

Thèse de Doctorat

Abir DAMMAK

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biotechnologies

Unité de recherche : Biopolymères, Interactions et Assemblages de l'INRA de Nantes

Soutenue le 27 Novembre 2014

Etude de la dégradation enzymatique de couches semi-réfléctives à base de biopolymères

JURY

Rapporteurs :	M. Gregory MOUILLE , Directeur de recherche, INRA, Versailles M. Julien BRAS , Maître de conférences, Institut National Polytechnique de Grenoble, Pagora
Examineurs :	M. Charles TELLIER , Professeur, Université de Nantes M. Bruno JEAN , Chargé de recherche, CERMAV, Grenoble Mme Gabrielle POTOCKI-VERONESE , Directeur de recherche, INRA, Toulouse
Directeur de Thèse :	M. Bernard CATHALA , Directeur de recherche, INRA, Nantes
Co-directeur de Thèse :	Mme Estelle BONNIN , Ingénieur de recherche, INRA, Nantes
Co-encadrant :	Mlle Céline MOREAU , Ingénieur de recherche, INRA, Nantes

Thèse de Doctorat

Abir DAMMAK

Etude de la dégradation enzymatique de couches semi-réfléctives à base de biopolymères

Study of The enzymatic degradation process
of biopolymer-based semi-reflective layers

Résumé

Les polysaccharides pariétaux (cellulose et hémicelluloses) peuvent être utilisés pour la production de bioéthanol. L'amélioration de la bio-raffinerie par hydrolyse enzymatique nécessite un effort constant pour la découverte d'enzymes performantes par des outils de criblage rapides, sensibles et robustes. L'objectif a été d'utiliser des films multicouches à base de biopolymères, comme substrats modèles d'assemblages de polysaccharides pariétaux. Nous avons élaboré deux types de films incluant des nanocristaux cellulose (CNC) combinés soit avec des xylanes cationiques (CX) soit avec des xyloglucanes (XG). La particularité de ces systèmes nanométriques est de provoquer l'apparition d'une couleur structurale. L'action d'une enzyme hydrolytique sur ces films peut être détectée par un changement de couleur lié à la diminution de l'épaisseur provoquée par l'hydrolyse. La pertinence de ces systèmes en tant que détecteurs visuels d'activité enzymatique a été validée avec une sensibilité équivalente (CNC-CX) ou meilleure (CNC-XG) que celle d'une méthode colorimétrique de référence. Des films (CNC-XG) avec architectures contrôlées ont été élaborés en jouant sur la concentration des CNC. L'étude de la structure interne de ces films par réflectivité des neutrons a montré que l'augmentation de la concentration induit une densification de l'adsorption des CNC. Les profils de dégradation obtenus en QCM-D et les pourcentages de perte de matière associés ont été comparés sur les films CNC3-XG et CNC5-XG. Un pourcentage de dégradation significatif a été obtenu dans les deux cas bien qu'il soit légèrement plus élevé pour les films CNC3 reflétant une accessibilité de chaînes de XG plus aisée.

Mots clés :

Nanocristaux de cellulose ; Xylanes cationiques ;
Xyloglucanes ; Films multicouches colorés ; Dégradation
enzymatique

Abstract

Cellulose and hemicelluloses are the major constituents of plant cell walls and can be used for the production of bioethanol. The improvement of the enzymatic biorefinery requires a constant search for efficient enzymes and requires rapid, sensitive and robust enzymatic screening tools. The objective was to use biopolymer-based multilayered films as substrate models of plant cell wall polysaccharide assemblies. Two types of films were developed that incorporated cellulose nanocrystals (CNC) combined with either cationic xylan (CX) or with xyloglucan (XG). The most outstanding feature of these nanoscale systems is that they give rise to a structural color. The hydrolytic action of an enzyme on these films may be detected by a change in color due to the decrease in film thickness following hydrolysis. The efficiency of these systems as visual enzymatic activity sensors was validated with a sensitivity that is equivalent to (for CNC-CX) or better than (for CNC-XG) a colorimetric reference method. CNC-XG films with controlled architectures were developed by varying the concentration of CNC. The study of the internal structure of these films by neutron reflectivity showed that the increase in CNC concentration results in the densification of CNC adsorption. The degradation profiles obtained by QCM-D and the associated percentages of matter loss were compared between CNC5-XG and CNC3-XG films. A significant degradation percentage was obtained in both cases although it is slightly higher for CNC3 films, probably due to the greater accessibility of XG chains.

Key Words:

Cellulose nanocrystals ; Cationic xylans ; Xyloglucans ;
Coloured multilayered thin films ; Enzymatic degradation

Remerciements...

Aux membres de jury de cette thèse : Monsieur Charles Tellier pour avoir accepté de présider le jury, Monsieur Julien Bras et Monsieur Grégory Mouille pour l'intérêt qu'ils ont porté et d'accepter être rapporteur de ce travail, Madame Gabrielle Potocki-Veronese et Monsieur Bruno Jean pour leur participation au jury et leur accompagnement au cours de ces trois ans, par l'intermédiaire de mon comité de thèse.

Au directeur de l'unité de recherche Biopolymères, Interactions, Assemblages du centre INRA Angers-Nantes, Jacques Guéguen et par la suite Marc Anton de m'y avoir accueilli.

A mon directeur de thèse Bernard Cathala qui, malgré ses nombreuses activités et son emploi du temps très chargé, a toujours su prendre le temps de m'écouter et de me transmettre ses précieux conseils et ses connaissances très approfondies.

A ma co-directrice de thèse Estelle Bonnin pour l'encadrement et le suivi ainsi que pour ses nombreux conseils pendant la rédaction.

A ma co-encadrante Céline Moreau pour l'encadrement et l'intérêt qu'elle a porté à mon travail. Je n'oublierai jamais les moments qu'elle m'a accordés pour discuter chaque fois pendant mes expériences ou au bureau pendant la rédaction. Je suis très ravie d'avoir travaillé à tes côtés.

A toute l'équipe nano : Nadège Beury pour son aide au quotidien et pour son implication importante dans la réussite de ce projet, Hervé Bizot pour ses conseils et nos discussions constructives, Joelle Davy pour sa bonne humeur, sa gentillesse et pour tous les petits services qu'elle m'a rendu durant ces trois ans et qui m'ont tant facilité la vie, Aiping Fang pour, nos nombreuses discussions scientifiques et autre, son amitié et son honnêteté, Isabelle Capron et Denis Renard pour leur gentillesse et la bonne compagnie pendant les congrès ACS et EPNOE, Fanch cherhal, mon collègue doctorant pour sa bonne humeur constante, pour ses nombreux coups de main et pour nos discussions des fois interminables surtout sur la thèse avec ses hauts et ses bas, Emilie Perrin pour sa belle compagnie au bureau surtout durant les derniers mois de la thèse, Firas Azzam et Ana Villares pour leur collaboration, leur conseils scientifiques toujours pertinents et pour leur joie de cœur, Mélanie Marquis, Marie Lebreton, Laetitia Couret, Dorra Saidane pour leur sympathie et pour nos rigolades pendant les moments de pause. A Dorra particulièrement pour son soutien et ses encouragements. Merci à Jane, Laurie et Christine pour le soutien logistique réalisé avec efficacité.

A tous les collègues de l'équipe MC2 pour les bons moments partagés au cours de ces trois années passées en leur compagnie à l'étage au labo, pendant les repas et les pauses.

A tous les membres de l'équipe PVPP de m'avoir bien accueilli dans leur laboratoire durant les expériences de dosages enzymatiques, de dosages des oses et de chromatographie.. Un merci particulièrement à Fanny, Alex, Merve, Richard, Séverine, Sayani, Nadia pour les bons moments qu'on a partagé ensemble.

A Bernard Quemener. Aucun mot n'est assez fort pour qualifier le respect et l'admiration que je ressens pour lui. Quel bonheur d'avoir travaillé à ses côtés pendant une période non négligeable de ma thèse. Il a largement contribué à ce travail tant par son aide durant les expériences de chromatographie, ses conseils ou par ses relectures toujours pertinentes et ses qualités humaines exceptionnelles. Etant toujours présent, à l'écoute, patient, il m'a souvent encouragé dans cette « aventure » qui a été pleine de beaux moments mais également de moments de doute forcément moins beaux ; tu m'as beaucoup appris et je n'oublierai jamais le jour où tu m'as dit que la réussite dans la science est conditionnée en bonne partie par la ténacité du chercheur face à tous les imprévus de la recherche ...

A Fabrice Cousin au labo LLB du CEA-Saclay pour son aide technique pendant les expériences de réflectivité des neutrons.

A Brigitte Bouchet et Camille Alavarado à la plate-forme BIBS pour leur aide durant les expériences en microscopie.

A Katrin Schwikal, Heiko Winter et Bodo Saake pour leur collaboration sur la partie concernant les films multicouches à base de xylane.

A Loua Gouider que j'ai eu le plaisir à l'encadrer et qui a accompli un travail de qualité.

Aux rencontres amicales nantaises associées à cette thèse : Amani, Hasan, Amel, Aiping, Gildas, Sarra, Dorra, Gisela, Ibtihel, Fatma, Azza, Ines, Raja... Merci d'avoir écouté mes états d'âmes associés à cette thèse! A la famille Quemener, Bernard, Cecile, Justin, je n'oublierai jamais les moments passés en votre belle compagnie...Merci encore à toi cher Bernard de m'avoir donné la chance de reprendre mon activité musicale en chantant dans le groupe Babel Canto, cela m'a permis de vivre de bons moments de loisirs en parallèle au boulot de la thèse et de vivre une belle expérience indéniable ..

A tous mes amis hors de Nantes notamment Nadia et Hanen. Un simple coup de fil de votre part a souvent constitué pour moi une source de réconfort durant ces années.

Aux joyaux de ma vie : Mes chers parents, cette thèse représente l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'ils m'ont prodigués tout au long de mes études. Malgré mon éloignement, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci Maman pour tout ce que tu as su m'apporter pendant toute ces années et pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui ... A Mon cher frère et ma chère sœur pour leur affection... Et à l'homme de ma vie, mon cher Aymen, pour son soutien sans faille, sa patience, ses attentions... Que ce modeste travail soit l'expression de ma profonde reconnaissance et sincère gratitude.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	I
LISTE DES TABLEAUX.....	II
LISTE DES FIGURES	IV
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I. ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS DE LA THESE.....	9
I. La paroi végétale	11
I.1. Composition de la paroi	11
I.1.1. Les polysaccharides pariétaux	11
a Les pectines.....	11
b Les hémicelluloses	12
c La cellulose	18
I.1.2. Autres polymères pariétaux	21
a Les protéines structurales.....	21
b Les lignines	22
I.2. La dynamique de la mise en place de la paroi végétale	22
I.3. Assemblage hémicelluloses/cellulose	24
I.3.1. Assemblage XG/cellulose	24
I.3.2. Assemblage xylandes/cellulose	31
I.4. Dégradation enzymatique de la cellulose, des xyloglucanes et des xylandes	35
I.4.1. Dégradation enzymatique de la cellulose.....	36
I.4.2. Dégradation enzymatique des xyloglucanes	38
I.4.3. Dégradation enzymatique des hétéroxylandes	40
I.4.4. Facteurs limitants la dégradation enzymatique	43
II. Films modèles de cellulose : construction, caractérisation et étude de la dégradation enzymatique	45
II.1. Cellulose et hémicelluloses comme briques élémentaires dédiées à la construction de films nanostructurés	46
II.1.1. Les nanocelluloses	46
a Les nanofibrilles de cellulose (NFC)	48
b Les nanocristaux de cellulose (CNC)	49
c La nanocellulose bactérienne (BNC)	49
II.1.2. Les xyloglucanes de tamarin	56
II.1.3. Les arabinoxylanes cationiques	56
II.2. Elaboration de films multicouches nanostructurés à base de cellulose par la technique couche par couche	58
II.2.1. Généralités : développement et intérêt de la technique couche par couche	58
a Principe	58
b Forces motrices.....	59
c Les principales techniques d'élaboration des films multicouches.....	60
II.2.2. Paramètres affectant l'épaisseur des films construits par « spin-coating »	61
a Cas de films de polymères	61
b Cas de suspensions colloïdales	63

II.2.3. Interactions mises en jeu dans les films multicouches à base de cellulose	64
a Construction de films multicouches à base de cellulose via des interactions électrostatiques .	64
b Construction de films multicouches à base de cellulose via des interactions non électrostatiques	69
II.2.4. Films multicouches à coloration structurale	70
II.3. Etude de la dégradation enzymatique des films modèles à base de cellulose	73
II.3.1. Type du mode d'injection : (continu ou en « batch »).....	77
II.3.2. Effet du type du film cellulosique	78
II.3.3. Effet du type d'enzymes utilisées : enzymes pures ou cocktails	79
III. Problématique et objectifs de la thèse	81

CHAPITRE II. PARTIE EXPERIMENTALE 84

I. Matériels pour la construction des films	86
I.1. Poly (hydrochlorure d'allylamine) (PAH)	86
I.2. Arabinoxylanes cationiques (CX)	86
I.3. Nano-cristaux de cellulose (CNC)	88
I.4. Xyloglucanes (XG)	93
I.5. Solutions utilisées pour la préparation des films	93
I.6. Supports solides	94
II. Enzymes pour la dégradation des films.....	95
II.1. Xylanase.....	95
II.2. Cellulyve ^{TR}	95
II.3. Xyloglucanase	96
III. Méthodes.....	96
III.1. Construction des films par la technique d'assemblage couche par couche assistée par « spin-coating »	96
III.2. Caractérisation des films	98
III.2.1. Profilométrie mécanique	98
III.2.2. Ellipsométrie spectroscopique	99
III.2.3. Caractérisation de la morphologie de surface des films CNC-CX par microscopie à force atomique (AFM)	102
III.2.4. Analyse de la structure interne des films par réflectivité des neutrons	104
III.3. Caractérisation de la dégradation enzymatique	111
III.3.1. Mesure d'activités enzymatiques par dosage d'extrémités réductrices	111
III.3.2. Détection d'activités enzymatiques à partir des films multicouches	113
III.3.3. Etude de la dégradation enzymatique par Microbalance à cristal de quartz avec dissipation (QCM-D)	114
III.4. Méthodes utilisées pour l'analyse des complexes CNC-XG.....	121
III.4.1. Isotherme d'adsorption	121
III.4.2. Analyse des produits de dégradation enzymatique des complexes CNC-XG par chromatographie haute performance d'échange d'anions (HPAEC)	123
III.4.3. Observation en MET des complexes (CNC-XG) avant et après immunomarquage des XG	125

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION	129
I. Elaboration de films multicouches à base des nanocristaux de cellulose et des xylanes cationiques : application à la détection enzymatique (article n° 1)	132
II. Modulation de la croissance et de l'architecture des films multicouches à base de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes (article n° 2)	148
III. Exploration de l'architecture et de la susceptibilité des assemblagesxyloglucanes-nanocristaux de cellulose à l'hydrolyse enzymatique, à différents régimes d'adsorption (article n° 3)	173
IV. Etudes préliminaires sur la dégradation enzymatique des films multicouches CNC-XG	205
IV.1. Dosage de l'activité enzymatique de la Cellulyve ^{TR} et de la xyloglucanase.....	206
IV.1.1. Mesure de l'activité de la Cellulyve ^{TR}	206
IV.1.2. Mesure de l'activité de la xyloglucanase	207
IV.2. Détermination de la sensibilité du test de détection visuelle	208
d'activités enzymatiques sur les films (CNC-XG)	208
IV.2.1. Détection visuelle de l'activité de la Cellulyve ^{TR}	210
IV.2.2. Détection visuelle de l'activité de la xyloglucanase	213
IV.3. Identification et quantification des oligomères issus de la dégradation enzymatique des films (CNC3-XG1) ₅ et (CNC5-XG1) ₅	215
IV.3.1. Quantification des oligomères issus de la dégradationdes films (CNC3-XG1) ₅ et (CNC5-XG1) ₅ .	215
IV.3.2. Distribution des oligomères au sein des chaînes de XG accessibles à l'hydrolyse enzymatique	217
IV.4. Suivi de la dégradation enzymatique des films CNC-XG en temps réel par QCM-D	219
IV.4.1. Suivi en QCM-D de l'état des films avant et après incubation avec la Cellulyve ^{TR}	222
IV.4.2. Suivi en QCM-D de l'état des films avant et après incubation avec la xyloglucanase	229
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	237
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	245

ABREVIATIONS

AFM: Microscopie à force atomique

BGL: β -glucosidase

CBM: Carbohydrate Binding Module

CBH: Cellobiohydrolases

CNC: nanocristaux de cellulose

CX: xylanes cationiques

DO: densité optique

DP: degré de polymérisation

DS: degré de substitution

EG: Endoglucanases

HPAEC: Chromatographie haute performance d'échange d'anions

MET: Microscopie électronique en transmission

PAH: poly (hydrochlorure d'allylamine)

PDDA: poly (diallyldiméthylammonium)

PEI: poly (éthylène imine)

QCM-D: Microbalance à cristal de quartz avec dissipation

XG: xyloglucanes

XGOs: xyloglucooligosaccharides

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les trois familles de matériaux de nano cellulose, leur principales sources et caractéristiques	47
Tableau 2. Exemples de longueurs (L) et de diamètres (d) de CNC de sources diverses obtenus via différentes techniques.....	53
Tableau 3. Composition des arabinoxylanes extraits de glumes de graines d'avoine .	87
Tableau 4. Nomenclatures et concentrations des solutions de polymères utilisés	94
Tableau 5. Résultats des essais préliminaires de construction des films (CNC-CX1) et (CNC-CX2).....	142
Tableau 6. Concentrations surfaciques de XG dans les films (CNC3-XG1) ₅ et (CNC5-XG1) ₅ spincoatés sur le support de Silicium avant et après hydrolyse par la xyloglucanase et moyennes de pourcentages de chaînes de XG hydrolysées sur trois répétitions	216
Tableau 7. Changement en fréquences des films secs préparés pour la dégradation à la Cellulyve ^{Tr} avant hydrolyse et détermination des concentrations surfaciques correspondantes.	223
Tableau 8. Etape d'hydratation des films préparés pour la dégradation à la Cellulyve ^{TR} : Estimation du contenu en eau et du pourcentage d'hydratation des films que du facteur de gonflement FG.....	224
Tableau 9. Changements en fréquence et en dissipation des films lors de l'hydrolyse par la Cellulyve ^{TR}	228
Tableau 10. Changement en fréquence des films préparés pour la dégradation à la xyloglucanase avant hydrolyse et détermination des masses surfaciques sèches correspondantes	230
Tableau 11. Etape d'hydratation des films préparés pour la dégradation à la xyloglucanase.	231

Tableau 12. <i>Changement en fréquence et en dissipation des films lors de l'étape d'hydrolyse par la xyloglucanase.</i>	233
---	-----

Tableau 13. <i>Comparaison des pourcentages de dégradation des films CNC3 et CNC5 par la Cellulyve^{TR} et la xyloglucanase</i>	242
--	-----

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure générale des xylanes.....	15
Figure 2. Structure du xyloglucane de tamarin	16
Figure 3. Oligomères constitutifs des XG de tamarin ou xyloglucooligosaccharides (XGOs).	17
Figure 4. Structure de la cellulose et de l'assemblage des chaînes à différentes échelles	18
Figure 5. Variabilité de taille et de morphologie des microfibrilles en fonction de l'origine de la cellulose	19
Figure 6. Ultrastructure d'une microfibrille de cellulose selon une coupe longitudinale.....	20
Figure 7. Représentation schématique des mailles élémentaires des celluloses Ia et Ib	21
Figure 8. La paroi primaire des cellules végétales.	23
Figure 9. La paroi secondaire des cellules végétales	24
Figure 10. Illustration schématique du réseau XG–cellulose de la paroi primaire des cellules végétales	26
Figure 11. Modèle révisé de l'architecture du réseau XG-Cellulose au sein de la paroi primaire	27
Figure 12. Conformations « vrillée » et en « ruban plat » des XG	30
Figure 13. Modèle de l'arrangement de cellulose, xylanes et lignines dans la paroi secondaire des plantes.	32
Figure 14. Mécanismes d'agrégation des xylanes en solution et leur interaction avec la surface de la cellulose	34

Figure 15. Représentation schématique simplifiée de l'hydrolyse enzymatique d'une microfibrille de cellulose.....	37
Figure 16. La dégradation de xyloglucanes de masse moléculaire importante en monosaccharides.	39
Figure 17. Dégradation enzymatique des hétéroxylanes. Ac, groupement acétyle ; Araf, L-arabinofuranosidase ; MeGlcA, 4-O-methyl-D-acide glucuronique ; Xyl, D-xylose ; Fe, acide férulique (Saha, 2000)	41
Figure 18. Images MET de la NFC (1), de la CNC (2) et Image en microscopie électronique à balayage de la BNC (3)	48
Figure 19. Hydrolyse acide des β -(1→4)-glucanes	50
Figure 20. Obtention de nanocristaux de cellulose par hydrolyse acide	51
Figure 21. a) Suspension de CNC issus de linters de coton, obtenue par hydrolyse à l'acide sulfurique et observée en MET après coloration négative. Les CNC sont déposés sur un film de carbone. b) Suspension de CNC de coton obtenue par hydrolyse à l'acide sulfurique et observée en cryo-MET.....	55
Figure 22. Réaction de cationisation de l'arabinoxylane avec le chlorure de 2,3 époxypopyltriméthylammonium (EPTA).....	57
Figure 23. Construction de films multicouches de polyélectrolytes cationiques (en vert) et anioniques (en bleu) sur une surface chargée négativement (schématisée par le rectangle jaune).....	59
Figure 24. Etapes successives du « spin-coating ».....	61
Figure 25. Relation entre l'épaisseur du film, la vitesse angulaire et la concentration (Cn) dans le procédé de « spin-coating ». Les mêmes relations s'appliquent également pour la viscosité des solutions	62
Figure 26. Effet de la force ionique sur le processus d'adsorption des CNC (bâtonnets gris) sur une chaîne de PAH (traits noirs) après séchage des couches.	66
Figure 27. Schéma représentant le phénomène d'interférence lié au dépôt d'un film sur une surface réfléchissante.	71
Figure 28. Principe d'interférence entre deux ondes lumineuses	72

Figure 29. Couleurs d'interférences de films de MFC/PEI en fonction du nombre de couches. Les chiffres indiquent le nombre de couches.....	73
Figure 30. Un profil de QCM-D typique de la dégradation enzymatique de films de cellulose. (1)+ (2) Phase d'adsorption + initiation de la phase de dégradation enzymatique (3) la phase de dégradation enzymatique (4) la fin du processus de dégradation	75
Figure 31. Formule de l'unité répétitive de PAH	86
Figure 32. Structure chimique des xylanes cationiques (CX) obtenus après réaction avec l'EPTA.....	87
Figure 33. Montage expérimental utilisé pour la préparation de CNC par hydrolyse acide de linters de coton.....	89
Figure 34. Cristal de quartz revêtu d'or utilisé pour des mesures en QCM-D	95
Figure 35. Principe de la construction des films par la technique « couche par couche » assistée par « spin-coating ».....	96
Figure 36. Le spin-coater utilisé (INRA-BIA)	97
Figure 37. Schéma de fonctionnement d'un profilomètre muni d'un système inductif.....	98
Figure 38. Profilomètre mécanique Dektak 8, Veeco(Bruker-Nano)(Arizona, TUCSON) de l'Institut des Matériaux de Nantes (IMN)	99
Figure 39. Ellipsomètre spectroscopique M2000U Woollam (Lincoln, USA)	100
Figure 40. Les étapes d'acquisition de signal et simulations des données ellipsométriques selon le modèle Cauchy	102
Figure 41. Schéma du principe du microscope à force atomique	103
Figure 42. Réflexion d'un faisceau de neutrons sur une surface plane.....	107
Figure 43. Principe de fonctionnement du spectromètre EROS du Laboratoire Léon Brillouin (LLB), du CEA (Saclay, France)	109
Figure 44. Schéma récapitulatif du principe de la mesure de réflectivité des neutrons sur les films multicouches (CNC-XG) avec soit le CNCh, soit le CNCd.	111
Figure 45. (A) Variation de l'amplitude de la fréquence de résonance suite à une excitation au bord d'un cristal de quartz nu. (B) Variation de l'amplitude de la fréquence de résonance suite à une excitation au bord d'un cristal possédant une masse sur sa surface .	115

Figure 46. Appareil de QCM-D E4 AUTO de la marque QSense (Q-Sense AB, Göteborg, Suède).....	117
Figure 47. Étapes de l'étude de la dégradation enzymatique des films par QCM-D en mode statique « ouvert »	118
Figure 48. Différents paramètres QCM-D, déterminés à chaque étape de l'expérience.	120
Figure 49. Schéma illustrant la détermination d'un point d'un isotherme d'adsorption	122
Figure 50. Variation de la fréquence ($n=3$) et de la dissipation en fonction de temps lors de l'injection en flux continu ($100\mu\text{l min}^{-1}$) de la xylanase ($d= 1/400$) sur un film $(\text{CNC-CX3})_4$	144
Figure 51. Variation de la fréquence ($n=3$) et de la dissipation en fonction de temps lors de l'injection en flux continu ($100\mu\text{l min}^{-1}$) de la xylanase ($d= 1/200$) sur un film $(\text{CNC-CX3})_4$ préalablement incubé avec la xylanase ($d=1/400$)	146
Figure 52. Couleur des films $(\text{CNC-XG})_n$ en fonction du nombre de bicouches et selon la concentration de CNC utilisée (3 ou 5 g l^{-1}).	208
Figure 53. Schéma illustrant les étapes du test de la dégradation enzymatique des films multicouches (CNC-XG) pour la détection visuelle de l'activité enzymatique.	209
Figure 54. Test visuel de l'activité enzymatique de la Cellulyve ^{TR} après 10 min à 20 °C sur différents films $(\text{CN3-XG1})_n$ et $(\text{CN5-XG1})_n$	210
Figure 55. Test visuel de l'activité enzymatique de la xyloglucanase GH74 après 10 min à 20°C sur différents films $(\text{CN3-XG1})_n$ et $(\text{CN5-XG1})_n$ avec $n = 4, 6$ ou 8 bicouches	213
Figure 56. Distribution normalisée des XGOs en fonction du type de film CNC-XG ou de XG1 seuls.....	218
Figure 57. Profil QCM-D typique obtenu lors de la dégradation enzymatique des films (CNC-XG) . Changement en fréquence ($\Delta f_3/3$, en bleu) et en dissipation (ΔD_3 , en rouge) en fonction du temps	220
Figure 58. Variation de fréquences ($\Delta F_3/3$, bleu) et de dissipation ($\Delta D_3 \times 10^{-6}$, rouge) pour les films $(\text{CNC5-XG1})_2$ et les films $(\text{CNC3-XG1})_2$ traités avec la Cellulyve ^{TR} ($0.17.10^{-2}$ nkat mL^{-1}).	226

Figure 59. Variation de fréquences ($\Delta F_3/3$, bleu) et de dissipation ($\Delta D_3 \times 10^{-6}$, rouge) pour les films (CNC5-XG1)₂ et les films (CNC3-XG1)₂ traités par la xyloglucanase (6.10^{-2} nkat mL⁻¹). 232

INTRODUCTION GENERALE

Les fluctuations importantes du prix des produits issus de ressources pétrolières et la prise de conscience collective du caractère 'non infini' des énergies fossiles ont fortement stimulé le développement de nouvelles alternatives de remplacement de ces ressources qui pourraient répondre à un double enjeu : économique (indépendance énergétique) et environnemental (réduction des gaz à effet de serre).

Le recours, dans ce cadre, au secteur des biotechnologies industrielles ou « biotechnologies blanches » s'avère une solution prometteuse. En effet, il s'agit d'un domaine qui met en œuvre des procédés enzymatiques et/ou de fermentation pour la fabrication, la transformation ou la dégradation de molécules ou de bio-systèmes entre autres la biomasse, et ceci dans un but industriel. Les biotechnologies blanches représentent une alternative aux procédés chimiques classiques. Elles sont respectueuses de l'environnement, et d'ores et déjà, utilisées dans de nombreuses filières industrielles telles que : l'agro-alimentaire (arôme par exemple), l'énergie (bioéthanol par exemple), les matériaux (synthèse de l'acide polylactique par exemple) ou l'industrie chimique (lessives par exemple). En 2008, le marché mondial des produits issus des biotechnologies était de 48 milliards d'euros (3,5 % des ventes mondiales de produits chimiques). En 2012, ce chiffre s'élevait à 135 milliards d'euros (7,7 %) et il est supposé atteindre jusqu'à 340 milliards d'euros (15,4%) en 2017. (Source : organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), 2009, Outlook on industrial biotechnology).

La lignocellulose est le principal constituant des parois des cellules végétales et offre la ressource la plus abondante de la biomasse végétale. En moyenne, elle est constituée de 40-60% de cellulose, 20-40% d'hémicelluloses et 10-25% de lignines (Bledzki and Gassan, 1999). On estime que la quantité de biomasse synthétisée chaque année est de l'ordre de 300 milliards de tonnes (Rinaudo and Joseleau, 2008). La biomasse lignocellulosique est parmi les candidats de choix pour la production d'énergie. En effet, l'hydrolyse enzymatique de ses polysaccharides constitutifs (cellulose et hémicelluloses) en monosaccharides fermentescibles aboutit à la production des biocarburants dits de deuxième génération.

La consommation mondiale de biocarburants a atteint 58,8 millions de tonnes équivalent pétrole (Mtep) en 2011 (41,6 Mtep de bioéthanol et 17,2 Mtep de biodiesel), soit 3,1 % de la consommation mondiale des transports routiers.

Bien que cette stratégie soit prometteuse, le défi consiste à surmonter les contraintes, souvent liées à la variété structurale des polysaccharides de la paroi végétale et à la résistance de certains d'entre eux à la dégradation enzymatique. L'enjeu majeur des biotechnologies blanches est d'exploiter de nouveaux biocatalyseurs (enzymes ou microorganismes) avec de nouvelles propriétés et/ou des propriétés améliorées afin d'optimiser le processus de transformation et répondre aux exigences industrielles. De tels catalyseurs doivent en premier lieu être identifiés grâce à des stratégies haut-débit de recherche d'activités enzymatiques.

L'exploration de la diversité microbienne par le biais de la métagénomique fonctionnelle, de même que les techniques d'évolution dirigée d'enzymes visant leur optimisation pour une propriété donnée (stabilité, efficacité...) nécessite le criblage robotisé de banques de clones de très grandes tailles, au minimum de plusieurs milliers de clones. De cette problématique émerge la nécessité de développer des nouveaux systèmes de détection d'activités enzymatiques très efficaces. L'objectif est d'améliorer les tests utilisés dans le cadre des technologies de criblage haut-débit, de manière à les rendre plus simples et plus rapides, tout en garantissant leur pertinence.

L'essor récent de nanotechnologies permet de répondre à ces nouveaux enjeux à la fois par des ruptures scientifiques liées à l'échelle nanométrique et des techniques de miniaturisation. De ce fait, le développement de dispositifs nanométriques et miniaturisés pourrait être une perspective prometteuse pour répondre aux exigences des biotechnologies blanches. Ceci est lié notamment à leur utilisation comme capteurs enzymatiques adaptés à leur intégration ultérieure dans des tests de criblage haut-débit.

Dans ce contexte, un système innovant de détection d'activités enzymatiques a été mis au point par l'INRA (Cerclier and Cathala, 2010; Cerclier, et al., 2010; Cerclier, et al., 2011). Cette méthode repose sur l'utilisation de nano-films multicouhes de biopolymères générant une couleur structurale. Cette couleur apparaît en raison d'un phénomène interférentiel intrinsèquement lié aux dimensions nanométriques des couches de biopolymères déposées sur un support réfléchissant.

La dégradation de la couche et le changement de couleur associé permettent de détecter visuellement de façon très sensible des activités enzymatiques hydrolytiques des biopolymères constituant le dépôt. Du fait des faibles dimensions de la couche, la sensibilité du test est significativement améliorée par rapport aux méthodes classiquement utilisées pour détecter des activités enzymatiques.

C'est dans ce cadre d'étude que mes travaux de thèse s'inscrivent, plus précisément dans le développement de films nanométriques, multicouches à base de cellulose et d'hémicelluloses de la paroi végétale, en allant de l'élaboration et la caractérisation de leur architecture jusqu'à leur utilisation comme biocapteurs pour l'étude d'activités enzymatiques. Les enzymes ciblées sont les enzymes de dégradation des polysaccharides pariétaux (cellulose et hémicelluloses). D'un point de vue cognitif, l'objectif de la thèse a été d'approfondir la compréhension des phénomènes mis en jeu lors de la dégradation enzymatique de biomolécules en milieu dense et hétérogène en utilisant des couches semi-réfléctives, qui sont en premier lieu construites et caractérisées, comme substrats modélisant les assemblages de la paroi végétale. Du point de vue applicatif, le but a été de valider la pertinence du test en termes de sensibilité, d'efficacité en comparaison avec un test classique.

Le premier chapitre de ce mémoire de thèse commence par l'état de l'art sur la paroi végétale, sa composition en polymères, et les caractéristiques majeurs de ses assemblages constitutifs, notamment xyloglucanes/cellulose et xylanes/cellulose qui font l'objet de cette étude. Ensuite, des informations de base sur les enzymes impliquées dans la dégradation de ces polymères sont développées. Enfin, un état de l'art sur les films modèles de cellulose est présenté: leur construction, leur caractérisation et l'étude de leur dégradation enzymatique. A l'issue de cette partie, la problématique et les objectifs du travail de la thèse sont annoncés de façon détaillée.

Dans un deuxième chapitre, les protocoles expérimentaux et les techniques de caractérisation employées sont décrits.

Les résultats obtenus sont exposés et discutés dans le troisième chapitre. Ce chapitre est divisé en quatre parties regroupant trois articles scientifiques et un rapport sur une étude préliminaire.

Le premier article est consacré à l'étude de l'architecture des films multicouches à base de nanocristaux de cellulose (CNC) et d'arabinoxylanes cationiques (CX) et à l'évaluation de leur efficacité pour la détection de l'activité de xylanases.

Le deuxième article concerne l'étude de films multicouches alternant des couches de CNC et des couches de xyloglucanes (XG). Dans ce travail, une étude détaillée a été réalisée sur la structure interne des films afin d'élucider l'effet de la variation de certains paramètres sur le contrôle et la modulation de l'architecture de ces films.

Le troisième article est centré sur la compréhension de l'architecture et la susceptibilité à la dégradation enzymatique des complexes XG/CNC à différents ratios de concentrations. Cette étude cherche à approfondir la compréhension du phénomène d'adsorption des XG sur la surface des CNC en suspension afin de pouvoir élucider le lien entre la dégradation enzymatique des films modèles et l'architecture des complexes xyloglucanes-nanocristaux de cellulose.

La quatrième partie des résultats rapporte des éléments préliminaires de l'étude de la dégradation enzymatique des films multicouches CNC-XG.

Le mémoire se clôture par une conclusion générale qui présente une synthèse globale des résultats obtenus et des perspectives afin de donner quelques suggestions pour la suite de ce travail de thèse.

Outre les publications présentées dans ce mémoire, ce travail a donné lieu à des communications dans des congrès scientifiques :

- Plant and Seaweed Polysaccharides Workshop (PSP 2012), July, 17-20, 2012. Nantes, France.

Detection of xylanase activity using semi-reflective films from layer-by-layer of plant polysaccharides. A. Dammak, C. Moreau, N. Beury, K. Schwikal, H. Winter, E. Bonnin and B. Cathala (Poster).

- The XIIIth Cell Wall Meeting. July, 7-12, 2013. Nantes, France.

Biomimetic thin films model of plant cell wall for enzymatic hydrolysis studies. A. Dammak, C. Moreau, N. Beury, L. Gouider, F. Cousin, B. Jean, F. Azzam, E. Bonnin and B. Cathala (Poster).

- International Soft Matter Conference. September, 15-19, 2013. Rome, Italy.

Controlled architecture and composition of self-assembly of cellulosic films. C. Moreau, A. Dammak, N. Beury, L. Gouider, F. Cousin, B. Jean, E. Bonnin and B. Cathala (Poster).

- International Polysaccharide conference (EPNOE 2013). October, 21-24, 2013. Nice, France.

Thin films based on cell wall plant polysaccharides: controlled architecture and application to enzymatic hydrolysis studies. A. Dammak, C. Moreau, N. Beury, L. Gouider, F. Cousin, B. Jean, E. Bonnin and B. Cathala (Poster).

- 247th ACS National Meeting & Exposition. March, 16-20, 2014. Dallas, Texas. Chemistry & Materials for Energy.

Structurally colored nanometric thin films composed of plant cell wall polymers for enzymatic activities detection. A. Dammak, C. Moreau, E. Bonnin, L. Gouider, N. Beury and B. Cathala (Communication orale).

CHAPITRE I. ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS DE LA THESE

I. La paroi végétale

La paroi végétale est une structure solide et continue qui entoure toute cellule végétale (Albersheim, et al., 2010; Buchanan, et al., 2000).

Selon l'âge de la cellule, on distingue deux grands types de paroi : la paroi primaire et la paroi secondaire. La première caractérise toute cellule jeune, la deuxième est caractéristique des cellules différenciées.

La paroi végétale est un matériau composite issu de l'assemblage de différents polymères de structures complexes. Elle est hétérogène et variable dans l'espace et le temps.

I.1. Composition de la paroi

I.1.1. Les polysaccharides pariétaux

Les polymères majoritaires de la paroi végétale sont les polysaccharides (les pectines, les hémicelluloses, la cellulose) auxquels s'ajoutent des lignines, des protéines structurales et des enzymes.

a Les pectines

Les pectines ont été isolées la première fois par Henri Braconnot en 1825, comme la molécule responsable de la gélification. Elle fut nommée pectine, du grec *pēktós* (« épais, caillé »). L'étude a permis de constater qu'il ne s'agissait pas d'une seule molécule mais d'un groupement de substances présentant une grande hétérogénéité. Ces pectines sont des polysaccharides acides complexes présents dans la plupart des végétaux supérieurs. Les pectines constituent jusqu'à 35% des parois primaires chez les dicotylédones et les monocotylédones non graminées (Mohnen, 2008).

Il s'agit d'un mélange de polysaccharides hétérogènes, branchés et chargés car riches en acide α -D-galacturonique plus ou moins estérifié par du méthanol. Ils contiennent également du L-rhamnose, L-arabinose et D-galactose.

Les pectines sont considérées comme un polymère multibloc dont les blocs constitutifs sont les homogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes de type I et les rhamnogalacturonanes de type II (Caffall and Mohnen, 2009; Mohnen, 2008).

b Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent 15 à 40% de la matière végétale. Elles sont définies comme des polymères amorphes, constitués de pentoses ou d'hexoses neutres (xylose, arabinose, mannose, galactose, glucose) et d'acides uroniques (acide glucuronique et acide 4-*O*-méthyl glucuronique). La chaîne principale des hémicelluloses est souvent constituée par un seul monosaccharide sur lequel viennent se greffer d'autres oses. Les hémicelluloses sont classées en quatre grands groupes (Scheller and Ulvskov, 2010):

- Les (1→4) (1→3)- β -glucanes
 - Les mannanes
 - Les xylanes
 - Les xyloglucanes
-
- Les (1→4) (1→3)- β -glucanes

Ces glucanes se trouvent principalement dans les parois primaires des graminées. Les chaînes sont constituées principalement d'une répétition d'un motif de base de 3 ou 4 glucoses liés en β -(1→4) et séparés par des liaisons β -(1→3). Ils contiennent en moyenne 30% de liaisons β -(1→3) et 70 % de β -(1→4) et ne sont pas ramifiés.

- Les mannanes

Ces hémicelluloses sont surtout présentes dans les parois de gymnospermes. Les mannanes regroupent les galactomannanes, les glucomannanes et les galactoglucomannanes. La chaîne principale est constituée d'unités mannose et glucose liées en β -(1→4). Cette chaîne principale est souvent ramifiée par des unités de galactose. Ces hémicelluloses sont souvent partiellement acétylées.

- Les xylanes

Les xylanes sont les polysaccharides pariétaux majoritaires après la cellulose de la paroi secondaire car ils représentent entre 25 et 35 % de la biomasse sèche des tissus ligneux des dicotylédones et des tissus lignifiés des monocotylédones. Ils peuvent constituer jusqu'à 50% de certains tissus de graines de céréales (Ebringerova and Heinze, 2000).

Les xylanes sont formés d'une chaîne principale dont les résidus D-xylopyranosyles sont liés par des liaisons β -(1→4). Ces résidus peuvent être ramifiés par de courtes chaînes osidiques. La variabilité structurale des xylanes dépend du tissu et de l'espèce considérée. Elle se manifeste par le degré et la nature des ramifications qui peuvent apparaître sur les C2 et C3 des unités xyloses (Ebringerova and Heinze, 2000), tels que des résidus de L-arabinofuranose ou plus rarement de L-arabinopyranose, liés en α -(1→3). D'autres substituants sont l'acide glucuronique et son dérivé 4-O-méthyle. Ils sont liés en α -(1→2) sur la chaîne principale. Enfin, certaines unités xylose portent des groupements acétyles en positions 2 et 3.

Sur la base de la présence ou l'absence de substitution, les xylanes sont classés en homoxylanes et hétéroxylanes. Les homoxylanes consistent une chaîne de résidus de xylose liés par des liaisons β -(1→4) et qui sont relativement rares chez les plantes supérieures mais existent dans le bois, et constituent une partie importante de la structure de la paroi cellulaire des algues (Painter, 1983).

Les hétéroxylanes, en revanche, sont présents dans les plantes supérieures incluant les arabinoxylanes, les glucuronoxylanes, les glucuronoarabinoxylanes. La variation de leurs

proportions dépend de l'espèce et de l'origine variétale. Ainsi, il n'existe pas une structure standard représentative des xylanes mais les différentes possibilités de variations structurales peuvent être schématisés comme cela est présenté à la **figure 1** (Dodd and Cann, 2009).

- Les arabinoxylanes

Les arabinoxylanes sont les hémicelluloses majeures des graminées. Ils sont présents dans de nombreuses céréales telles que le blé, le seigle, l'orge, l'avoine, le riz, le maïs et le sorgho, ainsi que dans d'autres plantes monocotylédones (Fincher and Stone, 1986; Ishii, 1991). La chaîne principale 1-4 xylose des arabinoxylanes est distinguée par la présence de branchement de α -L-arabinofuranose en position O-2 et/ou O-3 et peut être, soit monosubstituée, soit di-substituée. Chez les monocotylédones, les résidus d'arabinose des arabinoxylanes sont parfois estérifiés en position O-5 par des acides phénoliques comme l'acide férulique qui pourrait former des liaisons covalentes avec les lignines (Grabber, 2005) ou avec d'autres acides féruliques sur d'autres chaînes d'arabinoxylanes (Antoine, et al., 2003; Dervilly-Pinel, et al., 2001).

- Les glucuronoxylanes

Les glucuronoxylanes constituent les principales hémicelluloses dans la paroi secondaire des plantes dicotylédones. Leur chaîne principale de xylose est substituée par une liaison α -(1→2) d'acide α -D-glucuronique, qui peut être etherifié sous forme d'acide 4-O-méthylglucuronique (Baeza and Freer, 2000). Les 4-O-méthyl-glucuronoxylanes représentent plus de 90% de la composante hémicellulosique des bois durs et des plantes herbacées de zone tempérée (Ebringerova and Heinze, 2000).

- Les glucurunoarabinoxylanes

Les glucurunoarabinoxylanes sont typiquement rencontrés dans la lignocellulose isolée des graminées. Les glucurunoarabinoxylanes sont à la fois substitués par des résidus d'acide 4-O-méthyl glucuronique et par α -L-arabinofuranose en position C2 et C3, respectivement et peuvent être également substitués en faible proportion par des groupements acétyles (Dodd and Cann, 2009).

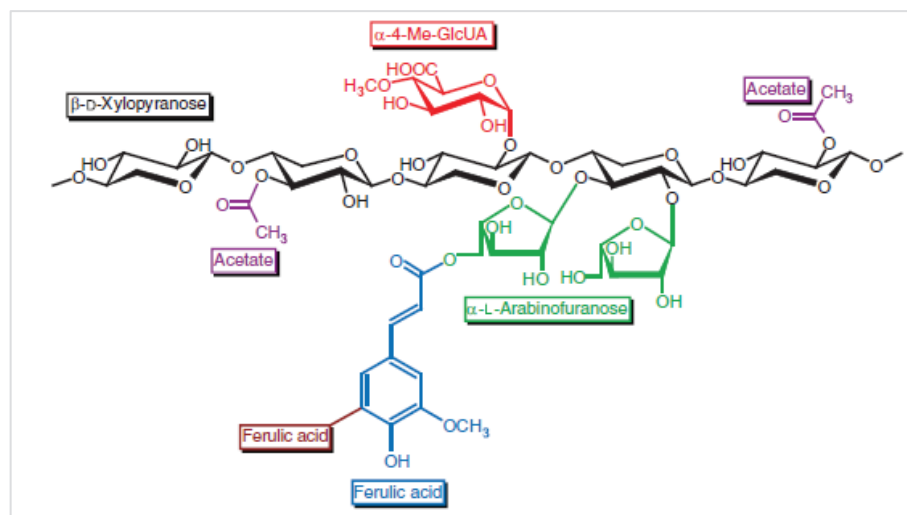


Figure 1. Structure générale des xylanes révélant les différents types de substitutions qui pourraient être identifiés dans une variété de xylanes extraits de la paroi cellulaire d'une plante (Dodd and Cann, 2009)

La distinction entre les arabinoxylanes et les glucuronoarabinoxylanes reste cependant floue et il existe toujours une ambiguïté entre les deux appellations. En effet, les hétéroxylanes dans les graminées sont souvent appelés arabinoxylanes bien qu'ils soient plus riches en acide glucuronique et en acide 4-*O*-méthyl-glucuronique que les arabinoxylanes d'endosperme de céréales. Il vaudrait donc mieux les appeler glucuronoarabinoxylanes (Scheller and Ulvskov, 2010).

- Les xyloglucanes

Les xyloglucanes (XG) constituent la famille la plus importante des hémicelluloses de la paroi primaire de dicotylédones où ils représentent 10 à 30% de la masse sèche des parois cellulaires (Fry, 1988).

Il s'agit d'hétéropolysaccharides constitués d'un squelette de β -(1→4)-D-glucose dont environ 75% peuvent être substitués en α -(1→6) par des résidus D-xylose. Les XG présentent une structure conservée, basée sur la répétition de motifs constitués de 7 à 10 monomères (figure 2).

Le motif répétitif des XG se compose plus précisément de 4 résidus glucose, dont trois sont substitués en α -(1 $\rightarrow$ 6) par des résidus xylose, pouvant eux-mêmes être substitués par certains résidus (Vincken, et al., 1997).

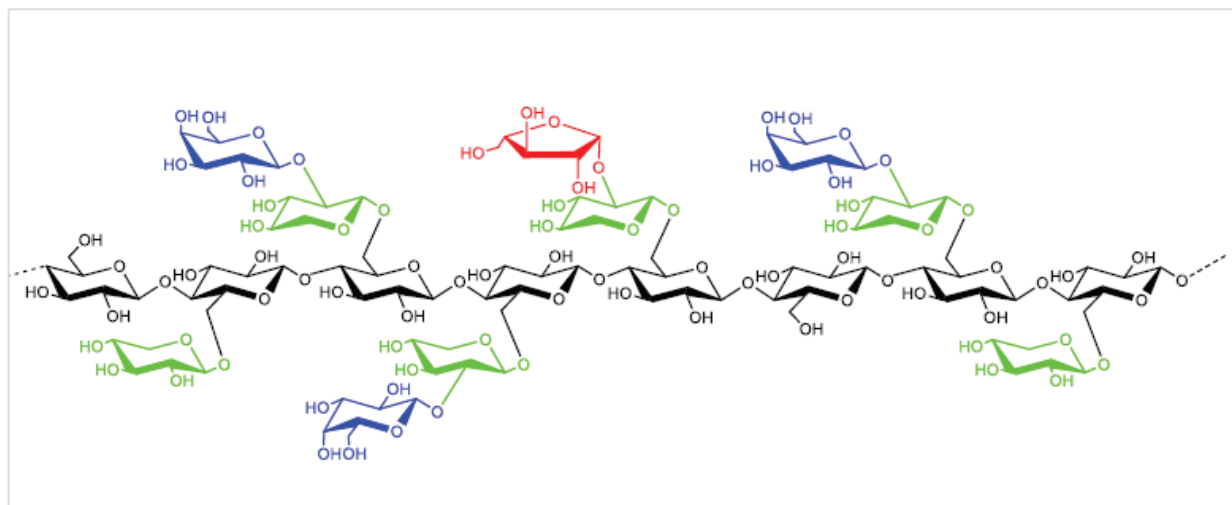


Figure 2. Structure du xyloglucane de tamarin, composé d'une chaîne principale de résidus glucose (noir) dont environ 75% sont substitués par des groupements xylose (vert). La moitié des substituants xylose porte des résidus galactose (bleu) et rarement, des résidus arabinose (rouge) (Eronen, et al., 2011)

Afin de simplifier la dénomination des chaînes latérales des XG, Fry, et al. (1993) ont proposé une nomenclature simple basée sur un code à lettres permettant de préciser la nature des substituants.

Ainsi, la lettre « X » représente une unité glucose substituée en position 6 par une unité xylose, la lettre « G » représente une unité glucose non ramifiée, la lettre « L » représente une unité glucose substituée en position 6 par une unité xylose, elle-même substituée en position 2 par une unité galactose, et la lettre « F » représente le bloc « X » substituée en position 2 du galactose par une unité fucose (**figure 3**).

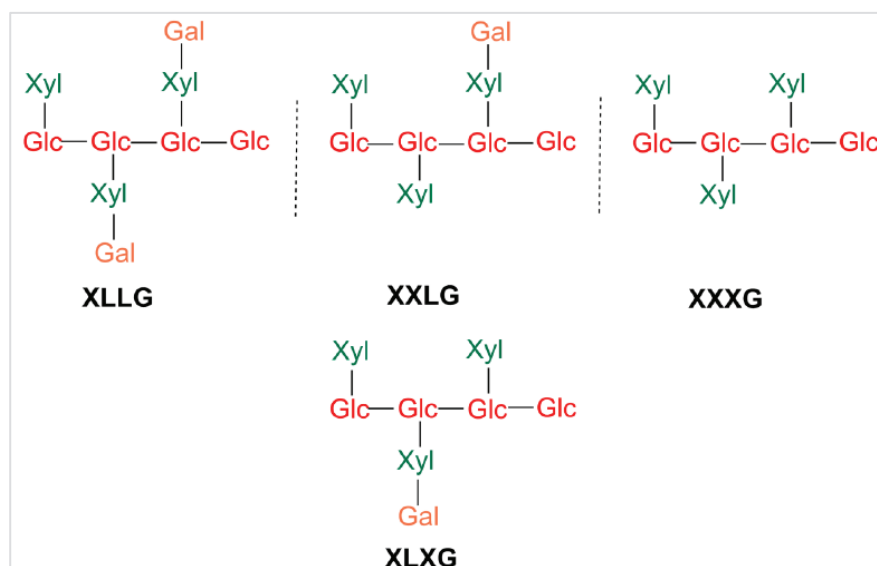


Figure 3. Oligomères constitutifs des XG de tamarin ou xyloglucooligosaccharides (XGOs). La nomenclature utilisée est celle de Fry, et al. (1993)

Les sources des XGs sont variées à savoir les graines de doussié (*Azizolium africana*), les graines de courbaril (*Hymenaea courbaril*), parois cellulaires de fruits (pomme, baie de raisin...), les coques de graine de colza, les fibres de coton, les graines de tamarin (*Tamarindus indica*) (Acebes, et al., 1993; Aspinall, et al., 1977; Doco, et al., 2003; Hayashi and Delmer, 1988; Hilz, et al., 2007; Ren, et al., 2004; Ren, et al., 2005; Soga, et al., 2007; Vierhuis, et al., 2001).

Il a été montré que le pourcentage de XG dans la paroi et leur structure, notamment la distribution des chaînes latérales, varie selon l'espèce de la plante et également selon le milieu dans lequel deux plantes de la même espèce ont évolué (Fry, 1989; Hayashi, 1989).

c La cellulose

La cellulose est le matériau le plus abondant sur la Terre, et est en grande partie responsable de la rigidité et de la stabilité structurale des parois cellulaires des plantes (Klemm, et al., 2005). La cellulose constitue jusqu'à 30% de la masse sèche de la paroi primaire, et beaucoup plus (40 à 90 %) de la masse sèche de la paroi secondaire (Pérez, 2000).

Comme présenté à la **figure 4** la cellulose est un homopolymère linéaire de résidus D-glucopyranose liés par des liaisons glycosidiques de type β -(1 $\rightarrow$ 4). L'unité répétitive de la cellulose est le dimère de glucose, le cellobiose.

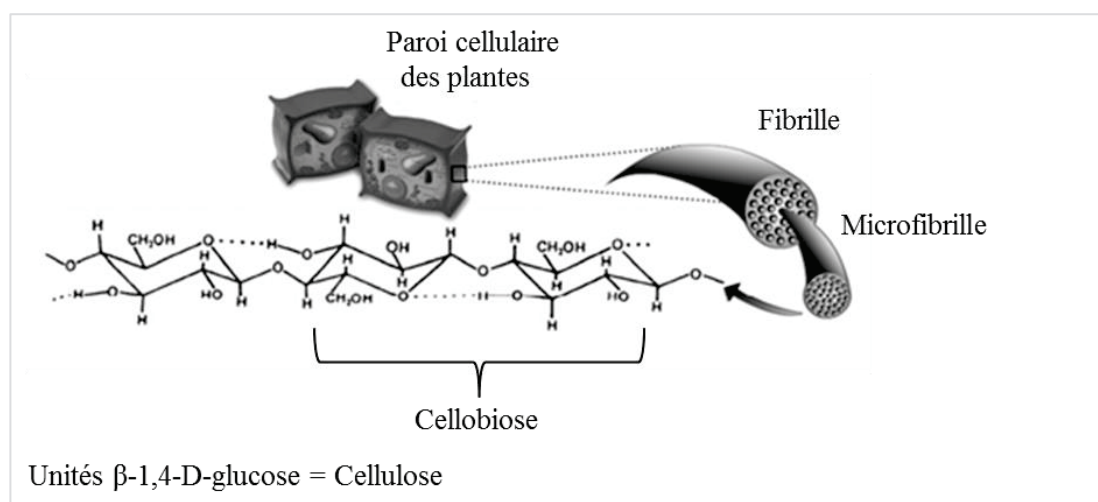


Figure 4. Structure de la cellulose et de l'assemblage des chaînes à différentes échelles (microfibrilles et fibrilles)(d'aprèsCranston, et al., 2012)

La présence de six groupements hydroxyles par motif répétitif permet l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires qui stabilise chaque chaîne. L'existence de liaisons hydrogène intermoléculaires permet aux chaînes de β -glucanes de s'organiser pour former des microfibrilles.

Les microfibrilles présentent des formes et des dimensions variables suivant l'origine de la cellulose comme l'ont montré des observations par microscopie électronique en transmission (MET)(Chanzy, 1990). La longueur, de l'ordre du micromètre, est toujours nettement plus importante que la largeur. Cette dernière peut varier de 2-3 nm dans la paroi primaire des plantes à 60 nm chez certaines algues (**figure 5**).

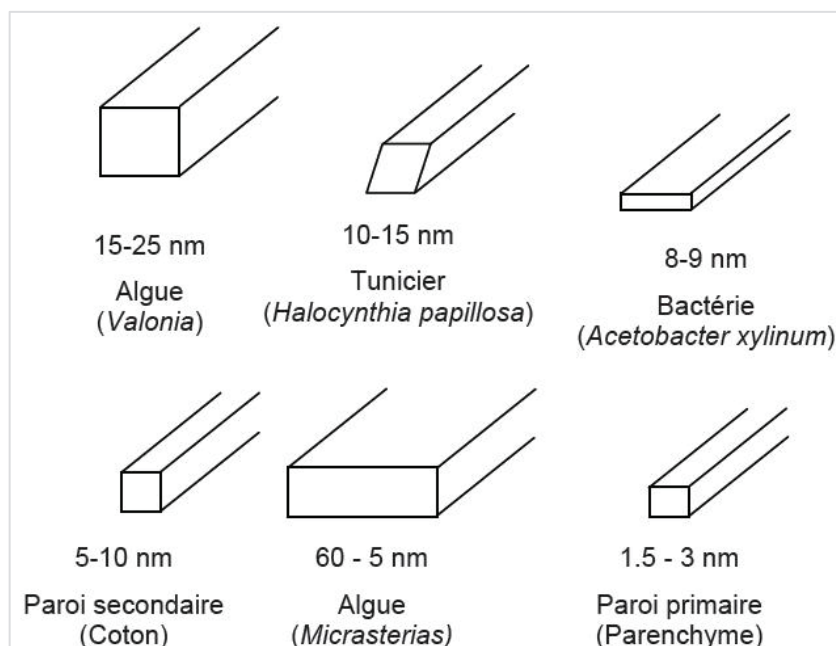


Figure 5. Variabilité de taille et de morphologie des microfibrilles en fonction de l'origine de la cellulose (d'après (Chanzy, 1990))

Les microfibrilles s'associent en plusieurs couches, selon une orientation bien définie pour donner des structures ordonnées de tailles plus importantes : les fibres.

La structure fibrillaire très condensée de la cellulose explique sa résistance aux dégradations physiques et chimiques ou enzymatiques, ainsi que son caractère insoluble dans l'eau. Le cœur d'une microfibrille de cellulose est très cristallin alors que les chaînes de surface constituent une zone paracristalline. Le long d'une microfibrille peuvent aussi exister divers types de défauts de structure (dislocations, torsions et contraintes ...). Ces zones de défauts, dites amorphes (**figure 6**), constituent avec les zones paracristallines des régions plus sensibles aux agents chimiques. La proportion relative de zones cristallines et amorphes

définit l'indice de cristallinité, qui varie en fonction de la source. Les degrés de polymérisation (DP, nombre d'unité glucose) et de cristallinité sont généralement plus élevés pour la cellulose de parois secondaires que pour celle de parois primaires.

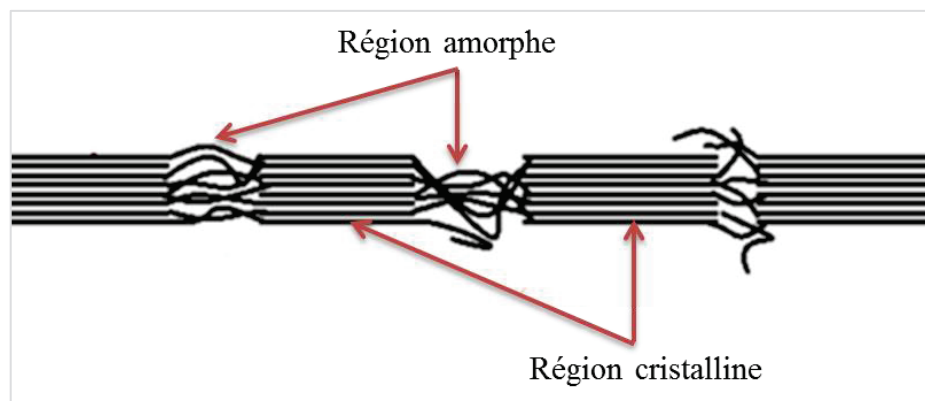


Figure 6. *Ultrastructure d'une microfibrille de cellulose selon une coupe longitudinale*

La cellulose native est présente sous forme de cellulose I. Ce type de cellulose est présent sous deux formes cristallines I α et I β , identifiées par RMN ^{13}C à l'état solide. Dans cette forme, les chaînes de cellulose sont parallèles les unes aux autres. L'allomorphe de type α est indexé par une maille triclinique à une chaîne et l'allomorphe de type β se caractérise par une maille monoclinique à deux chaînes (**figure 7**) (Atalla and Vanderhart, 1984; VanderHart and Atalla, 1984). La cellulose I α peut être transformée irréversiblement en I β par traitement alcalin à haute température (Sugiyama, et al., 1990).

Concernant la distribution des celluloses I α et I β dans la nature, l'allomorphe I α prédomine dans les celluloses provenant de bactéries et de plusieurs algues, tandis que l'allomorphe I β , le plus stable, se trouve majoritaire chez les végétaux supérieurs comme le bois ou le coton. Il est aussi le constituant unique de la cellulose de Tuniciér (Atalla and VanderHart, 1999; Debzi, et al., 1991; Kroon-Batenburg and Kroon, 1997; Sugiyama, et al., 1994).

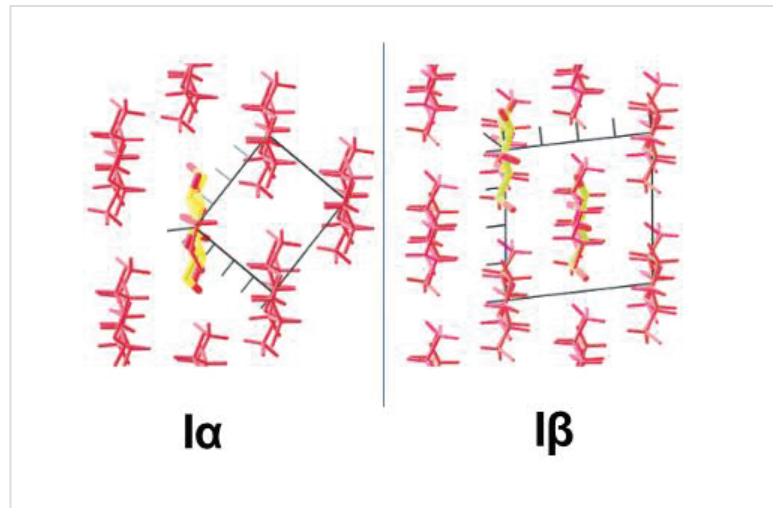


Figure 7. *Représentation schématique des mailles élémentaires des celluloses I α et I β*
(Nishiyama, et al., 2003)

I.I.2. Autres polymères pariétaux

a Les protéines structurales

Bien que la paroi soit très largement constituée de polysaccharides, des protéines structurales sont également présentes et assez impliquées dans la formation de réseaux dans la paroi. Il existe quatre grandes classes de protéines structurales à savoir, les protéines riches en hydroxyproline, les protéines riches en proline, les protéines riches en glycine et les arabinogalactanes-protéines (Showalter, 1993).

L'abondance des protéines structurales pariétales varie de manière considérable selon le type cellulaire, le stade de croissance, et les stimulations éventuelles. Par exemple, suite à un stress biotique chez la plante, l'expression des gènes codant pour la plupart de ces protéines augmente.

b Les lignines

Les lignines sont des polymères typiques des parois secondaires des plantes. Il s'agit de polymères phénoliques hétérogènes. Leur constitution chimique est variable selon l'espèce, les tissus et la localisation dans la paroi. Les unités de base de la lignine sont trois alcools aromatiques à savoir les alcools *p*-coumarylique, *p*-coniférylique, et *p*-sinapylique (Lewis and Yamamoto, 1990). Les lignines se présentent sous forme de maillage tridimensionnel, hydrophobe et très solide qui enveloppe les autres composés pariétaux.

I.2. La dynamique de la mise en place de la paroi végétale

La paroi végétale constitue un compartiment dynamique qui évolue tout au long de la vie cellulaire. La paroi primaire caractérise les cellules jeunes en division et en élongation, elle permet la croissance de la cellule. La paroi primaire est majoritairement composée de polysaccharides (cellulose, mais aussi de pectines et d'hémicelluloses) ainsi que de quelques protéines, minéraux et pigments. La paroi primaire est alors fine (de 0,03 à 1 μm), extensible, hydrophile et de faible densité, ce qui lui confère une résistance mécanique relativement faible. Entre les parois primaires de cellules voisines, il existe une interface appelée lamelle moyenne. Celle-ci assure la cohésion cellulaire (*figure 8*).

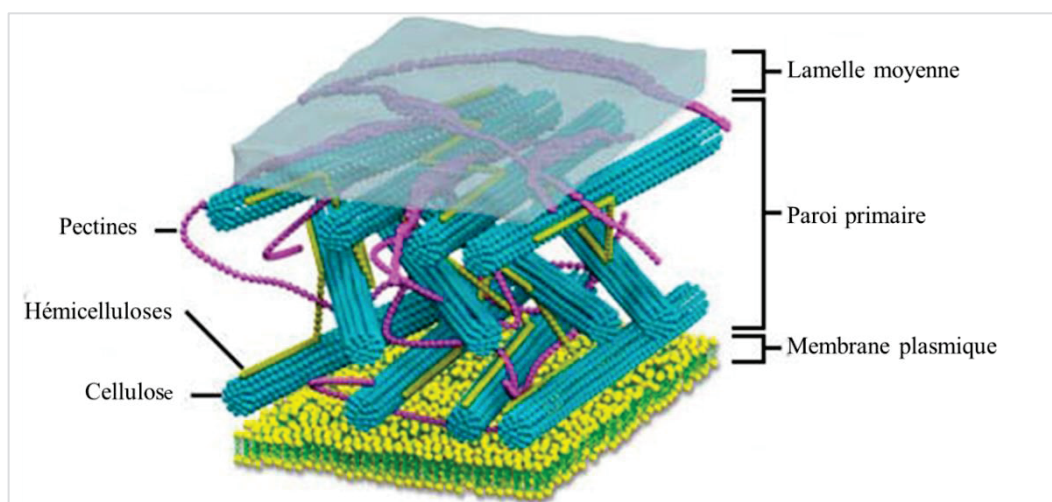


Figure 8. La paroi primaire des cellules végétales.
(<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>)

Une fois la croissance de la cellule terminée, la paroi primaire incorpore de nouveaux composés et se transforme alors en paroi secondaire. Ces composés incorporés correspondent notamment aux composés phénoliques dont les lignines.

La composition de la paroi secondaire varie en fonction de l'origine botanique, mais globalement elle contient 30 à 40% de cellulose, 30% de lignines, 30% d'hémicelluloses et environ 5% de pectines. La paroi secondarisée devient alors plus épaisse (jusqu'à 10 μm d'épaisseur), plus rigide et plus hydrophobe que la paroi primaire et présente un caractère inextensible ne permettant plus la croissance cellulaire. Elle est caractéristique des tissus conducteurs et de soutien.

La paroi secondaire est composée de trois couches distinctes appelées S1, S2 et S3, chacune composée de plusieurs plans de microfibrilles de cellulose (**figure 9**). A l'intérieur de ces plans, les microfibrilles sont disposées parallèlement. Dans chaque plan, les faisceaux de microfibrilles décrivent une hélice dont l'angle formé avec l'axe longitudinal de la cellule diffère d'une couche à l'autre. L'orientation différentielle des microfibrilles de cellulose au sein des couches sont responsables des propriétés mécaniques de la paroi.

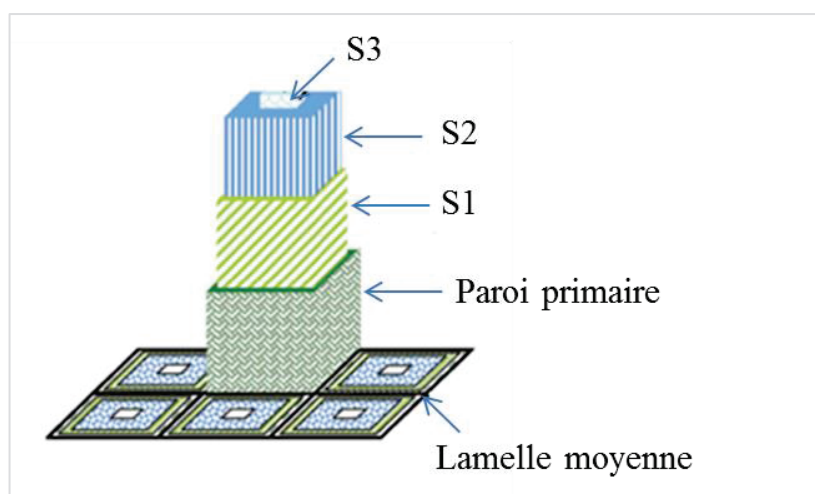


Figure 9. La paroi secondaire des cellules végétales (Klemm, et al., 1998; Krassig, 1993, Warwicker, et al., 1996)

I.3. Assemblage hémicelluloses/cellulose

I.3.1. Assemblage XG/cellulose

- Généralités

Les XG ont plusieurs rôles au sein des végétaux. Ils peuvent servir de substances de réserve et sont, dans ce cas, présents dans les graines des plantes et non fucosylés. C'est par exemple le cas des XG de *Tamarindus indica* (tamarin) (Carpita and McCann, 2000). Ils sont mobilisés pendant la germination comme réserve d'énergie avant que les jeunes plants ne soient photosynthétiquement autosuffisants. Par ailleurs, certains oligosaccharides peuvent, à très faibles concentrations, exercer des effets signalétiques dans les cellules végétales. Le xylogluco-oligosaccharide XXFG, par exemple, à une concentration d'environ 10^{-9} M, inhibe l'élongation de segments de tiges de pois induite par l'auxine de synthèse 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), hormone qui est responsable de la croissance cellulaire (York, et al., 1984).

Par ailleurs, à part leurs rôles physiologiques, les XG ont un rôle structural majeur dans les plantes et en particulier au sein de la paroi primaire des cellules, grâce à l'assemblage qu'ils forment avec la cellulose.

En effet, les XG interagissent avec les microfibrilles de cellulose via les liaisons hydrogène et les interactions polaires et de van der Waals (Hanus and Mazeau, 2006; Hayashi and Maclachlan, 1984; Lopez, et al., 2010; McCann and Roberts, 1994). De ce fait, les XG assurent la cohésion entre les microfibrilles de cellulose, limitent leur auto-association et leur octroient la souplesse nécessaire à leur mouvement. Ainsi, l'assemblage XG/cellulose joue un rôle clé dans la stabilité des parois (Hayashi, et al., 1987; Whitney, et al., 1999). La compréhension d'architecture des assemblages de XG/cellulose et les facteurs qui influencent la capacité d'adsorption de XG sur la cellulose est, à ce titre, importante.

La combinaison des résultats issus de différentes études menées *in vivo*, *in vitro* ou *in silico* a permis d'apporter des éléments de connaissance sur ce sujet.

- Les études d'assemblages XG/cellulose menées *in vivo*

Ces études consistent à élucider l'assemblage XG-cellulose au sein de la paroi des cellules végétales. Il peut s'agir d'observations directes des complexes XG/cellulose issus des parois primaires par des méthodes microscopiques. En effet, l'observation par microscopie électronique, le marquage avec le [³H]-fucose et l'utilisation de la microscopie de fluorescence au moyen d'une lectine à L-fucose fluorescente ont permis de démontrer que le XG est localisé à la surface ou entre les microfibrilles de cellulose (Hayashi and Maclachlan, 1984; Hayashi, et al., 1987; McCann, et al., 1990). Ceci pourrait correspondre aux deux premiers domaines d'assemblage de XG/cellulose parmi les trois qui ont pu être identifiés par Pauly, et al. (1999) à travers l'extraction séquentielle des parois cellulaires des tiges de pois étiolées (**figure 10**):

- un premier domaine de xyloglucanes qui inclue les chaînes de XG qui ne sont pas en interaction directe avec la cellulose à savoir, les ponts, les boucles et les queues situées entre les microfibrilles. L'extraction de ce domaine est possible par l'utilisation d'une xyloglucane-endoglucanase (XEG).

- un deuxième domaine, constitué de XG directement en interaction à la surface de la cellulose. Ce domaine est extractible par une solution alcaline concentrée (par exemple KOH, 24%) mais inaccessible aux xyloglucanases.

- un troisième domaine, piégé au cœur des microfibrilles de cellulose ou situé entre eux. Ce domaine ne peut être extrait de la paroi ni par l'utilisation d'une XEG ni par une solution alcaline mais uniquement à l'aide de cellulases qui dégraderaient en même temps les microfibrilles de cellulose.

L'existence de ce dernier domaine de XGn'est cependant pas totalement certaine car il est possible que sa présence soit liée au précédent traitement à la soude concentrée qui pourrait entraîner une mercerisation de la cellulose et le piégeage de certains XG au sein du réseau cellulosique nécessitant l'utilisation d'une cellulase pour leur extraction.

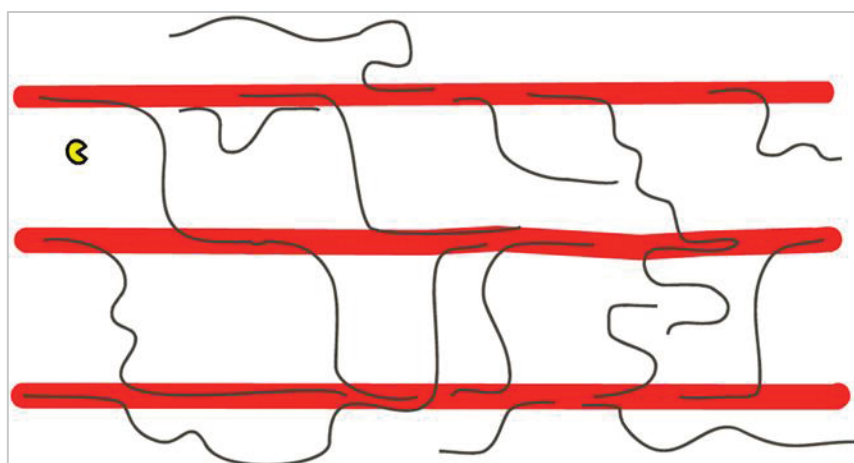


Figure 10. *Illustration schématique du réseau XG–cellulose de la paroi primaire des cellules végétales (Park and Cosgrove, 2012)*

Fujino, et al. (2000) ont réalisé des observations microscopiques couplées à des traitements chimiques ou enzymatiques par l'endo-(1→4)- β -glucanase dans la paroi primaire de pois et ont démontré la présence de chaînes de XG entre les microfibrilles de cellulose dans les régions où la croissance est achevée. Toutefois, les domaines caractéristiques de l'adsorption de XG sur la surface de cellulose n'ont pas pu être identifiés.

En complément à ces observations, Dick-Pérez, et al. (2011) ont supposé à partir des résultats d'études spectroscopiques, l'existence de certaines zones limitées de piégeage de XG au sein des microfibrilles plutôt qu'un recouvrement étendu sur toute la surface.

Récemment, Park and Cosgrove (2012) ont proposé une description améliorée du modèle d'assemblage XG/cellulose en utilisant différentes enzymes pour l'hydrolyse des domaines des XG et la détermination de leur localisation précise. A partir de leurs résultats, ils ont suggéré une nouvelle architecture dans laquelle une fraction mineure de XG agirait comme un adhésif entre les microfibrilles dans les petites zones où les microfibrilles sont suffisamment en contact. Les XG viendraient donc s'insérer en "sandwich" entre deux surfaces de microfibrille (**figure 11**).

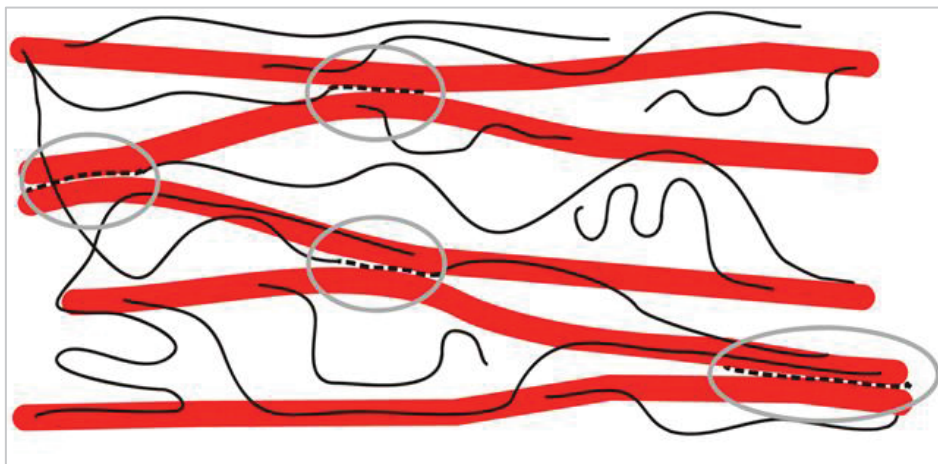


Figure 11. *Modèle révisé de l'architecture du réseau XG-Cellulose au sein de la paroi primaire (Park and Cosgrove, 2012)*

L'étude *in vivo* des parois cellulaires est donc un moyen efficace permettant d'analyser les phénomènes tels qu'ils se passent réellement au sein de la paroi de la plante et d'accéder aux différentes données à savoir la morphologie ou la localisation chimique.

Toutefois, afin d'accéder aux facteurs qui pourraient influencer l'adsorption de XG sur la cellulose, l'association de ces études aux approches de reconstruction *in vitro* est indispensable.

- Les études d'assemblages XG/cellulose menées *in vitro*

La reconstruction du complexe XG/cellulose consiste à assembler *in vitro* ces polysaccharides préalablement isolés de parois primaires. Cette approche a permis d'étudier l'adsorption des XG solubles sur une surface solide (cellulose). Afin d'exprimer la masse de XG adsorbée sur la surface de cellulose, des isothermes d'adsorption ont été établis. Des XG et de la cellulose de différentes origines ont été testés (Hayashi, et al., 1987; Hayashi, et al., 1994; Lima, et al., 2004; Vincken, et al., 1995).

Les recherches antérieures menées *in vitro* se sont focalisées notamment sur l'étude de la longueur de chaîne de XG comme facteur déterminant leur capacité d'assemblage sur la cellulose. Hayashi et ses collaborateurs ont montré qu'une augmentation de l'adsorption de XG de Tamarin sur la cellulose est observée en fonction du DP, entre 64-3000 résidus glucose sur leur chaîne principale (Hayashi, et al., 1994).

Vincken, et al. (1995) ont montré qu'entre 22 et 44 résidus glucose doivent être présents sur la chaîne principale de XG de tamarin pour permettre une adsorption optimale sur la surface de la cellulose microcristalline Avicel. Récemment, il a été montré que la capacité d'assemblage des XG sur la cellulose est améliorée avec l'augmentation de la masse moléculaire des XG et qu'un minimum de 12 résidus glucose dans la chaîne principale est nécessaire pour observer une adsorption significative. Par ailleurs, l'augmentation du nombre de résidus glucose non substitués favorise l'adsorption de XG sur la cellulose (Lopez, et al., 2010).

Les chaînes latérales de XG pourraient aussi influencer leur capacité d'adsorption à la cellulose bien que ces contributions ne soient pas à ce jour clairement établies. Cela étant, les travaux réalisés sur ce sujet ont d'ores et déjà permis d'apporter certaines informations.

de Lima and Buckeridge(2001) ont montré que le degré de galactosylation ainsi que la position de ces résidus a une influence sur la capacité d'adsorption. En effet les XG de tamarin adsorbés sur la cellulose microcristalline Avicel contient plus de motifs XXXG et XLXG mais moins de motifs XXLG et XLLG que les XGs natifs. Ce résultat semble cohérent avec l'hypothèse de Vincken, et al. (1995) selon laquelle la présence de résidus galactose serait un obstacle à la pénétration des XGOs dans les pores les plus petits de la cellulose. L'influence des résidus fucosyle, quant à elle, semble être très variable en fonction de l'origine du substrat cellulosique(Chambat, et al., 2005).

La nature des assemblages XG/cellulose pourrait également être influencée par l'état de cristallinité de la cellulose. Une adsorption plus importante de XGsur les celluloses peu cristallines telles que la cellulose de pois ou la cellulose amorphe a été observée comparativement aux celluloses plus cristallines comme la cellulose Avicel, la cellulose de coton ou la cellulose bactérienne (Hayashi, et al., 1987; Vincken, et al., 1995).

En complément des modèles *in vitro* étudiant principalement l'influence de la nature des XG et de la cellulose sur leurs associaions, des analyses *in silico* ont été effectuées afin d'apporter des informations d'ordre conformationnel et énergétique sur ces mécanismes d'interaction.

- Les études d'assemblage XG/cellulose menées *in silico*

Les études *in silico* mettent en œuvres des techniques de modélisation moléculaire qui permettent de simuler le comportement des molécules et de leur appliquer des conditions variées.

Les études récentes *in silico* ont montré que toute surface de cellulose I β est capable de fixer des oligomères de XG et aucune orientation particulière de la chaîne principale de XG par rapport à l'axe de microfibrilles de cellulose n'a été mise en évidence lors du processus d'adsorption (Hanus and Mazeau, 2006).

Des effets structuraux ont été cependant démontrés en fonction de la longueur des chaînes latérales. Plus les chaînes latérales des molécules de XG sont courtes (cas des XXXG), plus ils peuvent adapter leur conformation à la topologie de la microfibrille en modifiant leur conformation initiale « vrillée » en une conformation en « ruban plat » avec tous les résidues qui peuvent interagir avec la surface de la cellulose(**figure 12**). En revanche,

avec l'augmentation de la longueur de chaînes (cas de XXFG), les XGne sont plus en mesure d'adopter une conformation en « ruban plat » qui permette l'interaction de résidus avec la surface (Hanus and Mazeau, 2006).

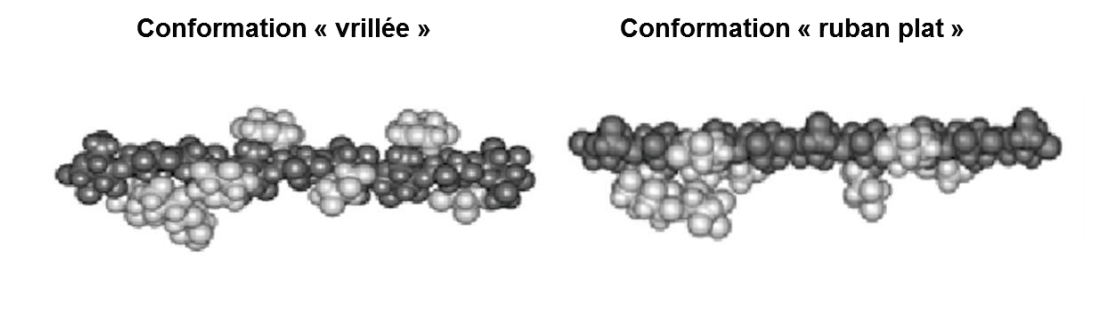


Figure 12. Conformations « vrillée » et en « ruban plat » des XG (Levy, et al. 1991)

La conformation « vrillée » serait celle des XG lorsqu'ils sont en solution, qui évoluerait ensuite vers une conformation en « ruban plat » lors des interactions avec la cellulose.

Chaîne principale en gris foncée, chaînes latérales en gris clair.

L'étude par modélisation moléculaire du rôle, direct ou indirect, des chaînes latérales des XG dans les interactions avec XG/cellulose apporte des résultats contradictoires. La présence de résidus fucosyles et donc nécessairement de chaînes latérales trisaccharidiques, a été, dans un premier temps, démontrée comme un facteur favorisant la conformation « ruban plat » des XG et donc facilitant leurs interactions avec la cellulose (Levy, et al., 1997). Cependant, les études menées par Hanus and Mazeau (2006) montrent par minimisation enthalpique que les trois XGOs : XXXG, XXLG, XXFG interagissent avec la cellulose et que la capacité d'interaction est sensiblement défavorisée par accroissement de la longueur de la chaîne latérale, contrairement aux conclusions précédentes.

Zhang, et al. (2011) ont étudié récemment les propriétés d'adsorption de trois XG, GXXXGXXXG, GXXLGXXXG et GXXFGXXXG, différant par la longueur et la composition des chaînes latérales, sur la surface de la cellulose dans un milieu aqueux.

La différence d'énergie d'interaction entre XG et la surface de cellulose en fonction du XG testé est négligeable. Ceci montre que la différence en un substituant n'a pas d'influence sur l'énergie d'adsorption.

L'utilisation complémentaire de ces trois approches, *in vivo*, *in vitro*, *in silico*, a permis d'acquérir un certain nombre de connaissances importantes sur la structure et les interactions de l'assemblage XG/cellulose présent dans la paroi. Cependant, beaucoup d'aspects sont également très importants à prendre en considération lors de ces études à savoir les différents domaines qui définissent l'assemblage de XG à la cellulose et notamment la proportion relative de chaque domaine d'adsorption. Cela est important pour la compréhension des propriétés du complexe XG-cellulose et la compréhension de ses fonctions.

I.3.2. Assemblage xylandes/cellulose

En comparaison aux xyloglucanes, les travaux portant sur l'interaction des xylandes avec la cellulose sont moins nombreux. Cependant, de fortes interactions ont été mises en évidence entre les xylandes et la cellulose. En effet, lors de l'assemblage de la paroi cellulaire, Taylor and Haigler (1993) ont mis en évidence la synthèse et le dépôt des xylandes à la surface de la cellulose.

Afin de simplifier l'étude de l'affinité xylane/cellulose et étudier la nature de leur interaction, des modèles ont été élaborés *in vitro* afin de maîtriser et isoler chaque facteur susceptible de jouer sur l'adsorption des molécules de xylane et la surface de la cellulose.

Reis and Vian (2004) ont associé des observations *in vivo* à des essais de réassociation *in vitro* de glucuronoxylanes/cellulose isolés pour étudier l'organisation hélicoïdale des parois secondaires et le rôle possible des glucuronoxylanes dans leur construction. L'observation en MET de la paroi secondaire à un stade précoce a révélé que les glucuronoxylanes jouent un rôle d'agents de rotation permettant l'agencement hélicoïdal des microfibrilles de celluloses.

La présence d'un recouvrement assez solide des microfibrilles de cellulose par les glucuronoxylanes a été détectée par l'immuno-marquage de l'acide glucuronique à la surface de cellulose. La reconstitution du complexe cellulose/glucuronoxylanes *in vitro* a démontré que les glucuronoxylanes ont également un rôle anti-floculant en empêchant la floculation de la cellulose lors de l'assemblage.

Dammström, et al. (2008) ont étudié les interactions entre cellulose et xylanes dans un système modèle qui consiste en un assemblage cellulose bactérienne/glucuronoxylanes de tremble (*Populus tremula*). Les résultats de mesures par analyse mécanique et spectroscopie dynamique FT-IR ont suggéré qu'il existe de fortes interactions entre la cellulose et ces xylanes. En se basant sur leurs résultats, les auteurs ont proposé un modèle de l'assemblage cellulose/xylane/lignine dans le bois feuillu, qui s'avère en cohérence avec celui proposé préalablement par Reis and Vian (2004). Le modèle montre deux fractions différentes de xylanes de tremble, une fraction associée à la cellulose et une fraction associée à la lignine (figure 13).

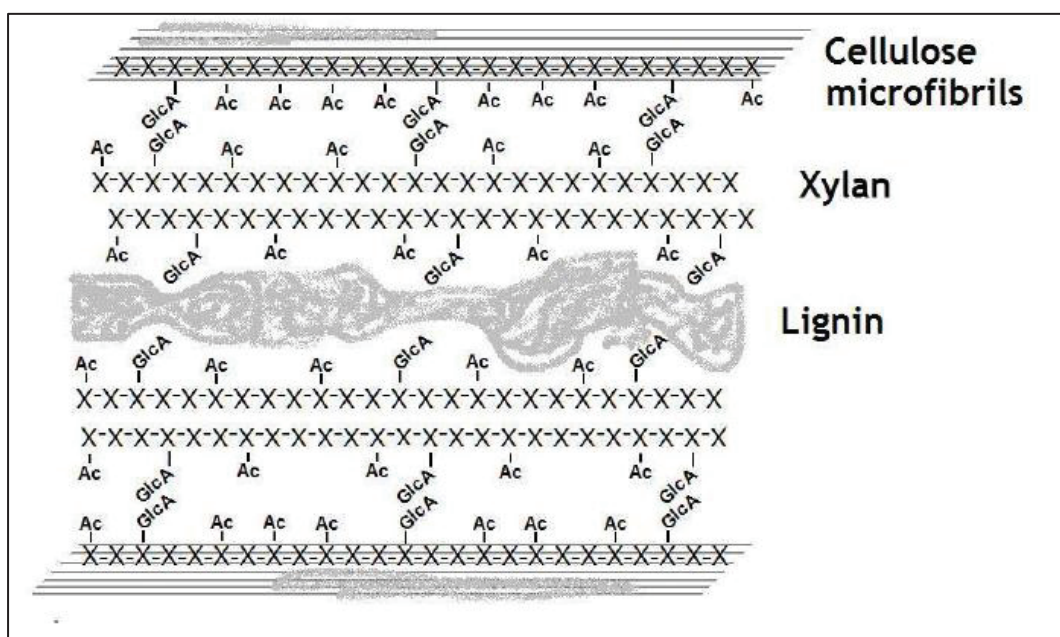


Figure 13. Modèle de l'arrangement de cellulose, xylanes et lignines dans la paroi secondaire des plantes. Les zones en gris représentent les lignines (Dammström, et al., 2008)

Winter, et al. (2006) ont montré que l'ajout d'arabinoxylanes plus ou moins purifiés, ayant donc des lignines résiduelles en plus ou moins grande quantité, au milieu de culture de *Gluconacetobacter xylinus*, favorise l'adsorption des arabinoxylanes sur la cellulose bactérienne. Cela suggère que les lignines et les arabinoxylanes pourraient avoir un effet synergique sur l'adsorption de ces derniers à la cellulose. La masse moléculaire semble également avoir un effet sur leur adsorption à la cellulose. En effet, dans la même étude, les auteurs ont montré que l'augmentation de la masse moléculaire des arabinoxylanes favorise l'adsorption des arabinoxylanes sur la cellulose bactérienne.

D'autre part, la solubilité des xylanes pourrait affecter leur adsorption à la cellulose. La solubilité des xylanes dépend de plusieurs facteurs tels que, la masse moléculaire, le degré de substitution et le type de substitutions présentes sur leur chaîne principale.

En traitant les molécules de xylanes à haute température (170°C) et à pH élevé (10), Linder, et al. (2003) ont obtenu des xylanes avec un taux plus faible en substituants 4-*O*-méthylesur l'acide glucuronique, chargés négativement. La diminution du taux de ces substituants par traitement thermique a contribué à la diminution des répulsions entre les chaînes et à leur agrégation. Une adsorption plus forte sur la cellulose bactérienne a été obtenue suggérant d'une part, que l'agrégation des molécules de xylanes favorise l'adsorption de ces derniers sur la surface de la cellulose et conforte, d'autre part l'idée que cette agrégation dépend du profil de substitution des xylanes. L'observation à la surface de la cellulose, de particules de xylanes de tailles nanométriques et de forme globulaires, à la suite d'un traitement thermique de courte durée, suggère que la structure de la surface est formée par l'adsorption d'agrégats de xylanes (*figure 14*).

L'agrégation des chaînes de xylanes met en jeu des liaisons hydrogène inter-chaînes entre les parties non substituées des chaînes linéaires et peut également être favorisée par des interactions hydrophobes dues à la présence de quelques acides phénoliques comme l'acide férulique qui sont liés par des liaisons covalentes aux lignines (Saake, et al., 2001).

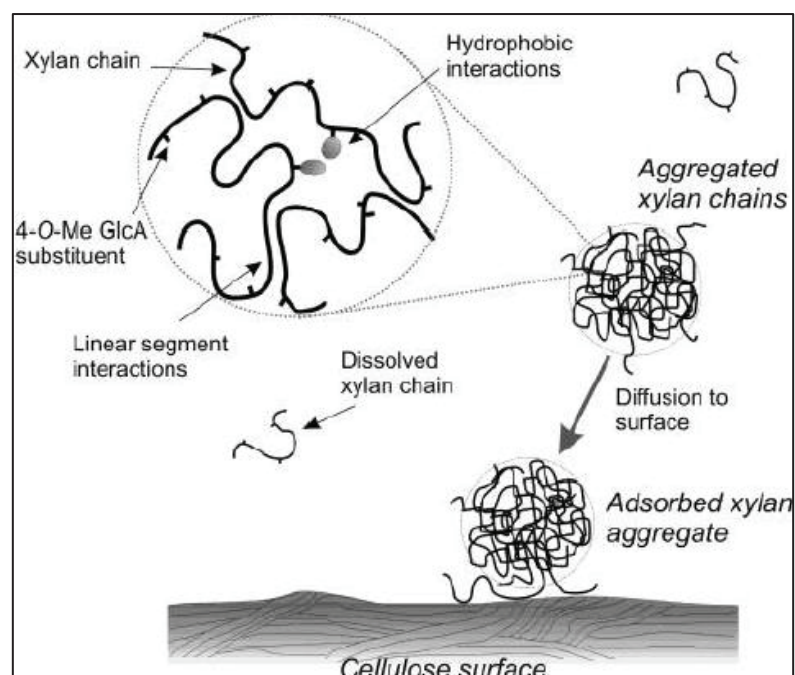


Figure 14. Mécanismes d'agrégation des xylandes en solution et leur interaction avec la surface de la cellulose (Linder, et al., 2003)

L'effet de la structure fine des xylandes sur leur adsorption à la surface de la cellulose a également été étudié par Kabel, et al. (2007) sur des assemblages modèles à base de xylandes/cellulose bactérienne. Les auteurs ont montré, en cohérence avec les travaux de Linder, et al. (2003), que les parties linéaires non substituées de la chaîne de xylane favorisent leur adsorption sur la surface de la cellulose. La présence de substituants arabinosyles et *O*-acétyles engendre une diminution considérable de l'adsorption des xylandes sur la surface de la cellulose.

Paananen, et al. (2004) ont utilisé l'AFM pour analyser les interactions entre les surfaces de cellulose dans des solutions de xylandes et ont constaté que la concentration en xylane affecte les forces entre deux surfaces de cellulose. Lorsque la concentration augmente de 10 à 100 mg L⁻¹, les xylandes s'adsorbent plus lentement et de manière irréversible sur la cellulose conduisant à une répulsion entre deux surfaces de cellulose en approche. L'adhésion entre les couches devient lente et semble être due à l'enchevêtrement des chaînes de polymères à des concentrations élevées.

L'étude des concentrations les plus élevées de xylanes par la microbalance à cristal de quartz avec dissipation (QCM-D) a mis en évidence l'adsorption lente d'une couche épaisse et hydratée sur les films de cellulose. Par la même technique, mais en utilisant des arabinoxylanes, Köhnke, et al. (2011) ont montré que cette adsorption était irréversible. De plus, les caractéristiques de l'adsorption ainsi que les propriétés de la couche de xylane adsorbée peuvent être contrôlées en fonction de la structure chimique des xylanes utilisés. En effet, une diminution du ratio arabinose/xylose conduit à une augmentation de la quantité de xylanes adsorbée sur la surface de cellulose microcristalline.

I.4. Dégradation enzymatique de la cellulose, des xyloglucanes et des xylanes

Les enzymes de dégradation des polysaccharides peuvent être classées selon différents critères. Actuellement, deux systèmes sont utilisés en parallèle pour classer ces enzymes, la classification selon la nomenclature EC (Enzyme Commission; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) et la nomenclature CAZy des enzymes actives sur les «carbohydrate» (<http://www.cazy.org>).

- La nomenclature EC

La nomenclature des enzymes selon le Comité de la nomenclature de l'Union internationale des Biochimie et Biologie Moléculaire (NC-IUBMB) a été créée en 1956 et a depuis lors fourni une classification systématique des enzymes selon la nature de la réaction qu'elle catalyse (Webb, 1992).

-Carbohydrate-Active enzymes : CAZy

La classification CAZy s'applique uniquement aux enzymes actives sur « les carbohydrates ». Les enzymes sont regroupées en familles en fonction de la similarité de leur séquence (Henrissat and Davies, 1997). En raison de cette similarité, certaines caractéristiques sont partagées au sein d'une même famille tels que la structure tridimensionnelle et les mécanismes catalytiques. Cependant la spécificité de substrat à l'intérieur d'une famille peut être assez diversifiée. Cette classification regroupe les glycosyle hydrolases, les glycosyl transférases, les polysaccharides lyases, les carbohydrate estérases et des enzymes auxiliaires comprenant principalement des polysaccharides oxydases (www.cazy.org).

Ce paragraphe est focalisé sur la description des enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides pariétaux préalablement décrits notamment la cellulose, les xyloglucanes et les xylanes qui font l'objet de cette étude.

I.4.1.Dégradation enzymatique de la cellulose

Aucune enzyme seule n'est capable de dégrader entièrement la cellulose et une hydrolyse complète nécessite l'action synergique de trois types d'enzymes regroupées sous le terme générique de cellulases(Lynd, et al., 2002)(*figure 15*).

Les endo-glucanases (EG) (EC 3.2.1.4) coupent d'une manière aléatoire les liaisons glucosidiques β 1-4 qui lient les unités glucose constitutives de la chaîne de cellulose. Ces enzymes agissent notamment dans les régions amorphes et très faiblement dans les régions cristallines (Mosier, et al., 1999). L'action de l'EG conduit à la libération d'oligosaccharides de différents DP (Lynd, et al., 2002). Les nouvelles extrémités de chaînes générées suite à l'action de l'EG deviennent des sites accessibles pour l'action des cellobiohydrolases(CBH). Ces dernières (EC 3.2.1.91 côté non réducteur, EC 3.2.1.176 côté réducteur) agissent de façon progressive sur les extrémités réductrices ou non des chaînes de cellulose libérant du cellobiose. Certaines d'entre elles attaquent les parties cristallines du substrat. A l'issue de leur action, le DP est faiblement affecté.

La β -glucosidase (BGL) (EC 3.2.1.21) hydrolyse le cellobiose et, dans une moindre mesure, les oligomères solubles de glucose de DP plus élevé. L'activité catalytique de la BGL est inversement proportionnelle au degré de polymérisation du substrat (Henrissat, 1994; Lynd, et al., 2002; Rabinovich, et al., 2002). Cette enzyme joue un rôle clé car elle permet de réduire l'inhibition des CBH et des EG par le cellobiose. Elle a donc le rôle majeur de régulateur de vitesse d'hydrolyse de la cellulose.

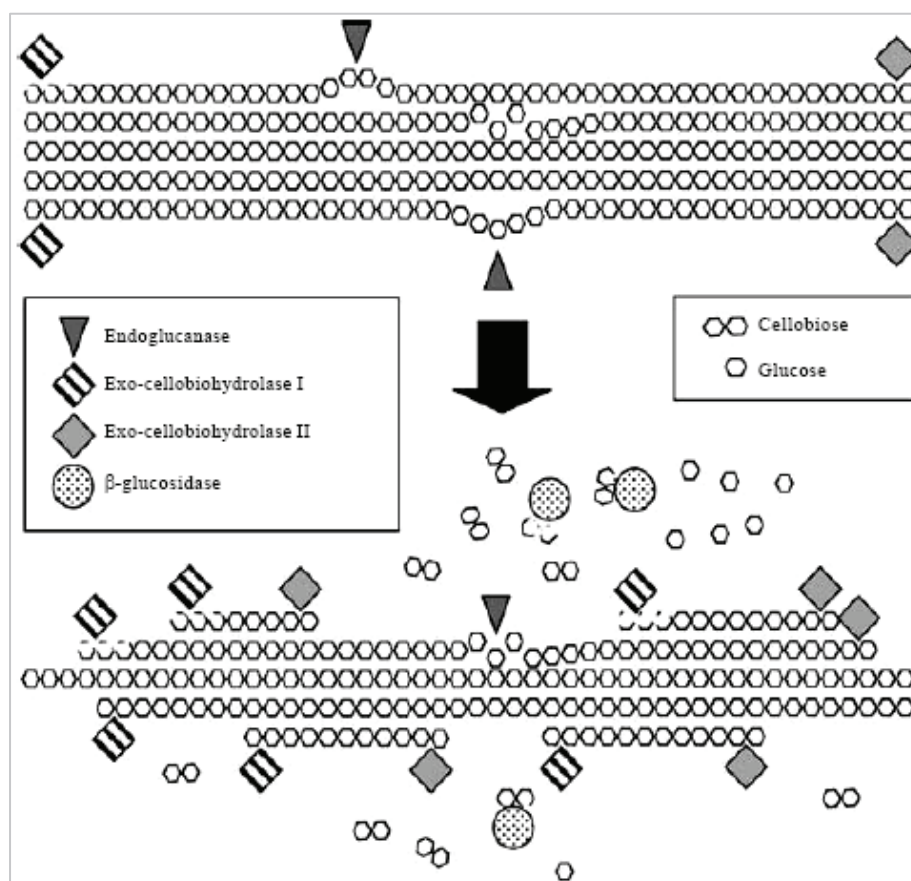


Figure 15. Représentation schématique simplifiée de l'hydrolyse enzymatique d'une microfibrille de cellulose. Les endoglucanases attaquent les régions amorphes dans la microstructure cristalline, créant ainsi de nouvelles zones accessibles à la dégradation par les cellobiohydrolases. Le cellobiose produit est hydrolysé par la β -glucosidase en monomères de glucose (Malherbe and Cloete, 2002)

Les enzymes de dégradation de la cellulose sont secrétées par de nombreux micro-organismes, champignons et bactéries (Enari, 1983). Parmi les microorganismes cellulolytiques, la souche *Trichoderma reesei*, découverte par Mandel et Reese (Mandels and Reese, 1957; Reese, et al., 1950) est reconnue pour sa capacité à produire une quantité importante d'enzymes cellulolytiques. Cependant, l'efficacité des cellulases secrétées par *T. reesei* est relativement limitée par la faible quantité de BGL présente dans son sécrétome (Herpoël-Gimbert, et al., 2008; Lynd, et al., 2002).

Cette limitation peut être levée en utilisant, soit une souche génétiquement modifiée de *T. reesei* surexprimant la BGL (Ayrinhac, et al., 2010), soit en supplémentant le cocktail enzymatique avec de la β -glucosidase sécrétée par un autre microorganisme.

Dans cette étude, nous avons utilisé un mélange cellulasique issu de cette souche pour la dégradation des films à base de cellulose et de xyloglucane.

I.4.2.Dégradation enzymatique des xyloglucanes

La structure chimique des xyloglucanes étant plus complexe que celle de la cellulose, leur dégradation nécessite également plusieurs enzymes (Minic and Jouanin, 2006).

Les enzymes impliquées dans la modification de la structure des xyloglucanes sont des EG spécifiques des xyloglucanes (les endo-xyloglucanases (EC 3.2.1.151), les β -D-galactosidases (EC 3.2.1.23), les α -L-fucosidases (EC 3.2.1.51/3.2.1.63), les α -D-xylosidases spécifique des oligosaccharides de xyloglucanes (EC 3.2.1.177) et les β -D-glucosidases (EC 3.2.1.21).

La dégradation des xyloglucanes commence par une attaque par les endo-xyloglucanases qui coupent au milieu de la chaîne de β -(1 $\rightarrow$ 4) glucopyrannoses. Ces enzymes sont classées en six familles GH5, 9, 12, 16 et 44 et la famille GH74 (<http://www.cazy.org/>). La plupart agissent par coupure des xyloglucanes après une unité glucosyle non substituée, G (Figure 16a).

La coupure en milieu de chaîne de β -(1 $\rightarrow$ 4) glucopyrannoses produit des XGOs (**figure 16 a**).

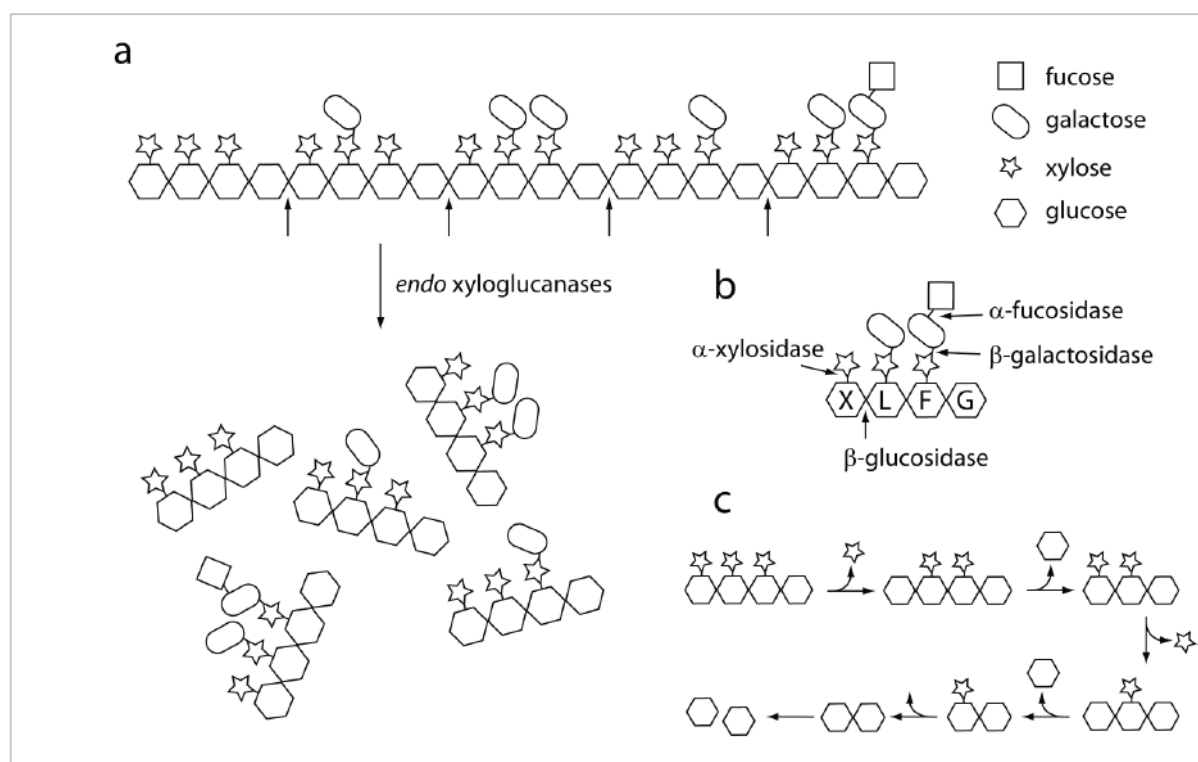


Figure 16. La dégradation de xyloglucanes de masse moléculaire importante en monosaccharides. *a* : La première étape dans la dégradation des xyloglucanes consiste en leur dépolymérisation en XGOs par les endo-xyloglucanases. *b* : des exo-enzymes agissent sur les chaînes latérales. *c* : la dégradation de XXXG en monosaccharides par l'action séquentielle des α -xylosidases and β -glucosidases est montrée telle qu'elle se déroule chez la plante *Arabidopsis* et les bactéries(Iglesias, et al., 2006; Johan, et al., 2011)

Après la coupure des chaînes du polymère de XG en oligomères XGOs, les exo-enzymes α -1,2-L-fucosidase (GH95, EC 3.2.1.51 et 3.2.1.63) et β -galactosidase (GH1, 2, 35, 42; EC 3.2.1.23) agissent sur les chaînes latérales des XGOs (**figure 16 b**) pour créer des XGOs « xylosylés » ne portant plus que du xylose (XXXG)(Iglesias, et al., 2006).

Ces oligosaccharides sont ensuite hydrolysés en monosaccharides en commençant par les extrémités non réductrices par l'action des α -xylosidases(GH31; EC 3.2.1.177) et β -glucosidases (GH1, 3, 5, 9, 30, 116; EC 3.2.1.21) (**figure 16c**)(Buckeridge, et al., 2000).

Selon les sources, d'autres exo-enzymes de débranchement peuvent être présentes comme des α -L-arabinofuranosidases par exemple (GH3, 10, 43, 51, 54 et 62; EC 3.2.1.55).

I.4.3.Dégradation enzymatique des hétéroxylanes

Etant donné la complexité et l'hétérogénéité structurale des xylanes, le système enzymatique exigé pour une dégradation enzymatique complète en monomères nécessite l'intervention de plusieurs types d'enzymes. Deux types d'activités enzymatiques sont nécessaires, une pour la dépolymérisation de la chaîne principale et une pour l'hydrolyse des chaînes latérales (Dodd and Cann, 2009).

Les activités de dépolymérisation comprennent les endo-1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8) qui génèrent des xylo-oligosaccharides substitués ou non, y compris le xylobiose et le xylotriose, et les β -xylosidases (EC 3.2.1.37) qui dégradent les xylo-oligosaccharides de DP courts à partir de leur extrémité non réductrice pour libérer du xylose (Biely, 1985; Coughlan and Hazlewood, 1993). La coupure enzymatique des chaînes latérales nécessite l'action de plusieurs activités enzymatiques accessoires incluant les α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), les féruloyl estérases (EC 3.1.1.73), les α -glucuronidases (EC 3.2.1.131 et 3.2.1.139), et les acétyl xylaneestérases (EC 3.1.1.72) (*figure 17*).

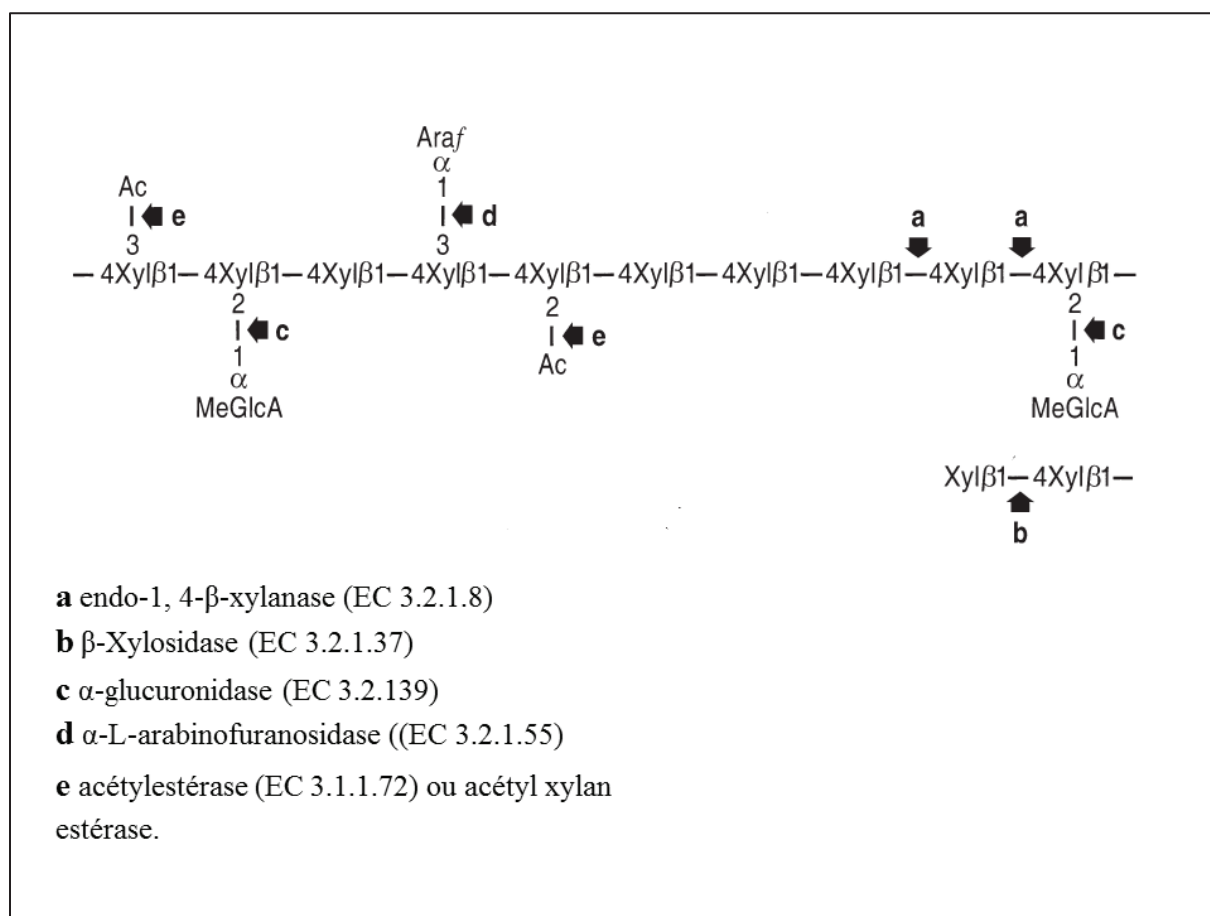


Figure 17. Dégradation enzymatique des hétéroxylanes. Ac, groupement acétyle ; Araf, L-arabinofuranosidase ; MeGlcA, 4-O-methyl-D-acide glucuronique ; Xyl, D-xylose ; Fe, acide férulique (Saha, 2000)

- Les endo-1,4-β-xylanases

Les endo-(1→4)-β-xylanases, (1→4-β-D-xylanxylohydrolase, EC 3.2.1.8), dépolymérisent le xylane par hydrolyse aléatoire des liaisons glycosidiques entre les résidus xylose sur la chaîne principale, générant ainsi de courtes chaînes de xylooligomères. La longueur de chaîne nécessaire à l'action dépolymérase dépend de la famille des endo-xylanases utilisées, mais dépasse généralement huit unités (Coughlan and Hazlewood, 1993).

Les xylanases sont classés dans les familles GH 5, 7, 8, 10, 11, 43 et 51 sur la base de leur séquence en acides aminés, leurs structures 3D et les mécanismes de catalyse impliqués (Cantarel, et al., 2009). Parmi ces familles les xylanases GH11 et GH10 sont les plus étudiées (Dodd and Cann, 2009).

- Les β -xylosidases

La (1 $\rightarrow$ 4)- β -xylosidase (1 $\rightarrow$ 4- β -D xylan xylohydrolase, EC 3.2.1.37) hydrolyse des courtes chaînes de xylo-oligomères en xylose. L'action de la β -xylosidase se fait à partir des extrémités non réductrices des xylo-oligomères. L'affinité de ces enzymes augmente avec la diminution du DP de ces derniers (Coughlan and Hazlewood, 1993). En conséquence, les β -xylosidases ne présentent aucune activité sur les xylandes polymériques.

D'autre part, elles peuvent être inhibées par le xylose obtenu à la fin de la réaction (Poutanen, et al., 1991).

Les β -xylosidases sont classées en dix familles différentes (GH1, 3, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 et 120) (Henrissat, 1991). Les β -xylosidases les plus étudiées appartiennent aux familles GH3 et GH 43 (Cantarel, et al., 2009).

- Les α -Arabinofuranosidases

La fonction des arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) dans la déconstruction des hétéroxylandes consiste en l'hydrolyse des chaînes latérales d'arabinose. Elles sont généralement plus affines pour les oligomères que pour les polymères d'arabinoxylanes (Coughlan and Hazlewood, 1993; Subramaniam and Prema, 2002). Elles appartiennent aux familles GH3, 43, 51, 54 et 62 (Dodd and Cann, 2009).

- Les α -glucuronidases

Les α -glucuronidases (EC 3.2.1.131 et 3.2.1.139) sont responsables de la libération de l'acide D-glucuronique par l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1 $\rightarrow$ 2) avec les unités xylopyranoses. Seules quelques glucuronosidases ont été isolées.

Leur substrat préférentiel est un court xylooligomère comme par exemple le 4-*O*-méthylglucuronoxyllobiose, avec peu voire pas d'activité vis-à-vis du polymère (Ryabova, et al., 2009).

- Les estérases

Des groupes acétyles sont enlevés par des acétyles xylane estérases (CE 3.1.1.72), qui coupent la liaison des groupes acétyles sur l'*O*-2 et l'*O*-3 des unités β -D-xylopyranosyles (Biely, 1985; Dodd and Cann, 2009). Les acétyles estérases ont montré une grande diversité et sont classées en sept familles de « carbohydrate » estérases : CE1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 12 (Cantarel, et al., 2009).

Les feruloyl estérases (EC 3.1.1.73) catalysent l'hydrolyse des liaisons esters entre les acides féruliques et les oses estérifiés, notamment l'arabinofuranose. Elles sont toutes classées dans la famille CE1 (Cantarel, et al., 2009).

I.4.4. Facteurs limitants la dégradation enzymatique

L'efficacité de l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique dépend étroitement de plusieurs paramètres, à savoir : le milieu réactionnel, les facteurs liés aux substrats et les facteurs liés aux enzymes.

L'hydrolyse enzymatique des polysaccharides pariétaux se déroule en phase hétérogène où le substrat est à l'état solide et l'enzyme à l'état soluble. La catalyse hétérogène s'oppose donc à la catalyse homogène, dans laquelle le substrat se trouve dans la même phase que l'enzyme. La catalyse hétérogène nécessite une étape de diffusion de l'enzyme vers le substrat, préalablement à l'adsorption à celui-ci. Cette adsorption est facilitée par la possession de l'enzyme, en plus de son module catalytique, d'un module de liaison aux polysaccharides, ou Carbohydrate Binding Module (CBM) (Mansfield, et al., 1999).

Toutefois, la diffusion et l'adsorption de l'enzyme pourraient être affectées par certains paramètres physiques tels que l'encombrement stérique engendré par les interconnexions entre les polysaccharides et la densité de la matière au sein de la paroi.

La structure physique du substrat fait également obstacle au processus d'hydrolyse. En effet, la surface spécifique (la surface accessible par unité de masse) affecte l'adsorption de l'enzyme au substrat nécessaire au déroulement de la réaction enzymatique et le processus d'hydrolyse est favorisé par l'augmentation de cette surface (Zhao, et al., 2012).

D'autre part, la cristallinité dans le cas de la cellulose est souvent décrite comme un obstacle qui limite considérablement la susceptibilité du substrat à la dégradation et affecte le rendement d'hydrolyse. La présence dans les régions cristallines d'un réseau de liaisons hydrogène important caractérisant l'assemblage des microfibrilles constitue un facteur important qui rend cette structure très résistante à l'hydrolyse enzymatique en comparaison aux régions amorphes (Mansfield, et al., 1999). Certains auteurs (Zhang and Lynd, 2004) suggèrent que les parties les plus "accessibles" sont hydrolysées en premier, les enzymes délaissant les parties les plus difficiles d'accès.

La composition chimique de la paroi est également un facteur important qui pourrait affecter considérablement l'hydrolyse. Par exemple, la présence de lignines et d'hémicelluloses affecte de manière considérable l'accessibilité des enzymes à la cellulose et leur présence pourrait limiter le rendement d'hydrolyse (Chang and Holtzapple, 2000; Draude, et al., 2001; Zhao, et al., 2012). D'autres facteurs comme le DP, la taille des particules et le taux de porosité semblent être également d'une importance critique pour l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (Mansfield, et al., 1999).

La perte de réactivité du substrat peut également être parmi les facteurs limitants de l'hydrolyse enzymatique. L'évaluation de la perte de réactivité de substrat au cours de la conversion est possible par le rajout d'enzymes « fraîches » après que l'hydrolyse soit arrêtée. (Desai and Converse, 1997) ont évalué le redémarrage de l'hydrolyse enzymatique sur du bois dur et ont montré que la vitesse de d'hydrolyse était inférieure à la vitesse initiale d'hydrolyse mais supérieure à la vitesse de réaction au moment de l'arrêt de la réaction. Wang, et al. (2006) ont également observé une diminution de plus de 20% de la vitesse d'hydrolyse après arrêt et redémarrage de la réaction sur des fibres de coton. Il semblerait que la réactivité intrinsèque du substrat diminue pendant la réaction et ce phénomène pourrait expliquer une partie de la forte diminution de la vitesse d'hydrolyse pendant la conversion.

Cependant, ces résultats sont à nuancer car il semblerait que la diminution de la réactivité dépende du type de substrat. En effet, la réactivité de la cellulose Avicel reste constante au cours de son hydrolyse suggérant que la diminution de la vitesse d'hydrolyse n'est pas la conséquence d'une perte de réactivité du substrat (Yang, et al., 2006) ou que la cellulose Avicel ne soit pas un bon substrat modèle de la complexité pariétale.

L'efficacité de l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique dépend également de la réactivité des enzymes. Les facteurs liés aux enzymes pourraient être:

- l'inhibition des enzymes par les produits de réaction : Par exemple, les enzymes cellulolytiques, principalement les cellobiohydrolases et les endoglucanases, sont connues pour être inhibées par le cellobiose, et dans une moindre mesure, par le glucose. Pour cette raison, l'hydrolyse ultérieure du cellobiose par une glucosidase participe à la synergie entre les enzymes de dégradation de la cellulose.

- l'inactivation des enzymes par une adsorption non productive sur le substrat (Ding and Xu, 2004).

II. Films modèles de cellulose : construction, caractérisation et étude de la dégradation enzymatique

Dans cette partie nous rappelons les informations nécessaires à la compréhension du processus d'élaboration des films multicouches à base de biopolymères, notamment les films à base de cellulose et hémicelluloses qui font l'objet de ce projet.

II.1.Cellulose et hémicelluloses comme briques élémentaires dédiées à la construction de films nanostructurés

II.1.1.Les nanocelluloses

Les nanoparticules de polysaccharides, notamment de cellulose, sont devenues des briques de base particulièrement attractives pour la conception de nanomatériaux biosourcés. Les nanoparticules de cellulose, désignées par le terme générique nanocelluloses, combinent les principales propriétés de la cellulose native à savoir le caractère hydrophile, la grande capacité à être chimiquement modifiées, la formation de fibres de morphologie semi-cristalline, tout en possédant des nouvelles propriétés spécifiques aux nanomatériaux notamment une très grande surface ou une stabilité colloïdale accrue. Le champ d'application des nanocelluloses est très large, nous citons à titre d'exemples, la fabrication des nanocomposites et de matériaux fonctionnels, leur utilisation en tant que matériaux de barrière (contre l'oxygène, la vapeur d'eau, de la graisse/l'huile) dans les emballages alimentaires, la stabilisation des émulsions...(Dufresne, 2013; Klemm, et al., 2006; Peresin, 2013).Selon leur origine et leur mode de préparation, on distingue trois catégories de nanocelluloses : la cellulose nanofibrillée (NFC), la nanocristaux de cellulose (CNC) et la cellulose bactérienne (BNC) (*tableau 1*).

Tableau 1. Les trois familles de matériaux de nano cellulose, leur principales sources et caractéristiques (dimensions, pourcentage de cristallinité relatif à la cellulose, fraction de la structure du cristal I β) (Abdul Khalil, et al., 2012; Klemm, et al., 2011; Rebouillat and Pla, 2013)

Type de nanocellulose	Sources typiques	Largeur (nm)	Longueur (nm)	Cristallinité (a) (%)	I β (%)
Cellulose microfibrillée (NFC)	bois, betterave à sucre, tubercule de pomme de terre, chanvre, lin	10-40	>1000	51-69	10-66
Cellulose nanocristalline (CNC)	bois, coton, chanvre, lin, paille de blé, écorce de mûrier, ramie, Avicel, tunicin, cellulose d'algues et de bactéries	2-20	100-600	54-88	68-94
Nano-cellulose bactérienne (BNC)	oses et alcools à faible poids moléculaire	20-100	—	63	3-27

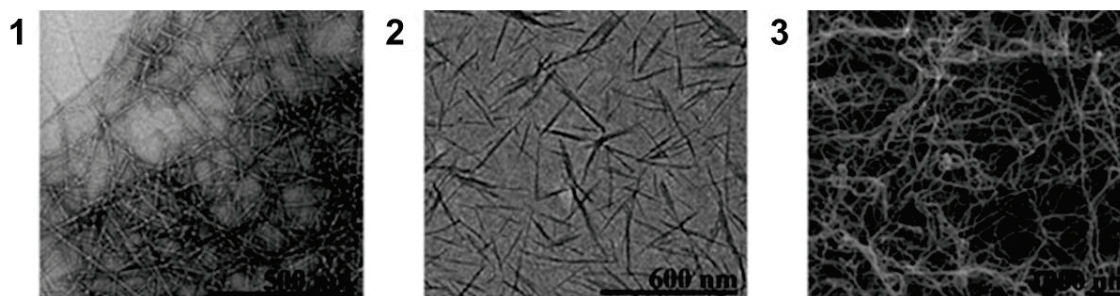


Figure 18. Images MET de la NFC (1), de la CNC (2) et Image en microscopie électronique à balayage de la BNC (3)(Klemm, et al., 2011)

a Les nanofibrilles de cellulose (NFC)

La première désintégration de la cellule de bois pour obtenir des agglomérats d'unité de microfibrille de cellulose a été élaborée par Herrick, et al. (1983) et Turbak, et al. (1983) par un traitement mécanique de la pâte à fibres. Ce traitement est composé de raffinage et de processus d'homogénéisation à haute pression, ce qui donne lieu à une dispersion très visqueuse analogue à celle d'un gel à des concentrations relativement faibles, c'est à dire 2% de suspension aqueuse. La nomenclature initialement attribuée à ce matériau est MFC (pour microfibrille de cellulose) et demeure utilisée à ce jour par plusieurs auteurs bien qu'elle ne corresponde pas réellement à la dimension de la fibrille obtenue qui est beaucoup plus petite que l'échelle du micromètre. Ainsi, la nomination NFC est préférée pour mettre l'accent sur leur dimension nanométrique. En effet, les NFC ont une largeur inférieure à 100 nm et une longueur typique de plusieurs micromètres. Les NFC sont des nanoparticules fortement allongées et flexibles et présentent une structure très enchevêtrée (**figure18 (1)**). La largeur de ces nanoparticules dépend de la source de la cellulose mais aussi des prétraitements spécifiques qui peuvent être incorporés dans le raffinage mécanique. Actuellement, deux principaux procédés de prétraitements sont appliqués aux fibres de cellulose pour produire les NFC, ie., le traitement enzymatique ou le traitement chimique au 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical TEMPO (Missoum, et al., 2013). La dimension latérale des NFC obtenus en utilisant ce dernier est idéalement de 4-5 nm.

b Les nanocristaux de cellulose (CNC)

Les CNC sont aussi appelés cellulose nanocristalline ou « nanowiskers » de cellulose. Ils sont obtenus par hydrolyse acide de la cellulose à partir de nombreuses sources et ont des largeurs de 5 à 70 nm et des longueurs entre 100 nm et 600nm. Malgré les dimensions similaires à celles des NFC, les CNC ont une flexibilité très limitée car ils sont dépourvus de régions amorphes et se présentent sous forme de bâtonnets cristallins (**figure 18 (2)**)(Habibi, et al., 2010; Klemm, et al., 2011)

c La nanocellulose bactérienne (BNC)

Egalement appelé cellulose bactérienne, elle est produite par des bactéries aérobies, telles que des bactéries acétiques du genre *Gluconacetobacter*. Contrairement aux NFC et CNC isolées à partir de sources de cellulose, la BNC est le produit d'assemblage nanométrique de sources de carbone de faibles masses moléculaires comme par exemple le D-glucose. La BNC est excrétée dans le milieu de culture sous forme exopolysaccharides à l'interface milieu-air. Elle se présente sous forme d'hydrogel stable et forme un réseau 3D de nanofibres en rubans (la largeur de chaque ruban est de 20 à 100 nm) et inclut jusqu'à 99% d'eau (Klemm, et al., 2011). Le réseau entremêlé de nanofibrilles de cellulose bactérienne forme une membrane gélatineuse, une pellicule de cellulose pure (**figure 18 (3)**).

Dans notre étude nous avons utilisé les CNC de coton comme l'une des briques élémentaires pour la construction des films multicouches, nous allons donc les décrire en détail dans le paragraphe suivant.

- Principe de l'hydrolyse acide de la cellulose

L'hydrolyse acide des microfibrilles de cellulose permet de dégrader préférentiellement les zones désordonnées (amorphes) par diffusion préférentielle des ions hydronium et de ne garder que les zones cristallines en suspension colloïdale dans l'eau (Battista, et al., 1956; Marchessault, et al., 1961). La coupure des liaisons β -glycosidiques conduit ainsi à l'individualisation des parties cristallines sous forme de nanocristaux plus courts que les microfibrilles de départ. Il existe plusieurs sources de cellulose, parmi lesquelles l'algue *Valonia* (Sugiyama, et al., 1994), le coton (Revol, et al., 1994) et la pulpe de bois (Revol, et al., 1992) sont les plus utilisées.

Le mécanisme réactionnel de l'hydrolyse acide de la cellulose est schématisé sur **la figure 19**. On distingue trois étapes. Dans un premier temps, le proton de l'acide qui est un catalyseur interagit rapidement avec l'oxygène de la liaison β -(1 $\rightarrow$ 4)-glycosidique (I), formant un acide conjugué (II). Cette étape est suivie par la scission de la liaison C-O qui entraîne une dépolymérisation donnant lieu à un cation carbonium cyclique intermédiaire (III). La protonation peut aussi se produire sur l'oxygène du cycle (II') entraînant la formation d'un cation carbonium non cyclique (III'). Le cation carbonium, instable, libère ensuite un proton par hydratation, créant ainsi une nouvelle extrémité réductrice.

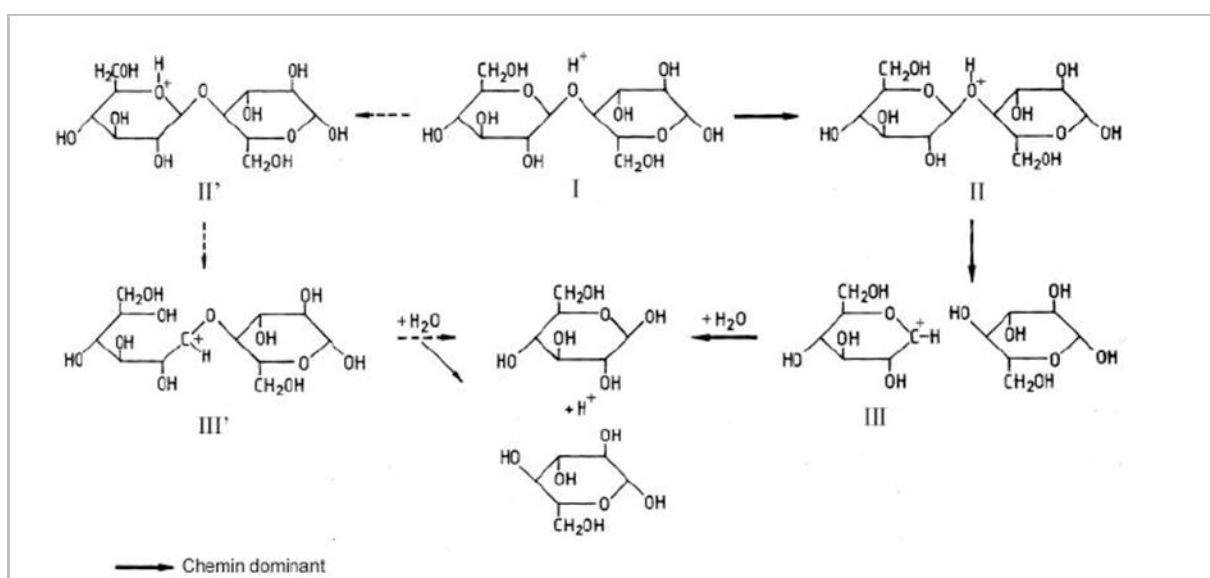


Figure 19. Hydrolyse acide des β -(1 $\rightarrow$ 4)-glucanes (Philipp, et al., 1979)

En évitant la dégradation des domaines cristallins de la cellulose, l'hydrolyse acide ménagée des microfibrilles permet d'obtenir des nanocristaux individuels allongés, les CNC (*figure 20*) (Battista, et al., 1956; Marchessault, et al., 1961).

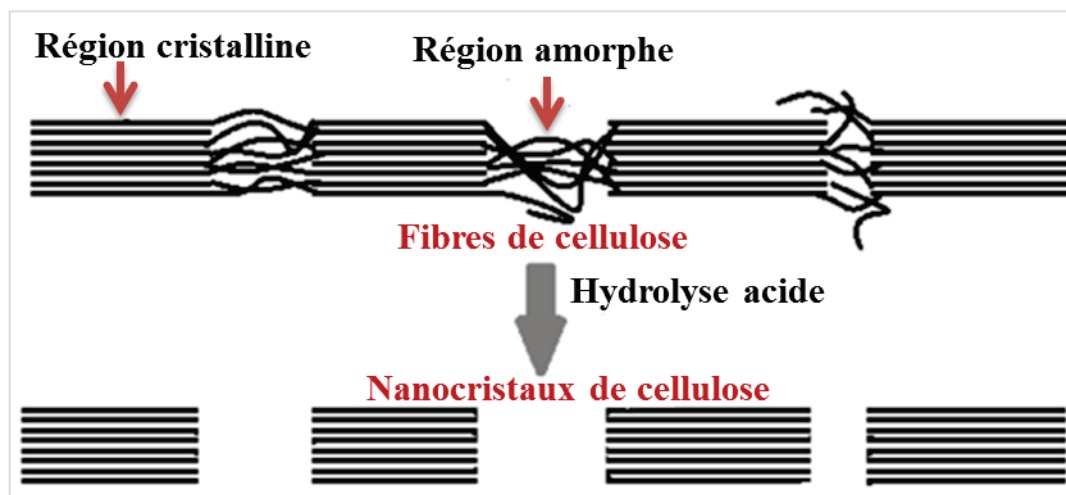


Figure 20. *Obtention de nanocristaux de cellulose par hydrolyse acide*

- Méthode de préparation

Le principal procédé utilisé pour obtenir les CNC est l'hydrolyse des fibres de cellulose à l'acide sulfurique (Elazzouzi-Hafraoui, et al., 2008; Revol, et al., 1992). Des conditions de réaction bien contrôlées (durée et température d'hydrolyse, concentration en acide et rapport acide/cellulose) sont nécessaires pour garantir l'obtention de nanocristaux stables en suspension.

L'hydrolyse à l'acide sulfurique introduit des groupements sulfates chargés négativement (SO_3^-) à la surface des nanocristaux. Ces charges confèrent une bonne stabilité colloïdale à la suspension grâce aux répulsions électrostatiques. La densité de charge des CNC obtenus varie entre 0,04 et 0,6 e.m⁻² et dépend de plusieurs paramètres tels que la concentration en acide, la durée et la température du traitement et le rapport acide/cellulose (Dong, et al., 1998; Hamad and Hu, 2010). La densité de charge peut être déterminée par titration conductimétrique (Dong, et al., 1996; Elazzouzi-Hafraoui, et al., 2008) ou analyse élémentaire (Dong, et al., 1998).

L'acide chlorhydrique a été également utilisé pour préparer les CNC. Les suspensions obtenues ne sont généralement pas stables et flocculent à cause de l'absence de charges de surface. Il est possible d'obtenir une suspension stable à partir de l'hydrolyse par HCl en réalisant une post-sulfatation (Araki, et al., 2000; Araki, et al., 1999).

- Morphologie et dimensions

Les dimensions géométriques des nanocristaux de cellulose (longueur L , largeur l et épaisseur e) dépendent de plusieurs facteurs à savoir la source initiale de cellulose et des conditions d'hydrolyse utilisées (temps, température, acide utilisé pour l'hydrolyse)(Habibi, et al., 2010).

Les différentes tailles mesurées pour des nanocristaux issus des sources de cellulose les plus couramment utilisées sont présentées dans le **tableau 2**, en indiquant la technique utilisée pour la caractérisation.

Tableau 2. Exemples de longueurs (*L*) et de diamètres (*d*) de CNC de sources diverses obtenus via différentes techniques. TEM : microscopie électronique en transmission ; E-SEM : microscopie électronique à balayage environnementale ; AFM : microscopie à force atomique ; DDLS : Diffusion dynamique de la lumière dépolarisée ; MCC : cellulose microcristalline (d'après Peng, et al., 2011)

Source	L (nm)	l (nm)	Facteur de forme(L/l)	Technique	Références
bactérienne	100-1000	10-50	2-100	TEM	(Araki and Kuga, 2001)
coton	100-150	5-10	10-30	TEM	(Araki, et al., 2001)
	150-210	5-11	15-42	E-SEM	(Miller and Donald, 2003)
MCC	~500	10	50	AFM	(Pranger and Tannenbaum, 2008)
Ramie	50-150	5-10	5-30	TEM	(Junior de Menezes, et al., 2009)
Sisal	100-500	3-5	20-167	TEM	(De Rodriguez, et al., 2006)
Tunicien	1160	16	73	DDLS	(de Souza Lima and Borsali, 2004)
	100-plusieurs microns	15-30	3-67	TEM	(Kimura, et al., 2005)
Valonia	> 1000	10-20	50-100	TEM	(Revol, 1982)
Bois	100-300	3-5	20-100	AFM	(Beck-Candanedo, et al., 2005)

Les données de ce tableau montrent que les dimensions des CNC varient sur une très large gamme. En conséquence, le facteur de forme des nanocristaux, défini comme le rapport longueur sur largeur de la section, peut prendre des valeurs très variées comprises entre 10 et 200. En fonction des propriétés recherchées, il est donc possible de choisir la source de cellulose et les conditions d'hydrolyse pour produire des CNC au facteur de forme le plus adapté.

La longueur des CNC du tunicier ou de la cellulose bactérienne est plus importante en comparaison à celle obtenue avec les CNC du bois ou de coton (Peng, et al., 2011). Cette différence est liée à l'origine de la cellulose. L'hypothèse retenue pour expliquer cette différence serait des organisations des complexes de biosynthèse de la cellulose différentes d'une source à l'autre.

Parallèlement, pour une même source, différentes études ont montré que les conditions d'hydrolyse influencent fortement la longueur des nanocristaux obtenus. A titre d'exemple, Beck-Candanedo, et al. (2005) ont montré que les CNC issus de l'hydrolyse de pâte de bois sont plus courts quand le rapport acide/cellulose ou la durée d'hydrolyse sont augmentés. Elazzouzi-Hafraoui, et al. (2008) ont montré que la longueur de CNC issus de linters de coton décroît avec l'augmentation de la température d'hydrolyse. En effet, pour des températures de 45, 54, 60 et 72°C, les auteurs ont obtenu respectivement des longueurs de 141, 131, 128 et 105 nm.

Les dimensions de la section des CNC (largeur l et épaisseur e), contrairement à la longueur (L), semblent ne pas être fonction des conditions expérimentales d'hydrolyse. Par exemple, il n'a pas été noté de variation de largeur ou d'épaisseur avec la température. En revanche, ils dépendent de l'organisation des complexes de biosynthèse de la cellulose. Par conséquent les dimensions de la section des microfibrilles et des CNC qui résultent de leur hydrolyse acide dépendent essentiellement de l'origine biologique de la cellulose (*figure 5*).

Il est à noter que, bien que les conditions d'hydrolyse soient généralement bien contrôlées de manière à obtenir des nanoparticules de CNC bien individualisées, elles ne permettent pas toujours d'isoler les cristallites élémentaires. En effet, les CNC peuvent être constitués de deux ou trois cristallites élémentaires rassemblés, tel que c'est le cas des CNC issus de la cellulose de coton ou du bambou (Brito, et al., 2012; Elazzouzi-Hafraoui, et al., 2008).

Dans notre étude, nous avons utilisé les linters de coton, c'est-à-dire les duvets de fibres très courtes adhérant aux graines de coton après l'égrenage, comme source de cellulose.

Les observations en MET et en cryo-MET des suspensions de CNC de linters de coton ont montré la présence de cristallites élémentaires accolées en ligne. Leur section finale est de forme rectangulaire avec un petit et un grand côté (*figure 21*).

Des techniques complémentaires d'imagerie et de diffraction/diffusion des rayons X ont également montré que les CNC issus de linters de coton obtenus après hydrolyse acide dans les conditions que nous utiliserons sont des nanoparticules provenant de l'association latérale de 2 à 3 cristallites élémentaires et de dimensions moyennes $128 \times 26 \times 6 \text{ nm}^3$ (Elazzouzi-Hafraoui, et al., 2008).

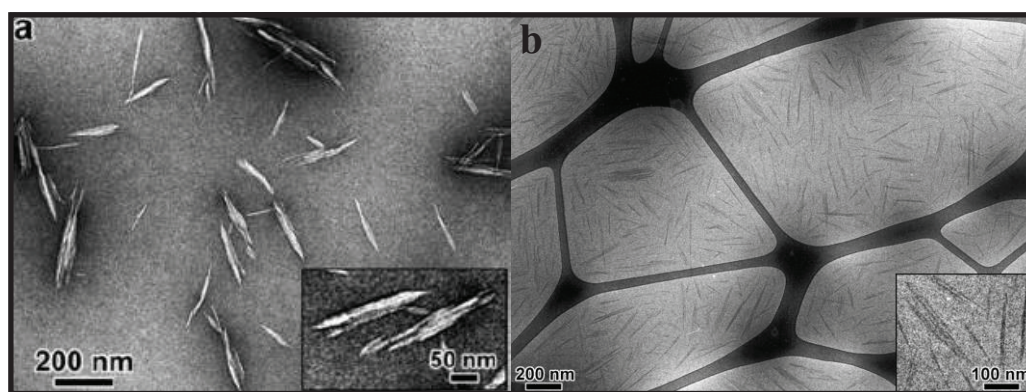


Figure 21.*a) Suspension de CNC issus de linters de coton, obtenue par hydrolyse à l'acide sulfurique et observée en MET après coloration négative. Les CNC sont déposés sur un film de carbone. b) Suspension de CNC de coton obtenue par hydrolyse à l'acide sulfurique et observée en cryo-MET. Les CNC sont figés dans un mince film de glace vitreuse. En insert: vue agrandie de quelques cristallites caractéristiques (Elazzouzi-Hafraoui, et al., 2008)*

II.1.2. Les xyloglucanes de tamarin

Les XG que nous avons utilisés dans ce travail pour l'élaboration des films multicouches sont issus de graines de Tamarin. Parmi les différents types de xyloglucanes, les XG de tamarin (**figure 2**) sont les plus étudiés pour ses différentes applications commerciales, industrielles et pharmacologiques (Mishra and Malhotra, 2009). Un certain nombre de techniques (FTIR, NMR, XRD, DSC, TGA, SEM, MALDI-TOFMS, test ELISA) ont été employées pour déterminer la structure et le comportement des XG de tamarin (Mishima, et al., 1998; Mishra, et al., 2008), (Dea, 1989; Gidley, et al., 1991; Kim, et al., 2006; Lang and Kajiwar, 1993; Sone and Sato, 1994; Taylor and Atkins, 1985; Yamagaki, et al., 1998; Yaoi, et al., 2005; York, et al., 1993).

Les XG de tamarin contiennent jusqu'à 75% de résidus glucopyranosyles substitués. York, et al. (1990) ont déterminé la structure chimique de XG de tamarin en élucidant la composition d'un oligosaccharide obtenu par une digestion par une β -galactosidase par résonance magnétique nucléaire (NMR) (^1H et ^{13}C) et spectrométrie de masse. Elle consiste en une chaîne principale de résidus glucopyranoses partiellement substituée par des résidus de xylose en position O-6, quelques résidus de xylose étant substitués en position O-2 par des résidus de D-galactose.

Les différents blocs constitutifs du xyloglucane de tamarin sont : XLLG qui est l'oligomère majoritaire (50% mol/mol), suivi de XXLG (28%), XXXG (13%) et XLXG (9%)

II.1.3. Les arabinoxylanes cationiques

La très grande majorité des films multicouches à base de polymères sont fabriqués par le biais d'interactions électrostatiques. Toutefois, les biopolymères ne sont pas tous des polyélectrolytes ; le plus souvent, la densité de charge de la surface des biopolymères n'est pas assez élevée pour donner des films suffisamment stables. Cependant, ce problème peut être surmonté en procédant à la modification chimique des polysaccharides par des fonctions chimiques ionisables (cationique ou anioniques).

Dans le cas des xylanes, la fonctionnalisation a été effectuée par le greffage d'une amine quaternaire. Cela permettra par la suite de construire des films multicouches basés sur les interactions électrostatiques entre les charges positives des xylanes cationiques et les charges négatives des CNC.

La procédure de cationisation consiste dans la réaction du polymère avec un réactif cationique par l'éthérification des fonctions hydroxyles en milieu alcalin. La cationisation de xylanes extraits de différentes sources végétales en solution aqueuse avec le 3-chloro-2-hydroxypropyltriméthylammonium (CHMAC) comme agent d'éthérification donne des degrés de substitution (DS) de 0,1 à 0,5 (Ebringerova, et al., 1994). Les mêmes auteurs ont également réussi la cationisation hétérogène de xylane de bouleau commercial en suspension alcaline dans un mélange diméthoxyéthane-eau, en utilisant le chlorure de 2,3-époxypropyltriméthylammonium (EPTA). Des valeurs de DS de 0,2 à 1,6 ont été obtenues (**figure 22**)(Schwikal, et al., 2005).

La variation de la valeur de DS dépend étroitement du ratio molaire xylane/ réactif (EPTA) et le ratio molaire réactif / NaOH (Ebringerova, et al., 1994).

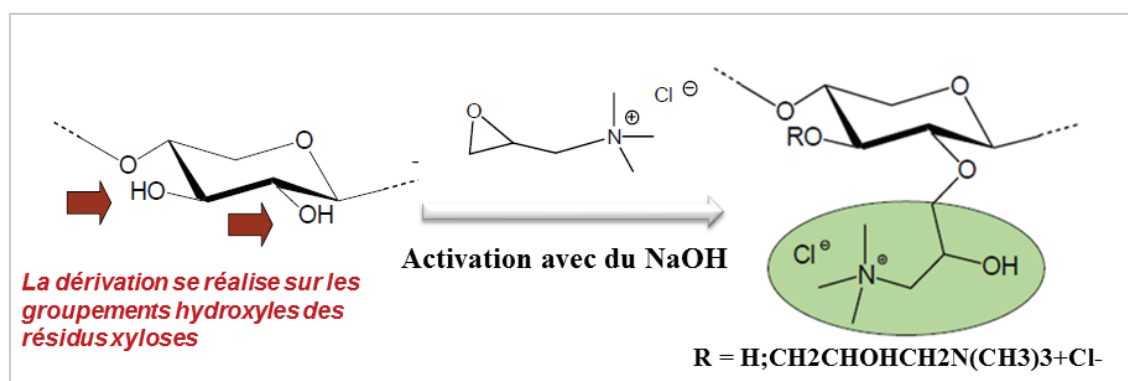


Figure22. Réaction de cationisation de l'arabinoxylane avec le chlorure de 2,3-époxypropyltriméthylammonium (EPTA)

II.2.Elaboration de films multicouches nanostructurés à base de cellulose par la technique couche par couche

II.2.1. Généralités : développement et intérêt de la technique couche par couche

La technique de dépôt couche par couche ou « layer-by-layer » a été répandue par (Decher, et al., 1992) dans les années 1990, bien qu'elle ait déjà été utilisée dès les années 1960, notamment par Iler (1966).

Cette technique permet la construction rapide et simple, sur tout type de support, de films auto-assemblés de polymères synthétiques, mais aussi de polymères naturels à savoir les polypeptides, les polysaccharides, l'ADN, les protéines ou les virus, ou encore de nanoparticules (plaquettes d'argiles, nanotubes de carbones...)(Ai, et al., 2003). Il s'agit d'une technique à fort potentiel car simple, rapide à mettre en œuvre et offrant de nouvelles potentialités dans le cadre de la modification de surface. Elle permet de modifier la topographie, la chimie et la physico-chimie ou encore les propriétés mécaniques de la surface en employant une chimie douce et sans danger.

a Principe

Un support solide généralement chargé négativement est d'abord mis en contact avec une solution de polycations pendant un temps donné permettant l'adsorption du composé sur la surface (**figure 23**). L'excès de polycations est éliminé par rinçage. Après rinçage, la surface est chargée positivement. L'adsorption d'un polyanion à partir d'une solution est alors possible via les interactions électrostatiques. Le rinçage permet d'éliminer l'excès de polyanions.

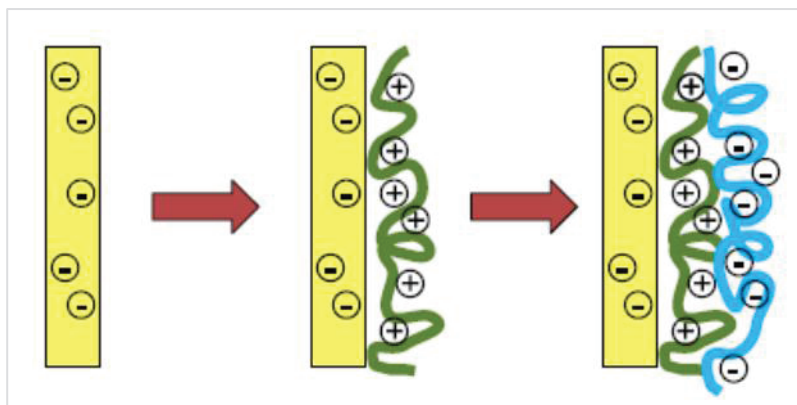


Figure 23. Construction de films multicouches de polyélectrolytes cationiques (en vert) et anioniques (en bleu) sur une surface chargée négativement (schématisée par le rectangle jaune)

b Forces motrices

Le phénomène de surcompensation de charges par le polyélectrolyte adsorbé à chaque dépôt a été mis en évidence par la mesure de potentiel zêta (Caruso, et al., 1999; Sukhorukov, et al., 1998) et a été longtemps considéré comme étant la principale force motrice de la construction des films multicouches. Toutefois, Kotov (1999) a démontré que de fortes interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes mis en jeu ne suffisent pas pour garantir la formation de multicouches et qu'il est nécessaire de prendre compte également des interactions non électrostatiques à savoir les interactions hydrophobes, reliées au réarrangement spatiale de molécules d'eau et des ions lors de la construction. Bucur, et al.(2006) ont montré plus tard que lors de la construction des films multicouches, il n'y a pas que l'implication d'une contribution enthalpique due à l'interaction électrostatique entre les chaînes de polyélectrolytes de charges opposées mais aussi un gain entropique dû au relargage d'ions lors des dépôts de chaînes de polyélectrolytes. Récemment, Qiao, et al.(2010) ont d'ailleurs montré, par simulations atomistiques, que l'entropie doit être prise en compte pour expliquer la formation des paires d'ions entre les polyélectrolytes.

c Les principales techniques d'élaboration des films multicouches

Les techniques d'élaboration de films multicouches sont diverses. La méthode classique de dépôt est celle du trempage (« dip-coating » ou « dipping ») (Decher, et al., 1992). Elle consiste à tremper la surface solide en alternance dans des solutions de polycations et de polyanions. Après un temps d'adsorption généralement de 10 à 20 min, une étape de rinçage à l'eau est effectuée. Cette méthode peut être réalisée soit manuellement, soit de manière automatisée. Le temps de trempage doit être suffisamment long pour atteindre l'équilibre d'adsorption et la surcompensation des charges de surface.

Le deuxième procédé de dépôt proposé est la pulvérisation ou « spray-coating », lors duquel les solutions sont nébulisées en alternance sur un support maintenu verticalement ou légèrement incliné, ce qui permet le drainage de l'excès de solution. Chaque pulvérisation de solution de polyélectrolyte est suivie par la pulvérisation d'une solution de rinçage (Schlenoff, et al., 2000). La répétition de ce cycle permet de construire des films contenant un grand nombre de paires de couches en temps beaucoup plus faible (40 s par couche, rinçage compris) que celui nécessaire pour l'obtention d'un film ayant la même épaisseur par le processus du « dipping ».

Un troisième procédé consiste au dépôt par enduction centrifuge ou « spin-coating ». Au début du processus, le substrat doit être statique ou en rotation à faible vitesse angulaire. Après dépôt d'une solution de polymère, la vitesse de rotation est ensuite rapidement accélérée. Les forces d'adhésion à l'interface liquide/support et les forces centrifuges qui agissent sur le liquide en rotation conduisent à l'expulsion du liquide qui cause un écoulement radial au cours duquel l'excès de solution est éjecté du support (*figure 24*).

Ce processus combiné à l'évaporation du liquide va provoquer la diminution de l'épaisseur du film liquide restant. Dans le cas d'un polymère, l'évaporation provoque l'augmentation de la concentration en polymère et donc de la viscosité à la surface. Un gradient de concentration se forme à l'intérieur du film liquide. Celui-ci va former après l'évaporation de la majeure partie du solvant, un film de polymère uniforme.

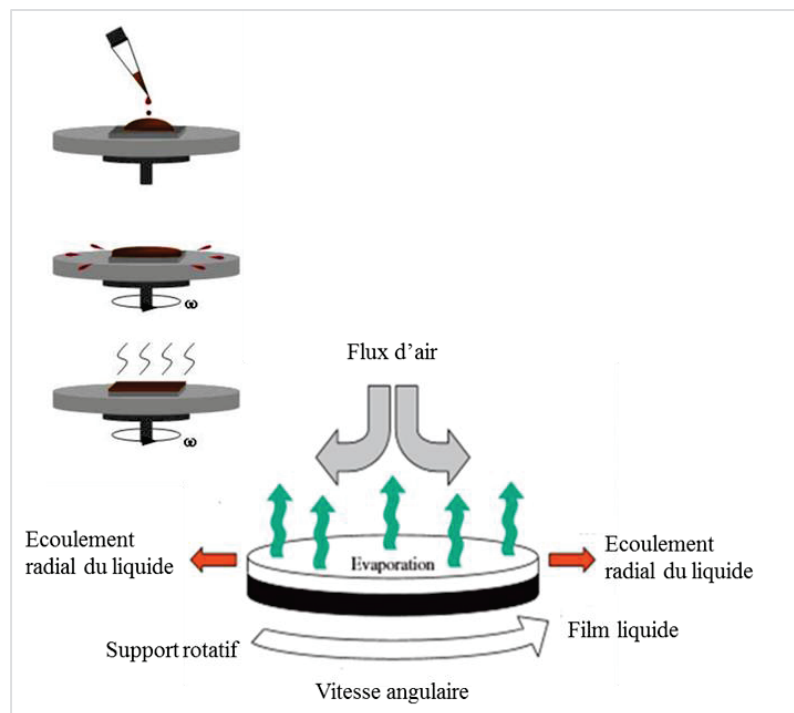


Figure 24. Etapes successives du « spin-coating » (Krebs, 2009)

II.2.2. Paramètres affectant l'épaisseur des films construits par « spin-coating »

a Cas de films de polymères

Lors de la construction des films multicouches plusieurs paramètres peuvent affecter l'épaisseur finale du film.

La majeure partie du travail expérimental décrit dans la littérature consiste à déduire des corrélations empiriques entre les paramètres expérimentaux et l'épaisseur du film (Jenekhe and Schuldt, 1984; Washo, 1977).

Il est maintenant acquis que la vitesse angulaire, la viscosité de la solution et donc sa concentration affectent de manière significative l'épaisseur du film, tandis que la quantité de solution déposée initialement sur le disque, la vitesse à laquelle elle est déposée et le temps de rotation ont des effets limités voir nuls sur l'épaisseur.

Dans le cas d'une solution de polymère, la concentration de la solution est directement reliée à la viscosité : celle-ci augmente (non linéairement) lorsque la concentration est plus forte. La vitesse angulaire et la concentration (ou la viscosité) ont été corrélées à l'épaisseur de film (Bornside, et al., 1991; Lawrence, 1988). La relation entre ces paramètres est représentée schématiquement à la **figure 25**.

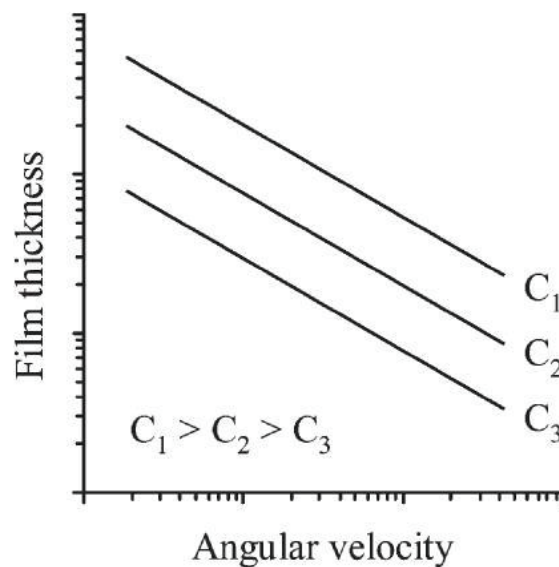


Figure 25. *Relation entre l'épaisseur du film, la vitesse angulaire et la concentration (C_n) dans le procédé de « spin-coating ». Les mêmes relations s'appliquent également pour la viscosité des solutions (Norrman, et al., 2005)*

Cette figure montre que l'épaisseur du film diminue pour les vitesses de rotation les plus élevées et/ou pour les plus faibles concentrations.

Cette corrélation a été largement observée expérimentalement. Ainsi, il est généralement accepté que la relation mathématique est de la forme suivante :

Équation 1

$$h = K \omega^\alpha$$

Où h est l'épaisseur du film, ω la vitesse angulaire, tandis que K_1 et α sont des constantes déterminées de manière empirique. Ces constantes dépendent de différents paramètres à savoir les propriétés physiques du polymère, le solvant, le support, les interactions polymères/solvants et solution/support et également les propriétés rhéologiques du polymère.

b Cas de suspensions colloïdales

Jusqu'à présent, les phénomènes physiques liés au « spin-coating » ont été décrits dans le cas de solutions de polymères. Cependant, nous utilisons la cellulose sous forme de suspension colloïdale de nanoparticules, dont le comportement en « spin-coating » n'est pas nécessairement le même que celui d'une solution de polymères. Rehg and Higgins (1992) ont étudié le comportement de suspensions de billes de polystyrène déposées sur un support par « spin-coating ». Ils ont montré des différences importantes entre « le spin-coating » de solutions de polymères et celui de suspensions colloïdales.

Une première différence réside dans la relation entre la viscosité et la concentration de la solution, qui semble jouer un rôle encore plus important dans le cas du « spin-coating » de suspension colloïdale. En effet, pour les suspensions colloïdales, de faibles variations de concentration peuvent conduire à de grandes variations de viscosité.

De plus, il existe des forces d'interactions dans les suspensions colloïdales qui vont être modifiées par des changements locaux de concentration, de pH ou de température. Tous ces paramètres vont avoir une influence sur la viscosité de la solution ainsi que sur la porosité du film. Les auteurs ont montré que la porosité des films obtenus à partir de suspensions colloïdales augmente avec la force ionique. Les interactions colloïdales pourraient également être mises en jeu pour déterminer la relation entre l'épaisseur du film et la vitesse angulaire du support : l'exposant α (*équation 1*) diminue lorsqu'on augmente la force ionique de la suspension.

Lors de cette étude, nous avons construit nos films par la méthode couche par couche assistée par « spin-coating ». Lors de ce procédé, un temps d'adsorption est nécessaire et le « spin-coating » seul ne suffirait pas pour construire les films. Les nanoparticules sont fixées à la surface durant la phase d'adsorption, la rotation permet de faire un étalement des nanoparticules mais surtout d'éliminer le surplus non adsorbé et de provoquer un séchage de la surface permettant la formation de liaisons hydrogène par exemple.

II.2.3. Interactions mises en jeu dans les films multicouches à base de cellulose

a Construction de films multicouches à base de cellulose via des interactions électrostatiques

Les charges négatives dues à la présence de groupements sulfates à la surface des micro ou nanocristaux de cellulose leur permettent d'établir des interactions électrostatiques avec des polycations. Plusieurs films multicouches ont été élaborés sur cette base en utilisant des micros ou nanocristaux de cellulose de différentes sources. Les principales sources sont le coton sous forme de linter (Jean, et al., 2008; Moreau, et al., 2012), le papier filtre (Cranston and Gray, 2008; Cranston and Gray, 2006; Cranston, et al., 2010; Podsiadlo, et al., 2005), la pulpe de bois (Aulin, et al., 2010; de Mesquita, et al., 2010; Wågberg, et al., 2008) ou le tunicier (Podsiadlo, et al., 2007).

Les polycations synthétiques les plus communément utilisés sont: le chlorydrate de poly(diallyldiméthylammonium) (PDDA)(Podsiadlo, et al., 2005; Wågberg, et al., 2008), le chlorhydrate de poly(allylamine) (PAH) (Azzam, et al., 2014; Cranston and Gray, 2008; Cranston and Gray, 2006; Cranston, et al., 2010; Jean, et al., 2008; Moreau, et al., 2012; Podsiadlo, et al., 2007) ou le poly(éthylène imine)(PEI)(Aulin, et al., 2010; Podsiadlo, et al., 2007; Wågberg, et al., 2008).

Des polycations d'origine biologique ont été également utilisés pour construire des assemblages multicouches à base de cellulose, à savoir le chitosane. Il s'agit d'un polymère issu de la chitine des arthropodes, composé de glucosamine et acétylglucosamine liées par des liaisons (1,4) et distribuées de façon aléatoire (de Mesquita, et al., 2010; Podsiadlo, et al., 2007).

D'autres polycations d'origine biologique peuvent former des interactions électrostatiques avec les CNC et donc être testés pour la construction de films multicouches avec la cellulose. C'est le cas des arabinoxylanes cationiques que nous utiliserons au cours de ce travail.

L'architecture et les propriétés des films multicouches de cellulose à base de polyélectrolytes sont modulées en contrôlant les différents paramètres de construction à savoir la nature des polymères choisis, la force ionique, le pH...etc (Martin and Jean, 2014).

- **Influence du type du polyélectrolyte**

Lors de l'élaboration de films à base de Polyélectrolyte/MFC par la méthode du « dipping », l'épaisseur des films varie selon la structure chimique du polyélectrolyte choisi (Wågberg, et al., 2008). En effet, les épaisseurs obtenues pour le PAH, le PDDA et le PEI pour 10 bicouches déposées sont respectivement de 20 nm, 50 nm et 180 nm. Les auteurs expliquent que ces différences sont liées à la l'organisation tridimensionnelle des polyélectrolytes.

- Effet de la force ionique

La force ionique peut influencer la structure tridimensionnelle du polyelectrolyte en écrantant une partie des charges, ce qui a pour effet l'augmentation de l'épaisseur du film. En effet, Wågberg, et al. (2008) ont montré dans l'étude citée précédemment, que pour 10 bicouches de PAH/MFC l'épaisseur de film est d'environ 140 nm en présence de 0,1 M NaCl et augmente jusqu'à 250 nm à 0,5 M NaCl.

Le même effet a été montré sur les films multicouches PAH/CNC (Moreau, et al., 2012). L'épaisseur de l'incrément par bicouche est de 7-9 nm dans le cas de PAH sans sel et augmente à 14-20 nm en présence de sel. En absence de sel dans la solution de PAH, les chaînes de polyelectrolytes adoptent une conformation étirée à cause des répulsions électrostatiques entre les charges portées par les groupements ionisables du polyelectrolyte. Les chaînes de PAH s'adsorbent « à plat » sur le support. En revanche à 1M de NaCl, les répulsions électrostatiques entre les charges fixes portées par une chaîne diminuent en raison de l'écrantage des charges du polyelectrolyte par le sel. Les chaînes du polycation adoptent dans ce cas une conformation en pelote statistique (*figure 26*).

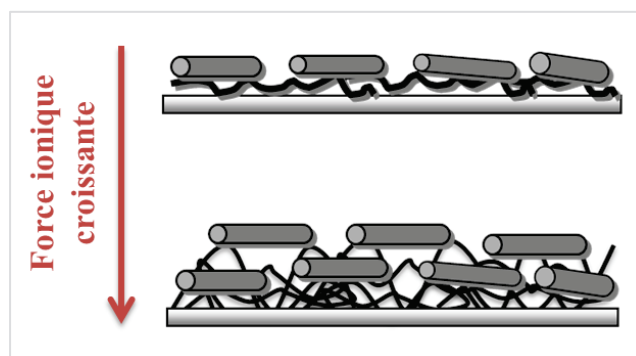


Figure 26. Effet de la force ionique sur le processus d'adsorption des CNC (bâtonnets gris) sur une chaîne de PAH (traits noirs) après séchage des couches. Sans sel, les chaînes de PAH s'adsorbent à la surface selon une configuration linéaire, et les CNC s'adsorbent selon une seule couche, tandis qu'en présence de sel les chaînes de PAH s'adsorbent selon une conformation en pelote et les CNC s'adsorbent en double couche (Moreau, et al., 2012)

- Effet du séchage

Moreau, et al., (2012) ont constaté un changement important dans l'apparence des films (PAH-CNC)₈ sans ou avec séchage. En effet, en introduisant une étape de séchage, des films homogènes ont été obtenus quel que soient les conditions, même avec les concentrations en CNC et les temps d'adsorption les moins élevés. En revanche, sans l'étape de séchage, la réussite de la construction dépend étroitement des autres paramètres, i.e., le temps de trempage, la force ionique de la solution de PAH et la concentration en CNC. L'effet de séchage est fort probablement lié à l'éjection des molécules d'eau, ce qui pourrait favoriser les interactions non électrostatiques comme les liaisons hydrogène entre les chaînes de polymères et les CNC.

Dans le cas du dépôt par enduction centrifuge « spin-coating », le séchage est effectué durant l'étape de rotation. Cet effet pourrait expliquer en partie les résultats obtenus par Cranston and Gray (2006) quant à la différence importante dans la pente de croissance entre des films multicouches élaborés par « dipping » sans séchage (2nm) et ceux élaborés par « spin-coating » (16nm). Dans le premier cas, la construction des films a échoué, puisque la valeur de pente de croissance était inférieure à la dimension des CNC. Ceci pourrait être attribué à l'absence de la phase de séchage. En appliquant le spincoating, la construction est réussie. Cela conforte l'idée que le séchage des couches suite à la rotation contribue à l'adsorption de suspensions plus concentrées en polymères suite à l'évaporation du solvant.

- Effet du temps d'adsorption

L'effet du temps d'adsorption ne semble pas être aussi clair que l'influence des autres paramètres sur la construction des films et il dépend lui-même de ces paramètres comme la concentration en solutions de polymères ou la présence ou non du séchage. Par exemple, sans étape de séchage entre chaque dépôt, Moreau, et al. (2012) ont montré que l'application d'un temps d'adsorption de (10-20 min) permet la construction des films à PAH₀ alors que juste une minute suffirait pour réussir la construction des films en introduisant le séchage entre les dépôts.

- Effet de la concentration

La concentration des polymères utilisés pourrait jouer également sur la croissance des films multicouches. L'influence de la concentration de CNC sur la croissance semble dépendante d'autres paramètres à savoir la présence ou non d'une étape de séchage.

Moreau, et al., (2012) ont montré que l'augmentation de la concentration des CNC de 5 à 35 g L⁻¹ a un effet significatif sur la croissance du film lorsque l'étape de séchage est non appliquée en passant d'une valeur d'épaisseur par bicouche de 7-9 nm à 15-19 nm lorsque la concentration des CNC passe de 5 g L⁻¹ à 35 g L⁻¹. Au contraire, lorsque le séchage est appliqué, l'augmentation de la concentration des CNC a un effet négligeable sur la croissance en passant seulement de 15 nm à 20 nm par bicouche.

Contrairement au cas de films PAH/CNC, dans les films à base de NFC/PEI la quantité de NFC déposée s'avère indépendante de la gamme de concentration utilisée (15-250 mg /L⁻¹)(Aulin, et al., 2008).

- Effet du pH

L'effet du pH sur la structure des films multicouches a été montré par Aulin, et al. (2008) sur les films multicouches à base de MFC/PEI. Les auteurs ont montré qu'un pH élevé associé à une concentration élevée en PEI favorise l'adsorption d'une quantité importante de PEI à la surface et, donc, de MFC lors de la construction des couches. Cela conduit, par conséquent, à l'augmentation de l'épaisseur du film.

Dans la perspective d'élaboration des films multicouches à base de polymères issus de la biomasse, des interactions autres qu'électrostatiques ont également été envisagées.

*b Construction de films multicouches à base de cellulose
via des interactions non électrostatiques*

Les premiers films multicouches entièrement composés de biopolymères ont été construits en associant les CNC au XG (Cerclier, et al., 2011; Cerclier, et al., 2013; Jean, et al., 2009). Cette construction est possible grâce aux forces d'interactions naturelles qui existent entre ces deux biopolymères au sein de la paroi primaire des plantes, à savoir les liaisons hydrogène et les interactions de type polaires et de van de Waals (Hanus and Mazeau, 2006).

La concentration de XG s'est avérée un paramètre important à prendre en considération pour réussir la construction des films multicouches CNC-XG (Cerclier, et al., 2010). En effet, en procédant au spincoating et à une concentration élevée de XG (régime enchevêtré, 5 et 10 g L⁻¹), les films ne croissent pas et leur épaisseur atteint un plateau après le dépôt de 2 ou 4 bicouches CNC-XG. A de telles concentrations, le XG doit être déposé sous forme d'agrégats et former une couche plus épaisse. Les chaînes de XG ne sont alors plus capables de lier à la fois les couches de nanocristaux de cellulose inférieure et supérieure. Lorsque le support est mis en rotation, la force de cisaillement va éliminer la couche supérieure composée de CNC et de XG. Au contraire, à une faible concentration de XG (régime semi-dilué non enchevêtré) à 0,5 g L⁻¹ et 1 g L⁻¹, une croissance non limitée des films a été observée. Les chaînes s'adsorbent de façon individuelle et non plus agrégée et interagissent donc avec les couches inférieure et supérieure de CNC.

La concentration de CNC influence également la croissance des films CNC-XG. En procédant le « spin-coating », Guyomard-Lack, et al. (2012) ont obtenu une augmentation des épaisseurs des films (CNC/XG)₈ de 74 nm à 123 nm en augmentant la concentration de CNC de 3 g L⁻¹ à 5 g L⁻¹.

La méthode de dépôt utilisée joue également sur la croissance des films. (Cerclier, et al., 2010) ont montré que la construction de films (CNC-XG) par « dipping » donne lieu à des films très fins (< 5 nm) lorsqu'une concentration faible de CNC est utilisée (0,5 g L⁻¹ ou 1 g L⁻¹).

L'obtention de films plus épais par « spincoating » avec ou sans rinçage semble être due en réalité à un effet de l'augmentation de la concentration de CNC déposé qui résulte de l'éjection du solvant durant la rotation. A des concentrations élevées en CNC de 53-57 g L⁻¹, la construction des films CNC/XG par « dipping » est réussie (Jean, et al., 2009). Ainsi, l'effet de la concentration de CNC et la méthode de dépôt utilisée sont deux paramètres interliés et ne peuvent pas être traités séparément.

II.2.4. Films multicouches à coloration structurale

Dans la nature, on peut observer d'une part des surfaces à coloration pigmentaire et d'autre part des surfaces à coloration structurale. La coloration par pigment est le type de coloration le plus fréquent. La coloration structurale quant à elle est moins fréquente mais reconnue depuis longtemps dans beaucoup d'assemblages biologiques. Elle résulte d'une structuration particulière de la matière (Vukusic, 2010; Vukusic and Sambles, 2003).

Cette coloration peut être obtenue lorsqu'un polymère est déposé sur la surface d'un support réfléchissant (le silicium par exemple). L'apparition de la couleur est due à la différence d'indice de réfraction entre le dépôt, l'air et le support, qui est à l'origine d'un phénomène d'interférence entre les deux rayons réfléchis par la lame : une partie du rayon incident est réfléchi à la première interface air-film, tandis que l'autre partie du rayon est réfléchi sur la deuxième interface film-support.

Le second faisceau parcourt une distance plus importante que le premier faisceau car il effectue un aller-retour (différence de marche) dans le film. Ceci produit un déphasage $\Delta\varphi$ par rapport au premier faisceau qui est $\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \delta + \pi$.

Ce déphasage dépend de la différence de marche δ entre les deux faisceaux, dont le calcul est présenté ci-dessous (*figure 27*)

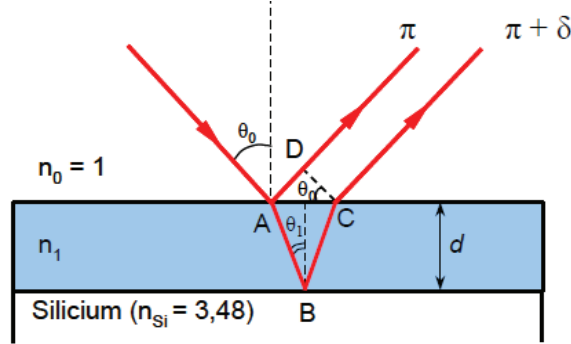


Figure 27. Schéma représentant le phénomène d'interférence lié au dépôt d'un film sur une surface réfléchissante.

$$\delta = n_1(\overline{AB} + \overline{BC}) - n_0(\overline{AD})$$

$$\text{Or } \overline{AD} = \overline{BC} = \frac{d}{\cos(\theta_1)} \text{ et } \overline{AD} = 2d \tan(\theta_1) \sin(\theta_0)$$

$$\delta = n_1 \left(\frac{2d}{\cos(\theta_1)} \right) - 2d \tan(\theta_1) \sin(\theta_1) n_0$$

En utilisant la loi de Snell-Descartes, $n_0 \sin(\theta_0) = n_1 \sin(\theta_1)$, δ devient :

$$\delta = n_1 \left(\frac{2d}{\cos(\theta_1)} \right) - 2d \tan(\theta_1) \sin(\theta_1) n_1$$

$$\delta = 2n_1 d \left(\frac{1 - \sin^2(\theta_1)}{\cos(\theta_1)} \right)$$

$$\delta = 2n_1 d \cos(\theta_1)$$

Ainsi le déphasage $\Delta\varphi$ est de $\frac{4\pi}{\lambda} n_1 d \cos(\theta_1) + \pi$, soit environ $\frac{4\pi}{\lambda} n_1 + \pi$ si on se place en incidence normale.

Les interférences(**figure 28**)sont :

- constructives si les deux ondes réfléchies sont en phase, c'est-à-dire si les ondes atteignent leur maximum(ou leur minimum) au même endroit et au même moment.

$\varphi = 2k\pi$, k étant un entier (ordre d'interférence) : les franges brillantes correspondent aux épaisseurs d telles que $2n_1d = \lambda/2, 3\lambda/2, 5\lambda/2, \dots$;

- destructives si elles sont en opposition de phase : $\varphi = (2k+1)\pi$. Les franges sombres correspondent donc aux épaisseurs telles que $n_1d = 0, 2\lambda, 4\lambda, \dots$

L'intensité de l'onde résultante dépend à la fois de la longueur d'onde de la lumière et de l'épaisseur optique du film (l'épaisseur optique correspond à l'indice de réfraction du film x l'épaisseur du film (n_1d))

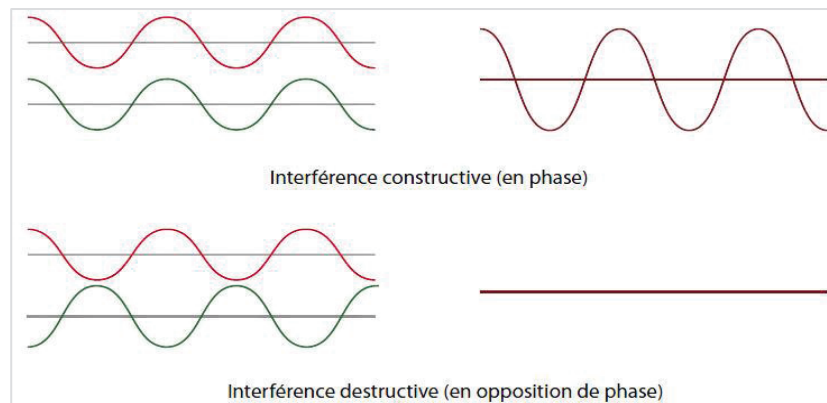


Figure 28.Principe d'interférence entre deux ondes lumineuses

Les premiers films multicouches colorés à partir de nanocelluloses ont été élaborés par Cranston and Gray(2006) avec des couches de CNC/polymères déposées sur une surface de silicium. Wågberg, et al. (2008) ont ensuite obtenu des films multicouches colorés à base de NFC et de différents types de polycations (PAH PDDA, PEI)(**figure 29**). Les épaisseurs de ces films sont variables selon le nombre de bicouches et le type de polycation utilisé, affectant ainsi la couleur obtenue.

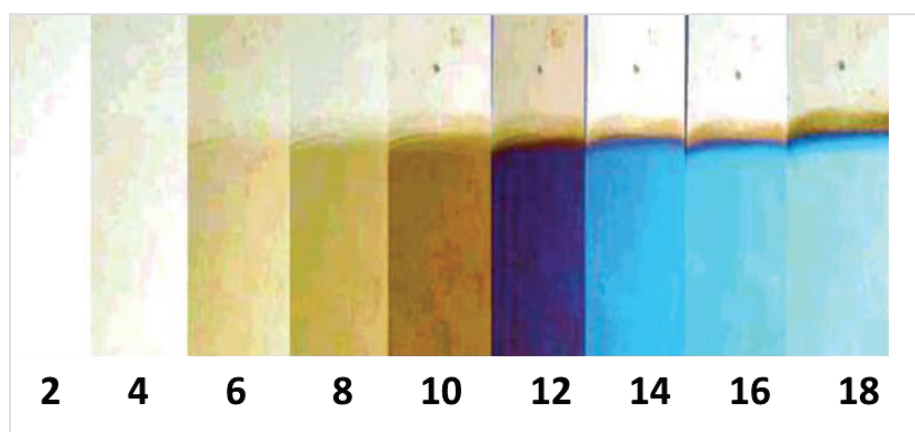


Figure 29. Couleurs d'interférences de films de MFC/PEI en fonction du nombre de couches. Les chiffres indiquent le nombre de couches. Par exemple 12 sur cette figure désigne un film de six bicouches de MFC/PEI (Wågberg, et al., 2008)

Des films multicouches entièrement formés de biopolymères cellulose et hémicelluloses ont également révélé une couleur structurale, qui varie selon la valeur d'épaisseur du film et l'indice de réfraction (Cerclier, et al., 2010; Cerclier, et al., 2011). Cette propriété a été exploitée pour développer des capteurs enzymatiques. La couleur structurale de ces films change suite à l'hydrolyse enzymatique de leurs biopolymères constitutifs (Cerclier, et al., 2011; Guyomard-Lack, et al., 2012). Cette découverte a été obtenue sur des films de (CNC/XG) soumis à la dégradation par une cellulase et permet de détecter l'activité de l'enzyme de façon simple, rapide et sensible.

II.3. Etude de la dégradation enzymatique des films modèles à base de cellulose

Vu la complexité de l'architecture et de la composition du matériel lignocellulosique au sein de la paroi végétale, la conception de systèmes biomimétiques simplifiés comme modèle du substrat lignocellulosique est une stratégie prometteuse pour identifier de manière individuelle, ses différentes caractéristiques structurales. Ceci est un outil de base pour comprendre par la suite les modalités de sa dégradation enzymatique. C'est dans ce cadre que plusieurs études se sont intéressées à la conception de films modèles de cellulose pour l'étude de la dégradation enzymatique. La QCM-D est largement appliquée aujourd'hui à l'étude de

la dégradation enzymatique des films de cellulose. Une description plus détaillée de cette technique est incluse dans la partie expérimentale de cette thèse.

D'une manière générale, la technique QCM-D utilise les propriétés piézoélectriques du cristal de quartz sur lequel le substrat est déposé sous forme d'une couche ultramince (telle que les films de cellulose).

Les changements des fréquences d'oscillation et de l'énergie de dissipation du cristal indiquent des changements dans les caractéristiques du film comme le gonflement de ces derniers suite à l'hydratation par des tampons ou la perte de matière suite à une dégradation par des enzymes (Ahola, et al., 2008; Fält, et al., 2004; Tammelin, et al., 2006).

L'action des cellulases sur les films cellulosiques consiste en deux étapes principales : une première phase d'adsorption de l'enzyme au substrat et une deuxième phase d'hydrolyse. Etant donné que la QCM-D permet le suivi de ces deux phases, son utilisation permet d'apporter plus d'informations concernant les mécanismes et la cinétique de l'action des enzymes sur le film.

Un profil typique de QCM-D issu de la dégradation de films de cellulose est montré ci-dessous (Jeong, et al., 2005; Rojas, et al., 2007; Turon, et al., 2008 ; Ahola, et al., 2008).

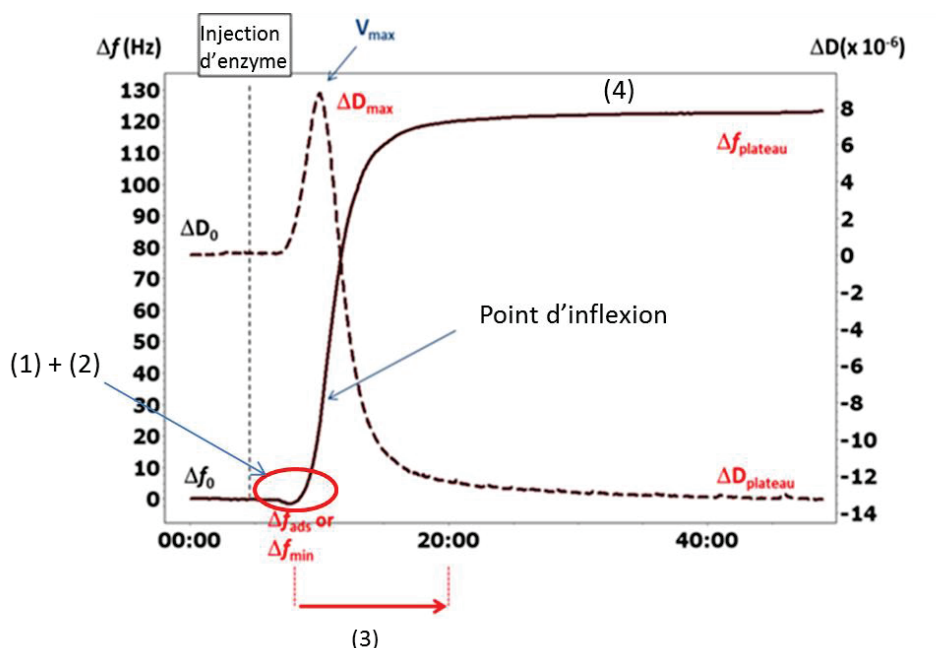


Figure 30. Un profil de QCM-D typique de la dégradation enzymatique de films de cellulose. (1)+(2) Phase d'adsorption + initiation de la phase de dégradation enzymatique (3) la phase de dégradation enzymatique (4) la fin du processus de dégradation

Lors des études focalisées sur le suivi de la dégradation enzymatique par QCM-D, les films cellulotiques sont premièrement soumis au gonflement dans la solution de tampon qui peut durer plusieurs heures jusqu'à atteindre l'équilibre produisant le signal de base sur le profil QCM-D (Δf_0 et ΔD_0 sur la **figure 30**). Une stabilisation complète du film gonflé est démontrée par une stabilisation de la fréquence ($\Delta f_n < 2 \text{ Hz.h}^{-1}$).

La première diminution de fréquence (Δf_{ads} ou Δf_{min} sur la **figure 30**) correspond à l'injection de la solution de cellulase dans la chambre QCM-D, remplaçant ainsi la solution de tampon. Ensuite, quatre phases sont observées (Turon, et al., 2008):

1. Une adsorption de l'enzyme
2. L'initiation de la phase d'hydrolyse
3. La phase de dégradation
4. La fin du processus d'hydrolyse (**figure 30**).

Après une diminution du signal de fréquence (Δf_{ads} ou Δf_{min} , **figure 30**) durant quelques minutes (environ 1-5 min), la fréquence commence à augmenter rapidement et puis se stabilise. L'augmentation de (Δf) traduit une diminution de la masse sur la surface du cristal de quartz, résultant de la solubilisation des produits d'hydrolyse. Le signal de fréquence atteint un plateau ($\Delta f_{plateau}$) lorsque tout le substrat disponible est hydrolysé. A ce niveau, la masse à la surface du cristal de quartz demeure constante.

Simultanément, la dissipation (ΔD) commence à augmenter lorsque l'enzyme s'adsorbe sur son substrat et la phase initiale de dégradation est commencée, jusqu'à atteindre un point maximum (ΔD_{max}). Ceci est lié à un état moins contraint et très hydraté du film. Cette augmentation indiquant le début d'hydrolyse du substrat, est due au gonflement et l'augmentation de l'hydratation du substrat suite à la coupure des chaînes de cellulose par les enzymes (Rojas, et al., 2007).

Avec le temps, les films deviennent de plus en plus hydratés, perdant au fur et à mesure leur structure initialement compacte. Après avoir atteint un pic, le signal de dissipation commence à diminuer en même temps que l'activité d'hydrolyse et finalement se stabilise en un plateau ($\Delta D_{plateau}$). Cela témoigne de la diminution de la nature dissipative du substrat hydraté lorsqu'il devient plus fin et se décroche progressivement du cristal de quartz suite à l'action des enzymes.

D'autre part, plusieurs travaux antérieurs (Turon, et al., 2008; Ahola, et al., 2008 ;Hu, et al., 2009) ont montré que l'effet des propriétés physiques de la solution (densité, viscosité des solutions d'enzymes) est très négligeable sur le changement de fréquence obtenu suite à l'injection de la solution d'enzyme sur les substrats cellulosiques.

Lors du suivi de la dégradation des films de cellulose, le profil QCM-D pourrait être affecté par plusieurs paramètres :

II.3.1.Type du mode d'injection : (continu ou en « batch »)

L'hydrolyse des films modèles a été étudiée en utilisant différents protocoles expérimentaux. Certaines études ont utilisé l'injection en « batch » qui consiste à injecter l'enzyme initialement en flux pendant un temps court, jusqu'au remplissage de la cellule QCM-D.

Un rinçage est ensuite réalisé, suite auquel l'action de l'enzyme préalablement adsorbée sur le film est étudiée en temps réel (Josefsson, et al., 2007). D'autres études ont utilisé l'injection en flux continu avec un débit constant (Suchy, et al., 2011; Turon, et al., 2008). Il est supposé que l'utilisation d'un flux constant pour l'injection de la solution enzymatique soit un moyen pour garantir d'une part, une concentration constante en enzymes durant le processus d'hydrolyse et d'autre part, l'absence du changement des caractéristiques du film durant l'hydrolyse. Toutefois, l'injection de l'enzyme en mode continu ou en « batch » ne permet pas de maîtriser la concentration initiale d'enzyme déposée sur le film et donc de connaître le ratio substrat/enzyme à t_0 dans le milieu réactionnel.

Rojas, et al. (2007) ont comparé l'évolution des pentes de dégradation de films de cellulose déposés sur des cristaux de quartz SiO_2 préalablement recouvert d'une couche de polyvinyl amine à différentes conditions de concentration, de pH ou de température en utilisant le mode continu ou le mode « batch ». Quel que soit le mode utilisé, la pente initiale de dégradation (Hz/min) évolue dans le même sens. En effet, elle augmente avec l'augmentation de la température (de 28 à 38°C) et diminue avec l'augmentation du pH de 4,5 à 10,0. Il a été également observé que, à une température constante de 38°C et pH constant de 4,5, la pente initiale de dégradation diminue en augmentant la concentration d'enzyme. Ces résultats montrent d'autre part, que la température le pH et la concentration en enzymes sont des facteurs clé pour une activité optimale de l'enzyme utilisée. Toutefois, en comparaison au mode continu, la pente de dégradation est plus élevée en mode « batch » à des concentrations faibles en enzymes (5,6-16,7 ppm) et plus faible à une concentration élevée en enzymes (50 ppm). Ainsi, l'effet de l'utilisation de l'un ou l'autre des modes d'injection ne semble pas univoque et dépend des conditions du système telle que la concentration d'enzymes.

D'autres paramètres sont également mis en jeu lors du processus de réaction enzymatique, tels que le type du film de cellulose ou le type des enzymes utilisées et affecte donc le profil QCM-D obtenu.

II.3.2.Effet du type du film cellulosique

Les études antérieures se sont notamment focalisées sur la dégradation enzymatique des films ultra-minces de cellulose amorphe.

Toutefois, dans d'autres études utilisant des films qui incluent des domaines cristallins de cellulose (Cellulose I) en plus des domaines amorphes, la présence de ces composants constitue souvent une contrainte à l'étude des différents facteurs qui pourraient influencer le mécanisme d'hydrolyse enzymatique.

Dans leur études sur l'effet de la structure de surface sur l'hydrolyse enzymatique, Ahola, et al. (2008) ont montré que la dégradation enzymatique des films de NFC est plus rapide en comparaison aux autres types de films cellulosiques à base de cellulose régénérée ou cellulose nanocristalline. Ces résultats ont été expliqués par une accessibilité plus importante de la surface des NFC à l'adsorption des enzymes et donc à la dégradation ultérieure du film et d'autre part par la présence de régions amorphes qui amorce la coupure des fibrilles par les EG.

Martin-Sampedro, et al. (2012) ont également montré une différence de rendement de dégradation enzymatique selon le substrat utilisé. En effet, une conversion totale de films à base de nanofibrilles de cellulose (L-NFC) en mono- et oligosaccharides solubilisés a été réalisée après 4h à 50°C et pH5. En revanche, juste une conversion partielle a été observée pour la cellulose cristalline (Avicel) après une durée plus prolongée, dans les mêmes conditions expérimentales.

Récemment, Jiang, et al. (2013) ont étudié l'effet de groupements sulfate des films de cellulose sur l'hydrolyse enzymatique et ont montré qu'ils gênent l'adsorption de la cellulase à travers le domaine CBD mais favorisent d'une autre part l'adsorption de la cellulase via d'autres interactions, correspondant probablement aux interactions électrostatiques.

La présence de ces groupements sulfates semble aussi contribuer à l'inhibition de l'hydrolyse enzymatique des substrats cellulotiques, vraisemblablement en s'opposant à la reconnaissance des sites de coupures par l'enzyme.

Bien que les différentes études menées en QCM-D sur la dégradation enzymatique des films de cellulose aient été réalisées dans des conditions expérimentales différentes et sur différents types de cellulose, elles montrent toutes que le processus de dégradation enzymatique sur les films modèles est conditionné par la nature de substrat notamment sa structure et sa morphologie.

II.3.3.Effet du type d'enzymes utilisées : enzymes pures ou cocktails

Les différents travaux sur le suivi par QCM-D de la dégradation enzymatique des films cellulotiques ont été réalisés en utilisant soit un mélange de cellulases soit des cellulases purifiées, notamment à partir de *T. reesei*.

En comparant l'action de cellulases purifiées, telles que l'EG et la CBH à celle d'un mélange des deux enzymes (EG+ CBH), Josefsson, et al. (2007) ont étudié la synergie entre ces deux enzymes sur la surface de cellulose II et ont établi une description qualitative de l'activité enzymatique. Le traitement par la solution d'EG mène à une hydratation et un gonflement du film conduisant ainsi à une augmentation de la masse. Comme le film gonfle, les parties extérieures du film deviennent moins denses, exposant de plus en plus les chaînes de cellulose à la phase liquide. L'incubation du film en présence de la CBH mène à une dégradation du film, accompagnée par une perte significative de sa masse. La dégradation des films avec des mélanges EG+ CBH montre un profil similaire à celui obtenu avec la CBH mais avec une cinétique plus rapide. Ce rendement plus élevé peut être expliqué par l'effet synergique entre les deux enzymes, selon lequel les EG augmentent le nombre des sites reconnus par les CBH.

Ahola, et al. (2008) ont montré que l'action de la CBH et celle de l'EG quant à la dégradation des films de cellulose semi-cristalline sont différentes.

L'exposition des films à l'EG conduit à une diminution rapide de fréquence et une augmentation continue de dissipation, attribuées à la prise d'eau par le film suite à son gonflement, ce qui montre que l'action de l'EG est accompagnée par un changement des propriétés rhéologiques du film. Toutefois, aucune diminution de masse n'a été observée ce qui démontre que l'action de l'EG seule ne contribue pas à la dégradation du film. En revanche, l'action de la CBH conduit à une hydrolyse rapide, indiquée par une augmentation du signal de fréquence.

A l'opposé des résultats observés dans les travaux d'Ahola, et al.(2008), Suchy, et al., (2011), lors de leur étude de la dégradation de films de cellulose amorphe ont observé une dégradation significative des films traités par l'EGI, tandis que la dégradation en présence de CBHI n'est pas significative. Ces résultats suggèrent que l'EGI agit préférentiellement sur les régions amorphes de la cellulose. Lorsque le même film de cellulose amorphe est exposé à un mélange commercial de cellulases, le signal de dissipation augmente quand la structure du film s'hydrate de plus en plus, et atteint son maximum lorsque le rendement d'hydrolyse est maximal et puis tend vers zéro lorsque l'intégralité du film est décrochée du cristal. Cette diminution n'a été pas observée sur les films traités par EGI. La différence de profil de dissipation entre la dégradation en présence d'un mélange de cellulase et celle en présence de l'EGI est donc due à une dégradation plus efficace par le mélange de cellulases.

Cheng, et al. (2011) et Cheng, et al.(2012) ont combiné la réflectivité des neutrons et la QCM-D pour étudier l'interaction de différentes enzymes (en mélange ou purifiées) sur des films de cellulose amorphe. A partir de ces deux études, ils ont trouvé une corrélation entre l'ampleur de pénétration de l'enzyme à travers le film et la présence d'un module CBM : les enzymes avec CBM ont une activité enzymatique plus importante sur les films de cellulose comparés à ceux sans CBM.

III. Problématique et objectifs de la thèse

L'analyse de la littérature qui précède est focalisée sur deux domaines de connaissance : le premier se rattache à la biologie de la paroi végétale et s'intéresse notamment à sa composition en polysaccharides et particulièrement la cellulose, les xylanes et les xyloglucanes, aux principales caractéristiques de leurs assemblages (xyloglucanes/cellulose ; xylanes/cellulose) et à leur dégradation enzymatique. Le deuxième domaine concerne la physicochimie des surfaces et s'intéresse aux films nanostructurés à base de cellulose et à leur dégradation enzymatique. Les données bibliographiques traitant cet axe font ressortir l'importance de ces modèles dans la compréhension du processus de dégradation enzymatique. Toutefois, la limitation majeure de la plupart de ces travaux est la structure de films étudiés restreinte à un seul composé. Ces modèles ne reflètent donc pas la complexité structurale qui caractérise la paroi végétale.

Ainsi, il est envisageable d'aborder l'étude de la dégradation enzymatique sur des systèmes plus complexes à savoir les films modèles d'assemblages hémicellulose/cellulose.

Le premier objectif de cette thèse a été d'élaborer les systèmes modèles à base de cellulose et hémicelluloses pour l'étude, dans un deuxième temps, de leur dégradation enzymatique : Le premier modèle est basé sur les CNC et les CX et tire avantage des interactions électrostatiques entre les charges négatives des CNC et les charges positives des CX. Ce modèle a été élaboré pour l'application à la détection de l'activité xylanase (**article n°1**). Le deuxième type de construction concerne les films à base de CNC et XG dont l'élaboration est basée sur les affinités naturelles entre ces deux polymères via des liaisons hydrogène et des interactions de type van der Waals. Ce système a fait d'ores et déjà, l'objet de la thèse de Carole Cerclier (INRA-BIA-Nantes) soutenue en 2010. Les tests préliminaires effectués au cours de cette étude antérieure ont permis de valider d'une part, la preuve du concept de l'application de ces films comme nouveau système pour la détection d'activités enzymatiques. Ils ont ouvert d'autre part, une piste pour chercher à mieux approfondir la compréhension des phénomènes mis en jeu lors de la dégradation enzymatique.

L'élaboration de films multicouches avec des architectures contrôlées et modulables à façon est donc une stratégie qui a été proposée au cours de cette thèse pour pouvoir maîtriser les paramètres difficilement modulables sur le substrat réel (matériel lignocellulosique de la paroi végétale) telles que la composition, l'accessibilité aux enzymes. Ces systèmes servent ensuite de substrats modèles pour l'étude de la dégradation enzymatique. Ainsi, l'élaboration des films de CNC et de XG en conditions contrôlées (concentration et force ionique des CNC) et l'évaluation de leurs structures internes font l'objet de **l'article n° 2**.

Le deuxième objectif, qui fait l'objet des parties 3 et 4 du chapitre 'Résultats et discussion' a été d'approfondir la compréhension de la relation entre l'organisation des assemblages XG/CNC et la susceptibilité à la dégradation enzymatique.

Pour cela nous nous attacherons, dans une troisième partie à l'exploration de l'architecture des complexes CNC-XG en suspension à différents ratios de concentrations XG/CNC en se basant sur la susceptibilité des XG à l'hydrolyse enzymatique. Cette étude sert ensuite de témoin permettant d'aider à l'appropriation des relations organisations d'assemblages de polymères-hydrolyse enzymatique sur les films (CNC-XG) (**article n° 3**).

Dans une quatrième partie, nous rapportons une étude préliminaire de la susceptibilité des films CN/XG à l'hydrolyse enzymatique des films multicouches CNC-XG avec des architectures contrôlées.

En conclusion générale de cette thèse, nous récapitulons les points importants relatifs à chaque partie et nous proposons des perspectives pour la suite de ce travail.

CHAPITRE II.

PARTIE EXPERIMENTALE

Ce chapitre est divisé en deux grandes parties : la première partie présente les matériaux utilisés et détaille pour certains leur mode de préparation ainsi que leur caractérisation physicochimique et morphologique. En deuxième partie, nous nous focaliserons en premier lieu, sur la technique utilisée pour construire les films multicouches et en deuxième lieu sur les techniques d'analyses de surfaces utilisées pour la caractérisation de leur architecture. Nous nous intéresserons, en troisième lieu, à la caractérisation des dégradations enzymatiques (méthode de dosage en solution, test visuel de détection, suivi *in situ* de la dégradation par (QCM-D)).

Ensuite nous nous attacherons aux méthodes utilisées pour l'analyse de l'adsorption des complexes XG/CNC, c'est à dire l'isotherme d'adsorption, l'analyse des produits de dégradation des complexes XG/CNC par chromatographie haute performance d'échange d'anions (HPAEC) et l'observation en MET des complexes avant et après immunomarquage des XG.

I. Matériels pour la construction des films

I.1. Poly (hydrochlorure d'allylamine) (PAH)

Le PAH ($M_w = 120\,000\text{--}200\,000\text{ g mol}^{-1}$) est commercialisé par PolySciences (Allemagne) et utilisé tel quel.

Le PAH est soluble dans l'eau, et possède un pKa de 8, 7-10 (Cranston and Gray, 2006; Yoo, et al., 1998). Il s'agit d'un polyélectrolyte chargé positivement à pH neutre grâce à son groupement amine (*figure 31*).

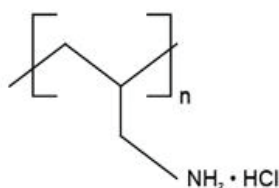


Figure 31. Formule de l'unité répétitive de PAH

I.2. Arabinoxylanes cationiques (CX)

Les CX ont été synthétisés par Schwikal et al (Thuringian Institute of Textile and Plastics Research, Rudolstadt, Allemagne) à partir d'arabinoxylanes extraits de glumes de graines d'avoine dont la composition est présentée dans le *tableau 3* suivant :

Tableau 3. Composition des arabinoxylanes extraits de glumes de graines d'avoine

Composition	
<i>Xylose</i>	65,8 %
<i>Arabinose</i>	9,1 %
<i>Galactose</i>	2,0 %
<i>Glucose</i>	3,4 %
<i>Cendre</i>	17,3 %
<i>Protéines</i>	0,7 %

La cationisation des arabinoxylanes a été réalisée en suspension en diméthoxyéthane-eau alcaline, par estérification au Chlorure de 2,3-époxypropyltriméthylammonium (EPTA) (*figure 32*).

La variation de la valeur de DS dépend étroitement du rapport molaire xylane/réactif (EPTA) et du rapport molaire réactif/NaOH (Ebringerova, et al., 1994). Le DS de nos échantillons varie de 0,05 et 0,18 par groupement hydroxyle.

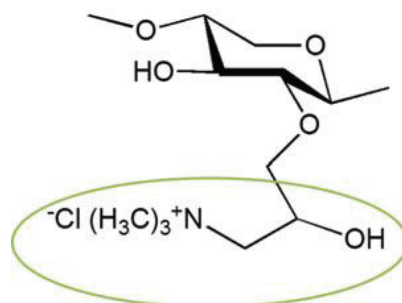
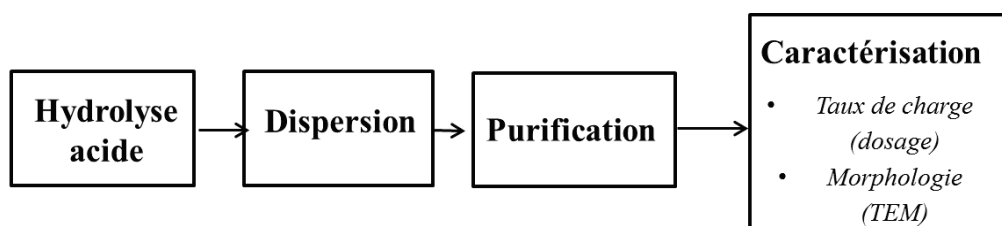


Figure 32. Structure chimique des xylanes cationiques (CX) obtenus après réaction avec l'EPTA

I.3. Nano-cristaux de cellulose (CNC)

La procédure suivante a été utilisée pour obtenir et caractériser les nanocristaux de cellulose :



- Hydrolyse acide

L'élaboration des nanocristaux de cellulose à partir de linters de coton (*Gossypium hirsutum*) a été réalisée par hydrolyse à l'acide sulfurique. Pour cela, 840 mL d'une solution d'acide sulfurique à 65 % en masse ont été initialement préparés en ajoutant lentement 420 mL d'acide sulfurique concentré à 420 mL d'eau ultrapure dans un bain de glace. La solution d'acide préparée est ensuite transférée dans un ballon tricol et placée dans un bain d'eau thermostaté à 65°C (**figure 33**). Après stabilisation de la température de la solution, on procède à l'hydrolyse en ajoutant dans le ballon 60 g de linters de coton secs. La réaction est ensuite maintenue sous agitation par un agitateur mécanique à 260 tr min⁻¹ pendant 35 minutes. La solution doit prendre une coloration jaune-ambrée à la fin de l'hydrolyse. La réaction est arrêtée au bout de 35 min par ajout de glace dans le ballon.

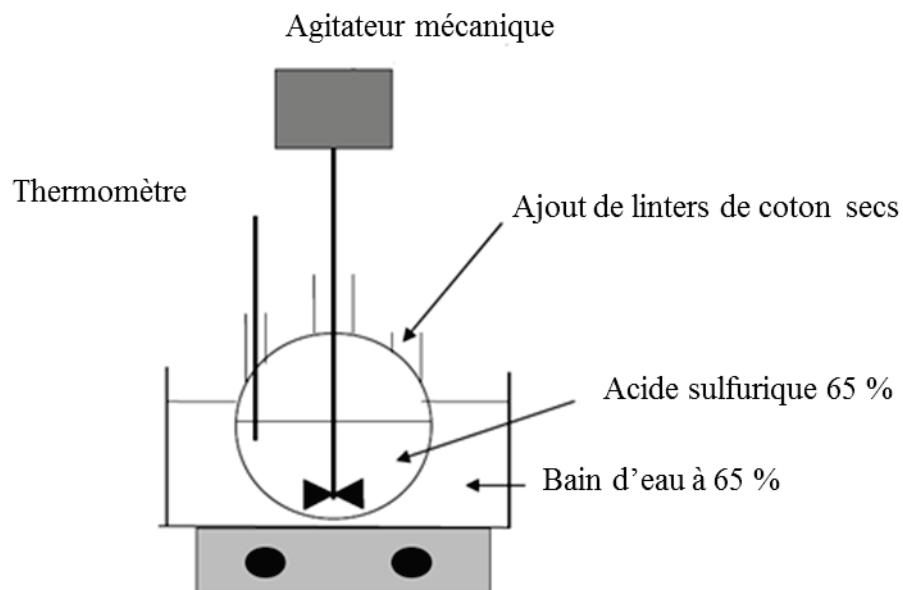


Figure 33. Montage expérimental utilisé pour la préparation de CNC par hydrolyse acide de linters de coton

- Dispersion

La préparation est ensuite centrifugée à 16430 g pendant 10 minutes, ce qui permet d'éliminer l'excès d'acide. Le culot est alors redispersé dans de l'eau ultrapure et la dispersion obtenue est centrifugée à nouveau. Ces étapes sont répétées jusqu'à l'absence de culot après centrifugation indiquant l'obtention d'une suspension colloïdale stable de CNC.

- Purification

A ce stade, la suspension de CNC est stable mais elle contient des petites molécules (reste d'acides, sels, monomères, oligosaccharides, etc...). Une étape de dialyse est conduite pendant 5 jours en utilisant une membrane de dialyse MW 14000 (Spectrumlabs, 4 spectra/For dialysis Membrane MWCO) préalablement lavée à l'eau chaude. Le pH de la suspension doit être stabilisé entre pH 4 et pH 5. La suspension est ensuite soniquée par lot de 200 mL pendant 4 minutes (Q 700 Qsonica, puissance maximale 700W, fréquence 20 Hz).

Enfin, une résine échangeuse d'ions (TDM-8, Sigma-Aldrich) est ajoutée à la suspension qui est laissée sous agitation douce pendant 48h. La suspension est alors filtrée sur un fritté de classe 1 porosité de 101 à 160 μm) et stockée à 4°C. Les suspensions ainsi préparées sont protégées du développement bactérien par ajout d'azoture de sodium (NaN_3) à 0,01 %.

- Caractérisation des nanocristaux de cellulose

L'objectif de cette caractérisation est de déterminer le taux de charges à la surface des CNC. La concentration des suspensions préparées est calculée par mesure de la masse sèche. Un mL de suspension est prélevé et déposé dans un creuset en aluminium. L'ensemble est placé dans une étuve à 103°C pendant 2 heures. Des pesées sont réalisées à avant et après séchage sur cinq prélèvements différents pour obtenir une concentration massique moyenne.

Le taux de charge est déterminé par conductimétrie. Le conductimètre utilisé est un conductimètre de type CDM 230 équipé avec une cellule de titration (CDC749, Radiometer, Danemark).

La titration réalisée à l'aide d'une solution de NaOH 10^{-2}M . A l'équivalence, la relation suivante est vérifiée.

Équation 2

$$V_{eq} \times C_{\text{NaOH}} = n_{\text{cellulose}} \times d_s$$

Avec V_{eq} le volume équivalent de NaOH , C_{NaOH} la concentration en NaOH , $n_{\text{cellulose}}$ la quantité de résidus de glucose et d_s le degré de substitution qui représente le nombre d'atomes de soufre par unité de glucose et $n_{\text{cellulose}}$ est la quantité de résidus de glucose

On sait que :

Équation 3

$$n_{cellulose} = \frac{m_{cellulose}}{M_{moy}}$$

Où $m_{cellulose}$ est la masse sèche de CNC introduite et M_{moy} la masse molaire moyenne d'un résidu de glucose substitué. Cette dernière est donnée par la relation suivante :

Équation 4

$$M_{moy} = 162(1 - d_s) + 242 d_s$$

Où 162 gmol^{-1} et 242 gmol^{-1} sont respectivement les masses molaires d'une unité de glucose seule et d'une unité de glucose sulfatée. Les **équations 2 et 3** nous permettent d'écrire :

Équation 5

$$d_s = \frac{V_{eq} \times C_{NaOH} \times M_{moy}}{m_{cellulose}}$$

On obtient donc un système de deux équations (**équation 5 et équation 6**) à deux inconnues (d_s et M_{moy}). La masse molaire moyenne est calculée d'après la relation suivante :

Équation 6

$$M_{moy} = \frac{162}{1 - 80 \times \frac{V_{eq} \times C_{NaOH}}{m_{cellulose}}}$$

Le degré de substitution peut ainsi être calculé grâce à l'équation 6. Enfin le taux de soufre, τ_s

Équation 7

$$\tau_s = \frac{32 d_s}{M_{moy}}$$

Où 32 g.mol^{-1} est la masse molaire du soufre

- Observation de la suspension de CNC par MET

La MET permet d'observer des échantillons à l'échelle nanométrique. Un faisceau d'électrons fortement accélérés traverse un échantillon très mince (de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur au maximum). Un système de lentilles électromagnétiques permet de contrôler la trajectoire des électrons et de former sur un écran fluorescent une image très agrandie du volume projeté de l'échantillon. L'image obtenue est donc une image optique à l'instar de la microscopie optique, la principale différence étant la nature du faisceau « éclairant ». L'interaction des électrons avec la matière conduit à différents phénomènes d'absorption, de diffusion ou de diffraction qui sont à l'origine de contrastes dans les images :

- le contraste de diffusion. Les objets épais ou composés d'atomes lourds diffusent plus fortement les électrons que les spécimens minces ou légers. L'insertion d'un diaphragme, qui ne laisse passer que les électrons transmis par l'échantillon, et élimine une certaine proportion d'électrons diffusés génère des contrastes dans l'image. Les objets lourds/épais apparaîtront alors sombres, et ceux minces/légers seront plus clairs.

- le contraste de diffraction. Certains électrons incidents sont déviés par les plans atomiques des échantillons cristallins selon des angles définis par la loi de Bragg. Le diaphragme ne sélectionnant que les électrons transmis par l'échantillon, les objets cristallins seront plus sombres en position de Bragg.

- le contraste de phase. Des interférences sont générées aux interfaces entre des zones de l'échantillon qui ont différents indices de réfraction des ondes électroniques. L'intensité, le contraste (sombre ou clair) et la distribution des franges de Fresnel ainsi formées dépendent de la focalisation de la lentille objectif, contrôlée par l'opérateur. Dans le cas des nanocristaux de cellulose, aucun de ces contrastes n'est suffisant pour obtenir des images satisfaisantes. Pour renforcer le contraste de phase, une méthode dite de « coloration négative » est appliquée aux échantillons. Pour cela, on ajoute sur l'échantillon de l'acétate d'uranyle. Ces métaux lourds rendent le fond noir tandis que l'échantillon apparaît en clair.

Préparation des échantillons CNC :

Vingt μL de la suspension de CNC sont déposés sur une grille de MET (CF200-Cu Delta Microscopies) préalablement rendue hydrophile par traitement ionisant au plasma (Cressington, 208 C), et laissés 2 minutes. L'excès de liquide est ensuite adsorbé à l'aide de papier filtre. Les échantillons sont ensuite colorés négativement par 20 μL d'acétate d'uranyle (2% W/V) pendant 2 minutes après lesquelles l'excès de contrastant est éliminé. Le séchage des échantillons est finalement réalisé à 40°C juste avant l'observation en MET sur un microscope Jeol JEM 1230 opérant à une tension de 80 kV.

I.4. Xyloglucanes (XG)

Le xyloglucane (P-XYGLN, lot100402, Megazyme, Bray, Country Wicklow, Ireland) est extrait des graines de Tamarin. Sa masse moléculaire en masse est de 202 000 g mol^{-1} .

I.5. Solutions utilisées pour la préparation des films

Toutes les solutions de polymères utilisés pour la construction des films ont été préparées dans l'eau ultrapure. Leurs nomenclatures sont répertoriées dans le **tableau 4**.

Tableau 4. *Nomenclatures et concentrations des solutions de polymères utilisés*

Abréviation	Solution	Concentration (g.L⁻¹)
PAH	PAH	1
CX	Xylane cationique	1
XG1	Xyloglucane	1
CNC3	Nanocristaux de cellulose	3
CNC5	Nanocristaux de cellulose	5

I.6. Supports solides

Les films sont construits sur deux types de supports solides différents selon le type de mesures envisagées :

Wafers de Silicium : Disques de Silicium dont le diamètre est de $58 \text{ nm} \pm 0,5$, provenant de chez ACM. Ces supports sont activés d'abord dans un bain piranha réalisé extemporanément et composé d'un mélange H_2SO_4 (95 %)/ H_2O_2 (30%) dans un rapport 7/3, v/v pendant 30 min. Ce trempage permet d'éliminer les impuretés présentes à la surface des wafers et de la charger négativement. Les wafers sont ensuite rincés intensément à l'eau ultrapure puis séchés sous flux d'azote. Le film doit être réalisé rapidement après que la surface ait été activée.

Cristaux de quartz : ce sont des supports solides de quartz recouverts de part et d'autre par des électrodes d'or dont le diamètre est de 14 mm (Qsx301, Q-sense) (*figure 34*). Ils sont utilisés pour les manipulations en QCM-D. Les cristaux sont nettoyés au bain piranha pendant 2 minutes puis rincés intensément à l'eau ultrapure et séchés sous flux d'azote. Ensuite, les cristaux de quartz sont traités au Plasma Cleaner (Harrick Plasma) afin de modifier leur surface en créant des charges négatives servant pour l'accrochage et l'adhésion des couches de polymères chargés.

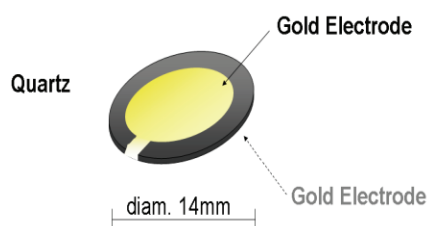


Figure 34. Cristal de quartz revêtu d'or utilisé pour des mesures en QCM-D

II. Enzymes pour la dégradation des films

II.1. Xylanase

La xylanase, endo-1,4- β -xylanase-M1 (E-XYTR1 lot 20502, Megazyme, Bray, County Wicklow, Ireland) de *Trichoderma viride*(famille CAZY GH11,) a une activité spécifique de 210 U mg⁻¹ à 40°C mesurée sur arabinoxylane de blé. Les solutions enzymatiques sont préparées et diluées dans un tampon acétate de sodium (10 mM, pH 5,0).

II.2. Cellulyve^{TR}

La Cellulyve^{TR} (Lyven, Colombelle, France) est dissoute à des concentrations de 25 et 50 mgL⁻¹ dans un tampon acétate de sodium (10 mM, pH 5,0). Elle est extraite de *Trichoderma reesei* et a une activité enzymatique optimale à 4,5 ≤ pH ≤ 5,0 et à 50°C.

II.3. Xyloglucanase

C'est une endo- β -1,4-glucanase de *Paenibacillus* sp. (Megazyme, GH 74). Le poids moléculaire de l'enzyme est de 108 kDa ; l'activité spécifique donnée par le fournisseur est de 45 U mg^{-1} à pH 6 et 70°C dans un tampon acétate de sodium de 100 mM sur xyloglucane de Tamarin à 5g L^{-1} . Les solutions enzymatiques sont préparées et diluées dans un tampon acétate de sodium (10 mM, pH 6,0).

III. Méthodes

III.1. Construction des films par la technique d'assemblage couche par couche assistée par « spin-coating »

La construction des films a été réalisée à l'aide du spincoater robotisé, construit à l'INRA-BIA.

La **figure 35** décrit les différentes étapes de la technique d'assemblage « couche par couche » assistée par « spin-coating ».

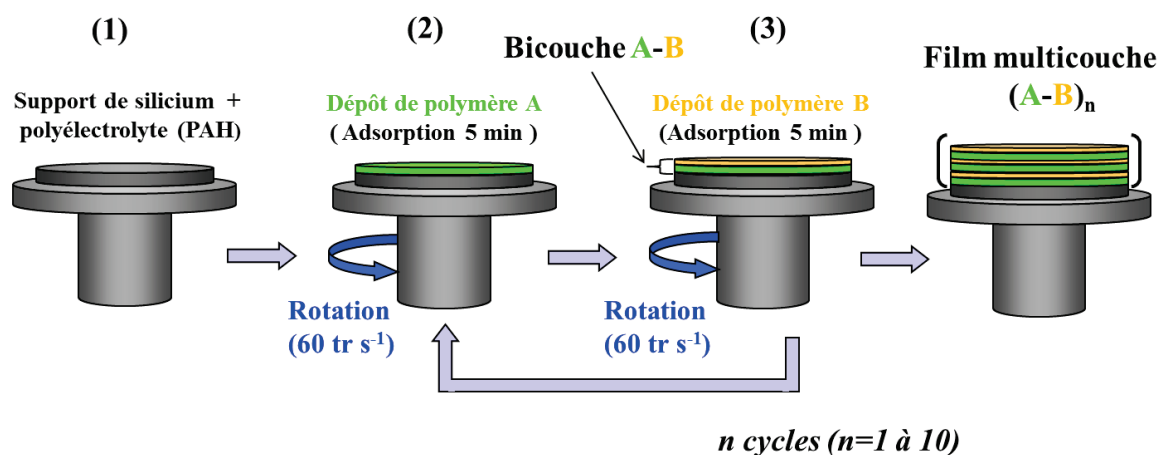


Figure 35. Principe de la construction des films par la technique « couche par couche » assistée par « spin-coating »

Avant la construction du film, la première étape consiste à déposer une couche de polyélectrolyte sur le support qui va servir de couche d'accroche à la première couche de polymère. Pour cela, une solution de PAH est déposée manuellement sur le support solide de silicium (*figure 35(1)*) puis laissée pendant 5 minutes pour une adsorption optimale.

Une rotation est ensuite appliquée à 60 tr.s^{-1} pendant une minute. Un rinçage à l'eau ultrapure est ensuite effectué, suivi par une nouvelle mise en rotation immédiate à 60 tr s^{-1} .

La construction du film de polymères $(A-B)_n$ a lieu en deuxième temps. Les solutions de CNC (A) (*figure 35(2)*) et de polymère B (CX ou XG) (*figure 35 (3)*) sont déposées en alternance sur le support (support de silicium ou cristal de quartz). Les dépôts de A et B sont effectués par le biais des pompes péristaltiques (*figure 36*) sur le support installé dans le spin-coater et dont la mise en route est automatisée. Cinq minutes sont à nouveau nécessaires à l'adsorption du polymère sur le PAH. La rotation du support est ensuite lancée à 60 tr s^{-1} pendant une minute. A la fin du processus, une couche de polymère d'épaisseur uniforme est obtenue. Ce cycle se répète n fois en fonction du nombre n de bicouches (A-B) souhaité (en général de $n=1$ à $n=10$, étant donné qu'une bicouche correspond à une couche de CNC (A) associée à une couche de polymère B. Dans le cas des films où le polymère B correspond au CX, des problèmes d'agrégation de ces derniers lors de la construction des films ont imposé une étape supplémentaire de rinçage à l'eau entre chaque dépôt.



Figure 36. Le spin-coater utilisé (INRA-BIA)

III.2. Caractérisation des films

La mesure des épaisseurs est une étape fondamentale pour comprendre l'architecture des films. Pour cela nous avons utilisé deux techniques : la profilométrie et l'ellipsométrie.

III.2.1. Profilométrie mécanique

La profilométrie mécanique est une technique qui permet d'évaluer la morphologie d'une surface et qui peut également être utilisée pour la détermination de l'épaisseur d'un dépôt (ou film) sur un support. L'élément principal du profilomètre est le palpeur (ou stylet) qui est en contact mécanique avec la surface et balaye celle-ci. Le mouvement vertical du stylet est capté par un système inductif et la variation en hauteur z est enregistrée en fonction du déplacement x (*figure 37*).

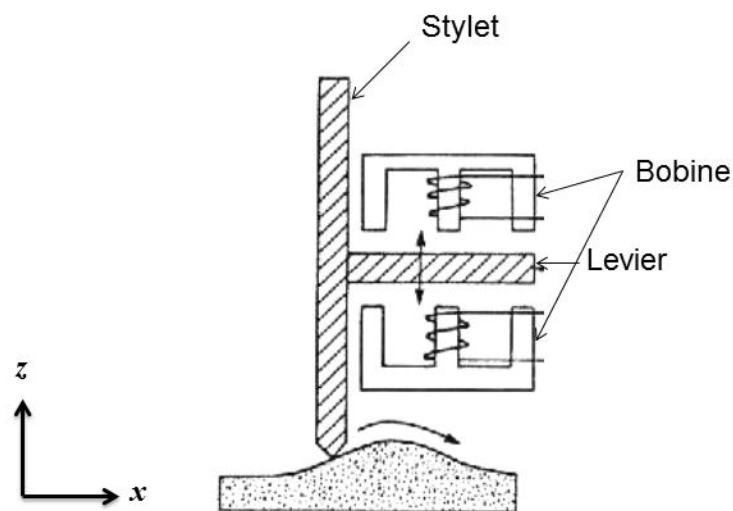
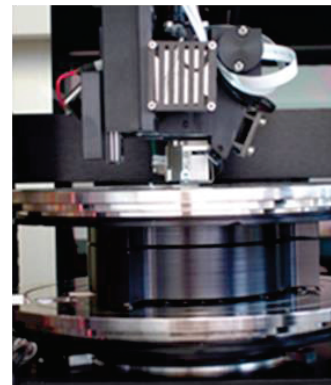


Figure 37. Schéma de fonctionnement d'un profilomètre muni d'un système inductif

Nous avons utilisé un profilomètre DEKTAK 8 (VEECO, Bruker-nano) équipé d'un stylet dont le rayon de courbure est de $2,5\text{ }\mu\text{m}$ (**figure 38**). La résolution verticale de l'appareil est de l'ordre du nanomètre. Pour déterminer l'épaisseur d'un film, on effectue une mesure de type « différence de marche » entre la surface du film et son support après entaille du film à l'aide d'un scalpel. Afin d'évaluer l'homogénéité du film, l'épaisseur est mesurée en trois zones distinctes le long de deux entailles distantes de plusieurs millimètres (soit six mesures différentes par film).



Vue d'ensemble de l'appareil



Vue de la platine porte-échantillon

Figure 38. Profilomètre mécanique Dektak 8, Veeco(Bruker-Nano)(Arizona, TUCSON) de l'Institut des Matériaux de Nantes (IMN)

III.2.2. Ellipsométrie spectroscopique

L'ellipsomètre (**figure 39**) est dédié à la mesure de l'épaisseur d'une ou plusieurs couches dans une gamme de mesure allant de l'angström ($\text{\AA}$) au micromètre (μm), et à la mesure de l'indice optique du matériau.

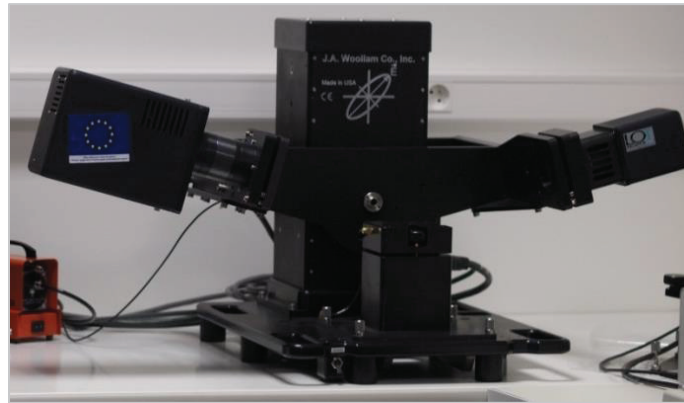


Figure 39. Ellipsomètre spectroscopique M2000U Woollam (Lincoln, USA)

Principe de l'ellipsométrie:

L'ellipsométrie est une technique optique basée sur la mesure de changement d'état de polarisation d'un faisceau de lumière après réflexion sur une surface plane d'un échantillon. En pratique, la quantité mesurée est le rapport entre les coefficients de Fresnel, correspondants aux composantes du champ électrique, r_p (parallèle) et r_s (perpendiculaire) lequel permet de déterminer les angles ellipsométriques Ψ et Δ .

Les paramètres Ψ et Δ représentent respectivement l'amplitude réfléchie du champ ($\tan \Psi$ (rapport relatif des amplitudes)) et Δ la différence de phase après réflexion (Déplacement relatif en phase) (équation 8).

Équation 8

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan(\Psi) e^{i\Delta}$$

Ces paramètres ellipsométriques sont des fonctions complexes de l'angle d'incidence θ , de la longueur d'onde λ , des constantes optiques du substrat (n_s), du milieu ambiant (n_{amb}) et des constantes optiques des couches de surface (n, k), ainsi que des épaisseurs d .

Équation 9

$$(\Psi, \Delta) = f(\theta, \lambda, n, k, d)$$

Le déroulement d'une mesure :

Lors d'une mesure, on enregistre les paramètres Ψ et Δ selon la longueur d'onde (entre 250nm à 1000 nm) et en faisant varier l'angle d'incidence θ (à 65°, 70° et 75°) (**Figure 40a**).

Pour déterminer l'épaisseur et/ou l'indice de réfraction, il est nécessaire de simuler ces courbes ellipsométriques selon le modèle le plus pertinent. Le logiciel de traitement intègre de nombreux modèles adaptés à plusieurs types d'échantillons. Dans notre cas, les échantillons sont des systèmes multicouches de polymères, le modèle de dispersion choisi pour la simulation est donc le modèle de Cauchy (**figure 40b et 40c**) :

Équation 10

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4}$$

Où n est l'indice de réfraction à la longueur d'onde λ et A , B et C sont les coefficients de Cauchy.

(a) Courbe expérimentale

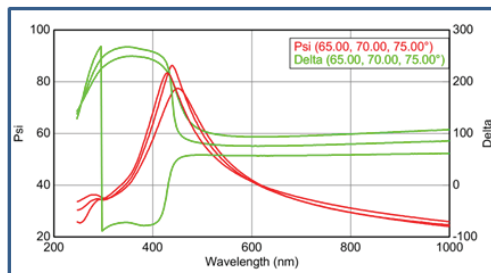
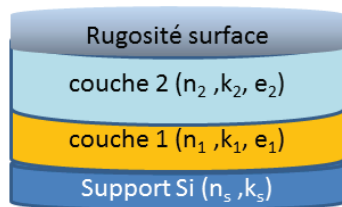


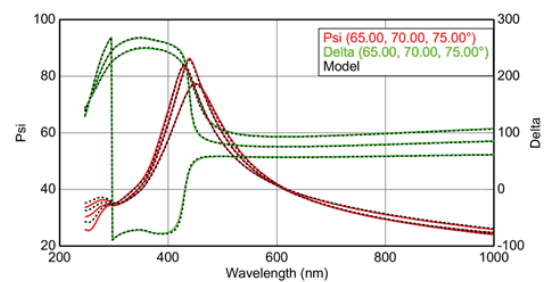
Figure. Angles ellipsométriques, (Ψ , Δ) enregistrés à trois angles d'incidence différents (65, 70 et 75°) dans la gamme de longueur d'onde de 250 à 1000 nm.

(b) Modèle de dispersion de Cauchy



Épaisseurs (e) de la couche
Constantes optiques (n, k)

(c) Courbe simulée selon le modèle Cauchy



Layer Commands: **Add Delete Save**
Include Surface Roughness = **ON** Roughness = **0.35 nm** (fit)
Layer # 2 = **Cauchy** Thickness # 2 = **85.73 nm** (fit)
A = **1.503** (fit) B = **0.00750** (fit) C = **-8.4757E-05** (fit)
k Amplitude = **0.00000** Exponent = **1.500**
Band Edge = **400.0 nm**
Layer # 1 = **SiO2_JAW** Thickness # 1 = **3.71 nm** (fit)
Substrate = **Si_JAW**
Angle Offset = **0.000**
+ MODEL Options
+ FIT Options
+ OTHER Options
Configure Options
Turn Off All Fit Parameters

Figure 40. Les étapes d'acquisition de signal et simulations des données ellipsométriques selon le modèle Cauchy

Pour chaque film, plusieurs mesures des angles (Ψ, Δ) sont réalisées à différents endroits sur la surface des films (6 à 8 spots) et les épaisseurs données correspondent aux moyennes des différentes valeurs d'épaisseurs issues de chaque simulation.

III.2.3. Caractérisation de la morphologie de surface des films CNC-CX par microscopie à force atomique (AFM)

- Principe

L'AFM est basée sur la mesure des forces d'interaction à courte distance des atomes du stylet fin avec ceux de la surface étudiée. La résolution ultime est de l'ordre du dixième de nanomètre.

Les forces d'interactions (attraction ou répulsion) entre l'extrémité du stylet (pointe) et la surface de l'échantillon induisent une flexion et/ou une torsion du levier qui supporte la pointe. Ces mouvements sont mesurés par l'intermédiaire d'un faisceau laser dont la réflexion sur le dos de la pointe vers une photodiode est enregistrée. L'ensemble pointe + levier est assimilé à un ressort qui peut être mis en résonance. Une boucle d'asservissement commandant la hauteur de l'échantillon permet de fixer une des variables (déflexion du levier ou amplitude de déflexion) (*figure 41*).

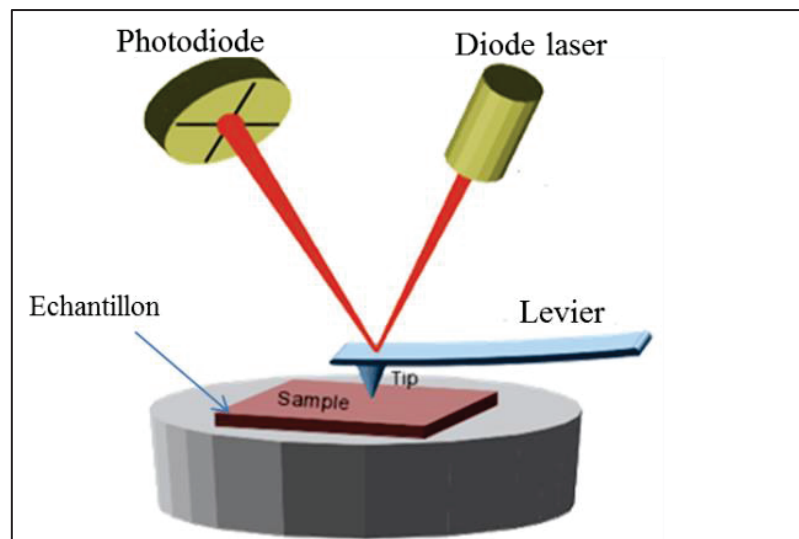


Figure 41. Schéma du principe du microscope à force atomique

En fonction de la variation de la distance entre la pointe et la surface analysée, il existe trois modes d'opération en AFM.

- Le mode contact

La déflexion du levier est fixée de sorte que l'on se situe dans la zone des forces de répulsion. Ce mode est le plus simple à utiliser et donne une très bonne résolution. A très courte distance entre la pointe et l'échantillon, la force totale devient très grande comprenant des forces d'adhésion et de friction. L'endommagement rapide de la pointe (et/ou de l'échantillon) est le principal inconvénient de ce mode. Si on peut se débarrasser des forces d'adhésion en travaillant en milieu liquide par exemple, d'autres modes de mesures (dits modes résonants) ont été développés pour se débarrasser des forces de friction.

- Le mode non-contact

La pointe oscille à la surface de l'échantillon sans jamais entrer en contact avec celui-ci. Dans ce mode, la pointe est placée à une distance correspondant à la zone des forces d'attractions et le levier est mis en résonance par application d'un champ électrique. C'est l'amplitude de déflexion qui est fixée ici et la boucle d'asservissement gère la hauteur de l'échantillon pour que cette amplitude reste constante. Il n'y a donc jamais de contact entre la pointe et l'échantillon. Ce mode n'offre pas une aussi bonne résolution que le mode contact, et il n'est pas souvent utilisé pour les mesures topographiques. En revanche, il permet l'analyse des forces longue portée et peut donc être utilisé de manière complémentaire avec des pointes électriques ou magnétiques.

- Le mode « tapping » (ou contact intermittent)

Le mode tapping ou contact intermittent constitue un compromis entre les modes contact et non contact, dans lequel la pointe vient « toucher » la surface d'un échantillon par intermittence. Il consiste à réguler l'amplitude d'oscillation pour restituer la topographie de l'échantillon. Le contact intermittent de la pointe avec la surface permet de limiter la destruction des surfaces des matériaux mous. Pour cette raison, ce mode est très utile pour l'analyse topographique des échantillons de polymères.

Les mesures sur les surfaces ont été donc réalisées à l'aide d'un AFM multi-mode (Nanoscope IIIa), en procédant en mode « tapping ». Toutes les images ont été obtenues en utilisant une pointe en silicium (PPP-NCHR; Nanosensors, constante de raideur 40 N m^{-1} , fréquence de résonance 297 kHz). Les traitements d'images ont été réalisés avec le logiciel Gwyddion freeware (release 2.26).

III.2.4. Analyse de la structure interne des films par réflectivité des neutrons

Les techniques de réflectivité, en particulier la réflectométrie des neutrons, sont bien adaptées pour caractériser les films multicouches. En effet, la réflectivité des neutrons est une technique non-destructive permettant de mesurer les épaisseurs et la composition chimique d'une ou de plusieurs couches minces sur une surface. Les épaisseurs caractéristiques mesurables lors d'une expérience sont comprises entre 1 nm et 100 nm.

Le principe de mesure consiste à envoyer un faisceau de neutrons en incidence rasante sur la surface du film étudiée et à enregistrer l'intensité réfléchie.

- Interaction neutron-matière

Le neutron est une particule neutre ayant une masse qui n'interagit pas avec les champs électriques dont ceux dus aux électrons. De ce fait, la pénétration dans la matière est très facile même avec des énergies cinétiques faibles. L'interaction neutron-matière est de très courte portée et a lieu directement entre le neutron et le noyau atomique. Elle est variable en fonction des éléments et des isotopes d'une même espèce chimique.

Chaque matériau est caractérisé par une densité de longueur de diffusion N_b (ou indice de réfraction neutronique) qui dépend de sa composition chimique et qui peut être calculée à partir de la relation suivante :

Équation 11

$$N_b = \frac{\sum_i b_i}{V}$$

Où b_i est la longueur de diffusion de l'atome i , et V le volume de la molécule.

Les polysaccharides par exemple, sont composés des mêmes atomes (C, O, H) et vont donc avoir un N_b similaire ($N_{bCNC} : 1,9 \cdot 10^{-6} \text{Å}^{-2}$, $N_{bXG} 1,6 \cdot 10^{-6} \text{Å}^{-2}$)

La substitution isotopique, en particulier d'atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium, modifie la densité de longueurs de diffusion et permet d'une part d'obtenir de forts signaux de réflectivité et d'autre part de mesurer dans une couche mixte le profil de concentration de chaque espèce. En particulier, le remplacement de tout ou d'une partie des atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium d'une molécule modifiera de façon importante son indice de réfraction sans changer ses propriétés physiques globales.

Dans le cas de films composés de CNC et de XG, il est possible de différencier la cellulose du XG en réalisant la deutération des CNC. La cellulose a été deutérée selon le protocole de Nishiyama, et al. (1999) et sa deutération a été contrôlée par spectroscopie FTIR. Le Nb de CNC_d en solution a été déterminé expérimentalement à une valeur de $3,3 \cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$ par la technique de diffusions des neutrons aux petits angles (DNPA) au laboratoire Léon Brillouin (LLB, CEA, Saclay). Cette valeur est très différente de celle de la cellulose hydrogénée ($1,9 \cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$).

- Réflexion des neutrons sur une surface plane

Le vecteur d'onde d'un neutron incident de longueur d'onde λ est défini par :

Équation 12

$$k = \frac{2\pi}{\lambda}$$

Considérons un faisceau de neutrons de longueur d'onde λ et de vecteur d'onde k_i se réfléchissant sur une surface plane avec un angle d'incidence q (**figure 42**).

Cette surface est définie par l'interface entre l'air, d'indice de réfraction $n = 1$, et un échantillon semi-infini d'indice de réfraction n .

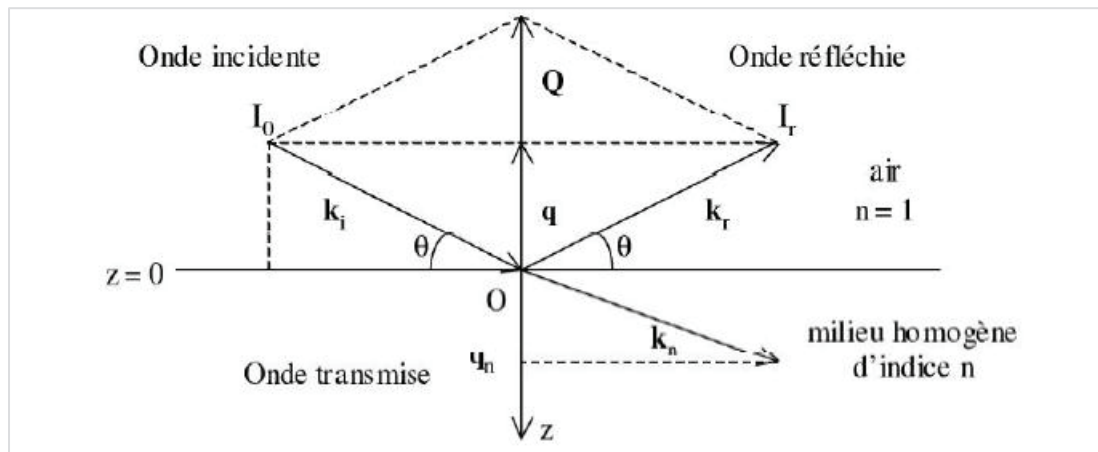


Figure 42. Réflexion d'un faisceau de neutrons sur une surface plane

Le rapport de réflectivité R est défini comme le rapport de l'intensité réfléchie de façon spéculaire (c'est-à-dire selon un angle égal à l'angle d'incidence θ) (I_r) et de l'intensité incidente I_0 :

Équation 13

$$R = \frac{I_r}{I_0}$$

R varie selon le vecteur de diffusion, $\mathbf{Q}$, défini par :

Équation 14

$$Q = k_r - k_i = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$$

Avec k_r vecteur d'onde du faisceau réfléchi.

Q est égal au double de la projection du vecteur d'onde incident k_i sur l'axe (Oz) normal à la surface. Un spectre de réflectivité est donc la représentation de la réflectivité R en fonction du vecteur de diffusion Q . En réflectivité, le vecteur de diffusion Q est souvent remplacé par $q = Q/2$.

- **Réalisation d'une mesure et traitement des données**

Les mesures de réflectivité de neutrons ont été réalisées sur le spectromètre à temps de vol EROS (Etude par Réflectivité de l'Organisation des Surfaces) (**figure 43**) du Laboratoire Léon Brillouin (Cousin, et al., 2011).

La technique de temps de vol utilisée sur ce spectromètre repose sur la relation de De Broglie : comme le neutron a une masse m , il se déplace à une vitesse finie v liée à sa longueur d'onde λ :

Équation 15

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

Avec h la constante de Planck ($6,63 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$).

En pratique, la gamme de longueurs d'onde utilisables va de 3 à 25 Å. Un guide de neutrons amène le faisceau contenant toutes les longueurs d'onde disponibles (faisceau blanc) au niveau du hacheur. Celui-ci permet d'envoyer une impulsion de neutrons en incidence rasante sur l'échantillon avec un angle θ fixé.

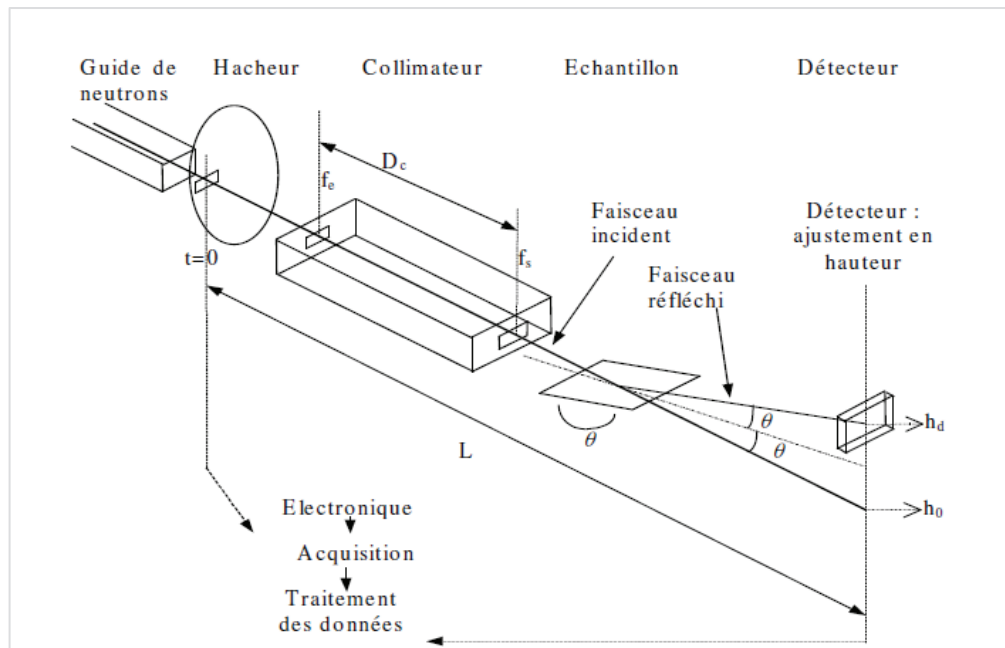


Figure 43. Principe de fonctionnement du spectromètre EROS du Laboratoire Léon Brillouin (LLB), du CEA (Saclay, France) (Cousin, et al., 2011)

Le hacheur est constitué d'un disque de 40 cm de diamètre absorbant les neutrons. Une fenêtre de taille ajustable de largeur 25 mm et de hauteur comprise entre 5 et 40 mm est située à la périphérie du disque.

La vitesse de rotation du hacheur est choisie de telle sorte que les neutrons les plus lents d'une impulsion arrivent sur le détecteur avant les neutrons les plus rapides de l'impulsion suivante. Le faisceau parcourt ensuite un long collimateur sous vide (4 m). La largeur des fentes d'entrée et de sortie de ce collimateur peuvent être ajustées entre 0,5 et 5 mm. Le faisceau incident est ensuite réfléchi par l'échantillon incliné d'un angle θ fixé. L'angle maximum utilisable est de 5° , ce qui permet de couvrir un domaine de vecteurs de diffusion Q de 0,008 à $0,2 \text{ \AA}^{-1}$. La plupart des expériences sont réalisées en utilisant un seul angle de mesure même si deux sont parfois nécessaires (1° et 4° par exemple). Le faisceau réfléchi est mesuré à l'aide d'un détecteur à Hélium 3 (^3He).

Le principe de réglage est simple : un angle de travail est choisi de telle façon qu'une partie du faisceau soit en réflexion totale sur la gamme de longueurs d'onde utilisable. La position verticale du détecteur est ajustée en conséquence, pour détecter le faisceau de neutrons réfléchis. On fait ensuite pivoter l'échantillon pour obtenir le maximum d'intensité réfléchie.

Nos expériences ont été réalisées en utilisant deux angles de mesure qui couvrent un domaine de vecteurs de diffusion Q de 0,008 à $0,1 \text{ \AA}^{-1}$: $0,93^\circ$ et 2° pour nos échantillons qui sont de type air/solide.

Les expériences de réflectivité de neutrons durent en moyenne 6 h (2 h pour la mesure au premier angle et 4 h pour la mesure au deuxième angle) pour obtenir un résultat significatif.

A l'aide du logiciel *refit* développé au LLB, il est possible d'ajuster numériquement une courbe calculée à la courbe expérimentale en utilisant un modèle constitué de n couches.

Les paramètres d'ajustement sont les épaisseurs et les densités de longueur de diffusion de chaque couche ainsi que les rugosités à chaque interface (*figure 44*).

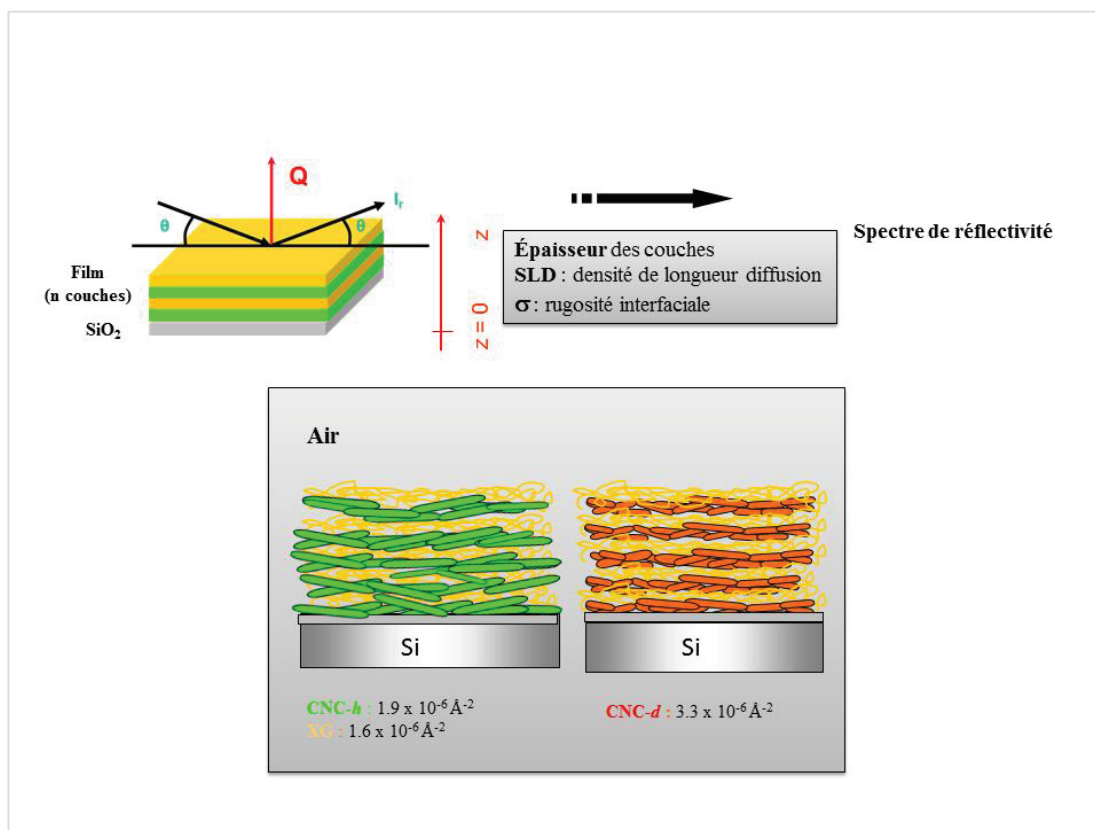


Figure 44. Schéma récapitulatif du principe de la mesure de réflectivité des neutrons sur les films multicouches (CNC-XG) avec soit le CNCh, soit le CNCd. Un spectre de réflectivité est superposé à la courbe expérimentale en utilisant un modèle constitué de n couches et en se basant sur les paramètres d'ajustement (épaisseur e , densité de longueur de diffusion Nb , et la rugosité σ du film)

III.3. Caractérisation de la dégradation enzymatique

III.3.1. Mesure d'activités enzymatiques par dosage d'extrémités réductrices

Les enzymes utilisées sont des enzymes commerciales et chacune d'entre elles possède une activité testée par le fournisseur dans les conditions optimales de température et de pH.

En revanche, les conditions de nos manipulations sont éloignées des conditions optimales et il a donc été nécessaire de mesurer l'activité de la Cellulyve^{TR}, la xylanase et la xyloglucanase sur les substrats utilisés dans ce travail, c'est à dire les CX, CNC et XG.

Ces activités ont été mesurées par dosage des extrémités réductrices libérées par la méthode de Nelson (Nelson, 1944).

L'hydrolysate est mis en présence d'ions cuivriques Cu^{2+} qui vont réagir avec le groupement pseudo-aldéhydique des extrémités réductrices pour former des ions cuivreux Cu^+ . Ces derniers réagissent avec le réactif arsénio-molybdique pour donner une coloration bleue dont l'absorbance (ou densité optique (DO)) est proportionnelle à la quantité d'oses réducteurs.

Pour rappel, l'activité enzymatique est exprimée en katal, qui correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse l'apparition d'une mole de produit par seconde.

Le dosage de Nelson se déroule en deux étapes :

- La détermination d'une droite d'étalonnage qui établit la valeur de DO mesurée en fonction de la concentration en extrémités réductrices. Cette étape est réalisée sur le monomère dont l'extrémité réductrice est libérée par l'enzyme, c'est à dire le glucose dans le cas des XG et CNC, et le xylose dans le cas des CX. Les gammes sont réalisées jusqu'à une concentration en monomère de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- Le dosage des activités des enzymes sur des substrats polysaccharidiques.

La droite d'étalonnage obtenue permet de déterminer le nombre d'extrémités réductrices libérées (donc les coupures effectuées par l'enzyme) sur chaque intervalle de temps. Cette donnée correspond à l'activité de la solution enzymatique testée et permet de calculer l'activité chaque enzyme, xylanase, Cellulyve^{TR} et xyloglucanase.

Conditions expérimentales :

Pour chaque réaction enzymatique, un volume de solution enzymatique de $50 \mu\text{l}$ a été incubé avec $450 \mu\text{L}$ d'une solution de substrat pendant 10 minutes.

Pour le dosage de l'activité de la xylanase sur le CX, la solution commerciale au 1/800 a été incubée avec une solution de CX à 1 mg mL^{-1} dans le tampon acétate (10 mM, pH 5,0) à 40°C . Pour le dosage de l'activité de la Cellulyve^{TR}, l'enzyme, ayant une concentration de

1,3 mg mL⁻¹ a été incubée avec une suspension de CNC à 5 mg mL⁻¹ ou avec une solution de xyloglucane à 1 mg mL⁻¹. Les dosages de la Cellulyve^{TR} sont réalisés à 20°C ou à 50°C (température optimale de l'enzyme). Enfin, l'activité xyloglucanase a été mesurée par une incubation de l'enzyme (solution commerciale diluée au 1/200) avec une solution de xyloglucane à 1 mg mL⁻¹ et à une température de 20°C ou à 40°C. Pour chaque cas, les enzymes inactivées, par chauffage dans un bain marie à 100°C pendant cinq minutes, ont été utilisées comme contrôles négatifs. Les mesures de DO sont alors effectuées et les activités enzymatiques sont déterminées à partir des courbes étalons.

La DO est mesurée sur un lecteur de plaques (Multiskan EX, ThermoElectron Corporation) à 600 nm. L'activité enzymatique est calculée comme suit :

$$\alpha = \frac{\Delta DO}{p} \times \frac{V_{reac}}{V_{ess}} \times \frac{d}{t} \times 1000$$

Avec- α : activité enzymatique en nkat mL⁻¹

- ΔDO : différence de densité optique entre l'échantillon et le blanc

- p : pente, exprimée en μmol ;

- V_{reac} : volume total du milieu réactionnel (μL)

- V_{ess} : volume de la prise d'essai d'enzyme (μL)

- t : temps d'incubation, exprimé en secondes

- d : dilution éventuelle de l'enzyme

La variation de DO minimum acceptable par rapport à la précision du dosage est de 0,1, correspondant à une activité d'environ 3 nkat mL⁻¹

III.3.2. Détection d'activités enzymatiques à partir des films multicouches

L'activité d'une enzyme sur un film multicouche déposé sur un support solide peut être détectée visuellement.

Pour cela, les films ont été d'abord réalisés par « spin-coating » (CNC-CX ou CNC-XG). Les solutions enzymatiques sont réalisées à partir de préparations commerciales diluées aux concentrations choisies dans le tampon acétate. Les tests sont réalisés à température ambiante. Deux μL de chaque solution enzymatique sont déposés sur les films qui sont ensuite rincés à l'eau ultrapure et séchés. L'hydrolyse est mise en évidence par changement de couleur du film (Cerclier and Cathala, 2010).

III.3.3. Etude de la dégradation enzymatique par Microbalance à cristal de quartz avec dissipation (QCM-D)

La microbalance à cristal de quartz avec dissipation, ou QCM-D, permet la quantification d'une masse de l'ordre du ng cm^{-2} déposée sur un cristal de quartz. Dans ce travail, un film multicouche (XG-CNC) a été déposé sur le cristal de la balance par « spin-coating ».

Le principe de la QCM repose sur les propriétés piézo-électriques du cristal quartz. Sous l'application d'une différence de potentiels électriques générée par les électrodes d'or, le quartz va se déformer et la contrainte mécanique subie va générer l'apparition d'oscillations électriques (d'une polarisation à ses bords). Le cristal après excitation entre alors en résonance (mécanique) à sa fréquence fondamentale (5 MHz).

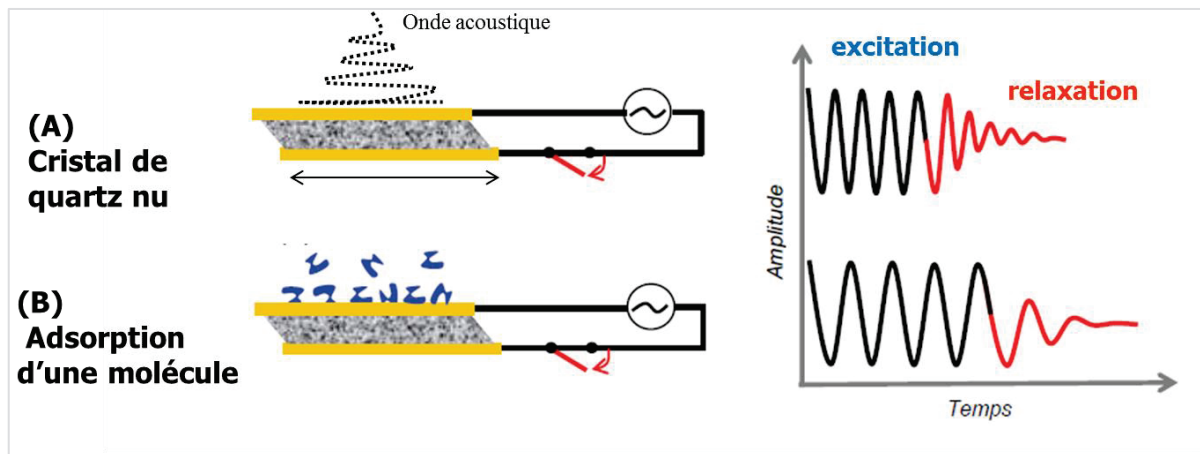
L'excitation du cristal est imposée sur une durée très brève (quelques μs) et dans un domaine de fréquences proche de la fréquence de résonance du cristal.

Après l'arrêt de l'excitation, pour chaque résonance ($v = 1, 3, 5, 7$), le cristal oscille librement à une fréquence de résonance proche de la fréquence d'excitation du cristal. Cette fréquence prend successivement la valeur de la fréquence fondamentale de résonance de la lame (5 MHz) et ses harmoniques (15, 25 et 35 MHz).

Pendant une mesure, on enregistre en continu, l'amplitude de ces oscillations et donc la variation de la fréquence de résonance du cristal (*figure 45*).

Le cristal au contact avec le tampon mis sous tension oscille à sa fréquence de résonance (courbe noire, *figure 45*). Après coupure de l'excitation électrique, l'oscillation est amortie (courbe rouge, *figure 45*).

Lors du dépôt d'objets (en bleu sur la **figure 45(B)**) sur le cristal et pendant la mise sous tension, la fréquence de résonance du cristal diminue (courbe noire figure 44). Après coupure de l'excitation, on observe un amortissement plus rapide dû à la dissipation d'énergie supplémentaire par rapport à la situation illustrée à la **figure 45(A)**, engendré par le dépôt qui se comporte comme un milieu viscoélastique.



Le quartz est considéré comme un système oscillatoire mécanique avec une fréquence de résonance f_r (exprimée en Hertz). L'équation 16 de la fréquence de résonance du cristal de quartz est :

Équation 16

$$f_r = \frac{1}{2\pi} \times \sqrt{\frac{K}{M}}$$

Avec K : constante de raideur (ng/s²) et M : masse du quartz nu (ng)

Après dépôt d'une masse (m) sur la surface du cristal de quartz, l'amplitude de la fréquence diminue (**figure 45B**). La fréquence de résonance f (Hz) du quartz devient :

Équation 17

$$f = \frac{1}{2\pi} \times \sqrt{\frac{K}{M+m}} = f_r \left(1 - \frac{m}{2M}\right)$$

La QCM-D permet donc de calculer la variation de la fréquence avant et après dépôt de cette masse sur la surface du quartz suivant l'équation de Sauerbrey:

Équation 18

$$\Delta f = f - f_r = -\frac{m}{C}$$

ΔC : Constante de Sauerbrey (17,7 ng/cm²/Hz) avec $m \ll M$

En QCM-D, la fréquence de résonance fondamentale f_l est enregistrée ainsi que les fréquences harmoniques, f_n avec $n=3, 5, 7, \dots$

Ainsi, pour calculer la masse déposée sur le cristal de quartz à partir des fréquences harmoniques, l'équation de Sauerbrey s'écrit :

Équation 19

$$\Delta m = -C \frac{\Delta f_n}{n}$$

D'après l'équation de Sauerbrey, la diminution de la fréquence traduit un gain de masse alors que l'augmentation de la fréquence traduit une perte de la masse de la surface du quartz.

Entre chaque excitation du cristal de quartz, les oscillations diminuent (signaux en rouge, *figure 45*) correspondant à l'amortissement du signal. Cette diminution est traduite par la mesure du facteur de l'énergie de dissipation D ($\times 10^{-6}$), qui est un paramètre sans dimension.

Le facteur d'énergie de dissipation D traduit l'état d'« élasticité » du matériel déposé sur le cristal de quartz. La dissipation nous donne des informations qualitatives sur la variation « physique » de la masse déposée. Par exemple, aucune variation du facteur de dissipation ne sera observée pour un film rigide et fin tandis qu'une augmentation du facteur de dissipation sera observée si le film gonfle en solution.

- Mode d'utilisation de la QCM-D

L'appareil QCM-D que nous avons utilisé (QSense AB, Göteborg, Suède) possède une chambre avec 4 cellules QCM (*figure 46*).

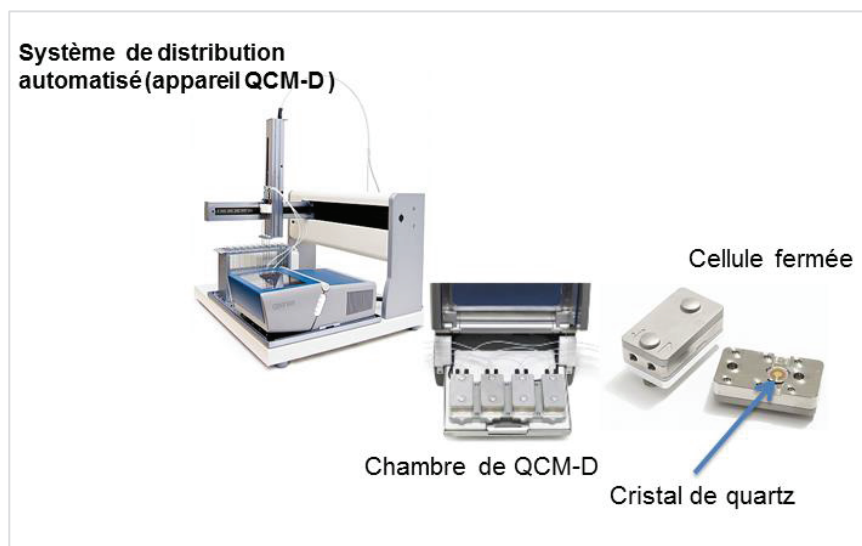


Figure 46. Appareil de QCM-D E4 AUTO de la marque QSense (Q-Sense AB, Göteborg, Suède)

La chambre de QCM-D est reliée au logiciel QSoft qui permet d'enregistrer en temps réel les variations de fréquence et de dissipation que subit le cristal de quartz dans la cellule.

La QCM-D peut être utilisée selon trois modes.

Le mode en flux continu : une solution est injectée en flux contrôlé en continu dans la cellule QCM

Le mode « batch » : la cellule QCM est remplie en flux continu contrôlé avant de stopper le flux

Le mode statique : la solution est déposée et enlevée manuellement sur la surface du quartz dans la cellule ouverte.

Pour suivre *in situ* la dégradation enzymatique de films de polysaccharides, nous avons utilisé la QCM-D en mode statique (avec utilisation du module ouvert) et le schéma suivant décrit les étapes de l'expérience (*figure 47*).

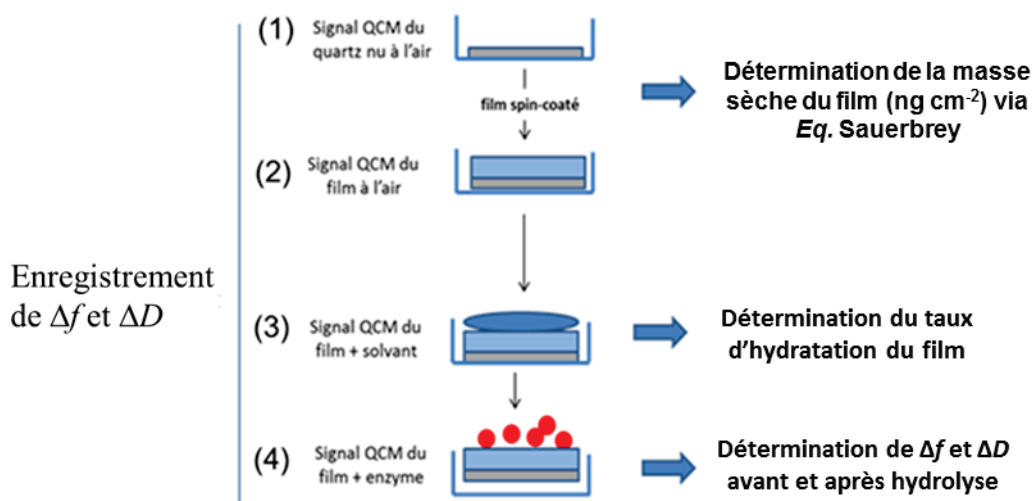


Figure 47. Étapes de l'étude de la dégradation enzymatique des films par QCM-D en mode statique « ouvert »

La figure 47 décrit la manipulation en 4 étapes :

Δf du quartz nu : Installation du cristal de quartz nu dans la cellule ouverte QCM et enregistrement de sa fréquence et sa dissipation.

Δf du quartz + film : le film est déposé par « spin-coating » sur le cristal de quartz avant installation dans la cellule QCM et les variations de la fréquence et de la dissipation sont enregistrées.

Δf du quartz + film gonflé dans la solution tampon : un volume de 45 μ l de tampon acétate est déposé sur le film, provoquant le gonflement du film. Les variations de la fréquence et de la dissipation du film hydraté sont enregistrées.

Δf du quartz + film en présence des enzymes : un volume de 5 μ l d'enzymes Cellulyve^{TR} ou xyloglucanase est déposé. Les variations de la fréquence et de la dissipation du quartz sont enregistrées.

Les expériences sont réalisées à la température de la pièce (environ 20-21°C).

- Détermination des paramètres QCM

Les masses surfaciques sont déterminées à partir des changements en fréquence correspondant à chaque étape spécifique du protocole de mesure (**figure 48**) :

- La masse du film déposée sur la surface du quartz $\Delta m_{film\ sec}$ avant hydrolyse et à sec ; (étape 2, **figure 47**) déterminée à partir de $\Delta f_{film\ sec}$.

- La masse de prise d'eau est $\Delta m_{eau} = \Delta m_{film\ hydraté} - \Delta m_{film\ sec}$ et correspond à l'étape d'hydratation du film (étape 2-3, **figure 47**) : $\Delta f_{eau} = \Delta f_{film\ hydraté} - \Delta f_{film\ sec}$

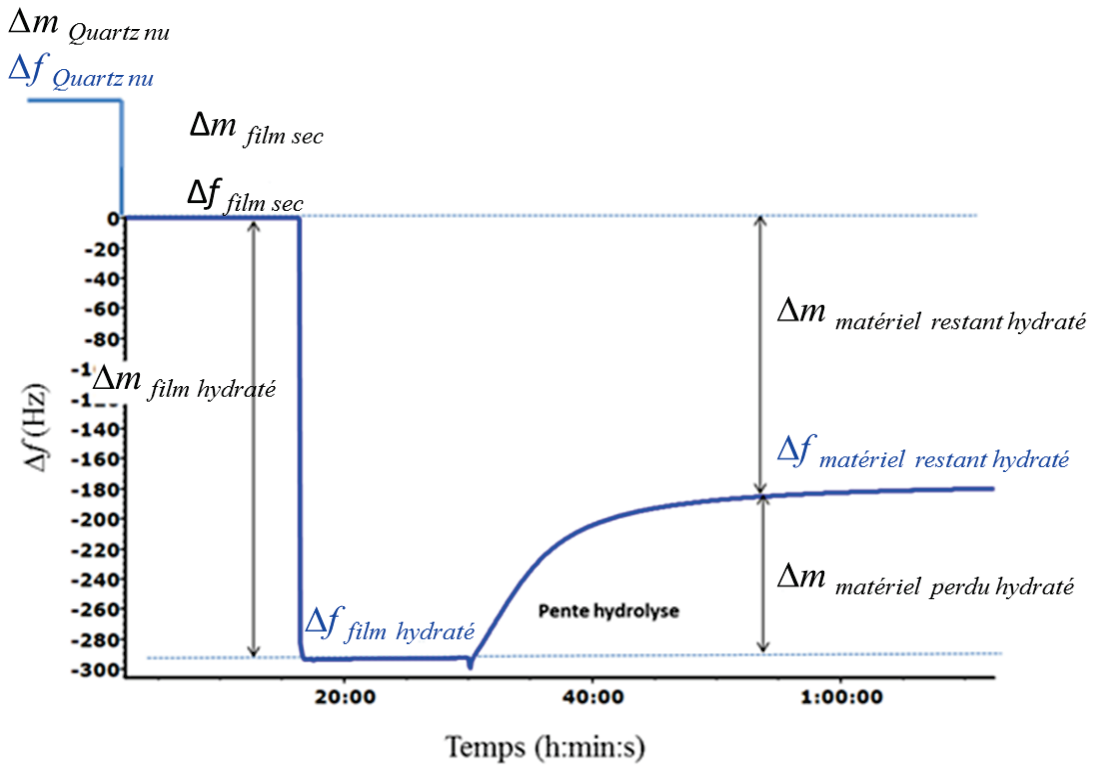


Figure 48. Différents paramètres QCM-D, déterminés à chaque étape de l'expérience. Les fréquences déterminées à partir du profil QCM-D sont les suivantes : $\Delta f_{\text{film sec}}$: fréquence entre le quartz nu et le quartz recouvert du film, $\Delta f_{\text{film hydraté}}$: fréquence après ajout du tampon sur le film, $\Delta f_{\text{film restant hydraté}}$: fréquence après hydrolyse du film. Les Δm sont les concentrations surfaciques (ng cm^{-2}) du matériel pris ou perdu à la surface du quartz et peuvent être estimées à partir de l'équation de Sauerbrey (équation 19)

Les variations de fréquence déterminées précédemment nous permettent de déterminer le taux d'hydratation des films.

$$\begin{aligned} \text{\%hydratation des films} &= [(\Delta f_{\text{film hydraté}} - \Delta f_{\text{film sec}}) / \Delta f_{\text{film hydraté}}] \times 100 \\ &= (\Delta f_{\text{eau}} / \Delta f_{\text{film hydraté}}) \times 100 \end{aligned}$$

L'étape d'hydrolyse (étape 3-4, **figure 47**) suivi jusqu'à la fin du processus (l'obtention de plateau) permet de mesurer $\Delta f_{\text{matériel perdu hydraté}}$ et déduire $\Delta f_{\text{matériel restant hydraté}}$

- La masse du matériel restant hydraté $\Delta m_{\text{matériel restant hydraté}}$ est ainsi calculée comme étant $\Delta m_{\text{film hydraté}} - \Delta m_{\text{matériel perdu hydraté}}$

$$\% \text{ perte du matériel hydraté} = (\Delta m_{\text{matériel perdu hydraté}} / \Delta m_{\text{film hydraté}}) * 100.$$

III.4. Méthodes utilisées pour l'analyse des complexes CNC-XG

III.4.1. Isotherme d'adsorption

Les isothermes d'adsorption du complexe XG/CNC en suspension ont été établis. Cette méthode permet d'évaluer la quantité de XG adsorbée sur la surface de CNC. Pour cela, on détermine la concentration d'une solution de XG avant et après incubation avec les CNC pendant 18h à 20°C.

Ces isothermes d'adsorption représentent les variations de la quantité de XG adsorbé, normalisée à la masse sèche de CNC, en fonction de sa concentration en solution à l'équilibre.

Le déroulement de l'expérience est représenté dans la figure ci-dessous :

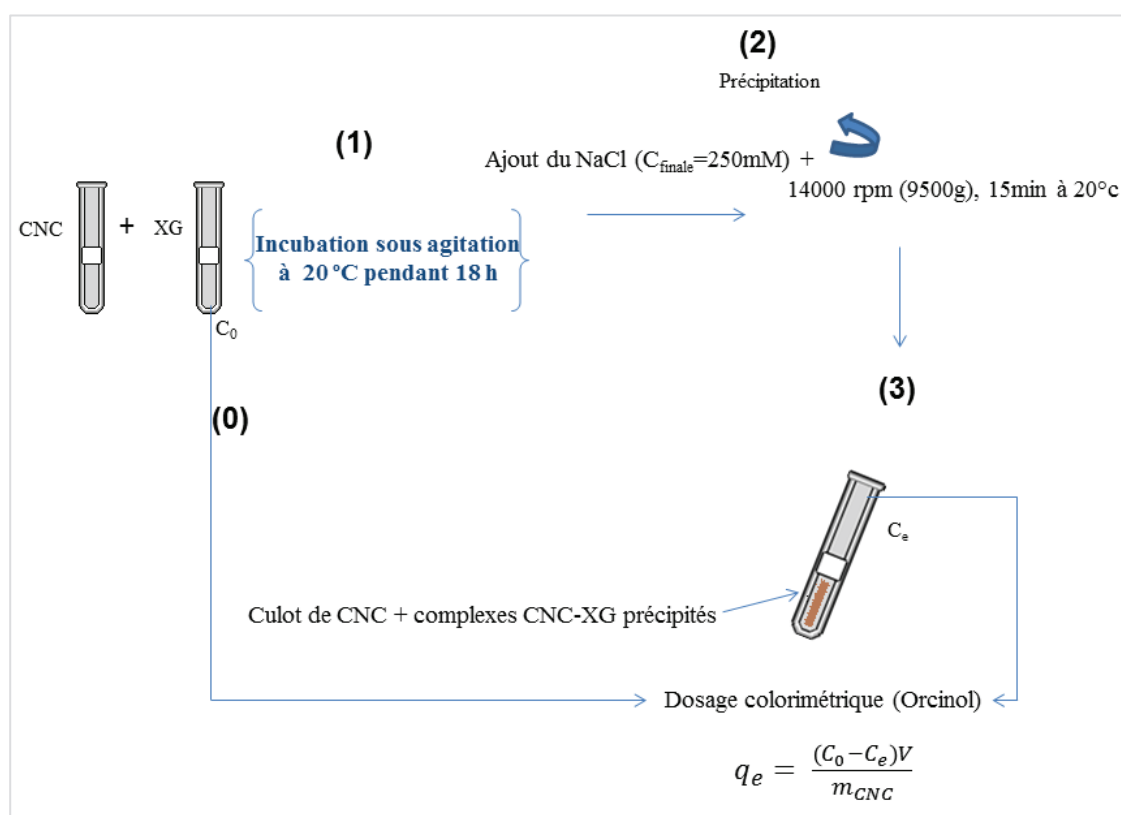


Figure 49 . Schéma illustrant la détermination d'un point d'un isotherme d'adsorption

Un mL de CNC (5 mg mL^{-1}) est mélangé avec 1 mL de XG à différentes concentrations entre $125\text{-}1250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Le mélange est incubé sous agitation continue à 20°C pendant 18h. Les XG libres (non associés aux CNC) sont isolés par précipitation des complexes XG-CNC par l'ajout d'une solution de NaCl à une concentration finale de 250 mM et centrifugation à 9500 g pendant 15 min. Les oses neutres totaux présents dans le surnageant sont ensuite quantifiés par dosage colorimétrique à l'orcinol (Tollier and Robin, 1979). La quantité de matériel adsorbé (q_e) est calculée à partir de la différence entre les quantités initiales dosées de XG (avant adsorption sur les CNC) et les quantités retrouvées dans les surnageants. Un contrôle négatif est réalisé avec des CNC sans XG ajoutés. Chaque point de l'isotherme a été répété 3 fois.

III.4.2. Analyse des produits de dégradation enzymatique des complexes CNC-XG par chromatographie haute performanced'échangéd'anions (HPAEC)

La quantification des oligomères solubilisés au cours de la dégradation enzymatique *in vitro* des films multicouches (CNC-XG) ou des assemblages modèles XG/CNC a été réalisée par HPAEC.

- Préparation des échantillons issus de la dégradation enzymatique **des films CNC-XG**

Sur les films multicouches (CNC3-XG1)₅ et (CNC5-XG1)₅ préalablement construits par la technique d'assemblage couche par couche assistée par « spin-coating » sur surface de silicium, un volume de 800 µL de xyloglucanase (12,1 nkat mL⁻¹) est utilisé pour recouvrir la surface du film et incubé pendant 2 h à 20°C dans des conditions saturantes en eau pour éviter le séchage du dépôt de la solution enzymatique. L'hydrolysate est ensuite récupéré et un rinçage du film est effectué avec 100 µL d'eau ultrapure pour récupérer toute la matière désorbée de la surface. Le film est finalement séché sous un flux d'azote afin de visualiser la couleur finale obtenue après dégradation. La couleur initiale (marron foncé) disparaît traduisant une perte, suite à l'hydrolyse enzymatique, du film adsorbé à la surface de Silicium.

- Préparation des échantillons issus de la dégradation enzymatique des **complexes XG/CNC en suspension**

L'hydrolyse enzymatique des assemblages XG/CNC, préalablement préparés *in vitro* ou de la solution XG seule (expérience référence) a été réalisée.

Pour les assemblages CNC-XG, deux expériences différentes d'hydrolyse ont été réalisées de manière indépendante, sur les différents mélanges XG/CNC préalablement préparés. Toutes les expériences d'hydrolyse ont été menées dans les mêmes conditions de température (20°C), temps (18h), rapport enzyme/substrat ...

Dans un premier cas, après hydrolyse enzymatique, les milieux d'incubation sont précipités en présence de 250 mM de NaCl et puis centrifugés (15 min, 9500g à 20°C) afin d'éliminer les complexes XG/CNC et les CNC non recouverts. Le surnageant contenant les produits d'hydrolyse est récupéré. Les produits d'hydrolyse correspondent aux oligomères issus des XG libres et des XG associés aux CNC mais accessibles à la dégradation (chaînes de XG sous forme de boucles et queues).

Dans un deuxième cas, les mélanges XG/CNC sont immédiatement précipités avec 250 mM NaCl et ensuite centrifugés (15 min, 9500 g à 20°C) afin d'éliminer les XG/CNC et les CNC non recouverts. Les surnageants ne contiennent alors que le XG libre. Ils sont incubés en présence de la xyloglucanase et les hydrolysats obtenus ne contiennent alors que les oligomères issus de la dégradation enzymatique du XG libre.

Pour ces deux expériences, les surnageants récupérés sont chauffés à 100°C pendant 10 min pour arrêter l'activité enzymatique et puis filtrés sur une membrane de 0,45 µm (Millipore, MA, USA). Les XGOs produits par l'hydrolyse enzymatique des XG, sont séparés et quantifiés par HPAEC.

Pour l'hydrolyse de XG seuls en solution, une incubation avec l'enzyme a été menée dans les mêmes conditions décrites précédemment (18h à 20 °C). L'inactivation de l'enzyme a été également réalisée par chauffage à 100°C pendant 10 min. L'hydrolysate est ensuite analysé pour son contenu en XGOs issus de la dégradation enzymatique de XG, qui correspondent à la quantité de XG totaux hydrolysés. Celle-ci a été ensuite utilisée comme référence pour estimer le rendement des fractions XG hydrolysées dans les deux autres expériences.

- Analyse des hydrolysats par HPAEC

Les oligomères présents dans les hydrolysats enzymatiques ont été séparés et quantifiés par HPAEC à l'aide d'une pompe ICS-3000 (Dionex, Sunnyvale, USA) équipée d'un échantillonneur automatique AS 3500 (Thermo Separation Products, USA) et d'un détecteur électrochimique ED 50A (Dionex, Sunnyvale, Etats-Unis) travaillant en mode ampérométrie. Un aliquote de 20 μL des différents surnageants obtenus a été injecté sur une colonne analytique Carbopac PA-200 (3 x 250 mm, Dionex, Sunnyvale, USA) thermostatée à 25 °C à l'aide d'un four Croco-cil (Cil Cluzeau Infos Labo, France) et équipée d'une colonne de garde Dionex Carbopac PA-200 (3 x 50 mm). La séparation des XGOs libérés a été effectuée à un débit de 0.45 mL min^{-1} dans des conditions isocratiques en utilisant comme éluant de la soude 100 mM contenant de l'acétate de sodium 40 mM. Un logiciel de Chromatographie (Chromeleon, Dionex) a été utilisé pour commander le chromatographe et pour collecter et traiter les données. Un mélange commercial de XGOs (XXXG, XXLG et XLLG, Mégazyme) est préparé à $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ et $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ et est ensuite utilisé comme étalon pour la quantification des oligomères issus des réactions enzymatiques.

III.4.3.Observation en MET des complexes (CNC-XG) avant et après immunomarquage des XG

- Préparation des échantillons pour l'observation MET

Les mélanges XG/CNC à deux rapports de concentration (XG/CNC à $25\text{ }\mu\text{g XG mg}^{-1}\text{ CNC}$ et $250\text{ }\mu\text{g XG mg}^{-1}\text{ CNC}$) sont préparés comme il a été déjà indiqué dans le paragraphe III.4.1 concernant l'isotherme d'adsorption.

Après centrifugation (15 min, 9500 g à 20°C), le surnageant contenant des XG libres (qui n'interagissent pas avec les CNC) sont récupérés et les culots contenant les complexes XG/CNC sont préparés pour les observations en MET.

Trois lavages des culots ont été effectués avec 250mM NaCl selon les mêmes conditions de centrifugation et chaque surnageant est récupéré.

Le culot est re-dispersé dans l'eau ultrapure. La suspension XG/ CNC obtenue est dialysée utilisant une membrane Cellu Sep ($0,32 \text{ mL cm}^{-1}$).

La coloration négative pour l'observation des complexes au MET a été réalisée comme décrit précédemment dans le paragraphe I.3.

- Immunomarquage et observations en MET

Une fois la suspension déposée, la grille carbonée (Electron Microscopy Sciences, Hatfield UK) est incubée pendant 30 min à température ambiante dans une solution de Sérum-albumine bovine 3% (w/v) dans 0,1 M d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 7.2) afin de bloquer tout marquage non-spécifique. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps monoclonal primaire produit chez le rat, anti-XG(LM15, Plant Probes, dilué à 1:5) dans le tampon PBS-Tween (0,1 M PBS supplémenté avec 1% BSA et Tween 20 0,05 %), pendant 1h à température ambiante.

Les grilles sont rincées abondamment dans le tampon PBS-Tween et ensuite incubées 1h à température ambiante à l'obscurité avec un anticorps secondaire de chèvre, anti-anticorps de rat conjugué à des particules d'or colloïdal de 1 nm (Biovalley), dilué au 1:20 (v/v) dans le tampon PBS-Tween. Le marquage est ensuite amplifié à l'argent (Aurion, 30 min). Les grilles sont enfin observées en MET sur un microscope JEOL JEM 1230 avec une tension d'accélération de 80 Kv.

CHAPITRE III.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre nous présentons les résultats obtenus au cours de ma thèse. Mon projet a porté sur le développement de films multicouches incorporant des polymères ou des assemblages végétaux allant de la fabrication jusqu'à leur application à la détection et l'étude d'activités enzymatiques.

Trois phases ont été nécessaires au déroulement de ce projet :

La première phase concerne l'élaboration des films : Cette partie englobe les essais de construction et de caractérisation de leurs architectures : les couches semi-réfléctives ont été élaborées par le biais de la méthode d'assemblage couches par couche assistée par « spincoating ». Deux systèmes ont été étudiés. Le premier porte sur des films multicouches à base de CNC et de CX et le second sur des films à base de CNC et de XG. L'architecture des couches a été étudiée par des méthodes d'analyse de surfaces (ellipsométrie, profilométrie mécanique, AFM, réflectivité des neutrons).

La deuxième phase est destinée à comprendre le comportement d'adsorption des XG sur des CNC en suspension. L'analyse par HPAEC des fragments issus de l'hydrolyse enzymatique des complexes permet de comprendre l'architecture de ces derniers en fonction de la proportion relative de chaque partenaire. La compréhension de l'architecture de ces assemblages en suspension permettrait d'aider par la suite à mieux comprendre la susceptibilité du substrat à l'hydrolyse enzymatique sur les films.

La troisième phase est une étude préliminaire sur la comparaison de l'effet de la différence d'architecture de films multicouches sur l'hydrolyse enzymatique. Cette étude a été effectuée par comparaison des tests visuels, quantification des produits d'hydrolyse par HPAEC et suivi *in situ* de la dégradation enzymatique par QCM-D.

Les trois phases sont complémentaires et permettent une appropriation plus complète des différents concepts physico-chimiques mis en jeu quant à l'organisation des polymères au sein des films ou à leur susceptibilité à la dégradation enzymatique.

I. Elaboration de films multicouches à base des nanocristaux de cellulose et des xylanes cationiques : application à la détection enzymatique (article n° 1)

Contexte et objectif

Cette partie s'intègre dans le premier volet de la thèse centré sur l'élaboration de films multicouches à base de polymères de la paroi végétale, cellulose et hémicelluloses. Ces films sont destinés à l'application comme substrats modèles pour la détection d'activités enzymatiques.

Il a été déjà montré que la construction de films multicouches à base de CNC et XG donne lieu à des films stables, homogènes et avec une faible rugosité (Cerclier, et al., 2010; Cerclier, et al., 2011; Jean, et al., 2009). Ces constructions sont établies grâce aux affinités naturelles entre ces deux biopolymères via des liaisons hydrogène et des interactions de type van der Waals. Par contre, la construction de films multicouches à base de xylanes et de cellulose pose des problèmes, notamment liés à la forte tendance des xylanes à s'auto-agréger.

Dans cet article, nous exploitons les propriétés physicochimiques d'arabinoxylanes modifiés chimiquement par le greffage de motifs cationiques, préparés par Katrin Schwikal et ses collaborateurs (Schwikal, et al., 2005; Schwikal, et al., 2011) afin de pouvoir élaborer des films multicouches à base d'interactions électrostatiques entre les charges positives portées par les CX et les charges négatives des CNC.

L'objectif de ce travail est donc d'établir la preuve du concept de la fabrication des films multicouches à base de CNC-CX aussi bien que le concept de leur application comme détecteurs d'activités enzymatiques notamment de l'activité xylanase.

Abir Dammak, Céline Moreau, Nadège Beury, Katrin Schwikal, Heiko T. Winter, Estelle Bonnin, Bodo Saake and Bernard Cathala*

Elaboration of multilayered thin films based on cellulose nanocrystals and cationic xylans: application to xylanase activity detection

Abstract: Multilayered thin films have been prepared by means of the “spin-assisted electrostatic layer-by-layer self-assembly” method, in which cellulose nanocrystals (CN) and cationic xylans (CX) are alternatively deposited up to 10 times on a rotating silicon wafer. The film growth process was studied and the thickness increment was found to be equal to 23 nm per bilayer. This value is relatively high in comparison with that of previous studies. Atomic force microscopy revealed that the surface of the films consists of thick layers of CX, which are deposited as a compact network of aggregates on the CN layers. After a few deposition cycles, structural color appears. When the film is submitted to enzymatic hydrolysis of xylans, the thickness of the film decreases and a visible color change is induced. The sensitivity of the test was evaluated in comparison with a usual colorimetric measurement, which relies on the detection of reducing sugars set free by enzymatic hydrolysis. The assay sensitivity was found to be similar to that of the colorimetric method. The presented new method is simple, fast, and easy to use. These findings show that the method based on multilayer thin films might open new opportunities to optimize the screening assays for xylanase discovery.

Keywords: cationic xylans, cellulose nanocrystals, enzyme activity detection, multilayered thin films, semi-reflective properties

*Corresponding author: Bernard Cathala, INRA, UR1268

Biopolymères, Interactions et Assemblages, rue de la Géraudière BP 71627, Nantes 44316, France, e-mail: bernard.cathala@nantes.inra.fr

Abir Dammak, Céline Moreau, Nadège Beury and Estelle Bonnin: INRA, UR1268 Biopolymères, Interactions et Assemblages, 44300 Nantes, France

Katrin Schwikal: Thuringian Institute of Textile and Plastics Research, Rudolstadt, Germany

Heiko T. Winter: Institute of Forest Utilization and Work Science/ Freiburg Materials Research Center (FMF), University of Freiburg, Werthmannstraße 6, 79085 Freiburg, Germany

Bodo Saake: Chemical Wood Technology, University of Hamburg, Leuschnerstr. 91B, 21031 Hamburg, Germany

Introduction

Hemicelluloses are the most abundant renewable polysaccharides after cellulose, and xylans are the major hemicellulosic components of the plant cell wall (Fengel and Wegener 1989). One focus of recent wood research in the context of biorefinery is the isolation of xylans and its conversion to the different value-added products (Westbye et al. 2008; Nakamura et al. 2010; Li et al. 2011; Poth et al. 2011; Um et al. 2011; Rodríguez-López et al., 2012). Microorganisms are an important source of biocatalysts for hydrolyzing xylans, which improve the release of monosaccharides for the subsequent fermentation leading to biofuels or other molecules of interest (Ebringerova and Hromadkova 1999; Dodd and Cann 2009; Hörhammer et al. 2011). This process, called enzymatic biorefinery, requires constant efforts for improvements, and most of all, optimized enzymatic cocktails have to be developed for xylan depolymerization. The discovery of new enzymes also needs appropriate detection methods (Biely and Puchart 2006).

The best known tests are based on the detection of reducing sugars formed during enzymatic hydrolysis that can be detected by several oxidoreduction methods, for example, by means of copper (Somogyi 1937, 1945; Nelson 1944), 3,5-dinitrosalicylic acid (Summer 1921; Miller 1959), or ferricyanide reagent (Kidby and Davidson 1973). Another detection strategy is based on insoluble xylans labeled with dyes (Remazol brilliant blue or Congo red). The hydrolysis releases xylan-dye fragments (Biely et al. 1985) or induces color changes on the solid-state culture (Stathopoulou et al. 2012). Highly sensitive assays were obtained by means of fluorogenic substrates (Ge et al. 2007). All these tests are reliable and widely used, but they need instruments, such as spectrophotometer. A systematic screening of the various and complex biological media calls for new approaches, for example, highly automated or high-throughput strategies (Entzeroth 2003; Chundawat et al. 2008; Song et al. 2010; Huang et al. 2012). Thus, methods are sought for, which are easy to handle, reliable, and rapid even in the case of large sample materials.

Recently, a new method was presented for the enzymatic detection based on the structural colors of biopolymer materials (Cerclier et al. 2010). The structural colors are known from the biological assemblies such as in butterfly wings (Vukusic and Sambles 2003; Vukusic 2010), which can also be produced artificially (Schauer et al. 2003; Cranston and Gray 2006; Cerclier et al. 2010) via an appropriate structure of the synthetic materials at the nanometric scale. The structural colors are due to the semireflective properties of coating materials causing interference effects. When the incident light reaches the air-film interface, a part of it is reflected, whereas the rest is transmitted into the film. Then, a second reflection occurs at the film-silicon wafer interface. The intensity of the net reflected light depends on the combination of reflected light waves from the interfaces of air-film and film-substrate. The film color can be tuned by controlling the film thicknesses. When the films are in contact with the enzymes able to hydrolyze the biopolymers, a change of the color is observed due to the decrease of the layer thickness (Cerclier et al. 2010). This method paves the way for the simple, efficient, and highly sensitive detection of enzymatic activities. Moreover, the color change is visible at the naked eyes, so that instrumentation is not needed.

The structurally colored nanometric films have already been obtained based on cellulose nanocrystals (CN). The approach is based on the layer-by-layer assembly of CN multilayers and polycations, and the films are deposited on a reflective substrate (Cranston and Gray 2006; Wagberg et al. 2008; Moreau et al. 2012). Generally, this method takes advantage from the electrostatic interactions between the negative charge of sulfate groups of the CN surface and the positive charges of polycations. The latter are most often synthetic (Podsiadlo et al. 2007; Jean et al. 2008) and thus not degradable by enzymes. The multilayered thin films fully composed of biopolymers have been seldom investigated (Jean et al. 2009; Cerclier et al. 2010, 2011; Qi et al. 2012), because film growth requires attractive interactions between polymers. Nevertheless, the biopolymer approach in combination with the CN film was demonstrated to be feasible with cationic (-chitin nanofibrils (Qi et al. 2012). The specific interaction in cellulose-xyloglucan assemblies is also promising (Jean et al. 2009; Cerclier et al. 2011).

The electrostatic attraction between contrarily charged polymers is the best known driving force for the formation of multilayered thin films. However, not all biopolymers have polyelectrolyte character; frequently, the surface charge density is not high enough to provide highly stable films. The challenge is especially high for multilayer films with natural xylans and cellulose.

Against this background, the present study is aiming at the construction of colored multilayered thin films (CN-CX) based on the alternate deposition of CN and cationic xylans (CX) solutions by the spin-coating method. Here, the CN and CX layers are alternatively deposited several times on a rotating silicon wafer and form the $(\text{CN-CX})_n$ multilayers. The surface morphology of the $(\text{CN-CX})_n$ films should be investigated by atomic force microscopy (AFM). The sensitivity of the developed endo-1,4- β -xylanase test of CN-CX films will be reported in comparison with the conventional enzyme activity determination.

Materials and methods

Materials

Polycation solution (1 g l⁻¹ distilled water): poly(allylamine hydrochloride) ($M_w=120\,000$ – $200\,000$ g mol⁻¹; PolySciences, Germany). Enzymatic degradation assays after dilution in sodium acetate buffer (10 mM, pH 5.0): endo-1,4- β -xylanase-M1 from *Trichoderma viride* (CAZY family: GH11, specific activity: 210 U mg⁻¹, at 40°C, pH 4.5, wheat flour arabinoxylan as substrate) was from Megazyme (Bray, County Wicklow, Ireland). Sensitivity test of the film to cellulase: Cellulyve TR (Lyven, Colombelle, France). Cellulyve TR was dissolved in concentrations of 25 and 50 mg l⁻¹ in sodium acetate buffer (10 mM, pH 5.0).

Preparation of CN suspensions

CN were extracted from cotton linters (*Gossypium hirsutum*) according to Revol et al. (1992). The linters were hydrolyzed with 65% H₂SO₄ at 65°C for 35 min. The CN was obtained by centrifugation of the suspension (10 000 rpm for 10 min). The precipitate was repeatedly washed and centrifuged and the resulting colloidal suspension was dialyzed against distilled water until neutrality. Mixed-bed research-grade resin (Sigma TMD-8, Sigma-Aldrich Chimie, S.a.r.l. L'Isle D'Abeau, France) was added to the CN suspension for 48 h to remove residual electrolytes. Sodium azide (0.01%) was added for storage. The concentration of the colloidal suspension of CN in further experiments was 5 g l⁻¹. The CN charge (0.54 e nm⁻²) was determined by the conductometric titration with 10 mM NaOH solution performed on a TIM900 titration manager (Gemini B.V., Apeldoorn, Netherland) and a CDM230 conductivity meter (Radiometer Analytical SAS., Villeurbanne, France) equipped with a CDC749 conductivity cell. The micrographs of CN nanorods were obtained with transmission electron microscopy (TEM, JEOL, Japan) imaging (Kalashnikova et al. 2012). Dimensions: 100–300 nm in length and 6–8 nm in width (Figure 1).

Preparation of CX

CX were synthesized from oat spelt xylans (OSX). In an exemplary procedure, 80 g (0.61 mol) of the OSX was suspended in 233 ml H₂O and heated under reflux for 15 min. The mixture was cooled to room

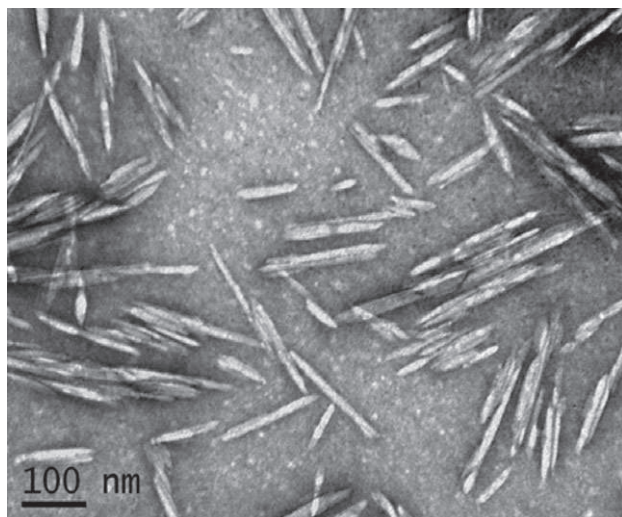


Figure 1 TEM micrograph of negatively stained cotton CN.

temperature and 7.2 g NaOH was added. After 2 h at room temperature, 46.06 g (0.3 mol) of epoxypolytrimethylammonium chloride (EPTA) were added. The reaction mixture was stirred for 22 h at room temperature. After the neutralization with HCl, the product was precipitated with ethanol and washed with 80% ethanol. Finally, it was dried under vacuum at 60°C to afford the CX3. Yield: 85%, 78 g; C: 41.01%; H: 7.61%; N: 1.42%; Cl: 0.74%. The different degrees of substitution (DS) in Table 1 were obtained by adjusting the molar ratio between EPTA and OSX. The DS of the cationic 2-hydroxypropyltrimethylammonium (HPMA) xylan (Figure 2) was calculated from the ratio of the N and C contents: $DS_N = (60.0\% \text{ N}) / (14.0\% \text{ C} - 72.0\% \text{ N})$. Turbidity measurements of the 1% solutions: Turbiquant 3000 IR (Merck), which was calibrated with a Turbiquant calibration standard kit up to 10 000 nephelometric turbidity unit. M_w determination: according to Saake et al. (2001) in dimethyl sulfoxide (DMSO)/water (90:10, v/v) containing 0.05 mol LiBr. CX solutions in the experiments: 1 g l⁻¹, pH 5, and filtered (pore filter membrane, 5 µm).

(CN-CX)_n films were built up on silicon wafers as solid support, which were first cleaned in a piranha solution (H₂SO₄/H₂O₂, 7:3, v/v) for 30 min and then rinsed with distilled water and finally dried under N₂ stream. The initial layer is composed of the synthetic cationic polyelectrolyte, poly(allylamine hydrochloride), which is a good anchor for the first layer of anionic CN. Then, the layers were successively and alternately deposited, that is, CN (5 g l⁻¹) and CX3 (1 g l⁻¹) by spin coating on the rotating silicon wafer (5 min adsorption before rotating at 3600 rpm for 1 min). A bilayer is defined as a CN layer plus a CX3 layer.

Table 1 M_w , DS, and turbidity of xylan samples.

Xylan samples	M_w (g mol ⁻¹)	DS	Turbidity after 1 h (NTU)
OSX	24 500	0	402
CX1	21 400	0.05	1515
CX2	N.D. ^a	0.06	2450
CX3	N.D. ^a	0.18	2084

^aN.D., not determined because these samples are not soluble in DMSO/water (90:10). CX1–CX3, cationic HPMA xylyns; NTU, nephelometric turbidity unit.

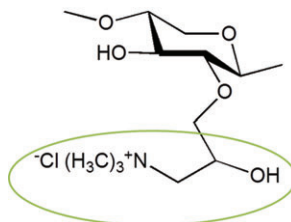


Figure 2 Chemical structure of CX after the reaction with EPTA chloride.

Thickness measurement of films were determined by mechanical profilometry (Dektak8, Veeco, Bruker-Nano, Palaiseau, France) and/or spectroscopic ellipsometry (M-2000U; J.A. Woollam, Lincoln, USA). For the profilometry measurements, the scratched surfaces were scanned along multiple straight lines using a 2.5 µm radius hemispherical tip carbide stylus and a contact force of 5 mg. The ellipsometric thickness was determined over a wavelength range from 250 to 1000 nm, simultaneously, at the incidence angles of 65°, 70°, and 75° based on numerical fitting of the ellipsometric data and relying on the Cauchy model (WVASE32 software; J.A. Woollam, Lincoln, USA). For each sample and both techniques, at least eight points per spots were measured to obtain an average film thickness.

Surface analysis

AFM images were recorded at ambient conditions with MultiMode AFM and Nanoscope IIIa controller (Digital Instruments) operating in tapping mode; silicon tips (PPP-NCHR; Nanosensors). Image processing: Gwyddion freeware (release 2.26).

Xylanase activity detection assay

The incubation with the enzyme was performed in a solution of CX3 (1 mg ml⁻¹) in sodium acetate buffer (10 mM, pH 5.0) at 40°C during 10 min. The release of reducing sugars was measured by the method of Nelson (1944) adapted to microplates (Sturgeon 1990) with xylose as the standard. The assay involves the reduction of Cu²⁺ to Cu⁺ by the reducing sugars and the formation of colored compounds with the arseniomolybdate reagent. One enzyme unit is defined as the amount of enzyme required to release 1 µmol of reducing groups per minute under the standard assay conditions. As a negative control, the xylanase was inactivated by heating in a water bath at 100°C for 5 min.

Visual test of xylanase activity on semi-reflective thin films (CN-CX)_n

Droplets (2 µl) of enzyme solutions of decreasing activities were deposited on the (CN-CX)_n thin film surfaces, which initially display the structural colors that depend on the film thicknesses. The incubation was performed for 10 min at 40°C in an oven and under saturated water conditions to avoid droplets drying. Subsequently, the films were washed with distilled water and dried under N₂ stream.

Results and discussion

The average dimensions of cotton NC in this work range about 100–300 nm in length, 12–21 nm in width, and 6–8 nm for thickness (Elazzouzi-Hafraoui et al. 2008; Kalashnikova et al. 2012; Figure 1). The NC form stable colloidal suspensions due to the sulfate charges introduced onto the crystal surface during hydrolysis with sulfuric acid. The layer building is based on electrostatic interaction. The cationic counterpart in the multilayered thin films of the present article was xylans derived from OSX obtained by alkaline extraction. It consists of a β -1,4-linked xylose backbone with branches of arabinofuranosyl and 4-O-methyl glucuronyl groups (Ebringerová and Heinze 2000). OSX were modified to cationic derivatives (Figure 2) by reacting with EPTA according to Schwikal et al. (2006, 2011).

Growth pattern

The spin-assisted layer-by-layer method was applied, in the course of which layers of CN and three cationic HPMA xylan derivatives (CX; Figure 3a) are deposited alternately. CX was prepared with three different DS, that is, DS=0.05, 0.06, and 0.18 named CX1, CX2, and CX3, respectively

(Table 1). All samples have high turbidity values, and this can be interpreted that a high level of polymer aggregation occurs in the solutions. In preliminary observations (data not shown) concerning film construction by sequential spin-assisted deposition of CX and CN, the surfaces obtained from CX1 and CX2 (i.e., with the lowest DS values) showed highly inhomogeneous colors. This is an indication of rough surfaces. Therefore, these samples were not further investigated in the present article. On the contrary, sample CX3 with a DS of 0.18 resulted in multilayered films exhibiting homogeneous and uniform colors (Figure 3b). These observations confirm the high impact of DS on the xylan adsorption and color. It is also clear from the literature that a minimum charge of the polymer is required to strengthen the polymer adsorption together with smooth and homogeneous thin films (Glinel et al. 2002).

In the following, the film growth was studied by the observation of color and thickness evolution, with CN and CX3 as the starting materials. After three deposition cycles, a structural color is clearly visible (Figure 3b). As expected, the colors can be tuned according to the number of the deposition cycles. To elucidate the growth mode of $(\text{CN-CX})_n$ films, the thickness of each individual film was determined. The variation in film thickness characterized by the bilayer number shows a linear film growth

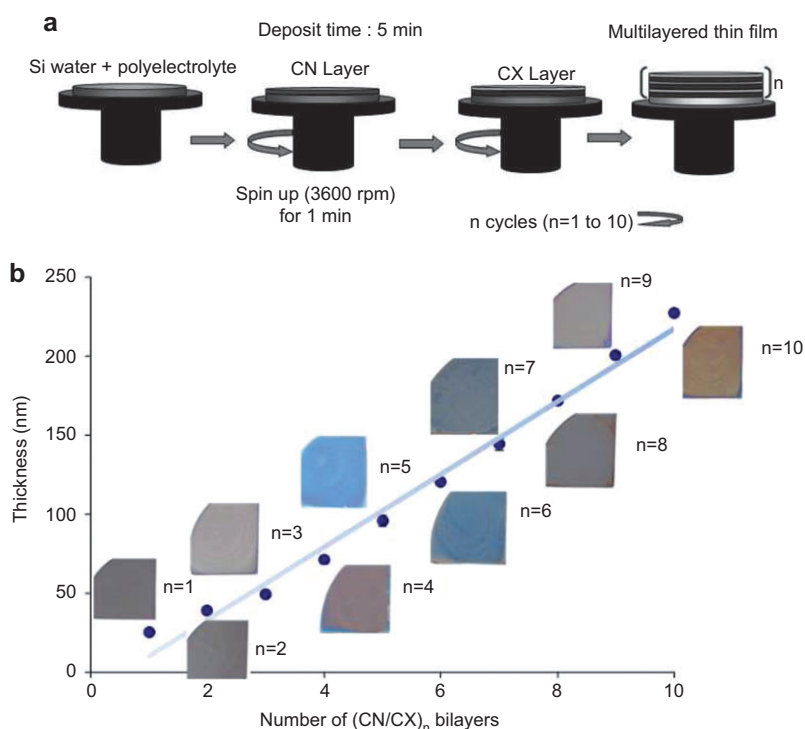


Figure 3 (a) Scheme of the automated spin coating-assisted process for the preparation of thin films composed of CN and CX. (b) Thickness of the multilayer films $(\text{CN-CX})_n$ as a function of the number of bilayers ($n=1-10$). Error bars are smaller than the symbol size.

(Figure 3b). The thickness increment per bilayer is 23 ± 0.63 nm. This value is rather high compared with the previously reported values for CN/polyelectrolytes systems (Jean et al. 2008; Moreau et al. 2012). In the quoted works, growth slopes of 6–8 nm (single CN layer) and 12–16 nm (double layers) were measured, whereas the lateral dimensions of the individual NC were in the range of 6–8 nm.

The higher deposition value in CN-CX systems in the present work can be explained tentatively by the adsorption of CN multilayers per deposition cycle or by the deposition of thick CX3 polymer layers. To understand better the deposition process, the thickness increment was measured after each CN and CX3 deposit. The average increment after the CN deposit was found to be 14 ± 3.5 nm, whereas, in the case of the CX3, the deposition was 8.1 ± 2 nm. Accordingly, the higher thicknesses are due to the deposition of CN double layers. This is, on the contrary, probably due to the random coil conformation of the corresponding polycation (Moreau et al. 2012), whereas the extended conformation of the same polycation would result in the adsorption of a single CN layer.

The determination of the chain conformation of CX3 is challenging. The concept of aggregation is supported by the turbidity data. Accordingly, the CX3 polymers do not behave as individually extended chains but as highly intricate networks that induce the adsorption of CN double layers. This hypothesis is also supported by the

thickness of the CX3 layer formed at the surface after the spin-coating process. On the contrary, CX3 may also form very thin layers if individual chains are absorbed. This is obvious based on the low molar mass of the xylan ($21\,400 \text{ g mol}^{-1}$, see Table 1, in DMSO/ H_2O) and the fact that xylan chains are not aggregated. Due to the thickness of 8 nm measured after CX3 adsorption, it is likely that the CX3 is adsorbed at the surface as heavily aggregated molecules. To check this assumption, the film surfaces were imaged by AFM.

Surface morphology imaged by AFM

Figure 4 shows the images of the $(\text{CN-CX})_n$ film surfaces (Figure 4c and d) compared with spin-coated reference layers of CN (Figure 4a) and CX3 (Figure 4b). The images of the reference layer composed of CN display well-defined cellulose nanorods with lengths ranging from ~100 to 300 nm as already reported for cotton CN (Elazzouzi-Hafraoui et al. 2008). On the opposite, the spin-coated xylan surface displays small globular-type structures that have a diameter of about a few tens of nanometers, indicating a strong aggregation tendency of xylan chains. Saake et al. (2001) observed also a high self-association tendency of xylans in solutions. Such features were also typical for xylan adsorption on bacterial cellulose (Linder et al. 2003).

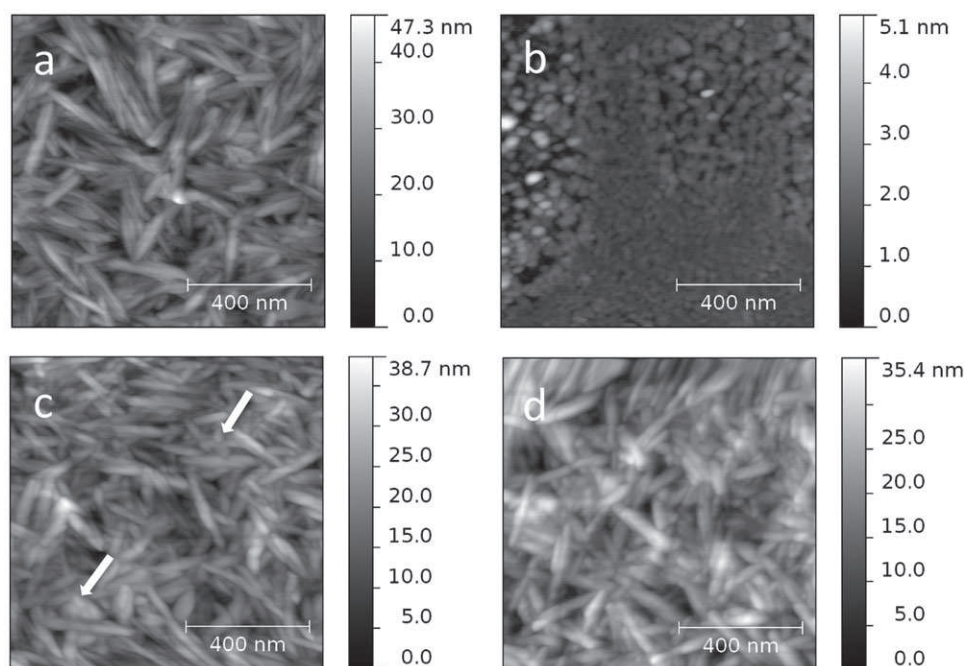


Figure 4 (a) CN monolayer (rms=5.7 nm), (b) CX3 monolayer (rms=0.4 nm), (c) $(\text{CN-CX})_{8.5}$ film surface (last deposition is CN; rms=4.7 nm), and (d) $(\text{CN-CX})_8$ film surface (last deposition is CX3; rms=5 nm).

Figure 4c is the image of a film surface where the CN is the last deposited layer. It shows a smoother surface morphology and a lower roughness compared with the single CN surface (Figure 4a). Some round-shaped aggregates are visible (Figure 4c, arrows), suggesting that the CN are embedded in a matrix of xylans. When the last layer deposited is xylans, round-shaped aggregates are visible besides the CN nanorods. However, CX3 does not completely cover all CN that are still clearly visible. These surface patterns can be explained by the beforehand association of xylans in solution and the subsequent adsorption as round-shaped aggregates onto CN surface. Obviously, CX form a dense intricate structure, which embeds the CN during the construction process of $(\text{CN-CX})_n$ films. Future research should clear the internal structure of $(\text{CN-CX})_n$ films by calculating the volume fraction of each polymer per bilayer by means of neutron reflectivity.

Enzymatic degradation of the layers

Because the final goal of this study is developing enzymatic screening assays, $(\text{CN-CX})_n$ films were submitted to the action of a xylanase. The susceptibility of the visual detection method from semireflective layers was compared with the results of the Nelson-Somogyi method, which is based on the detection of reducing sugars released by the endo-1,4- β -xylanase.

It is relevant that the films are stable toward the buffer of the enzymatic assay, because all the film surfaces remain unchanged after soaking in sodium acetate buffer (10 mM, pH 5) at room temperature for 2 h. For the visual enzyme detection assays, droplets of xylanase solutions with varying enzymatic activities are deposited on the film surfaces for the determination of the sensitivity limit of the multilayered systems. Figure 5 shows the example of $(\text{CN-CX})_6$ film before and after the incubation with the xylanase.

The absence of degradation for the negative control with thermally inactivated enzyme (spot 1) confirms that the color change is only due to the enzyme action. For the highest enzyme concentrations (spots 2 and 3), a brown color is clearly visible replacing the initial blue color. This is due to a partial degradation of the film. This new color characterizes the four-bilayer film, which presents a thickness of about 71 nm (Figure 3b). In comparison, the ability of the endo-1,4- β -xylanase to degrade CX3 was evaluated by quantifying the appearing reducing ends. The xylanase activity value toward CX3 was found to be four times lower than the activity on wheat flour arabinoxylan. This could be explained by the different origin and properties of xylan as

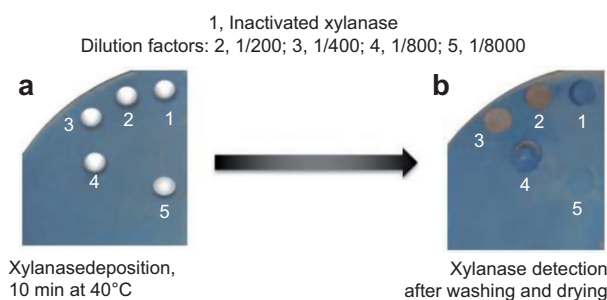


Figure 5 Effect of xylanase on a CN-CX film consisting of six bilayers with a blue structural color (thickness of ~ 117 nm). Xylanase activity: starting xylanase $9400 \text{ nkat ml}^{-1}$; increasing dilution factors from 1:200 to 1:8000. Inactivated xylanase was the negative control.

well as by the introduced cationic substituents that might significantly limit the enzyme activity or accessibility. Based on the extrapolation of the standard Nelson-Somogyi assay, a 1,4- β -xylanase activity of about 4.5 nkat ml^{-1} is detectable on the films. Thus, the sensitivity of film detection is in the range of the traditional colorimetric method.

Apparently, the higher density of polysaccharides on the surface compared with that in solution does not inhibit the enzyme. Moreover, to evaluate the specificity of the proposed test, a commercial cellulase mixture (Cellulyve TR) was also deposited on the film (Figure 6). Even after 30 min of contact time at 40°C , no color changes can be seen demonstrating the stability of the film against cellulase. This result is probably due to the highly crystalline structure of the CN hindering their enzymatic hydrolysis. The details of cellulose degradation are still waiting for elucidation.

Conclusion

Multilayered thin films constructed from CN and CX3 by means of a spin-assisted layer-by-layer procedure have

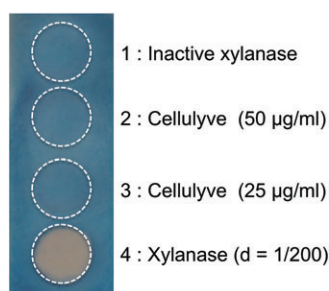


Figure 6 Degradation assay of six bilayered thin films by inactivated xylanase (spot 1), cellulolytic enzymes (Cellulyve TR; spots 2 and 3), and active xylanase diluted 1:200 (spot 4).

been obtained for the first time. The structural colors were observed after a few deposition cycles. The preliminary results of the growth pattern and the surface morphologies are interpreted that the films are composed of CN embedded in a CX3 matrix. The films were found to be sensitive to xylanase action; thus, these types of multilayer systems can be useful for the detection of xylanase activity. In future works, the neutron reflectivity study will be performed to learn more about the internal structure of films in relation with their swelling behavior and their enzymatic degradation.

Acknowledgements: The authors thank the Materials Institute of Nantes (Nantes, France) for the experimental facility, Emilie Perrin for the carrying out of the TEM micrograph, Yi Thomann (Freiburg Materials Research Center, Freiburg, Germany) for the support during AFM measurements, and the French National Research Agency through the Reflex Program (ANR P2N 2011) for the financial support.

Received October 30, 2012; accepted February 14, 2013; previously published online xx

References

- Biely, P., Puchart, V. (2006) Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes. *J. Sci. Food Agric.* 86:1636–1647.
- Biely, P., Mislovičová, D., Toman, R. (1985) Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- β -xylanases and endo-1,4- β -glucanases. *Anal. Biochem.* 144:142–146.
- Cerclier, C., Cousin, F., Bizot, H., Moreau, C., Cathala, B. (2010) Elaboration of spin-coated cellulose-xyloglucan multilayered thin films. *Langmuir* 26:17248–17255.
- Cerclier, C., Guyomard-Lack, A., Moreau, C., Cousin, F., Beury, N., Bonnin, E., Jean, B., Cathala, B. (2011) Coloured semi-reflective thin films for biomass-hydrolyzing enzyme detection. *Adv. Mater.* 23:3791–3795.
- Chundawat, S.P.S., Balan, V., Dale, B.E. (2008) High-throughput microplate technique for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotech. Bioeng.* 99:1281–1294.
- Cranston, E.D., Gray, D.G. (2006) Morphological and optical characterization of polyelectrolyte multilayers incorporating nanocrystalline cellulose. *Biomacromolecules* 7:2522–2530.
- Dodd, D., Cann, I.K.O. (2009) Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy* 1:2–17.
- Ebringerová, A., Heinze, T. (2000) Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.* 21:542–556.
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z. (1999) Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 16: 325–346.
- Elazzouzi-Hafraoui, S., Nishiyama, Y., Putaux, J.-L., Heux, L., Dubreuil, F.d.r., Rochas, C. (2008) The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. *Biomacromolecules* 9:57–65.
- Entzeroth, M. (2003) Emerging trends in high-throughput screening. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:522–529.
- Fengel, D., Wegener, G. *Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions.* De Gruyter, Berlin. 1989. p. 613.
- Ge, Y., Antoulakis, E.G., Gee, K.R., Johnson, L. (2007) An ultrasensitive, continuous assay for xylanase using the fluorogenic substrate 6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl beta-D-xylobioside. *Anal. Biochem.* 362:63–68.
- Glinel, K., Moussa, A., Jonas, A.M., Laschewsky, A. (2002) Influence of polyelectrolyte charge density on the formation of multilayers of strong polyelectrolytes at low ionic strength. *Langmuir* 18:1408–1412.
- Hörhammer, H., Walton, S., van Heiningen, A. (2011) A larch based biorefinery: pre-extraction and extract fermentation to lactic acid. *Holzforschung* 65:491–496.
- Huang, J., Xia, T., Li, A., Yu, B., Li, Q., Tu, Y., Zhang, W., Yi, Z., Peng, L. (2012) A rapid and consistent near infrared spectroscopic assay for biomass enzymatic digestibility upon various physical and chemical pretreatments in *Miscanthus*. *Biores. Technol.* 121:274–281.
- Jean, B., Dubreuil, F., Heux, L., Cousin, F. (2008) Structural details of cellulose nanocrystals/polyelectrolytes multilayers probed by neutron reflectivity and AFM. *Langmuir* 24:3452–3458.
- Jean, B., Heux, L., Dubreuil, F.d.r., Chambat, G.r., Cousin, F. (2009) Non-electrostatic building of biomimetic cellulose/xyloglucan multilayers. *Langmuir* 25:3920–3923.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B., Capron, I. (2012) Modulation of cellulose nanocrystals amphiphilic properties to stabilize oil/water interface. *Biomacromolecules* 13:267–275.
- Kidby, D.K., Davidson, D.J. (1973) A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal. Biochem.* 55:321–325.
- Li, J., Martin-Sampedro, R., Pedrazzi, C., Gellerstedt, G. (2011) Fractionation and characterization of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) from *Eucalyptus* fibers. *Holzforschung* 65:43–50.
- Linder, A., Bergman, R., Bodin, A., Gatenholm, P. (2003) Mechanism of assembly of xylan onto cellulose surfaces. *Langmuir* 19:5072–5077.
- Miller, G. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426–428.
- Moreau, C., Beury, N., Delorme, N., Cathala, B. (2012) Tuning the architecture of cellulose nanocrystals-poly(allylamine hydrochloride) multilayered thin films: influence of dipping parameters. *Langmuir* 28:10425–10436.
- Nakamura, A., Miyafuji, H., Saka, S., Mori, M., Takahashi, H. (2010) Recovery of cellulose and xylan liquefied in ionic liquids by precipitation in anti-solvents. *Holzforschung* 64:77–79.
- Nelson, N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375–380.

- Podsiadlo, P., Sui, L., Elkasabi, Y., Burgardt, P., Lee, J., Miryala, A., Kusumaatmaja, W., Carman, M.R., Shtein, M., Kieffer, J., Lahann, J., Kotov, N.A. (2007) Layer-by-layer assembled films of cellulose nanowires with antireflective properties. *Langmuir* 23:7901–7906.
- Poth, S., Monzon, M., Tippkötter, N., Ulber, R. (2011) Lignocellulosic biorefinery: process integration of hydrolysis and fermentation (SSF process). *Holzforschung* 65:633–637.
- Qi, Z.-D., Saito, T., Fan, Y., Isogai, A. (2012) Multifunctional coating films by layer-by-layer deposition of cellulose and chitin nanofibrils. *Biomacromolecules* 13:553–558.
- Revol, J.F., Bradford, H., Giasson, J., Marchessault, R.H., Gray, D.G. (1992) Helicoidal self-ordering of cellulose microfibrils in aqueous suspension. *Int. J. Biol. Macromol.* 14:170–172.
- Rodríguez-López, J., Romaní, A., González-Muñoz, M.J., Garrote, G., Parajó, J.C. (2012) Extracting value-added products before pulping: hemicellulosic ethanol from *Eucalyptus globulus* wood. *Holzforschung* 66:591–599.
- Saake, B., Kruse, T., Puls, J. (2001) Investigation on molar mass, solubility and enzymatic fragmentation of xylans by multi-detected SEC chromatography. *Biores. Technol.* 80:195–204.
- Schauer, C.L., Chen, M.-S., Chatterley, M., Eiseemann, K., Welsh, E.R., Price, R.R., Schoen, P.E., Ligler, F.S. (2003) Color changes in chitosan and poly(allyl amine) films upon metal binding. *Thin Solid Films* 434:250–257.
- Schwikal, K., Heinze, T., Ebringerová, A., Petzold, K. (2006) Cationic xylan derivatives with high degree of functionalization. *Macromol. Symp.* 232:49–56.
- Schwikal, K., Heinze, T., Saake, B., Puls, J., Kaya, A., Esker, A. (2011) Properties of spruce sulfite pulp and birch kraft pulp after sorption of cationic birch xylan. *Cellulose* 18:727–737.
- Somogyi, M. (1937) A reagent for the copper-iodometric determination of very small amount of sugar. *J. Biol. Chem.* 117:771–776.
- Somogyi, M. (1945) A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160:61–68.
- Song, L., Laguerre, S., Dumon, C., Bozonnet, S., O'Donohue, M.J. (2010) A high-throughput screening system for the evaluation of biomass-hydrolyzing glycoside hydrolases. *Biores. Technol.* 101:8237–8243.
- Stathopoulou, P.M., Galanopoulou, A.P., Anasontzis, G.E., Karagouni, A.D., Hatzinikolaou, D.G. (2012) Assessment of the biomass hydrolysis potential in bacterial isolates from a volcanic environment: biosynthesis of the corresponding activities. *World J. Microb. Biotech.* 28: 2889–2902.
- Sturgeon, R.J. (1990) Monosaccharides. In: *Methods in Plant Biochemistry*. Eds. Dey, P.M., Harbone, J.B. Academic Press, London, UK. pp. 1–38.
- Summer, J. (1921) A reagent for the estimation of sugar in normal diabetic urine. *J. Biol. Chem.* 47:5–9.
- Um, B.-H., Friedman, B., van Walsum, G.P. (2011) Conditioning hardwood-derived pre-pulping extracts for use in fermentation through removal and recovery of acetic acid using triethylphosphine oxide (TOPO). *Holzforschung* 65:51–58.
- Vukusic, P. (2010) Natural designs for manipulating the appearance of surfaces. *Ophthalm. Physiol. Opt.* 30:435–445.
- Vukusic, P., Sambles, J.R. (2003) Photonic structures in biology. *Nature* 424:852–855.
- Wagberg, L., Decher, G., Norgren, M., Lindstrom, T., Ankerfors, M., Axnas, K. (2008) The build-up of polyelectrolyte multilayers of microfibrillated cellulose and cationic polyelectrolytes. *Langmuir* 24:784–795.
- Westbye, P., Köhnke, T., Gatenholm, P. (2008) Fractionation and characterization of xylan rich extracts from birch. *Holzforschung* 62:31–37.

Résultats supplémentaires et discussion

- **Construction de films (CNC-CX)**

Le premier objectif a été de déterminer les conditions opératoires qui permettent d'obtenir des films (CNC-CX) peu rugueux et suffisamment épais pour observer des couleurs homogènes et qui peuvent donc être choisis comme substrats pour la détection et l'étude d'activité enzymatique.

Nous avons initialement disposé de trois échantillons de CX (CX1, CX2, CX 3 de DS 0,05 ; 0,06 ; 0,18 respectivement). Sur ces échantillons nous avons réalisé des essais de construction de films (CNC-XG) en procédant le « dipping » ou le « spin-coating ».

La méthode de « dipping » a été testée en premier lieu. Elle consiste à tremper le support de Silicium, sur lequel une couche d'accroche PAH est initialement déposée, en alternance dans la solution de CNC et dans la solution de CX. Un rinçage à l'eau a été effectué entre les couches pour éliminer l'excès en polymères. Ce test préliminaire de construction a abouti à des films non homogènes et extrêmement rugueux quel que soit la concentration en polymères utilisée. En deuxième lieu, des essais de construction ont été réalisés par « spin-coating » sans rinçage ou avec rinçage à l'eau. L'étape de rinçage s'avère nécessaire à la réussite de construction. Elle permet probablement d'éliminer le surplus d'agrégats à la surface (*tableau 5*).

Tableau 5. Résultats des essais préliminaires de construction des films (CNC-CX1) et (CNC-CX2)

Concentration (g L ⁻¹)		Méthode dépôt		
		« Dipping »	« Spin-coating »	
CNC	CX1 ou CX2	Avec rinçage	Avec rinçage	Sans rinçage
5	0,5	L'obtention de film n'est pas possible		
1	1	L'obtention de film n'est pas possible		
5	1	Films non mesurables, très inhomogènes et rugueux	Films non homogènes et rugueux	L'obtention de film n'est pas possible

De la même manière, on a procédé à la construction de films (CNC-CX3) dont le CX possède la valeur de DS la plus importante (0,18) selon les mêmes conditions décrits précédemment. Le seul essai qui a été réussi est celui effectué par « spin-coating » avec rinçage entre les couches et en utilisant des concentrations de CNC et de CX3 de 5 g L⁻¹ et de 1 g L⁻¹ respectivement. Ce procédé a donné lieu à des films homogènes avec couleurs uniformes (*Cf figure 3 de l'article*)

L'obtention de films avec des couleurs très inhomogènes, avec les DS les plus faibles (0,05 et 0,06), traduit une rugosité extrêmement élevée de la surface. Cela pourrait être dû à la formation d'agréats de CX lors du dépôt des couches.

Ces essais démontrent l'effet important de DS sur l'adsorption des xylanes et l'homogénéité des couleurs des films obtenus. L'obtention de films plus homogènes et moins rugueux avec les CX ayant la valeur de DS la plus élevée et qui sont, donc, les plus chargés, pourrait s'expliquer par l'impact positif des charges sur l'adsorption des polymères.

Il est d'ailleurs admis, à partir de la littérature, qu'un minimum de charges des polymères est nécessaire pour stabiliser leur adsorption à la surface et permettre l'obtention de couches bien homogènes (Glinel, et al., 2002).

D'autre part l'utilisation du « dipping » des couches n'a été pas appropriée dans les conditions de concentrations de polymères que nous utilisons et seul le processus de « spin-coating » avec rinçage s'est avéré efficace pour la construction.

Lors de ses travaux de thèse, Carole Cerclier a montré que l'effet de rinçage est inutile, voire néfaste à la croissance des films multicouches (CNC-XG) et que c'est plutôt l'effet de concentration en polymères qui gère la croissance. Contrairement à ces résultats, nous constatons que dans le cas des films (CNC-CX), le rinçage a un effet positif sur la croissance et contribue probablement à l'élimination des agrégats de CX en excès sur la surface et qui pourrait éventuellement gêner l'adsorption ultérieure des CNC. Il serait intéressant d'étudier de manière exhaustive l'effet de ces paramètres de construction sur la croissance de ce type de films dans des futurs travaux.

A l'issue de ces tests, nous avons donc choisi, pour effectuer cette étude, les films (CNC-CX3) élaborés par « spin-coating » selon les conditions précédemment décrites.

- Suivi de la dégradation enzymatique des films CNC-CX *in situ* par QCM-D

Outre le travail présenté dans l'article, nous avons cherché à comprendre le processus de la dégradation enzymatique des films CNC-CX *in situ* par QCM-D.

La figure montre un exemple d'analyse de film (CNC-CX)₄. Les films ont été placés dans les cellules QCM-D thermostatées à 40°C puis laissés sous flux continu (100 $\mu\text{L min}^{-1}$) du tampon. Une fois le signal stabilisé, la solution de xylanase est injectée en flux continu (100 $\mu\text{L min}^{-1}$) et la variation de fréquence (Δf) et le facteur de dissipation (D) sont enregistrés en fonction du temps.

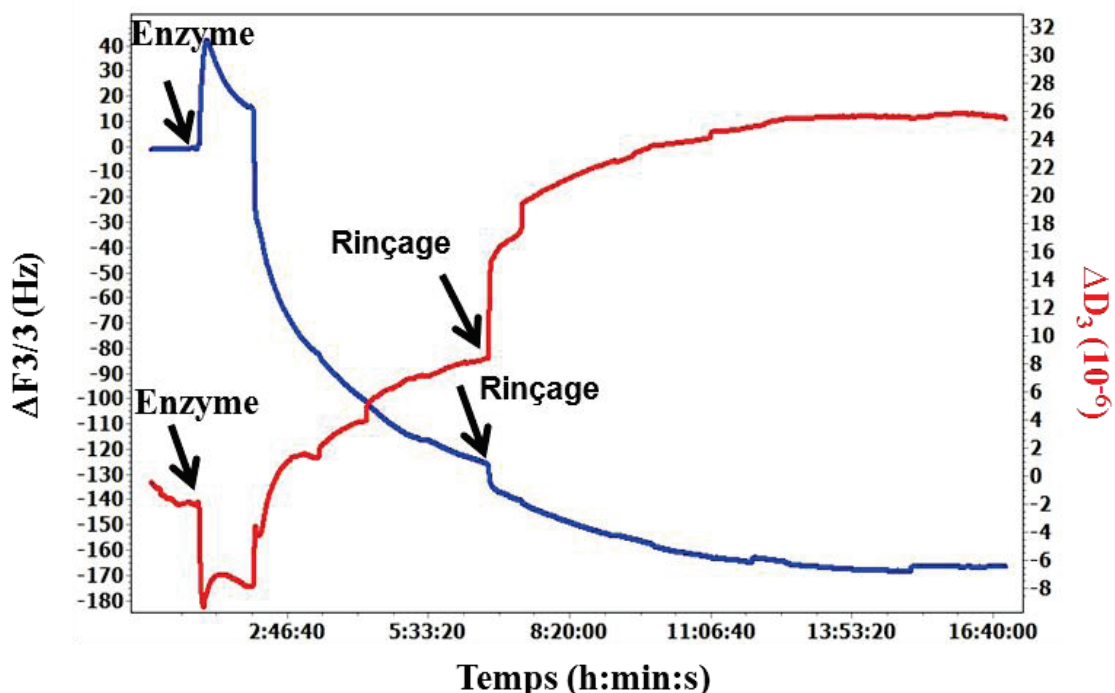


Figure 50. Variation de la fréquence ($n=3$) et de la dissipation en fonction de temps lors de l'injection en flux continu ($100\mu\text{l min}^{-1}$) de la xylanase ($d= 1/400$) sur un film $(\text{CNC-CX3})_4$

Sur le profil de l'évolution de signal de fréquence (Δf), une augmentation immédiate du signal a été observée suite à l'injection de la solution d'enzyme traduisant une perte de masse à la surface du film. Ceci pourrait indiquer l'initiation de la dégradation du film par la xylanase. Cependant, cette augmentation est très rapide et est suivie par une chute de fréquence jusqu'à une valeur de l'ordre de -165 Hz après avoir atteint un pic ($\Delta f_{\text{max}} = 40$ Hz). Ces résultats ne sont pas en cohérence avec les profils observés dans la littérature pour le suivi en QCM-D de la dégradation de films soumis à une enzyme. Le profil habituellement rencontré débute par une augmentation du signal de fréquence qui atteint ensuite un plateau indiquant la fin de l'hydrolyse (Suchy, et al., 2011; Turon, et al., 2008). Il faut également noter que les profils que nous avons obtenus sont très bruités et assez chaotiques. Même si l'aspect général des profils reste similaire entre les répétitions, la reproductibilité est faible.

La chute de fréquence suivant l'augmentation instantanée de Δf (*figure 50*), implique qu'une augmentation de masse ait eu lieu après l'injection de l'enzyme. Ceci pourrait être simplement le résultat d'un gonflement du film suite à l'action de l'enzyme. En effet, en coupant quelques chaînes de CX, l'enzyme ne permettrait pas de libérer entièrement la structure initialement très dense (sous forme d'agrégats) des xylanes qui resteraient, par conséquent, toujours accrochés à la surface. Par contre, son action contribue au relâchement de la structure et à la pénétration de l'eau. Cela conduit au gonflement du film se manifestant par l'augmentation de masse observée.

En parallèle à l'évolution de signal de fréquence, une diminution rapide du facteur de dissipation (D) est observée suite à l'injection de l'enzyme. Cette diminution de D a été suivie par une augmentation importante et continue. Cette augmentation est en corrélation avec la prise de masse indiquée par la diminution de Δf , et renseigne sur un état moins rigide du film. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'un gain de masse supplémentaire suite à l'injection de nouveau du tampon (*figure 50*). Cela suggère que le flux continu en tampon ne permette pas de décrocher les produits de dégradation mais contribue de plus en plus à la pénétration de l'eau dans la structure.

Des essais ont été effectués dans le but d'analyser de nouveau l'action de l'enzyme suite au rinçage avec le tampon. Sur les mêmes échantillons de films (CNC-CX) préalablement soumis à l'action de la xylanase et puis au rinçage avec le tampon, nous avons injecté de nouveau une solution de xylanase en flux continu $100 \mu\text{L min}^{-1}$, mais à une concentration deux fois plus élevée que celle précédemment utilisée (*figure 51*).

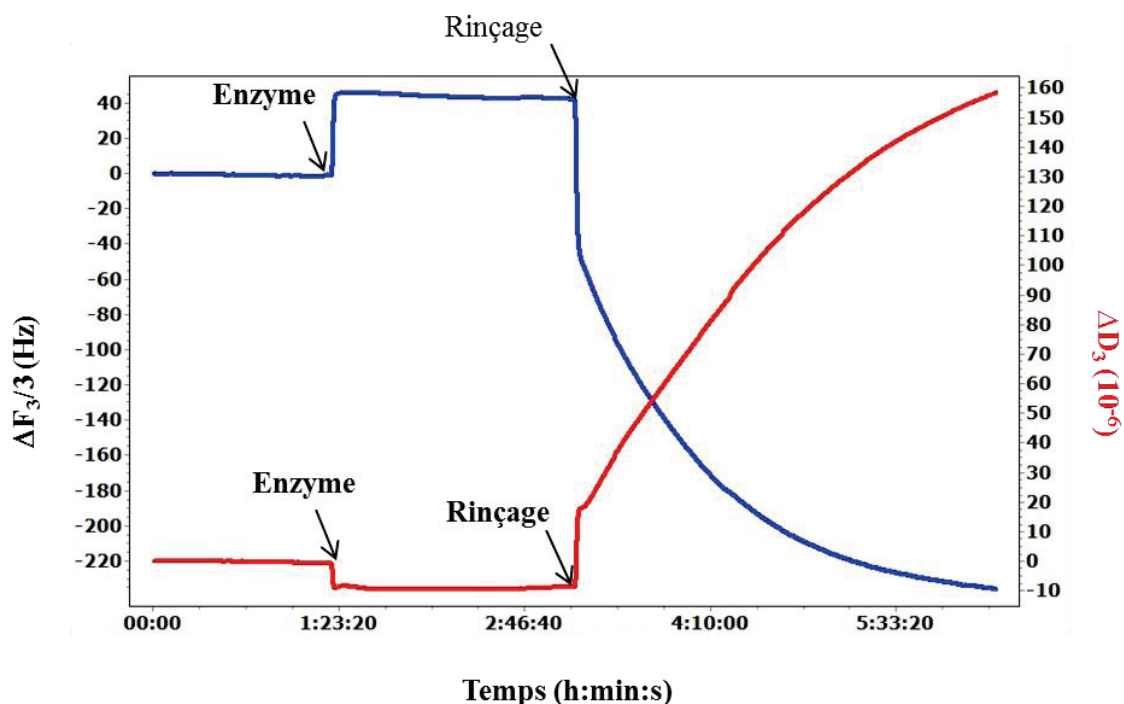


Figure 51. Variation de la fréquence ($n=3$) et de la dissipation en fonction de temps lors de l'injection en flux continu ($100\mu\text{l min}^{-1}$) de la xylanase ($d= 1/200$) sur un film $(\text{CNC-CX3})_4$ préalablement incubé avec la xylanase ($d=1/400$)

Le profil présenté dans la **figure 51** montre une augmentation immédiate de Δf jusqu'à 40 Hz et demeure constant pendant une heure et demi environ, indiquant l'absence d'un changement de masse. Le plateau observé pourrait être expliqué par une adsorption massive de l'enzyme conduisant à une saturation de la surface disponible. Suchy, et al., (2011) ont évoqué le même phénomène d'encombrement de surface par l'enzyme lors du suivi de la dégradation des films modèles de cellulose amorphe par l'EGI. Les auteurs ont également observé que le rinçage de la surface par le tampon a réduit cet encombrement et a permis de relancer le processus de dégradation. Josefsson, et al. (2007) ont observé au contraire un accrochage irréversible de l'EGI suite au rinçage par le tampon lors du suivi de la dégradation des films modèles de cellulose semi-cristalline. A l'opposé de ces observations, le rinçage du film au tampon dans notre cas induit une chute de Δf indiquant un gain de masse à la surface. Ce résultat suggère un décrochement de l'enzyme de la surface induisant la pénétration simultanée de l'eau et/ ou de polyélectrolytes dans la structure et donc son gonflement.

Le profil représentatif du facteur D montre une diminution négligeable (de l'ordre de 20 Hz), suite à l'injection de l'enzyme suivie par un plateau. Cela indique un état physique du film stable lors de la saturation de la surface par les molécules d'enzymes. L'injection du tampon par la suite conduit à l'augmentation de la dissipation. Cette augmentation indique une perturbation de nouveau de la structure suite à son gonflement par le tampon.

A partir des expériences préliminaires effectuées pour le suivi de l'hydrolyse des films (CNC-CX), il est clair que l'architecture des films constitue un verrou au déroulement de l'hydrolyse enzymatique. Ceci est probablement dû aux agrégats de xylanes cationiques adsorbés limitant ainsi l'accès de l'enzyme aux chaînes de xylanes. Toutefois, il semble que ces résultats soient contradictoires avec ceux observés par la dégradation visuelle car les films CNC-CX sont dégradables par la xylanase alors qu'ils semblent résister à l'hydrolyse en QCM-D.

Afin d'aider à l'interprétation de ces travaux, il serait intéressant de déterminer le comportement de ces films en solution (pourcentage de gonflement) par la réflectivité des neutrons.

En conclusion de cette partie, nous avons réussi la construction de films multicouches à base de CNC et de CX. Ces films sont homogènes et révèlent une couleur structurale qui apparaît après quelques bicouches CNC-CX déposées (3 bicouches). La caractérisation des films via l'étude du profil de croissance, associé à la morphologie de surface observée en AFM, indiquent que ces films sont composés d'une double couche de CNC ancrée dans une matrice de CX. Le test visuel de dégradation enzymatique a montré que ce système est dégradable par la xylanase et révèle une sensibilité similaire à celle d'un test classique de détection d'activité enzymatique. Toutefois, l'étude préliminaire menée en QCM-D a démontré la difficulté de maîtriser la reproductibilité du système. D'autre part les résultats obtenus restent difficilement compréhensibles et interprétables. Nous avons donc décidé de focaliser nos efforts sur les systèmes CNC-XG qui seront décrits dans les parties suivantes de ce chapitre.

II. Modulation de la croissance et de l'architecture des films multicouches à base de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes (article n° 2)

Contexte et objectif

L'étude de la dégradation enzymatique de la paroi cellulaire des plantes est un challenge qui est notamment dû à sa complexité structurale. Ainsi, l'utilisation des couches semi-réfléctives comme modèle biomimétique de la paroi avec des structures contrôlées et modulables à façon est une stratégie qui a été proposée dans ce travail de manière à pouvoir dé-corréler les paramètres difficilement modulables *in vivo* tels que les concentrations en polymères ou leur organisation.

Cet article s'intègre donc dans la première phase du projet de thèse concernant la construction des films multicouches de biopolymères et leur caractérisation et elle concerne en particulier la modulation de l'architecture de films multicouches CNC-XG en variant la concentration des CNC. D'autre part cet article a également pour objectif, la caractérisation fine de l'organisation des assemblages nanométriques au sein de ces films qui est une étape indispensable permettant d'apporter les éléments nécessaires à l'élucidation des phénomènes de dégradation enzymatique par la suite.

**Modulating the growth and architecture of cellulose nanocrystals
(CNC)-xyloglucans multilayered films by varying the CNC
concentration**

*Abir Dammak^a, Céline Moreau^a, Firas Azzam^a, Bruno Jean^b, Fabrice Cousin^c, Bernard
Cathala^{a*}*

^a INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, 44316 Nantes, France

^b Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS), 38041
Grenoble, France

^c Laboratoire Léon Brillouin, CEA-CNRS Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France

ABSTRACT

In this work, the effect of the variation of cellulose nanocrystals (CNC) concentration on the growth pattern of CNC-xyloglucans (XG) multilayered films is investigated. We found that a transition in the growth slope occurs at a CNC concentration of roughly 3-4 g L⁻¹. The same effect can be obtained by the addition of ionic strength to the CNC solutions, suggesting that electrostatic interactions are involved. Dynamic light scattering investigation of CNC dispersions at increasing concentrations demonstrated that the interaction parameter between CNC solutions changes as CNC concentrations increase. Neutron reflectivity was used to probe the internal structure of the films. The increase of the CNC concentration was found to induce a densification of the CNC adsorption, as well as the increase of the ionic strength, even though the mechanism is not strictly identical. This finding indicated that the increase of the CNC concentration induces a modification of the hydrodynamic radius through the collapse of the electrical double layer. Using this method, it is very simple to control the architecture of CNC-based multilayered thin films and, as a result, their functional properties.

INTRODUCTION

Cellulose nanocrystals (CNC) are colloidal nanoparticles that result from cellulose fibril hydrolysis¹. Due to their renewable nature, their low toxicity and their outstanding mechanical properties, they have been the object of increasing interest over the last decades because of their use in the production of biobased materials^{1, 2, 3}. They have notably been used to produce multilayered thin films for coatings, targeting a wide range of applications⁴. In most cases, CNCs have been associated with polyelectrolytes through electrostatic interaction due to their anionic character⁵. More recently, with the goal to achieve fully biobased materials, Jean et al and our group reported the elaboration of CNC/xyloglucan

(XG) multilayered thin films ^{6, 7, 8, 9}. Xyloglucan is a hairy β 1-4-glycan, i.e., a statistical multiblock copolymer consisting of a cellotetraose in which three out of four successive glucose units carry a flexible α -(1,6) linked D-xylosyl substituent, either as a single sugar or as a β -D-Gal-(1,2)- α -D-Xyl/or α -l-Fuc-(1,2)- β -D-Gal-(1,2)- α -D-Xyl side chain. Their adsorption on cellulose is mediated by hydrogen bonding and van der Waals forces^{10, 11}. These polysaccharides are assumed to play a crucial role in cell wall elongation and have been used as thickening agents in the food industry and dispersing agents in the paper industry.

A significant challenge in the fabrication of nanomaterials is the accurate control of their architecture in order to optimize and control the functional properties of the materials. The deposition of colloidal nanoparticles is influenced by many factors. Obviously, particle size and shape, electrostatic and/or steric particle-particle interactions, particle-surface interactions, and many other parameters such as the method of deposition, can have a profound effect on the adsorption process and the resulting distribution/organization of the particle/polymer on the surface, inducing changes in the architecture and associated properties. For example, the effects of nanocrystal morphology and organization have been found to influence the antireflective properties ¹² and the appearance of structural colors ¹³. Therefore, fully biobased thin films with highly controlled architecture and composition can be useful and relevant models to understand enzyme action on solid substrates ^{9, 14, 15, 16}.

Previous studies dealing with the production of XG/CNC multilayers report that different architectures can be obtained by varying the experimental procedure. For example, Jean et al. reported an increase in the thickness per bilayer of 8 nm when using a dipping procedure at high CNC concentrations ⁶, whereas our group reported an increment of 16 nm per bilayer with spin-coated assisted deposition ¹⁷. This obviously suggests that the structure of the films can be finely tuned on the basis of an accurate understanding of the physicochemical rule of construction. Accordingly, in this study, we investigated the effect of variations in CNC

concentration on the growth pattern of XG/CNC film and used neutron reflectivity to evaluate its impact on the inner film architecture. We found that the growth pattern is altered at a CNC concentration of roughly 3-4 g L⁻¹. A similar effect can be obtained by the addition of ionic strength to the CNC solutions, suggesting that the change in interparticle interaction is electrostatic in nature. Dynamic light scattering investigation of CNC dispersion at increasing concentrations demonstrated that the interaction parameter between CNC changes as CNC concentrations increase. This finding offers new insights into the physicochemical properties of CNC and demonstrates that rigid and slightly charged colloidal particles have characteristics that are different from flexible polyions that can be used to tune the architecture of nanomaterials.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

Poly(allylaminehydrochloride) (PAH; $M_w=120,000-200,000$ g mol⁻¹) was provided by PolySciences (Germany), and the aqueous polycation solution was used at 1 g L⁻¹. Xyloglucan (XG) from *Tamarindus indicaw* was provided by Megazyme (Bray, County Wicklow, Ireland) ($M_w= 202$ kD; viscosity: 6.5 dL g⁻¹; sugar composition: xylose = 38%, glucose = 42%, galactose = 16%, arabinose = 4%). XG solution was prepared at 1 g L⁻¹.

Deionized water (18.2 MΩ, Millipore Milli-Q purification system) was used to prepare all polymer solutions.

Preparation of cellulose nanocrystal (CNC) suspensions

CNC were extracted from cotton linters as previously described by Revol et al. (1992). The cotton linters were hydrolyzed with 65wt% H₂SO₄ at 65°C for 35 min. The suspension was centrifuged at 10000 rpm for 10 min to concentrate the cellulose and to remove excess aqueous acid. The resulting precipitate was repeatedly washed by centrifugation and the resulting colloidal suspension was dialyzed against distilled water until neutrality. Mixed-bed research-grade resin (Sigma TMD-8) was added to the cellulose nanocrystal suspension for 48 h in order to remove residual electrolytes. Sodium azide (0.01%) was added for storage. The CNC charges were determined by conductometric titration with 10 mM NaOH solution performed on a TIM900 titration manager and a CDM230 conductivity meter equipped with a CDC749 conductivity cell and was found to be equal to 0.5 e nm⁻². Micrographs of CNC nanorods were carried out using a Transmission Electron Microscopy (TEM) imaging (Kalashnikova et al., 2012). Dimension values of 100-300 nm in length and 6-8 nm in width were found. A colloidal suspension of CNC was used at 3 g L⁻¹ and 5 g L⁻¹ for experiments.

Static light scattering

Static light scattering (SLS) measurements were carried out using an ALV/CGS-8FS/N069 goniometer (from ALV), SPCMCD3296H photon counting modules (from Perkin-Elmer), a 35 mW red helium-neon linearly polarized laser operating at a wavelength, λ , of 633 nm (from JDSU), and ALV-7004 V.3.0.4.9 software (from ALV). The aqueous CNC suspensions remained unfiltered in order to maintain reliable concentration values. After being loaded onto 10-mm-diameter borosilicate glass cylindrical cells, the aqueous suspensions were immersed in a toluene bath and thermostated at a temperature of 25.0 ± 0.1°C prior to measurement. Data were collected at a scattering angle of 90° for different CNC concentrations, c , ranging from 0.5 to 8 g L⁻¹. These data allowed us to extract the Debye plot, Kc/R vs. c . In this

expression, K is the optical constant defined as $4\pi^2(dn/dc)^2n_0^2/N_A\lambda^4$ (where dn/dc is the refractive index increment calculated to be 0.103 mL g^{-1} , n_0 is the refractive index of the pure solvent equal to 1.332, and N_A is Avogadro's number) and R is the excess Rayleigh's ratio, which is proportional to the scattered intensity corrected by the solvent signal and normalized by the toluene signal. Moreover, the ultraviolet-visible absorbance of the aqueous suspensions was measured to be extremely close to zero at a wavelength of 633 nm.

Multilayered thin film preparation

(CNC-XG)_n films were built on silicon wafers provided by ACM (Villiers Saint Frederic, France) as a solid support. The wafers were first cleaned in a piranha bath ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, 7:3, v/v) for 30 min, rinsed with distilled water and then dried under a N_2 stream. The initial layer consisted of PAH as a cationic polyelectrolyte, a good anchor for the first layer of anionic CNC. PAH solution was deposited on the SiO_2 surface and after an adsorption time of 5 min, was spun at 3600 rpm for 1 min followed by a rinsing step with water. The CNC and XG layers were then successively and alternately deposited, i.e., CNC dispersions (at 5 g L^{-1} or 3 g L^{-1} without NaCl and 3 g L^{-1} with 5 mM NaCl) and XG solution (at 1 g L^{-1}), by spin-coating on a PAH-coated wafer substrate (5 min adsorption before rotating at 3600 rpm for 1 min). A bilayer is defined as the combination of a CNC layer and an XG layer. For each condition, the deposition of $n = 1$ to $n = 10$ bilayers was performed.

Ellipsometry

The ellipsometric thickness of each multilayer film was determined over a wavelength range of 250 to 1000 nm, simultaneously, at the incidence angles of 65° , 70° and 75° , based on numerical fitting of the ellipsometric data and relying on the Cauchy model (WVASE32

Software; J.A. Woollam, Lincoln, NE, USA). For each sample, at least eight points per spot were measured to obtain an average film thickness.

Neutron reflectivity

Specular neutron reflectivity experiments were carried out with the EROS time-of-flight reflectometer at the Laboratoire Léon Brillouin, CEA Saclay, France¹⁸. To access a broad momentum transfer range, data were collected at two different fixed angles, 0.93° and 2° with a neutron white beam covering wavelengths from 3 to 25 Å. The final accessible Q-range is 0.008-0.1 Å⁻¹.

A standard treatment was applied to the raw data to obtain reflectivity curves on an absolute scale. Data were analyzed using a “box” model that consisted of dividing the thin film into a series of layers. Each layer was characterized by a finite thickness (d), scattering length density or SLD (ρ), and interfacial roughness (σ) with the neighboring layer.

In order to determine the internal composition of polysaccharides and air in these multilayer films as a function of CNC concentration (and NaCl content), neutron reflectivity (NR) experiments were carried out on (CNC-XG)₅ films. As previously shown in an earlier work^{9, 19}, NR data from films made of hydrogenated or deuterated CNC dispersion make it possible to determine the volume fractions of individual polysaccharides and air and, consequently, the surface concentrations of polysaccharides in these films. Details of the fitting procedure and the calculated volume fraction of each polysaccharide and air can be found in the Supporting Information⁹.

For all films, Si support and its native SiO₂ layer were fitted using the following parameters: Nb = 3.4 and 2.07 ($\times 10^{-6}$ Å⁻²), d = 0 and 1.2 nm, σ = 0 and 0.2 nm, respectively. The anchoring layer, PAH, was fitted as one thin layer of approximately 1.4 nm and an interfacial roughness (σ) of approximately 0.1 nm with a theoretical SLD value of 0.55×10^{-6} Å⁻¹.

RESULTS

Influence of the CNC concentration on the growth pattern of (CNC-XG) films

CNC-based multilayered thin films are generally made by taking advantage of the electrostatic interactions between cationic polyelectrolytes and anionic sulfate charges borne by the CNC⁴. Studies dealing with non-electrostatic interactions as driving forces for the production of CNC-based films are rare, and one noteworthy example of this is films built from XG and CNC. Indeed, it is widely known that XGs interact with the cellulose surface through van der Waals interactions, hydrogen bonding and polar interactions¹⁰. Studies on the production of XG/CNC multilayered films report that growth patterns may be different depending on the experimental procedure. In some studies, the thickness increment per bilayer range is approximately 6-8 nm^{6, 19}, whereas in other studies, increments of approximately 14-16 nm have been measured when a bilayer is deposited^{9, 19}. Our previous investigation suggests that such growth pattern modification⁹ can be linked to the variation of CNC concentration. In order to determine whether this parameter has an impact on film growth, we carried out a systematic investigation of the effect of the variation of CNC solution on the magnitude of the growth step. The procedure used for the film formation consists in an alternated deposition of CNC and XG to form a bilayer. After deposition of CNC or XG, an adsorption step is applied and followed by spinning to dry the film. Figure 1 shows the growth of (CNC-XG) films from one to eight bilayers as a function of CNC concentration (2, 3, 4 and 5 g L⁻¹) and with a fixed concentration of XG (1 g L⁻¹), in accordance with our previous studies⁹. Obviously, a transition of the growth slope is observed between films constructed from CNC solutions at 2-4 g L⁻¹ and those at 5 g L⁻¹, i.e., the slope value abruptly changes from 5.5-7.4 nm/bilayer to 12 nm/bilayer at a critical concentration of 3-4 g L⁻¹ of CNC dispersion. This indicates that the architecture of the CNC

layer could be controlled by the initial concentration of CNC dispersion used during the adsorption process. Variations in the thickness increment have already been reported in the case of films constructed from polyelectrolytes, and can induce variations by changing different experimental parameters such as the ionic strength of the solution that modifies the conformation of polyelectrolytes or the screening of electrostatic interactions, as well as the type of polyelectrolytes or counterions²⁰. Similar features have also been reported in the case of nanocellulose^{4, 21, 22}. However, in the present case, all of the parameters have been kept constant except for the concentration of the CNC dispersion. Consequently, added salt or the nature or the conformation of polymers cannot be invoked to explain the changes observed. The relationship between the concentration and film growth has rarely been investigated, and almost always in relation to the kinetic aspect of adsorption. We investigated the effect of adsorption kinetics by developing protocols with higher adsorption times at both low and high CNC concentrations, and found no differences. Adsorption has also been investigated by QCM-D, and the shift in frequency was found to be stable within a minute scale. As a consequence, the increase of the growth slope cannot be attributed to the kinetics of adsorption but, instead, to a change in the interaction between CNCs as the concentration increases.

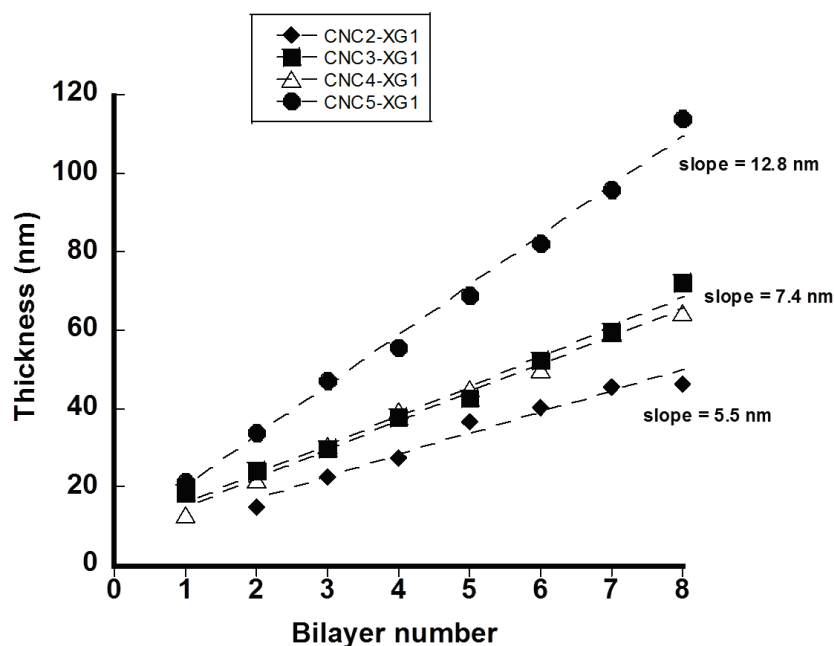


Figure 1. Growth of (CNC-XG) films from one to eight bilayers as a function of the concentration of CNC dispersion (2, 3, 4 and 5 g L⁻¹) and with a fixed concentration of XG (1 g L⁻¹).

The effect of the variation in concentrations has rarely been investigated, even in the case of polyelectrolytes, since it is usually assumed that the variable has a weak effect that can be easily lowered when the polymer concentration or adsorption time is high enough. Adsorption in fact occurs when the critical threshold of a polyelectrolyte concentration is exceeded. After this threshold, a plateau value should be rapidly expected if the adsorption is irreversible but, experimentally, a continuous slight increase in the addition of materials with an increase in concentration is often observed until the equilibrium is reached²³. However, no straightforward transition is observed that is similar to the one observed for CNCs. This slow addition of materials with an increase in polymer concentration can be explained by the slow rearrangement of the layer. Yet, in the case of polyelectrolytes, this mechanism is only possible in the presence of ionic strength that screens the electrostatic barrier arising from the adsorbed polymers and prevents additional adsorption²⁴. In the case of nanocellulose, the effect of bulk concentration on the surface concentration was studied by Aulin et al.²⁵, who

reported that the amount adsorbed on the surface remained the same when increasing the NFC concentration from 15 mgL⁻¹ to 250 mg L⁻¹. Only our previous preliminary results suggest an impact of CNC concentration on film construction¹⁹. Nevertheless, a similar phenomenon was reported in the case of multilayer deposition for SiO₂ nanoparticles²⁶. The thickness of the adsorbed layer increased with increasing concentrations of SiO₂, suggesting a decrease in the repulsion forces between particles at high concentrations. Since SiO₂ nanoparticles are negatively charged, like CNCs, a possible screening of electrostatic repulsion can be assumed. In order to evaluate this effect, the influence of ionic strength was evaluated.

Influence of the ionic strength of the CNC dispersion on the growth pattern of (CNC-XG) films and static light scattering investigation

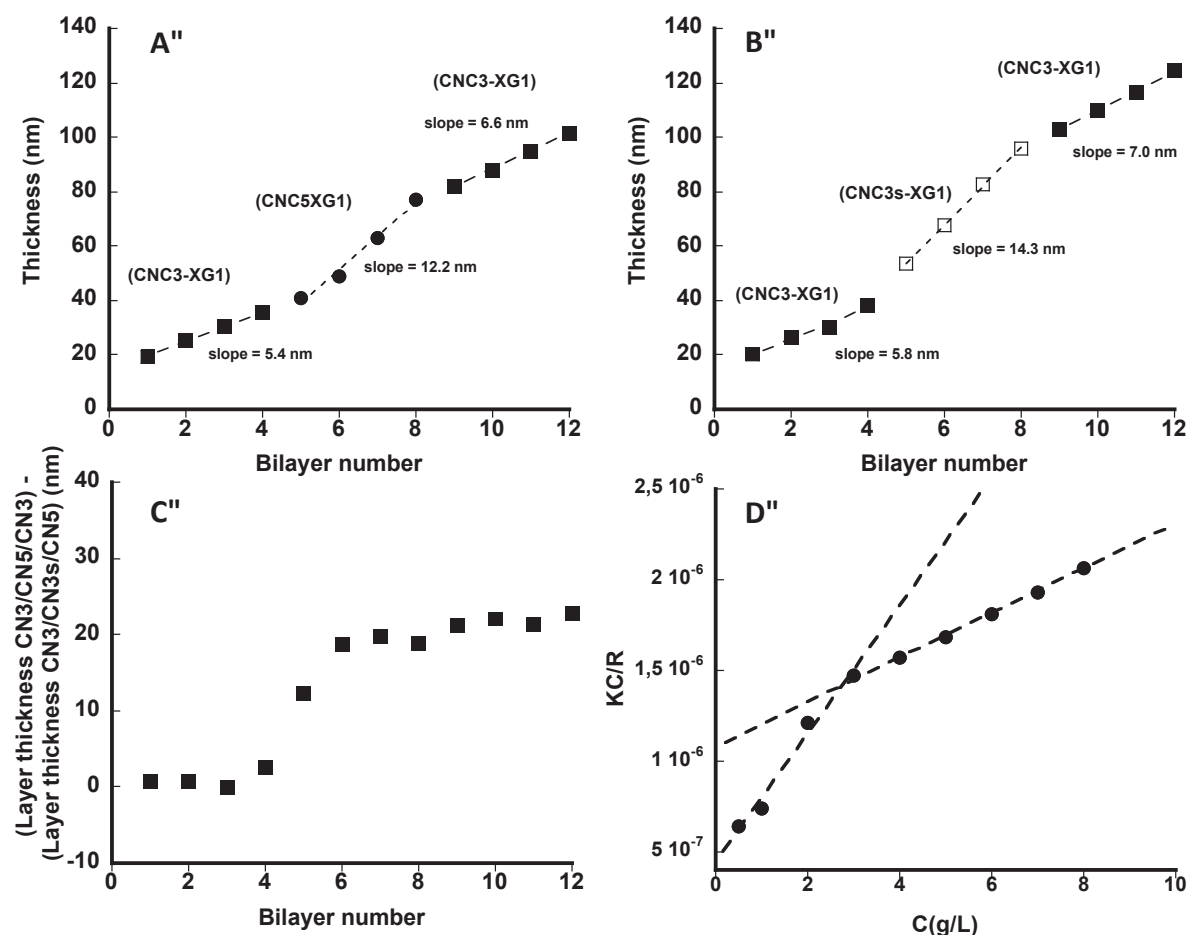


Figure 2. Construction of films consisting of CNC and XG (1 g L^{-1}) by varying (A) the concentration (3 (CNC3) or 5 (CNC5) g L^{-1}) or (B) the ionic strength (0 (CNC3) or 5 mM NaCl (CNC3s)) of CNC dispersion, and the difference between film thicknesses at the bilayer number (C). Evolution of the KC/R ratio vs. CNC concentration (D).

It is widely acknowledged that the electrostatic interaction between polyelectrolyte are affected by the ionic strength of the solution. However, CNCs are loosely charged nanoparticles and the addition of high ionic strength induces aggregation and, finally, precipitation of the CNC. We thus investigated the growth pattern at low NaCl concentrations

(5 mM). The thicknesses of the layers adsorbed are displayed in Fig. 2. Figure 2A shows the growth of a (CNC-XG) film constructed using two CNC concentrations, 3 and 5 g L⁻¹, with no added salt. A CNC dispersion at 3 g L⁻¹ was used for the first bilayers (from n = 1 to 4), and a CNC dispersion at 5 g L⁻¹ was then deposited from five to eight bilayers, before completing the film construction with 3 g L⁻¹ CNC up to 12 bilayers. Nevertheless, a slope change is clearly observed when the CNC concentration increases from 3 to 5 g L⁻¹ (from 5.4 to 12 nm) and returns to almost the same value (6.7 nm) when CNC3 is used once again. A similar procedure was repeated where the 5 g L⁻¹ solution was replaced with a 3 g L⁻¹ solution containing 5 mM of NaCl, and the change of the slope growth was observed once again. However, the growth patterns are not fully identical. Indeed, the change from the 3 g L⁻¹ CNC dispersion to the 5 g L⁻¹ CNC dispersion with salt does not induce the same increase in the layer thickness as those observed from the 3 g L⁻¹ CNC dispersion to the CNC 3 g L⁻¹ dispersion with salt. In order to distinguish possible discrepancies between the two growth patterns, Fig. 2C illustrates the difference in thickness for each bilayer deposition. It shows that the growth is remarkably identical for the deposition between one and four bilayers and after the 6th bilayer, demonstrating the high reliability of the process. A sharp increase is only visible at the 5th bilayer deposition. This difference has no clear explanation, but the results of neutron reflectivity presented later in this paper show that CNC5 deposition induces the adsorption of higher amounts of XG, therefore allowing us to assume that the first adsorption step of the CN5 is not fully effective since not enough XG is adsorbed on the previous CNC3 deposition. This point should be investigated in a further study in order to fully describe the XG/CNC association process. Nevertheless, the similarities between the growth slope change obtained with and without salt suggest that the change in the growth process is due to the modification of the electrostatic interactions between CNC. Taking the lateral dimension of cotton CNC (6 +/- 2 nm high, 13 +/- 4 nm wide and 189 +/- 51 nm long) into account ²⁷), it

can be supposed that the increase in the growth slope from 6-7 nm to 12-14 nm corresponds to the densification at the surface that can result from the adsorption of a double layer of CNC lying flat on the surface. This implies the decrease of the repulsive forces between the CNCs. We thus investigated the concentration transition zone using Static Light Scattering (SLS). Figure 2D shows the KC/R ratio vs. the CNC concentration. A clear slope change can be observed for a CNC concentration of approximately 3 gL^{-1} , indicating a change in the value of the second virial coefficient and, consequently, a transition in the quality of the solvent. However, before and after the transition, the slope of the KC/R ratio is positive, avoiding any aggregation process of the CNC that remains isolated. Nevertheless, this indicates a change in the quality of the solvent, probably due to the increase of the ionic strength of the solution as a result of the charges carried by the CNC themselves. In order to support this assumption, we calculated the ionic strength induced by the CNC charges. Taking the average dimensions of the CNC (length: 189 nm; width: 13 nm; and height: 6 nm) and the amount of CNC charges (0.5 e nm^{-2}) into account, the degree of substitution of the CNC is equal to 0.036 and the concentration of charges for a solution of 1 g/L is approximately 0.22 mM . Thus, the ionic strength for a 5 g L^{-1} CNC solution is 1.1 mM , which is rather low but no longer negligible. Indeed, the effect of the low ionic strength of cellulose nanocrystals has already been investigated, especially in the case of the formation and organization of the liquid crystal phase^{28, 29}. The addition of a trace of electrolytes has been found to influence the colloidal behavior of cellulose nanocrystals by decreasing the overall hydrodynamic size of the nanocrystals by condensing the electrical double layer around the CNC particles³⁰. This phenomenon is in agreement with what is expected on the basis of the DLVO theory. Thus, it is likely that the increase in ionic strength due to the increase in the CNC concentration induces the change in the second virial coefficient in the solution. Previous studies of nanoparticle adsorption on solid surfaces reveal the positive effect of the ionic strength on the

adsorption density^{31, 32}. In order to verify the possible densification of the CNC/XG layer when the CNC concentration increases from 3 to 5 g L⁻¹, the internal compositions of the films were investigated by neutron reflectivity together with those of a film obtained with the addition of 5 mM NaCl in the CNC solution.

Internal structure and composition of (CNC-XG) films

Neutron Reflectivity(NR) makes it possible to measure the chemical composition profile perpendicular to the surface and thus provides structural details concerning the thickness, density and roughness of a thin film. It consists in the determination of the neutron scattering length density (SLD) profiles that are related to the chemical composition of the film material. However, the SLD results from the contribution of polymer embedded in the film and the determination of volume fractions of individual components cannot be achieved in a single experiment. A way to determine CNC and XG volume fractions in the film and, consequently, their surface concentrations, consists in taking advantage of the difference in the neutron scattering length between hydrogen (1H) and deuterium (2H). Partially deuterated CNCs obtained by applying the hydrothermal method³³ have been successfully used to determine the volume fraction of individual components in a CNC/XG mixture^{8, 9, 22}. We used five bilayered films since their thicknesses are within the range of NR investigation (typically 5 to 100 nm). In order to determine the influence of concentration and ionic strength, CNC3 without (CNC3-XG1) and with (CNC3s-XG1) the addition of 5 mM NaCl and CNC5 (CNC5-XG1) films were investigated using hydrogenated CNC (CNCh; Fig. 3A) and deuterated CNC (CNCD; Fig. 3B). NR spectra of hydrogenated and deuterated samples reveal distinct oscillations known as Kiessig fringes. The solid lines in Fig. 3 indicate the best fits obtained for the two systems considering the films as a single homogeneous layer.

The scattering length density profiles obtained from the fitting procedure of the reflectivity curves show the density distribution (SLD) along the direction normal to the film surface (axis-z), i.e., from the solid substrate (Si wafer) to the air environment (Figs. 3C and D). For all films, Si support and its native SiO₂ layer were fitted using the following parameters: Nb = 3.4 and 2.07 ($\times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$), d = 0 and 1.2 nm σ = 0 and 0.2 nm, respectively. The anchoring layer, PAH, was fitted as one thin layer of approximately 1 nm and an interfacial roughness (σ) of approximately 0.1 nm, with a theoretical SLD value of $0.55 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-1}$ (or 1.19 for PAH-*d*). Details on the fitting procedure can be found in ⁹. The modeling of the reflectivity data indicates that a four-layer model (L1-L4) is needed to fit both films well. Fitting parameters are given in the Supporting Information (Table S1). Table 1 gives the thickness and the average SLD (ρ_{film}) value of each film deduced from the fitting of the corresponding profiles. Film thicknesses from NR data are in accordance with those measured by ellipsometry.

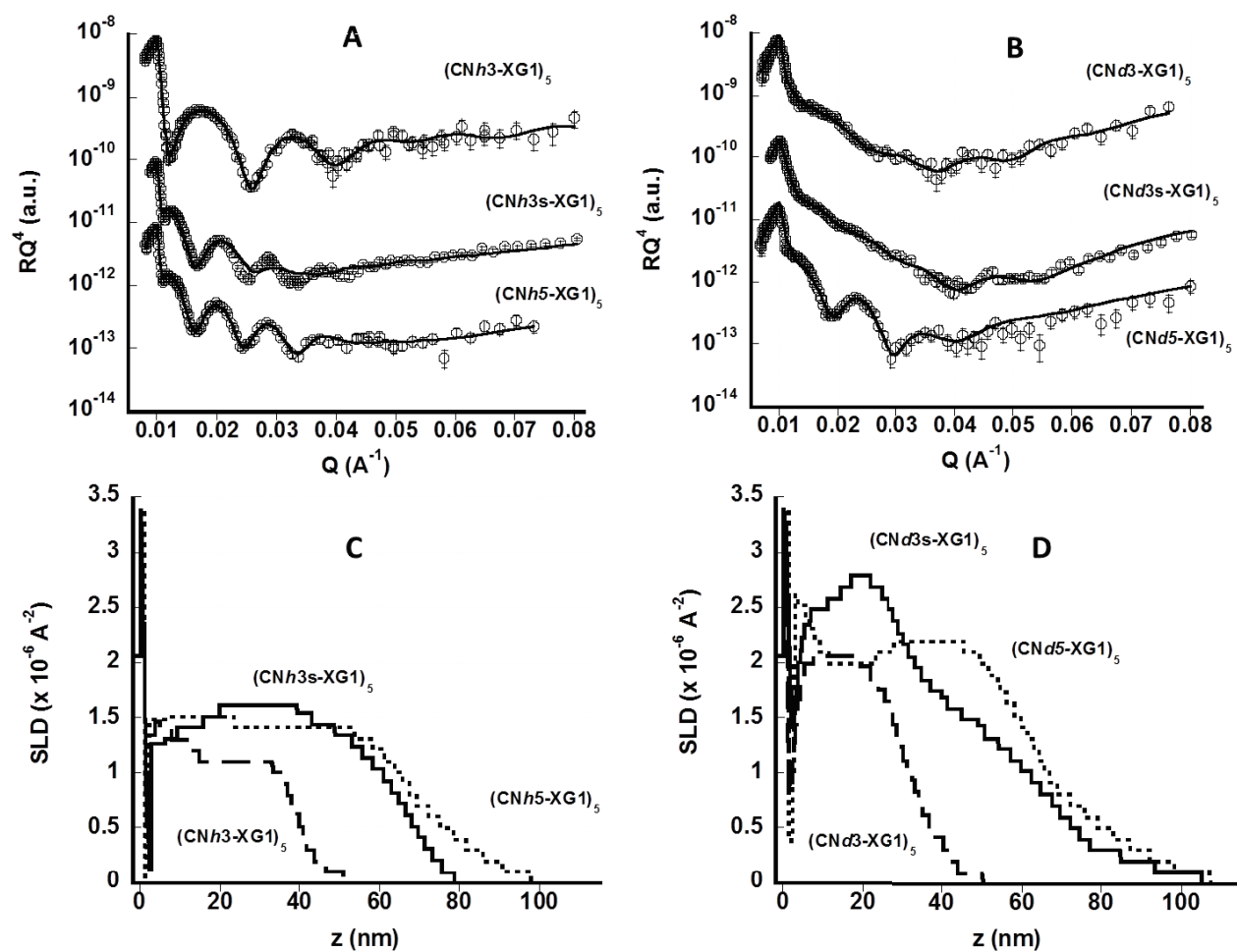


Figure 3. Reflectivity curves (A, B) and the corresponding best fits (C, D) for (CNC-XG)₅ films prepared from hydrogenated CNCh (A, C) and deuterated CNCd (B, C) cellulose nanocrystals at 3 (CNC3) and 5 (CNC5) g L⁻¹ and XG at 1 g L⁻¹.

Volume fractions (ϕ) of individual polysaccharides and of air were calculated by taking the value of measured ρ_{film} and the theoretical SLD value of CNCh ($1.9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$), CNCd ($3.3 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) and XG ($1.60 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) into account, according to the following equations:

$$SLD_{\text{film-h}} = \phi_{\text{CNC}} SLD_{\text{CNCh}} + \phi_{\text{XG}} SLD_{\text{XG}} + \phi_{\text{air}} SLD_{\text{air}}$$

$$SLD_{\text{film-d}} = \phi_{\text{CNC}} SLD_{\text{CNCd}} + \phi_{\text{XG}} SLD_{\text{XG}} + \phi_{\text{air}} SLD_{\text{air}}$$

With $\phi_{\text{CNC}} + \phi_{\text{XG}} + \phi_{\text{air}} = 1$

Table 1. Total Thickness (d), roughness (σ) and average scattering length density (ρ_{film}) of $(\text{CNC-XG})_5$ films with CNC concentration of 3 g L^{-1} or 5 g L^{-1} without added salt (CNC3 or CNC5), and 3 g L^{-1} with 5 mM NaCl (CNC3s) from hydrogenated (CNCh) and deuterated (CNCd) samples at the air/film interface. The relative volume fraction, ϕ , and the corresponding surface concentration (in $\mu\text{g cm}^{-2}$) were calculated from NR data (see reference ⁹).

	(CNC3-XG) ₅	(CNC3s-XG) ₅	(CNC5-XG) ₅
$d_{\text{dry H}}$ (nm) / σ (nm)	42.0 / 2.9	77.7 / 5.9	69.1 / 6.7
$d_{\text{dry D}}$ (nm) / σ (nm)	43.4 / 3.4	76.8 / 8.4	67.8 / 8.7
$\rho_{\text{film-h}}$ ($10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$)	1.126	1.244	1.500
$\rho_{\text{film-d}}$ ($10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$)	1.534	1.830	2.066
ϕ_{CNC}	0.29	0.42	0.40
ϕ_{XG}	0.36	0.28	0.46
ϕ_{air}	0.35	0.30	0.14
[CNC] ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	1.93	5.01	4.29
[XG] ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	2.41	3.03	4.38
[XG] / [CNC]	1.10	0.61	1.02

As previously measured on similar films with a CNC concentration of 5 g L^{-1} but with a higher molecular weight XG sample ⁹, the volume fraction of CNC (40%) and XG (46%) are on the same order in $(\text{CNC5-XG})_5$ films consisting of 14% air content. In contrast, for

(CNC3-XG)₅ film, the CNC and XG volume fractions are reduced compared to (CNC5-XG)₅, with 29% of CNC and 36% XG. (CNC3-XG)₅ film is more porous since the air content is roughly twice as much as that of CNC5 films. It is thus obvious that the increase of CNC concentration induces the formation of denser layers. When salt is added to the CNC and XG volume fractions of the CNC3 film, the CNC volume fraction is close to that of CNC5 (0.42 vs. 0.40), but the XG volume fraction is still low (0.28).

Surface concentration (in $\mu\text{g cm}^{-2}$) of CNC and XG in each film was calculated on the basis of polysaccharide density values: CNC = 1550 kg m^{-3} and XG = 1400 kg m^{-3} . Similar surface concentrations for XG and CNC ($\sim 4.3 \mu\text{g cm}^{-2}$) are found in (CNC5-XG) film, whereas in (CNC3-XG) film, lower surface concentrations of CNC and XG are found. Without salt, a XG/CNC ratio of roughly 1 is obtained for both CNC concentration conditions, in agreement with previous findings⁹. In contrast, the addition of salt results in a lower CNC/XG ratio of approximately 0.6. This suggests that the mechanisms of adsorption with and without ionic strength are not strictly identical. Adsorption of XG seems to be more efficient when the CNC concentration is high than when NaCl is added. This could indicate that the CNC surface is more available for XG interaction, and that the particles start to form particle clusters as the ionic strength increases, as previously observed for gold nanoparticles^{32, 34}. It is therefore likely that the CNCs are adsorbed under a slightly associated form, limiting the availability of the CNC surface for XG adsorption. In the case of an increase in the CNC concentration, the nanocrystals still behave like individual particles. This different adsorption of XG can be the reason for the difference observed when CNC5s and CNC3s are adsorbed on the CNC3 film (Fig. 2). A sharp increase is observed at the adsorption of the 5th cycle with CNC3s, whereas the change of slope is observed at the 6th cycle for the CNC5s. When salt is added, CNC interactions are strongly screened and densification may occur, even if the amount of XG available for interaction is low, whereas when the CNC concentration increases, the transition

is smoother and requires an initial adsorption of higher amount of CNC, thus inducing a higher adsorption of XG and resulting in an increase in slope growth. This mechanism should be verified in a future study.

In summary, we present a very simple and efficient way to tune the architecture of fully biobased multilayered thin films by changing the CNC concentration. This finding indicates that the increase of the CNC concentration leads to a denser adsorption of nanocrystals on the surface and thus supports the change in the modification of the hydrodynamic radius through the collapse of the electrical double layer. This amazing property is useful for applying coatings with tunable surface density throughout the thickness of the film and is effective for preparing materials with optimized properties. This variation in the architecture of these films can be especially useful for varying film porosity and for related functions such as the visual recognition of transfer properties.

Supporting Information

Table S1. Parameters from the best fits

Film at air interface	Layer 1	Layer 2	Layer 3	Layer 4	Layer 5
(CNCh3-XG) ₅	d = 10.6 $\rho = 1.47$ $\sigma = 3.0$	d = 14.4 $\rho = 1.06$ $\sigma = 3.4$	d = 8.8 $\rho = 1.26$ $\sigma = 3.0$	d = 6.0 $\rho = 0.70$ $\sigma = 2.9$	
(CNCd3-XG) ₅	d = 9.1 $\rho = 2.00$ $\sigma = 2.2$	d = 14.6 $\rho = 2.29$ $\sigma = 5.9$	d = 8.4 $\rho = 1.02$ $\sigma = 4.0$	d = 8.3 $\rho = 0.42$ $\sigma = 3.4$	
(CNCh5-XG) ₅	d = 9.8 $\rho = 1.49$ $\sigma = 2.5$	d = 15.1 $\rho = 1.68$ $\sigma = 6.2$	d = 16.0 $\rho = 1.22$ $\sigma = 5.4$	d = 26.4 $\rho = 1.61$ $\sigma = 6.7$	
(CNCd5-XG) ₅	d = 5.6 $\rho = 2.66$ $\sigma = 2.8$	d = 20.3 $\rho = 1.86$ $\sigma = 4.9$	d = 20.1 $\rho = 2.38$ $\sigma = 5.1$	d = 19.2 $\rho = 1.89$ $\sigma = 8.7$	
(CNCh3s-XG) ₅	d = 16.2 $\rho = 1.26$ $\sigma = 4.7$	d = 21.5 $\rho = 1.68$ $\sigma = 8.0$	d = 20.0 $\rho = 1.54$ $\sigma = 6.9$	d = 13.9 $\rho = 0.93$ $\sigma = 4.8$	d = 7.7 $\rho = 0.09$ $\sigma = 1.9$
(CNCd3s-XG) ₅	d = 15.3 $\rho = 2.35$ $\sigma = 5.5$	d = 9.6 $\rho = 3.17$ $\sigma = 4.1$	d = 15.9 $\rho = 1.75$ $\sigma = 3.5$	d = 15.4 $\rho = 1.49$ $\sigma = 5.5$	d = 17.6 $\rho = 0.81$ $\sigma = 8.4$

REFERENCES

- (1) Habibi, Y.; Lucia, L. A.; Rojas, O. J. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical reviews* 2010, 110, 3479-3500.
- (2) Tingaut, P.; Zimmermann, T.; Sebe, G. Cellulose nanocrystals and microfibrillated cellulose as building blocks for the design of hierarchical functional materials. *Journal of Materials Chemistry* 2012, 22, 20105-20111.
- (3) Lin, N.; Huang, J.; Dufresne, A. Preparation, properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials: a review. *Nanoscale* 2012, 4, 3274-3294.
- (4) Martin, C.; B., Jean. Nanocellulose/polymer multilayered thin films: tunable architectures towards tailored physical properties. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* 2014, 29, 19-30.
- (5) Podsiadlo, P.; Choi, S. Y.; Shim, B.; Lee, J.; Cuddihy, M.; Kotov, N. A. Molecularly engineered nanocomposites: Layer-by-layer assembly of cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules* 2005, 6, 2914-2918.
- (6) Jean, B.; Heux, L.; Dubreuil, F.; Chambat, G.; Cousin, F. Non-Electrostatic Building of Biomimetic Cellulose-Xyloglucan Multilayers. *Langmuir* 2009, 25, 3920-3923.
- (7) Cerclier, C.; Cousin, F.; Bizot, F.; Moreau, C.; Cathala, C. Elaboration of Spin-Coated Cellulose-Xyloglucan Multilayered Thin Films. *Langmuir* 2010, 26, 17248–11725.
- (8) Cerclier, C.; Lack-Guyomard, A.; Moreau, C.; Cousin, F.; Beury, N.; Bonnin, E.; Jean, B.; Cathala, B. Coloured Semi-reflective Thin Films for Biomass-hydrolyzing Enzyme Detection. *Advanced Materials* 2011, 23, 3791–3795.
- (9) Cerclier, C. V.; Guyomard-Lack, A.; Cousin, F.; Jean, B.; Bonnin, E.; Cathala, B.; Moreau, C. Xyloglucan-Cellulose Nanocrystal Multilayered Films: Effect of Film Architecture on Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules* 2013, 14, 3599-3609.
- (10) Hanus, J.; Mazeau, K. The xyloglucan-cellulose assembly at the atomic scale. *Biopolymers* 2006, 82, 59-73.
- (11) Lopez, M.; Bizot, H.; Chambat, G.; Marais, M.-F.; Zykwinska, A.; Ralet, M.-C.; Driguez, H.; Buléon, A. Enthalpic Studies of Xyloglucan– Cellulose Interactions. *Biomacromolecules* 2010, 11, 1417-1428.
- (12) Podsiadlo, P.; Sui, L.; Elkasabi, Y.; Burgardt, P.; Lee, J.; Miryala, A.; Kusumaatmaja, W.; Carman, M. R.; Shtein, M.; Kieffer, J. Layer-by-layer assembled films of cellulose nanowires with antireflective properties. *Langmuir* 2007, 23, 7901-7906.
- (13) Cranston, E. D.; Gray, D. G. Morphological and optical characterization of polyelectrolyte multilayers incorporating nanocrystalline cellulose. *Biomacromolecules* 2006, 7, 2522-2530.

- (14) Hu, G.; Heitmann Jr, J. A.; Rojas, O. J. In situ monitoring of cellulase activity by microgravimetry with a quartz crystal microbalance. *The Journal of Physical Chemistry B* 2009, 113, 14761-14768.
- (15) Suchy, M.; Linder, M. B.; Tammelin, T.; Campbell, J. M.; Vuorinen, T.; Kontturi, E. Quantitative Assessment of the Enzymatic Degradation of Amorphous Cellulose by Using a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Langmuir* 2011, 27, 8819-8828.
- (16) Cheng, G.; Datta, S.; Liu, Z.; Wang, C.; Murton, J. K.; Brown, P. A.; Jablin, M. S.; Dubey, M.; Majewski, J.; Halbert, C. E.; Browning, J. F.; Esker, A. R.; Watson, B. J.; Zhang, H.; Hutcheson, S. W.; Huber, D. L.; Sale, K. L.; Simmons, B. A.; Kent, M. S. Interactions of Endoglucanases with Amorphous Cellulose Films Resolved by Neutron Reflectometry and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Langmuir* 2012, 28, 8348-8358.
- (17) Cerclier, C.; Guyomard-Lack, A.; Moreau, C.; Cousin, F.; Beury, N.; Bonnin, E.; Jean, B.; Cathala, B. Coloured Semi-reflective Thin Films for Biomass-hydrolyzing Enzyme Detection. *Advanced Materials* 2010, 23, 3791-3795.
- (18) Cousin, F.; Ott, F.; Gibert, F.; Menelle, A. EROS II: A boosted time-of-flight reflectometer for multi-purposes applications at the Laboratoire Léon Brillouin. *The European Physical Journal Plus* 2011, 126, 1-11.
- (19) Guyomard-Lack, A.; Cerclier, C.; Beury, N.; Jean, B.; Cousin, F.; Moreau, C.; Cathala, B. Nano-structured cellulose nanocrystals-xyloglucan multilayered films for the detection of cellulase activity. *European Physical Journal-Special Topics* 2012, 213, 291.
- (20) von Klitzing, R. Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2006, 8, 5012-5033.
- (21) Wågberg, L.; Decher, G.; Norgren, M.; Lindström, T.; Ankerfors, M.; Axnäs, K. The build-up of polyelectrolyte multilayers of microfibrillated cellulose and cationic polyelectrolytes. *Langmuir* 2008, 24, 784-795.
- (22) Moreau, C.; Beury, N.; Delorme, N.; Cathala, B. Tuning the Architecture of Cellulose Nanocrystal-Poly(allylamine hydrochloride) Multilayered Thin Films: Influence of Dipping Parameters. *Langmuir* 2012, 28, 10425-10436.
- (23) Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers. *Macromolecules* 1999, 32, 8153-8160.
- (24) Lowack, K.; Helm, C. A. Molecular mechanisms controlling the self-assembly process of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules* 1998, 31, 823-833.
- (25) Aulin, C.; Varga, I.; Claesson, P. M.; Wågberg, L.; Lindström, T. Buildup of polyelectrolyte multilayers of polyethyleneimine and microfibrillated cellulose studied by in situ dual-polarization interferometry and quartz crystal microbalance with dissipation. *Langmuir* 2008, 24, 2509-2518.
- (26) Lvov, Y.; Ariga, K.; Onda, M.; Ichinose, I.; Kunitake, T. Alternate assembly of ordered multilayers of SiO₂ and other nanoparticles and polyions. *Langmuir* 1997, 13, 6195-6203.

- (27) Kalashnikova, I.; Bizot, H.; Bertoncini, P.; Cathala, B.; Capron, I. Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. *Soft Matter* 2013, 9, 952-959.
- (28) Hirai, A.; Inui, O.; Horii, F.; Tsuji, M. Phase separation behavior in aqueous suspensions of bacterial cellulose nanocrystals prepared by sulfuric acid treatment. *Langmuir* 2008, 25, 497-502.
- (29) Araki, J.; Kuga, S. Effect of trace electrolyte on liquid crystal type of cellulose microcrystals. *Langmuir* 2001, 17, 4493-4496.
- (30) Boluk, Y.; Lahiji, R.; Zhao, L.; McDermott, M. T. Suspension viscosities and shape parameter of cellulose nanocrystals (CNC). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2011, 377, 297-303.
- (31) Kooij, E. S.; Brouwer, E. M.; Wormeester, H.; Poelsema, B. Ionic strength mediated self-organization of gold nanocrystals: an AFM study. *Langmuir* 2002, 18, 7677-7682.
- (32) Winkler, K.; Paszewski, M.; Kalwarczyk, T.; Kalwarczyk, E.; Wojciechowski, T.; Gorecka, E.; Pocięcha, D.; Holyst, R.; Fialkowski, M. Ionic Strength-Controlled Deposition of Charged Nanoparticles on a Solid Substrate. *The Journal of Physical Chemistry C* 2011, 115, 19096-19103.
- (33) Nishiyama, Y.; Isogai, A.; Okano, T.; Müller, M.; Chanzy, H. Intracrystalline deuteration of native cellulose. *Macromolecules* 1999, 32, 2078-2081.
- (34) Brouwer, E. M.; Kooij, E. S.; Wormeester, H.; Poelsema, B. Ionic strength dependent kinetics of nanocolloidal gold deposition. *Langmuir* 2003, 19, 8102-8108.

III. Exploration de l'architecture et de la susceptibilité des assemblages xyloglucanes-nanocristaux de cellulose à l'hydrolyse enzymatique, à différents régimes d'adsorption (article n° 3)

Contexte et objectif

Le travail décrit dans l'article précédent a permis de mettre au point des films, modèles de substrats réels relativement plus simple avec architecture contrôlée et modulable à façon. La variation de la concentration des CNC a permis l'obtention des films (CNC-XG) avec des caractéristiques structurales différentes à savoir le mode de dépôt de CNC, la porosité et les fractions volumiques de polymères constitutifs. La différence d'architecture des films suggèrent des modes d'adsorption différents des chaînes de XG ayant pour conséquences la formation d'assemblage plus ou moins denses. Toutefois, cette information ne donne pas d'indication sur l'architecture des complexes dans les couches et l'accessibilité des chaînes de xyloglucane dans l'assemblage. En effet, ces chaînes peuvent adopter, soit un régime d'adsorption en chaînes étendues, soit en boucles. Les études déjà réalisées dans la littérature indiquent que les chaînes adsorbés sous forme de trains ne sont pas dégradées par les enzymes (Park and Cosgrove, 2012; Pauly, et al., 1999). La détermination de cette architecture dans les couches n'est également pas aisée.

Notre objectif est donc de mettre en œuvre des complexes XG/CNC dans des conditions plus simples, en suspension. Ce système témoin est utilisé pour étudier le comportement d'adsorption de XG sur les CNC à différents ratio de concentrations XG/CNC, en relation avec l'organisation du complexe XG/CNC et la susceptibilité des XG à l'hydrolyse enzymatique.

Cette étude permettrait d'aider à mieux comprendre les phénomènes d'organisation des assemblages XG/CNC au sein des films. Cela permettrait ensuite d'apporter une interprétation plus complète de la relation entre les différents paramètres physicochimiques mis en jeu lors de la construction des films et le processus de leur dégradation enzymatique.

Exploring architecture of xyloglucan cellulose nanocrystal complexes through enzyme susceptibility at different adsorption regimes

Abir Dammak, Bernard Quémener, Estelle Bonnin, Camille Alvarado, Brigitte Bouchet, Ana Villares, Céline Moreau and Bernard Cathala

AUTHORS' ADDRESS

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, 44316 Nantes, France

KEYWORDS

Cellulose nanocrystals; Xyloglucan; Adsorption isotherm; Enzymatic degradation; Xyloglucanase; Immunolabeling.

ABSTRACT

Xyloglucan (XG) is believed to act as a cementing material that contributes for the crosslinking and mechanical properties of the cellulose framework in plant cell walls. XG can adsorb to the cellulose nanocrystal (CNC) surface *in vitro* in order to simulate this *in vivo* relationship. The target of our work was to investigate the sorption behavior of tamarind seed XG on CNC extracted from cotton linters at different XG/CNC concentration ratios, i.e., different adsorption regimes regarding the XG-CNC complex organization and the enzymatic susceptibility of XG.

First, we determined the adsorption isotherm. Secondly, XG-CNC complexes were enzymatically hydrolyzed using a xyloglucan-specific endoglucanase in order to quantify the different XG fractions involved in binding to CNC and to determine adsorption regimes, i.e., presence of loops, tails and trains. Finally, the architecture of the XG/CNC complex was investigated by TEM imaging of negatively stained XG/CNC suspensions and XG immunolabeled suspensions at different XG/CNC concentration ratios, both before and after xyloglucanase hydrolysis process. This study revealed that an increasing XG/CNC concentration ratio led to a change in the XG binding organization to CNC. At low XG/CNC concentration ratios, almost all XG chains were bound as trains to the CNC surface. In contrast, at increasing XG/CNC concentration ratios, the proportion of loops and tails increases. The organization change induces CNC aggregation to form a cellulose/XG network at low XG/CNC regimes, whereas CNC remains in the form of individual particles at higher XG/CNC regimes. Results are discussed both regarding the biological role of XG in plant cell walls and in the perspective of designing new bio-based materials.

INTRODUCTION

Xyloglucans are an important group of hemicelluloses that occur in the primary cell walls of higher plants. Xyloglucans interact with cellulose microfibrils via hydrogen bonds, van der Waals and polar interactions^{1, 23, 4}. These interactions lead to the formation of a flexible network, which plays an important role in cell wall integrity⁵⁻⁸. The basis for such interactions is believed to be the characteristic β -(1-4)-glucosyl backbone present in both XGs and cellulose⁵. The presence of substituents attached to the β -1,4-linked D-Glcp-based backbone in XGs is the structural particularity that distinguishes it from cellulose. The repeating unit of XGs in dicotyledons consists of four backbone glucosyl(G) residues that are predominantly substituted at C-6 with α -

D-Xylp-(1→6)moieties (X). The latter may also be attached to other sugars, most frequently D-galactose (L) and L-fucose (F)⁸.

In order to directly demonstrate the XG-cellulose nanocrystal (CNC) assembly, *in vivo* approaches, including microscopic^{9, 12} and spectroscopic¹⁰ assessments and enzymatic degradation processes¹¹, have been performed. These approaches have been completed by *in vitro* experiments in order to obtain a deeper understanding of the different factors that may influence the adsorption process. Binding capacities for different XGs and cellulose sources and adsorption isotherms of XGs were determined. The influence of XG structures such as molecular weight and substitution pattern have been also investigated^{4, 12-15}.

The combination of data from *in vivo* and *in vitro* approaches has led to the so-called “tethered network model” in which three XG domains are defined. The first domain includes the non-directly bound parts of XG on cellulose, such as loops and tails that can be degraded by specific enzymes, namely endo-glucanases. In the second domain (to which the major part of XGs belongs), the XGs are believed to be directly in contact with cellulose forming the so-called trains, which cover the microfibrils, and can be extracted with concentrated alkali solutions. Finally, the third domain consists of XGs entrapped within the amorphous cellulose microfibrils, which are only accessible with the help of cellulases after alkaline treatment¹⁶⁻¹⁹. Recently, Park et al.(2012) proposed an improved version of this model by using different enzymes to digest XG domains and to determine the exact location of XG¹¹. Their results made it possible to describe a new architecture in which a minor fraction of the XG acts as a microfibril adhesive, forming a sandwich-like structure where XG is placed between two adjacent cellulose surfaces. The relative proportion of each type of these domains is probably relevant to the understanding of the XG-CNC network properties and functions. In the present work, we aim at investigating the architecture of XG-CNC assemblies, i.e., the proportion of trains and loops and tails, and its

influence on the aggregation of cellulose-XG complexes. To do this, we first evaluated the adsorption isotherms of XG on cotton CNC to determine the XG concentration threshold level for which the CNC surface is saturated and to thus define different XG regimes for adsorption. Complexes obtained at various XG/CNC concentration ratios were submitted to enzymatic digestion to determine the evolution of the proportion of accessible (loops and tails) and inaccessible XG fractions (trains). The β -(1, 4)-endoglucanase from *Paenibacillus* sp. that belongs to the family 74 of glycoside hydrolases was chosen because it efficiently cleaves the XG backbone and exhibits high specificity towards XG²⁰. Hydrolysis of tamarind XG generates XG oligosaccharides (XGOs) that have a tetrasaccharide backbone (XXXG, XLXG, XXLG, XLLG, etc.) where the letters G, X and L refer to an unbranched Glc residue, an α -D-Xylp-(1,6)- β -D-Glcp segment, and a β -D-Galp-(1,2)- α -D-Xylp-(1,6)- β -D-Glcp segment, respectively. Determination of XGO composition was achieved by HPAEC. In parallel, the dispersion state of CNC suspension was investigated by TEM analysis for two XG/CNC concentration ratios representing the two main adsorption regimes.

Results indicated that at low XG/CNC concentration ratios, almost none of XG chains are accessible to enzymes, suggesting that XG are bound as trains to the CNC surface. In contrast, at high XG/CNC concentration ratios, the amount of the XG fraction accessible to enzymes increases, suggesting the more frequent occurrence of “loops” and “tails”. Whereas a strong aggregation of CNC is observed at low XG/CNC ratios, CNC dispersion is enhanced at high XG/CNC ratios, as observed by TEM. At high concentration ratios, XG induces the formation of individual CNCs, probably due to steric hindrance induced by XG adsorption on the CNC surface, whereas at low XG/CNC ratios, it induces the formation of connected CNC networks. These results pave the way to the development of new cellulose-based assemblies at the

nanometric scale with optimized internal structure characteristics inspired by the XG-CNC assembly.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials.

Xyloglucan solutions. Xyloglucan from *Tamarindusindica* ($M_w=202$ kDa; viscosity: 6.5 dLg^{-1}) was provided by Megazyme (Bray, County Wicklow, Ireland). XG solutions were prepared in MilliQ water at different concentrations ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $1250 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Monosaccharide composition of XG. Identification and quantification of tamarind xyloglucan sugars were checked by HPAEC. Material was firstly hydrolyzed in 1 M sulfuric acid (2h, 100°C) (Blakeney, 1983). The hydrolysate was then diluted 20 times, filtrated on a $0.45\mu\text{m}$ filter (Millipore membrane) and injected onto an analytical CarboPac PA-1 column (4 x 250 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA), thermostated at 25°C and equipped with a Dionex CarboPac PA-1 guard column (4 x 50mm). The separation of sugars was performed in isocratic conditions using 25 mM NaOH at a flow rate of 1mL min^{-1} . Standard sugars, namely arabinose and glucose (Fluka, Germany), galactose and xylose (Sigma, USA) were used for the identification and quantification of released sugars.

The total sugar yield was $92.6\pm0.6\%$ with a monosaccharide composition on dry matter basis of Glc= $45.1\pm0.05\%$, Xyl= $30.4\pm1.2\%$, Gal= $15.6\pm0.7\%$, and Ara= $1.5\pm0.0\%$.

Cellulose nanocrystal (CNC) suspension. Cellulose nanocrystals (CNC) were obtained from acid hydrolysis (H_2SO_4) of cotton linters as previously described ²¹. This procedure leads to a stable colloidal CNC suspension due to the presence of anionic sulfate groups on the CNC surface. The surface charge density of CNCs was determined by conductometric titration (Titrand 856 Conductometer Module, Metrohm, Switzerland) to be equal to 0.304 e nm^{-2} . CNC nanorods

ranging from 100-300 nm in length and 6-8 nm in width were obtained²². A colloidal suspension of CNC was used at 5 mg mL⁻¹ for all experiments.

Enzyme. Xyloglucan-specific endo-beta-1, 4-glucanase from *Paenibacillus* sp. (CAZY family: GH74; specific activity: 45 U mg⁻¹; 100 U mL⁻¹ at 70°C; pH 6; with tamarind xyloglucan being used as a substrate at 5mg mL⁻¹) was obtained from Megazyme (Bray, County Wicklow, Ireland). Enzyme solutions were prepared in 100mM buffer acetate at pH 6. According to our experimental conditions, the enzymatic activity on the tamarind XG substrate was determined following incubation with 1 mg mL⁻¹ enzyme solution at 20°C for 10 min, by measuring the newly-formed reducing ends²³.

Adsorption Isotherm.

Adsorption experiments were performed using CNC suspension at a constant concentration of 5 mg mL⁻¹ and XG solutions with various concentrations ranging from 125 to 1250 µg mL⁻¹, in order to have an XG/CNC concentration ratio ranging from 25 µg XGmg⁻¹ CNC to 250 µg XGmg⁻¹ CNC. CNC/XG mixtures were obtained by simply mixing CNC dispersion and XG solutions under stirring at 20°C for 18 h, after which adsorption equilibrium is known to be reached⁴. Free xyloglucan was then isolated by precipitation of CNC with the addition of sodium chloride (250 mM) and centrifuged at 14000 rpm (9500 g) for 15 min at 20°C. The supernatants containing free XGs (not bound to CNC) were then recovered to determine their total neutral sugar contents using the automated colorimetric orcinol method²⁴. The amount of adsorbed material was calculated from the difference in sugar content measured from XG solutions before and after adsorption on CNC. A negative control consisting of supernatants collected in the same conditions, i.e., after CNC precipitation from XG-free CNC suspension was also analyzed to

verify the absence of sugars released by CNC. XG concentration data were the result of three independent measurements and the average value was calculated.

Enzymatic degradation of XG solution and XG/CNC mixtures.

In order to determine the accessible and inaccessible XG fractions, all the enzymatic degradation assays of XG-CNC complexes were performed using GH74xyloglucanase. As a control experiment, a total enzymatic hydrolysis of xyloglucan solution was carried out in order to determine the XG oligomer (XGO) composition. Two strategies for the hydrolysis of XG-CNC complexes were conducted: (i) In the first assay, XG and CNC were incubated for 18 h at 20°C at various XG/CNC concentration ratios: 25, 50, 100, 150, 200 and 250 $\mu\text{gXGmg}^{-1}\text{CNC}$. After incubation, NaCl at a final concentration of 250 mM was added to the reaction mixture to precipitate XG-CNC complexes. The XG/CNC complexes were then centrifuged (15 min, 9500 g at 20°C). Finally, the unbound XGs that remained soluble in the supernatants were treated with GH74xyloglucanase, and the XGOs were analyzed by HPAEC to determine the composition of unbound XGs for each XG/CNC ratio. (ii) In the second assay, XG and CNC were incubated with GH74 xyloglucanase, as previously described, prior to the addition of NaCl. After the completion of hydrolysis, CNCs, complexed to an enzyme-non-accessible XG fraction, were precipitated and separated by centrifugation. The XGOs remaining in the supernatants were analyzed by HPAEC to determine the composition of free XGOs and XGOs involved in the enzyme-accessible fraction (i.e., loops and tails).

Identification of XGOs. The HPAEC-PAD system is equipped with an ICS-3000 pump (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) fitted with an AS 3500 auto-sampler (Thermo Separation Products, USA) and an ED 50A electrochemical detector (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) working in amperometric mode. An aliquot of 20 μL of the different enzymatic digests was injected onto an

analytical Carbowpac PA-200 column (3 x 250 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA), thermostated to 25°C using a CROCO-CIL®oven (Cluzeau Info Labo, C.I.L., France) and equipped with a Dionex Carbowpac PA-200 guard column (3 x 50mm). Dionex Chromeleon chromatography software was used to control the chromatograph and to process the data. The separation and identification of released XGOs was performed at a flow rate of 0.45 mL min⁻¹ in new isocratic conditions using 100 mM NaOH containing 40 mM sodium acetate throughout the run (Quémener et al., under publication). The commercial mixture of XGOs (XXXG, XXLG and XLLG) was purchased from Megazyme (Bray, County Wicklow, Ireland) and was used for the identification and quantification of released XGOs.

XG/CNC sample preparation for Transmission Electron Microscopy (TEM).

CNC/XG mixtures at two different XG/CNC concentration ratios (25 µg XG mg⁻¹ CNC and 250 µg XG mg⁻¹ CNC) were prepared as previously described. After centrifugation (15 min, 14000 rpm, 9500 g) at 20°C, the pellets containing the XG-CNC complexes were used for TEM imaging. Pellets were washed three times with 250 mM NaCl under the same centrifugation conditions. The XG-CNC suspensions obtained were dialyzed using Membrane Cellu Sep (0.32 mL cm⁻¹) until total removal of salt monitored by the conductivity of suspensions (Titrand 856 Conductometer Module, Metrohm, Switzerland).

Twenty µL of CNC or XG-CNC dispersion, diluted 8-fold, were then deposited on freshly glow-discharged carbon coated copper grids (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, UK) for 2 min, and the excess water was removed by blotting with a filter paper. The sample was then immediately negatively stained with aqueous uranyl acetate solution (1 % w/v) for 2 min and dried before observation. The grids were examined with a Jeol JEM-1230 transmission electron microscope with an accelerating voltage of 80 kV.

Immunolabeling of XG. LM15 (Rat monoclonal anti-xyloglucan antibody; epitope structure for carbohydrate antigen: XXXG heptasaccharides from tamarind seed xyloglucan) was obtained from Plant Probes (LM15-050, Plant Probes)²⁵. Twenty μ L of the suspension were deposited on freshly glow-discharged carbon-coated nickel grids (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, UK) and allowed to dry after blotting with a filter paper. Grids were incubated in a blocking solution of 3% (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) for 30 min at room temperature to block non-specific labeling. Grids were then incubated with primary monoclonal rat antibodies (LM15, diluted at 1:5) in a PBS-Tween buffer (0.1 M PBS supplemented with 1% BSA and 0.05% Tween 20) for 1 h at room temperature. The grids were extensively washed in PBS-Tween buffer and then incubated 1 h at room temperature in the dark with goat anti-rat antibody conjugated with colloidal nanogold (Goat Anti-rat IgG - nanogold; 800.055, Biovalley) complexes diluted 1:20 (v/v) in the PBS-Tween buffer. Labeling was then intensified (30 min) with the silver enhancement kit (Aurion), according to the manufacturer's instructions, and then rinsed in deionized water. The grids were examined with a Jeol JEM-1230 transmission electron microscope with an accelerating voltage of 80 kV.

RESULTS AND DISCUSSION

Adsorption of XG to CNC

Imperviously works, in order to assess the *in vitro* binding of XG to cellulose, adsorption isotherms were achieved using different sources of cellulose^{4, 13, 14, 26}. In these studies, the cellulose substrates are usually insoluble and the cellulose-bound and unbound XG fractions are easily separated by centrifugation. In this study, the adsorption isotherm was also used to assess the binding capacity of XG to CNC. However, due the presence of an anionic charge on the CNC surface, CNCs occur as a stable dispersion in water due to inter-particle electrostatic repulsion.

Thus, in order to separate bound and unbound XG fractions, ionic strength was increased to screen electrostatic repulsion and induce CNC precipitation at the equilibrium. The unbound XG fraction remains soluble, whereas the bound fraction precipitates with the CNC.

The binding capacity, q_e ($\mu\text{g XG mg}^{-1}\text{CNC}$), i.e. The amount of XG adsorbed per unit weight of CNC, was calculated based on the following mass balance equation:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{m_{\text{CNC}}}$$

where C_0 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) is the initial concentration of XG in the liquid phase, C_e ($\mu\text{g mL}^{-1}$) is the concentration of XG remaining in solution at equilibrium after adsorption, V (mL) is the volume of the liquid phase, and m_{CNC} (mg) is the mass of CNC. Figure 1 (a) shows the adsorption isotherms at 20°C of XG on CNC represented as the binding capacity (q_e) as a function of the XG concentration remaining in solution at equilibrium (C_e).

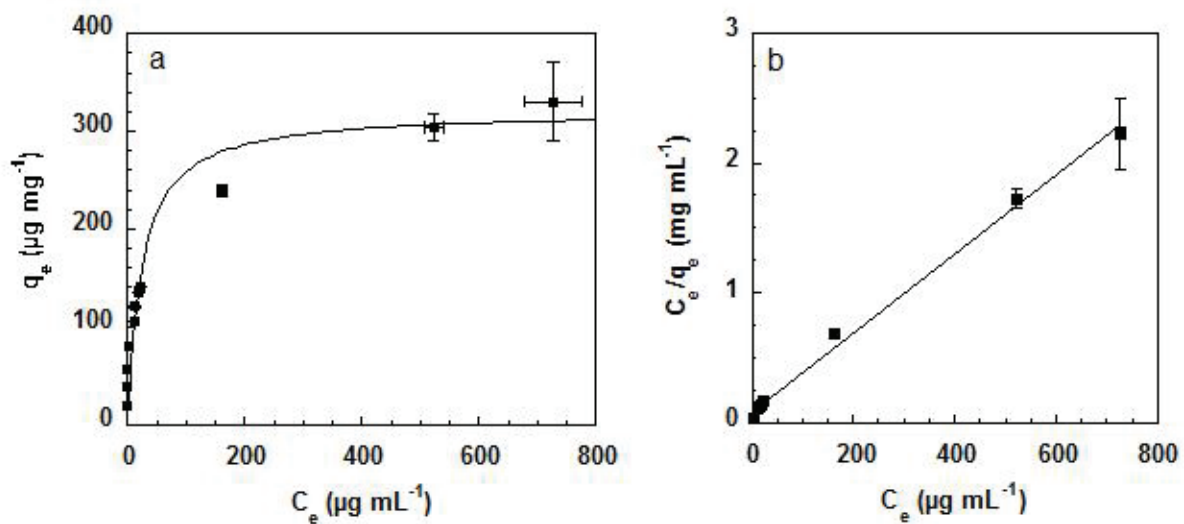


Figure 1.(a) Binding isotherm of tamarind xyloglucan (XG) to cellulose nanocrystals (CNCs) at 20°C;(b)Linearized Langmuir fitting of the adsorption isotherm. The error bars represent the standard deviation calculated from the replicate experiments.

The isotherm adsorption curve shows two distinct regions. The first part of the isotherm corresponds to a low XG concentration ($< 50\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$). The steepness of this part shows that all XG molecules were bound to CNC surfaces, suggesting a first regime of adsorption. The second part of the isotherm shows that at higher XG concentrations ($>100 \mu\text{g mL}^{-1}$), q_e increases less sharply. This suggests that the CNC surface has started to become saturated and indicates the maximum adsorption capacity. In order to quantify the adsorption mechanism, a Langmuir model was applied to the adsorption data. The Langmuir model ²⁷ can be expressed as follows:

$$q_e = q_m \frac{bC_e}{1 + bC_e}$$

where q_m ($\mu\text{g XG mg}^{-1} \text{ CNC}$) is the maximum adsorption capacity, and b ($\text{mL}\mu\text{g}^{-1}\text{XG}$) is the adsorption affinity. The experimental binding isotherm data were plotted according to the linearized form of the Langmuir model (Fig.1b):

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{bq_m} + \frac{C_e}{q_m}$$

The good agreement between experimental data and the model plot suggests that CNCs present only one type of interaction site for XG chains. The maximum adsorption capacity, q_m , calculated

from the slope of the Langmuir linear plot, is $333 \mu\text{g mg}^{-1} \text{CNC}$. Linear plots were likewise previously obtained with native polymeric tamarind XG binding to bacterial microcrystalline cellulose (BMCC), although slightly lower values of q_m were obtained, in the range of $250 \mu\text{g XG mg}^{-1} \text{CNC}^4$. More recently, Gu et al. reported a q_m value of approximately $98 \mu\text{g XG mg}^{-1} \text{CNC}$ from the adsorption isotherm of XG on cotton CNC prepared from HCl hydrolysis and devoid of charges²⁸. The authors attributed this lower value to the occurrence of ink bottle pores that limit the XG adsorption. It is thus possible that the acid used for CNC preparation influences their surface porosity and, consequently, the sorption process.

The other parameter determined from the Langmuir fit is the adsorption constant value (b). This value was about $3.2 \cdot 10^{-2} \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$, in the same range as those previously determined for the adsorption of tamarind XG either on bacterial cellulose ($4.7 \cdot 10^{-2} \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$)⁴ or cotton CNC ($3.3 \cdot 10^{-2} \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$)²⁸. These results reveal the affinity of XG for the CNC surface in these experimental conditions and also emphasize the fact that the occurrence of sulfate charges on the CNC surface does not inhibit the adsorption phenomenon of XG to exposed sites on the CNC surface.

Analysis of enzymatic degradation products

As discussed in the introduction, according to the “tethered network model”, XG polymers associated with CNC can be classified into three categories based on their susceptibility to enzymes and chemical treatments. Tethers, loops and tails that are not directly in contact with the cellulose surface can be degraded by xyloglucan-specific enzymes (accessible XGs), whereas trains that are tightly bound to the surface cannot be degraded by enzymes but are extracted by alkali treatment. The third XG domain corresponds to XG chains entrapped inside or between the cellulose microfibrils, and can be released only by cellulase treatment on cell walls in combination with alkali and xyloglucan-specific enzyme. It is unlikely that the latter XG fraction

exists in simplified model systems constituted by XG adsorbed on CNC. Thus, we assume that the XG chains are only defined as enzyme-accessible (tails + loops) and -inaccessible fractions (trains).

In order to depict the proportion of each fraction, we used an XG-specific endo- β -1,4-glucanase, the xyloglucanase(GH74) from *Paenibacillus* sp. Two different enzymatic hydrolysis experiments were performed (Fig. 2) and used to determine the configuration of XG chains adsorbed onto CNC surfaces as a function of XG/CNC concentration ratio (Fig. 3). Actually, enzymatic hydrolysis of XG was achieved before or after the precipitation of XG-CNC complexes. When enzymatic digestion takes place after the precipitation of XG-CNC complexes, only the unbound XG chains are quantified. In contrast, when digestion is achieved before XG-CNC precipitation, free XG chains and enzyme-accessible fractions are analyzed (Fig. 2). The difference between the two hydrolysis experiments made it possible to determine the amount of tethers (loops and tails), i.e., the enzyme-accessible XG fractions from the XG-CNC complexes. Since the total XG amount was known, the train fraction can be determined. These procedures were applied at various XG/CNC ratios to calculate the variation in the proportions of the accessible and inaccessible XG fractions that varied all along the adsorption isotherm.

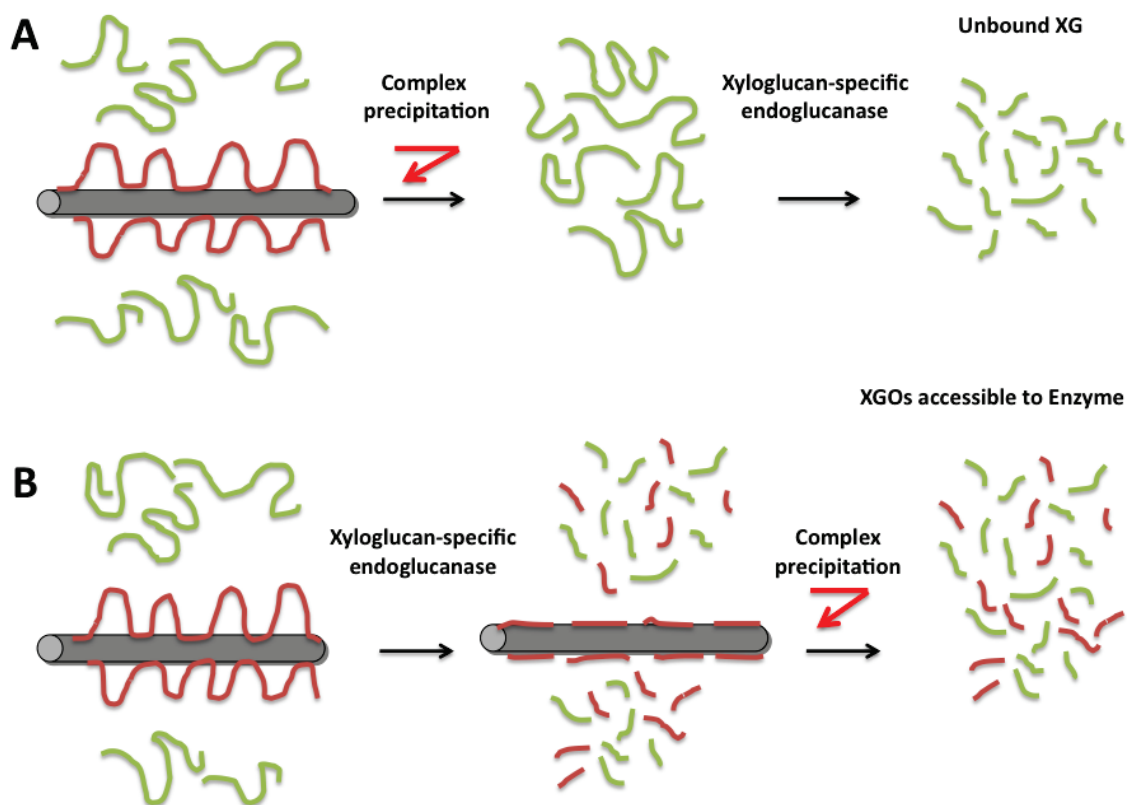


Figure 2. Schematic description of both enzymatic digestion procedures using the β -1,4-endoxyloglucanase. (A) The CNC-XG complexes were first precipitated and the xyloglucan-specific endoglucanase was then applied to the unbound XG. (B) The xyloglucan-specific endoglucanase was first applied on the CNC/XG complexes, and the CNCs carrying residual XG were then precipitated. The gray cylinders represent CNCs, whereas accessible and inaccessible XG chains are represented by green and red lines, respectively.

Figure 3 displays the relative percentage of the accessible XG fraction (loops, tails and tethers) and inaccessible XG fraction (trains) as a function of the XG/CNC concentration ratio. At the lowest XG/CNC concentration ratio, the percentage of train XG fraction is large (about 85%),

indicating that a small amount of accessible XGs are present. As the XG/CNC ratio increases from 100 to 250 $\mu\text{g XG mg}^{-1}\text{ CNC}$, a progressive decrease of the train XG percentage is observed up to a constant value at a percentage of approximately 52%. Consequently, the percentage of loops and tails XG fraction gradually increases and stabilizes from 100 to 250 $\mu\text{g XG mg}^{-1}\text{ CNC}$, with an average value of 48%. The distribution of XG fractions varies according to the XG/CNC ratio, indicating that the XG adsorption may occur differently according to the concentration regime. To our knowledge, these results are the first systematic report on the variation of the different XG fractions as a function of XG proportion. Nevertheless, previous studies have already examined this possibility. For example, in the late 1990s, Pauly et al. investigated the distribution of XG in XG-Avicel composites⁷. They found that about 15% of the XG was released by an XG specific-endoglucanase, suggesting that 85% of the XGs were adsorbed on the cellulose surface. Since the XG/Avicel ratio was 66 mg g^{-1} of cellulose, this result is in rather good agreement with our data with regard to the different type of cellulose and endoglucanase used. In fact, the percentage released in our study by the xyloglucanase for the XG/CNC ratio of 66 mg g^{-1} of cellulose is about 25% (Fig. 3). The same study also focused on the sequential extraction of XG, combining enzymatic and chemical agents to estimate the proportion of non-associated and associated XG fraction etiolated pea stem⁷. About 8% of the cell wall dry weight was solubilized by the action of the XG-specific endoglucanase, 10% was extracted by KOH and, finally, a 3% XG fraction was obtained by combining KOH and endoglucanase action. The XG fraction susceptible to the enzyme corresponds to 38% of the total XG, and the tightly bound XG fraction to 62%. The same authors investigated the susceptibility of XG fractions by sequential extraction of elongating and non-elongating segments of pea stems²⁹. Variations in the proportion of XG solubilized by enzymatic treatments and KOH extraction were revealed

according to the physiological state of the cell wall, emphasizing the possible role of XG in the regulation of plant cell wall growth.

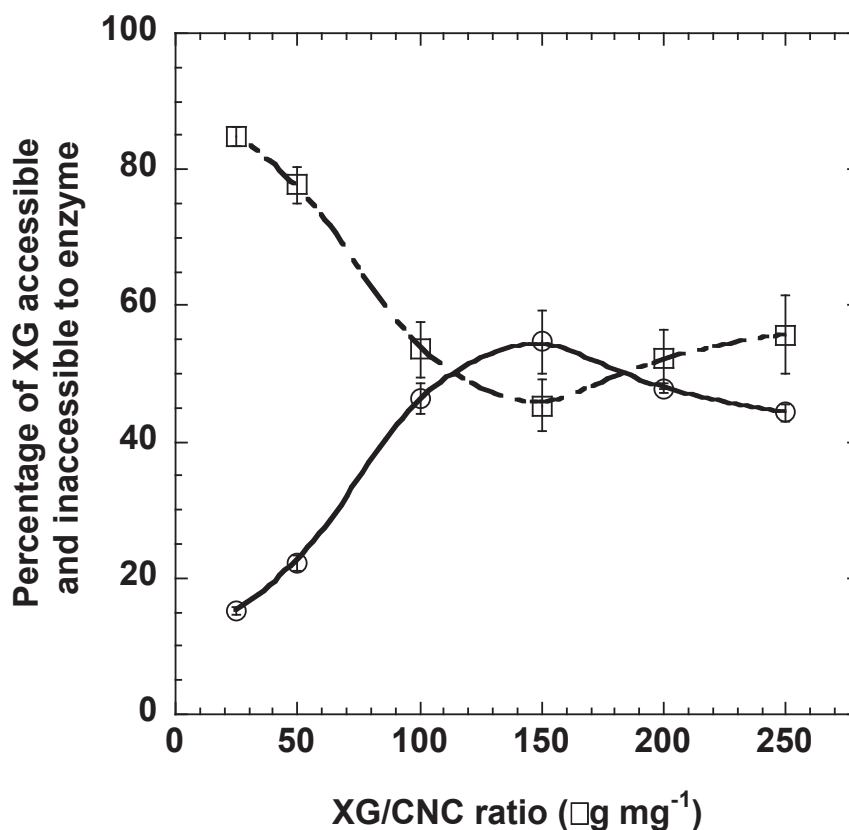


Figure 3. Variation of the relative proportion (%) of the accessible XG fraction (circles and solid line), and the inaccessible XG fraction (squares and dashed line) relative to the total XG fraction as a function of the XG/CNC concentration ratio. Lines are only guides for the eyes. The error bars represent the standard deviation calculated from the replicate experiments.

Another point that was emphasized in Pauly's study was the change in the fine chemical structure of XGs during cell wall growth²⁹. In order to determine if some XGOs are preferentially adsorbed on the surface and may thus provoke a variation in the accessible XGO fraction composition, we

determined the XG oligomer (XGO) composition after enzymatic degradation as a function of the XG/CNC ratio. Figure 4 shows the variation of proportions of the main oligosaccharides normalized to the total XGOs released after enzymatic digestion and analyzed by HPAEC. This was compared to the distribution of XGOs in a solution of XG alone analyzed as a reference. Obviously, there is no striking variation between the XGO composition and the proportion released when the XG is adsorbed on cellulose or when it is hydrolyzed in solution. Only the first XG/CNC ratio ($25 \mu\text{g XGg}^{-1} \text{CNC}$) seems to present a different pattern since two XGOs are absent in the hydrolysate (XXXG and XLXG). However, since the amount of XGOs released at this ratio is very low, the concentrations of the lacking XGOs are probably under the detection limit of the analytical technique. The absence of the variation in XGO distribution can be explained either by similar affinity between the XGOs, regardless of their structure, or by the random distribution of the XGOs along the polymer chain, since a minimal number of XGOs is required for adsorption¹³. Since previous reports indicate that the substitution pattern can influence the adsorption affinity of XG to cellulose³⁰, it is likely that the tamarind XGs have a statistical structure without any blockwise distribution of XGOs.

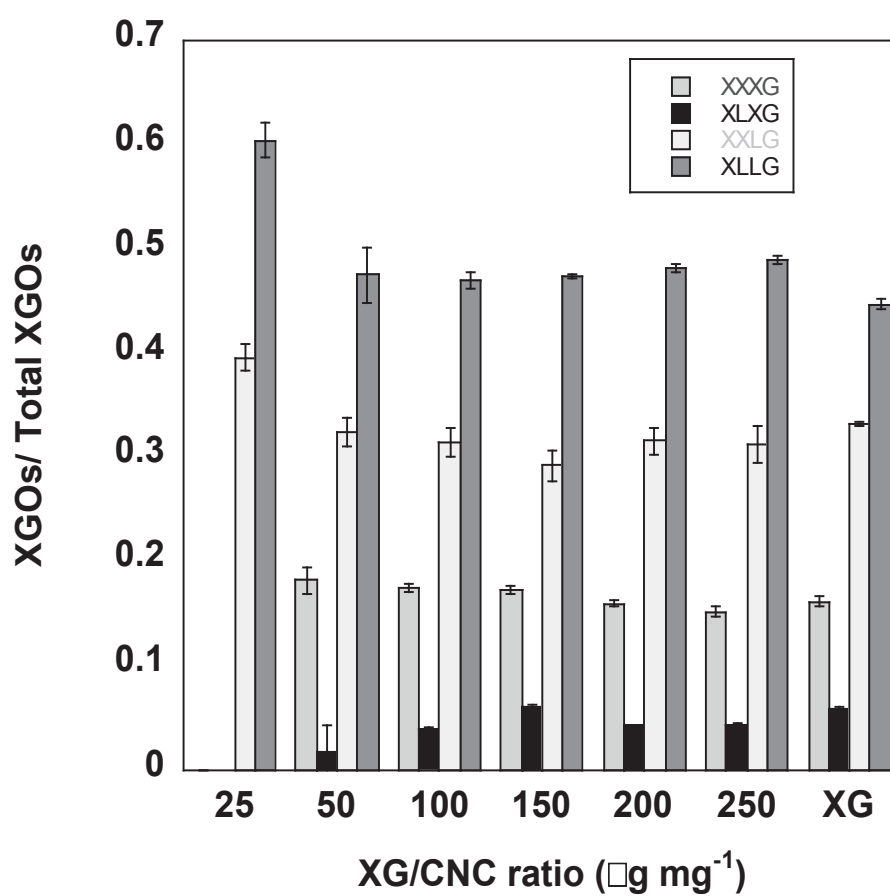


Fig. 4. Normalized distribution of XGOs as a function of the XG/CNC ratio ($\mu\text{g mg}^{-1}$). The “XG sample” corresponds to the reference XGO distribution determined from the enzymatic hydrolysis of XG in the absence of CNC.

Organization of the XG-CNC complexes

In order to gain further insights into the characterization of CNC-XG complex organization, samples representative of the two different regions of the adsorption regime, i.e., XG/CNC concentration ratios of 25 $\mu\text{g XG mg}^{-1}\text{ CNC}$ and 250 $\mu\text{g XG mg}^{-1}\text{ CNC}$, were analyzed by TEM after negative staining before and after hydrolysis by xyloglucanase. In addition, immunolabeling was performed using anti-xyloglucan antibody LM15, a rat monoclonal antibody able to specifically detect the XXXG structural motif of xyloglucans²⁵. Representative images of the samples are shown in Fig. 5. CNC without XG were also shown as reference images (Figs. 5a and 5a'). CNCs show homogeneous morphologies of well-defined cellulose nanorods, with lengths ranging from ~100 to 300 nm, as already reported for cotton CNC³¹. When LM15 was applied, no significant immunolabeling could be detected from the XG-free CNC sample, and only limited nonspecific binding was visualized. This confirms the absence of any potential epitopes of LM15 on CNC and supports the specificity of the LM15 antibody to xyloglucans. It should be noted that the CNCs predominantly behave as individual objects and no large aggregates can be seen, indicating that the preparation method does not induce a strong association among CNCs. In contrast, the XG-CNC complexes with a ratio of 25 $\mu\text{g XG mg}^{-1}\text{ CNC}$ before xyloglucanase hydrolysis displayed a very strong aggregation pattern (Figs. 5b and 5b'). Almost all the CNCs were associated together to form intricate networks. TEM images of LM15 immunolabeling indicated that some epitopes were detected; revealing the presence of XGs (Fig. 5b'). Nevertheless, the general pattern observed from this sample suggested that the CNCs were strongly crosslinked through XG tethers. This point was confirmed by the action of the specific xyloglucanase (Figs. 5c and 5c'). In fact, after the action of the enzyme, the CNCs were better dispersed than in the previous samples, suggesting that some tethers or links between

the CNCs were hydrolyzed (Fig. 5c). Once again, the LM15 immunolabeling was positive and the presence of XGs in the sample was confirmed (Fig. 5c'). Moreover, if we assume that the enzyme has entirely degraded the accessible XG fractions (tethers, loops and tails), it can be hypothesized that LM15 is able to bind to XGs adsorbed on the cellulose surface since the labeling increases after hydrolysis. The increase of the XG/CNC ratio to 250 $\mu\text{g XG mg}^{-1}\text{ CNC}$ induces another striking effect (Figs. 5d-e'). At this ratio, all the CNC-XG complexes behave as individual or geminated nanorods, without any evidence of aggregation. The dispersion appears to be even better compared to the reference sample (Fig. 5a). Once again, the immunodetection of XG was successful (Fig. 5d') and the density of the gold particles was higher than for the other complexes. With regard to the results obtained after the enzymatic degradation, the accessible fraction of XGs can be organized as a corona around CNCs, preventing CNCs aggregation through steric repulsion forces. Confirmation of the presence of the corona hypothesis will require more in-depth characterization, notably using scattering techniques. When the same XG-CNC complex is submitted to xyloglucanase hydrolysis, the dispersion of suspension particles seems to be less efficient than before hydrolysis (Figs. 5d and 5e) and appears to be similar to that of the CNCs reference dispersion (Fig. 5a). This can be explained by the hydrolysis of "loop" and "tail" accessible fractions that limit the interaction between CNCs.

These results are in good agreement with our previous study that reports improved colloidal stability of neutral bacterial cellulose nanocrystals (BCN) by the addition of XG or CMC³². However, in this study, we also demonstrated the role of XGs in the aggregation of CNCs. Indeed, contrary to neutral BCN, CNCs display anionic charges on their surfaces that induce a very efficient colloidal stability. TEM images evidence a strong aggregating effect of XG on

CNCs, probably due to the formation of crosslinks between nanocrystals. Thus, according to the XG/CNC ratio, XG are responsible for two different effects. At low XG/CNC ratios, XGs act as crosslinking agents, whereas at higher ratios, beyond the cellulose surface saturation level, XGs prevent cellulose association and act as dispersing agents. This point was previously demonstrated using a friction experiment between two cellulose sphere surfaces³³. The addition of XGs on the surfaces increases the repulsion forces between the cellulose spheres and therefore decreases the friction between the cellulose surfaces that are saturated by the XG adsorption. Lowered friction can thus be explained by steric repulsion³³. Similarly, construction of XG-CNC multilayer thin films with high XG concentrations cannot be achieved, suggesting a slippery effect of XG when cellulose surface area is fully covered, whereas at lower XG concentrations, XG act as crosslinking agent in the film construction.³⁴ Hence, the XG/CNC ratio can be a key parameter to explain the apparently contrasting properties of xyloglucan, which can act on the one hand, as an adhesive agent and on the other as a lubricant and anti-adhesive polymer. Since it has been demonstrated that the amount of XG can vary according to the physiological state of the plant cell wall, this hypothesis should be examined to investigate the physiological role of XGs in plants.

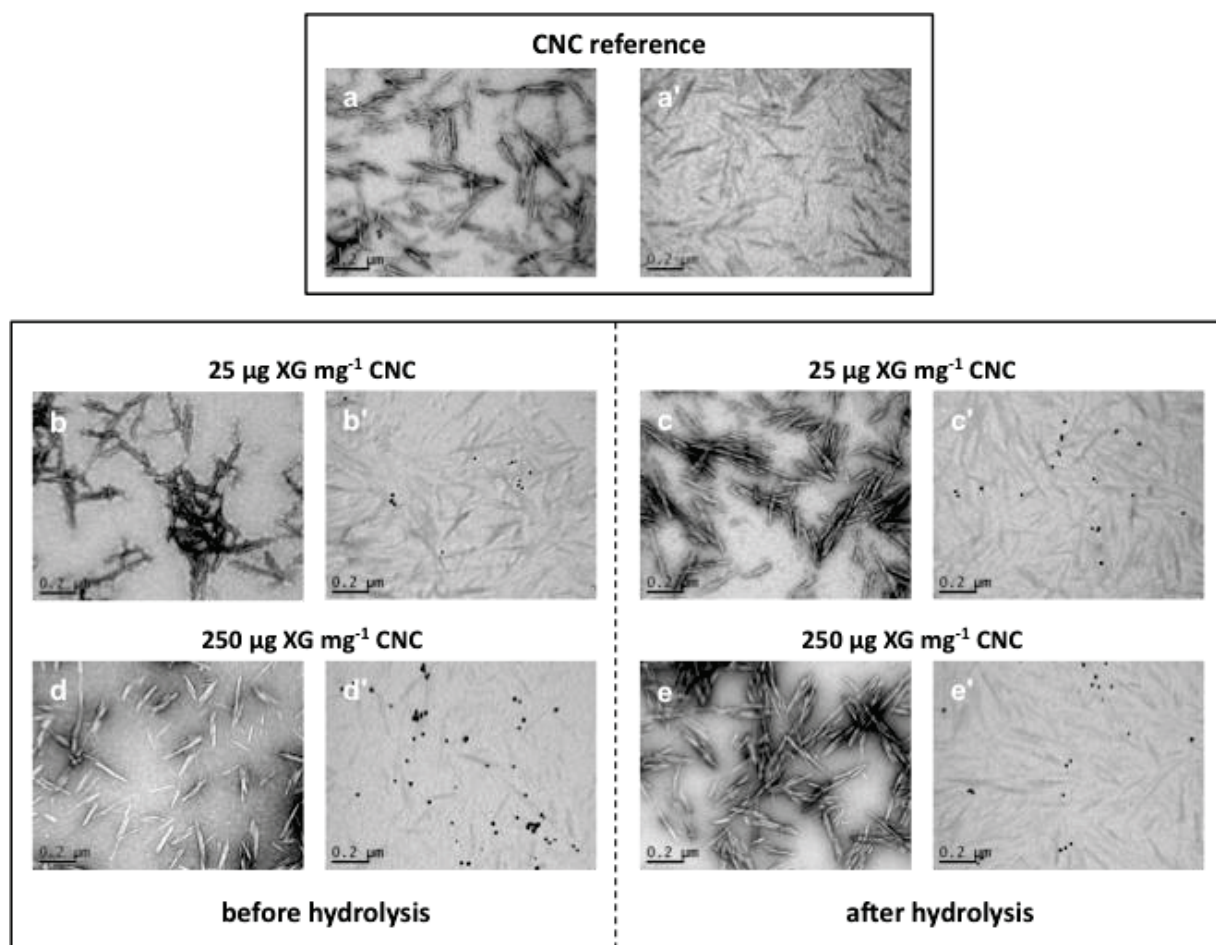


Figure 5. TEM images of CNC dispersion (a, a'), CNC-XG complexes at 25 µg XG mg⁻¹ CNC before xyloglucanase hydrolysis (b, b') and after hydrolysis (c, c'), and CNC-XG complexes at 250 µg XG mg⁻¹ CNC before (d, d') and after hydrolysis (e, e'). Images (a-e) obtained after negatively stained and images (a'-e') obtained after immunolabeling of XG adsorbed to CNC by the monoclonal anti-xyloglucan antibody LM15.

CONCLUSION

We have investigated the *in vitro* binding properties of tamarind XG on CNC using a xyloglucan-specific endoglucanase. The XG-CNC binding behavior was shown to be closely dependent on the XG/CNC concentration ratio. In fact, at low XG-CNC concentration ratios, all XG are bound to the CNC surface. This induces a strong aggregation pattern of CNCs that can be visualized by TEM. In contrast, at higher XG-CNC concentration ratios, the accessible XG fraction increased and XG probably formed ‘‘loops’’ and tails’’ on the CNC surface, inducing steric repulsive interaction between nanocrystals, leading to individual objects. Thus, the XG coatings present two apparently opposed functions. These results can be helpful to provide a better understanding of the physiological role of the XG and may also encourage the development of new bio-based materials.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding authors

Email: * bernard.cathala@nantes.inra.fr

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Marie-Jeanne Crépeau for her technical assistance and the French National Research Agency (ANR) for their financial support through the Reflex Program (ANR P2N 2011). We thank ‘‘Biopolymers Structural Biology’’ Platform (INRA Nantes, France) for the use microscopy facilities.

REFERENCES

1. Hayashi, T.; Maclachlan, G., Pea xyloglucan and cellulose I. Macromolecular organization. *Plant physiology* **1984**, 75, (3), 596-604.
2. McCann, M. C.; Roberts, K., Changes in cell wall architecture during cell elongation. *Journal of Experimental Botany* **1994**, 45, (Special Issue), 1683-1691.
3. Hanus, J.; Mazeau, K., The xyloglucan-cellulose assembly at the atomic scale. *Biopolymers* **2006**, 82, (1), 59-73.
4. Lopez, M.; Bizot, H.; Chambat, G.; Marais, M.-F.; Zykwinska, A.; Ralet, M.-C.; Driguez, H.; Buléon, A., Enthalpic Studies of Xyloglucan– Cellulose Interactions. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (6), 1417-1428.
5. Hayashi, T., Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1989**, 40, 139-168.
6. Carpita, N. C.; Gibeaut, D. M., Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **1993**, 3, (1), 1-30.
7. Pauly, M.; Andersen, L. N.; Kauppinen, S.; Kofod, L. V.; York, W. S.; Albersheim, P.; Darvill, A., A xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Glycobiology* **1999**, 9, (1), 93-100.
8. Fry, S.; York, W.; Albersheim, P.; Darvill, A.; Hayashi, T.; Joseleau, J.; Kato, Y.; Lorences, E.; MacLachlan, G.; Mort, A.; Reid, J.; Seitz, H.; Selvendran, R.; Voragen, A.; White, A., An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol Plant* **1993**, 89, 1 - 3.
9. Fujino, T.; Sone, Y.; Mitsuishi, Y.; Itoh, T., Characterization of cross-links between cellulose microfibrils, and their occurrence during elongation growth in pea epicotyl. *Plant and Cell Physiology* **2000**, 41, (4), 486-494.
10. Dick-Pérez, M.; Zhang, Y.; Hayes, J.; Salazar, A.; Zabolina, O. A.; Hong, M., Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two-and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry* **2011**, 50, (6), 989-1000.
11. Park, Y.; Cosgrove, D., A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases. *Plant physiology* **2012**, 158, (4), 1933-1943.
12. Hayashi, T.; Marsden, M. P.; Delmer, D. P., Pea xyloglucan and cellulose VI. Xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiology* **1987**, 83, (2), 384-389.

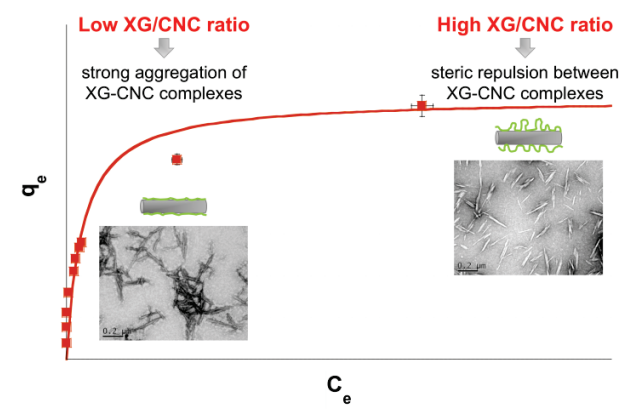
13. Hayashi, T.; Ogawa, K.; Mitsuishi, Y., Characterization of the adsorption of Xyloglucan to Cellulose. *Plant and Cell Physiology* **1994**, 35, (8), 1199-1205.
14. Vincken, J. P.; Keizer, A. d.; Beldman, G.; Voragen, A. G. J., Fractionation of Xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. *Plant Physiology* **1995**, 108, 1579-1585.
15. Lima, D. U.; Loh, W.; Buckeridge, M. S., Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. *Plant Physiology and Biochemistry* **2004**, 42, (5), 389-394.
16. Somerville, C.; Bauer, S.; Brininstool, G.; Facette, M.; Hamann, T.; Milne, J.; Osborne, E.; Paredes, A.; Persson, S.; Raab, T., Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* **2004**, 306, (5705), 2206-2211.
17. Cosgrove, D. J., Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology* **2005**, 6, (11), 850-861.
18. Doblin, M. S.; Pettolino, F.; Bacic, A., Evans Review: Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Functional Plant Biology* **2010**, 37, (5), 357-381.
19. Albersheim, P.; Darvill, A.; Roberts, K.; Sederoff, R.; Staehelin, A., Biochemistry of the cell wall molecules. *Plant cell walls: from chemistry to biology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, NY **2011**, 67-118.
20. Yaoi, K.; Nakai, T.; Kameda, Y.; Hiyoshi, A.; Mitsuishi, Y., Cloning and characterization of two xyloglucanases from *Paenibacillus* sp. strain KM21. *Applied and environmental microbiology* **2005**, 71, (12), 7670-7678.
21. Cerclier, C. V.; Guyomard-Lack, A.; Cousin, F.; Jean, B.; Bonnin, E.; Cathala, B.; Moreau, C., Xyloglucan-Cellulose Nanocrystal Multilayered Films: Effect of Film Architecture on Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules* **2013**, 14, (10), 3599-3609.
22. Kalashnikova, I.; Bizot, H.; Cathala, B.; Capron, I., Modulation of cellulose nanocrystals amphiphilic properties to stabilize oil/water interface. *Biomacromolecules* **2011**, 13, (1), 267-275.
23. Nelson, N., A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem* **1944**, 153, (2), 375-379.
24. Tollier, M.; Robin, J., Adaptation of the orcinol-sulfuric acid method for the automatic titration of total neutral sugars-conditions of application to plant-extracts. *Annales de Technologie Agricole* **1979**, 28, (1), 1-15.
25. Marcus, S. E.; Verhertbruggen, Y.; Hervé, C.; Ordaz-Ortiz, J. J.; Farkas, V.; Pedersen, H. L.; Willats, W. G.; Knox, J. P., Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology* **2008**, 8, (1), 60.

26. Levy, S.; York, W. S.; Stuike-Prill, R.; Meyer, B.; Staehelin, L. A., Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. *The Plant Journal* **1991**, 1, (2), 195-215.
27. Langmuir, I., The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society* **1918**, 40, (9), 1361-1403.
28. Gu, J.; Catchmark, J. M., The impact of cellulose structure on binding interactions with hemicellulose and pectin. *Cellulose* **2013**, 20, (4), 1613-1627.
29. Pauly, M.; Qin, Q.; Greene, H.; Albersheim, P.; Darvill, A.; York, W. S., Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. *Planta* **2001**, 212, (5-6), 842-850.
30. de Lima, D. U.; Buckeridge, M. S., Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. *Carbohydrate Polymers* **2001**, 46, (2), 157-163.
31. Elazzouzi-Hafraoui, S.; Nishiyama, Y.; Putaux, J.-L.; Heux, L.; Dubreuil, F. d. r.; Rochas, C., The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (1), 57-65.
32. Winter, H. T.; Cerclier, C.; Delorme, N.; Bizot, H.; Quemener, B.; Cathala, B., Improved colloidal stability of bacterial cellulose nanocrystal suspensions for the elaboration of spin-coated cellulose-based model surfaces. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (11), 3144-3151.
33. Stiernstedt, J.; Brumer, H.; Zhou, Q.; Teeri, T. T.; Rutland, M. W., Friction between cellulose surfaces and effect of xyloglucan adsorption. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (7), 2147-2153.
34. Cerclier, C.; Cousin, F.; Bizot, F.; Moreau, C.; Cathala, C., Elaboration of Spin-Coated Cellulose-Xyloglucan Multilayered Thin Films. *Langmuir* **2010**, 26, (22), 17248–1725.

ABBREVIATIONS

CNC: cellulose nanocrystal; XG:xyloglucan; HPAEC: high performance anion-exchange chromatography; PAD: pulsed amperometric detection; XGO: xyloglucan oligosaccharide; XXXG, XLXG, XXLG and XLLG: xyloglucan oligosaccharides according to the nomenclature of Fry et al. (1993),where G, X, and L represent different substituted β -D-glucosylresidues of xyloglucan; G: β -D-Glcp; X: α -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glcp;L: β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Glcp(*p*indicates pyranose)

SUMMARY GRAPHIC



Commentaire sur l'article n°3

Dans le but d'évaluer l'affinité d'adsorption *in vitro* des XG, nous avons déterminé l'isotherme d'adsorption XG/CNC établie en mode intégral (mélange direct de l'adsorbat nu avec la solution d'adsorbant dans des conditions données qui sont maintenues constantes tout au long du processus d'adsorption et avec laquelle il doit s'équilibrer ou atteindre un régime stationnaire). Nous avons montré à l'issue de cette étude que la présence des charges négatives à la surface des CNC n'affecte pas l'affinité des XG à la surface des CNC et que l'adsorption a toujours lieu. Ces résultats confirment ceux obtenus lors de la thèse de Marie Lopez (2007) concernant l'isotherme d'adsorption de XG sur les CNC chargés qui a montré une adsorption, rapportée à la masse sèche cellulosique identique à celle de la cellulose bactérienne. La capacité maximale d'adsorption a été déterminée à 0,33 mg XG/mg CNC. Pour comparer ces résultats avec les résultats théoriques concernant la proportion xyloglucanique *versus* son partenaire d'adsorption CNC, nous nous sommes basés sur une géométrie moyenne des CNC (longueur 189 nm +/- 51 nm ; largeur 13 nm +/- 4 nm , et épaisseur 6 +/- 2 nm) (Kalashnikova, et al., 2013) pour calculer la proportion de chaînes de surface par rapport au nombre total des chaînes soit : 0,23 dans l'approximation choisie avec une forme parallélépipédique. En se basant sur la méthode de calcul/d'évaluation de la surface occupée par une adsorption en mode 'superposition' décrite par (Lopez, et al., 2010), la surface de CNC selon les dimensions citées pourrait être saturée par environ 0,15 mg XG/mg CNC. En effet, chaque résidu glucose AGU (unité anhydroglucose), de la chaîne principale de XG éclipse approximativement trois AGU à la surface de la cellulose cristalline, ceci en ne tenant pas compte de la fraction de boucles et de queues non superposées pour des raisons cinétiques ou thermodynamiques. Ainsi, un ratio 1/3 entre AGU de chaîne de XG et AGU exposé en surface de cristallite se traduit en rapport massique à un taux de recouvrement maximal de 0,15 en prenant comme masse molaire moyenne d'AGU décoré de ce xyloglucane $M_w = 1284,38 \text{ g mol}^{-1}$ déduite de la composition).

La capacité maximale d'adsorption obtenue en se basant sur l'isotherme d'adsorption ($q_m = 0,33$ mg XG/mg CNC) est donc deux fois plus élevée, qu'on peut attribuer à la fois à la sous évaluation de la surface réellement accessible et à la présence de boucles et trains de chaînes solvatées. Selon ce second facteur, on estime qu'à saturation la moitié de domaines de XG adsorbés sont sous forme de trains (52%), l'autre moitié est sous forme de boucles (48%) (*Cf figure 3 de l'article n°3*). Ce régime riche en boucles correspond à la deuxième partie de l'isotherme d'adsorption conduisant à la saturation de la capacité d'adsorption.

La capacité d'adsorption maximale plus importante que la capacité de recouvrement de la surface de CNC par XG théoriquement estimée est due donc à la présence en pratique, de boucles de XG en plus de la fraction trains. La proportion de boucles de XG correspond à la fraction des XG accessible à l'hydrolyse enzymatique lorsque ces assemblages XG/CNC sont conservés en suspension. L'évaluation de cette proportion est donc d'une importance critique dans la compréhension du processus de dégradation d'assemblages obtenu dans des conditions de cinétique température, dilution et mode d'adsorption (intégral ou progressif) données.

Sur les films multicouches CNC/XG dont l'architecture est étudiée dans la partie précédente (article n°2), la quantité de XG adsorbés en trains pourrait être estimée théoriquement à partir de la composition en CNC à travers l'évaluation des chaînes de surface de cellulose qui interagissent selon un ratio molaire AGU décoré/AGU nu cellulosique 1/3. Cette estimation va permettre de déduire la quantité de XG adsorbés et non adsorbés puisque la quantité totale de XG est connue à partir des résultats de réflectivité des neutrons. La quantité minimale de chaînes non adsorbées qui correspond au minimum de la fraction de XG accessible, pourrait être estimée en supposant que les chaînes de XG couvrent en entier la surface des CNC.

Etant donné la valeur du ratio de la surface de chaînes de cellulose par rapport au nombre total de chaînes estimée à 0,23. La quantité minimale de XG non adsorbés à la surface de CNC pourrait être estimée selon la formule suivante :

$[XG]_{\text{non adsorbés}} = [XG]_{\text{total}} - ([CNC] \times 0.23)$. Par conséquent, la fraction de XG non adsorbé pourrait être estimé à $1,97 \mu\text{g cm}^{-2}$ ($[XG]_{\text{adsorbés}} = 0,44 \mu\text{g cm}^{-2}$) pour le film (CNC3-XG1)₅ et à $3,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ ($[XG]_{\text{adsorbés}} = 0,99 \mu\text{g cm}^{-2}$) le film (CNC5-XG1)₅. Les pourcentages de fractions de XG théoriquement accessibles à l'hydrolyse enzymatique sont donc d'environ

82 % et 78 % pour les films CNC3 et CNC5 respectivement. Cela indique que le pourcentage de XG non adsorbés (accessibles) à l'enzyme est plus important dans les assemblages au sein des films en comparaison à la fraction de XG accessibles au sein des complexes XG/CNC en suspension. Ces résultats seront utiles pour la comparaison des modalités de dégradation des assemblages XG/CNC dans les films multicouches avec celles en suspension, qui sera abordée dans la partie suivante.

Nous avons également montré dans ce travail que selon le ratio de concentration XG/CNC, les XG se comportent différemment soit comme un agent de réticulant à faible ratio de concentration, soit comme un agent dispersant au-delà du seuil de saturation de la surface de CNC.

Ces résultats ont permis de clarifier certains points sur les modalités d'adsorption des XG sur CNC et d'apporter des éléments de connaissance qui vont nous aider à la compréhension de la dégradation enzymatique des assemblages de XG/CNC lorsqu'ils sont incorporés dans des films et qui fait l'objet du volet suivant de cette thèse.

IV. Etudes préliminaires sur la dégradation enzymatique des films multicouches CNC-XG

Le but de cette section est de mieux comprendre la relation entre l'organisation des polysaccharides au sein des assemblages CNC-XG et leur susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique. Des études préliminaires ont été donc réalisées sur la dégradation enzymatique de ces assemblages en milieu dense (films multicouches) en utilisant deux types d'enzymes, un cocktail commercial, la Cellulyve^{TR} et une xyloglucanase purifiée.

Cette étude est constituée de quatre parties. Nous avons mesuré en premier lieu les activités enzymatiques du mélange Cellulyve^{TR} et de la xyloglucanase sur les deux polysaccharides utilisés pour former les films (CNC et XG) par dosage des extrémités réductrices libérées. Ensuite, la détection visuelle de la dégradation enzymatique des films a été étudiée et comparée aux activités mesurées, afin de valider la pertinence des films (CNC-XG) comme détecteurs d'activités enzymatiques et déterminer la sensibilité de ce test visuel. Nous nous sommes intéressés en troisième lieu à la quantification des produits d'hydrolyse issus de la dégradation enzymatique des films (CNC3-XG1) et (CNC5-XG1). Dans une quatrième partie, nous nous sommes focalisés sur le suivi en temps réel de la dégradation des films (CNC-XG) par QCM-D afin de comprendre notamment l'impact de la différence d'architecture dans les films (CNC3-XG1) et les films (CNC5-XG1) sur la dégradation enzymatique.

IV.1. Dosage de l'activité enzymatique de la Cellulyve^{TR} et de la xyloglucanase

La Cellulyve^{TR} (Lyven) utilisée dans ce travail est un mélange des différentes cellulases issues de *Trichoderma Reesei*.

Pour l'endo-xyloglucanase utilisée, il s'agit d'une β -1,4-glucanase spécifique du xyloglucane (EC 3.2.1.155) de la famille GH 74 (<http://www.cazy.org>) produite par la souche bactérienne KM21 *Paenibacillus* sp. (Matsuzawa, et al., 2014).

IV.1.1. Mesure de l'activité de la Cellulyve^{TR}

La mesure de l'activité de la Cellulyve^{TR} sur le XG en solution et les CNC en suspension a été réalisée par le dosage des extrémités réductrices libérées suite à la coupure des liaisons osidiques (Nelson, 1944). La Cellulyve^{TR} est riche en plusieurs types d'activités de dégradation de la cellulose, notamment les CBH, les EG et les BGL. Malgré cela, aucune activité n'a été détectée dans nos conditions sur la dispersion de CNC. Ceci est dû à l'état hautement cristallin de la cellulose dans les CNC. La présence du réseau de liaisons hydrogène très stable rend la cellulose cristalline résistante à l'hydrolyse enzymatique (Zhao, et al., 2012).

A l'inverse, l'activité de la Cellulyve^{TR} a été détectée sur la solution de XG (1 g L⁻¹) et correspond à une valeur de 105 nkat mL⁻¹ mesurée à 50 °C (température optimale de la Cellulyve^{TR}). L'activité de la Cellulyve^{TR} a été également mesurée à 20°C (température que nous utilisons pour les tests de dégradation sur les films) et correspond à une valeur de 4,6 nkat mL⁻¹. La baisse d'activité est attribuée à l'utilisation d'une température qui ne correspond pas à la température optimale des enzymes.

L'activité minimale qui peut être détectée par cette méthode de dosage du pouvoir réducteur est d'environ 4 nkat mL⁻¹. Ainsi dans le cas de la mesure d'activité de la Cellulyve^{TR} à 50°C, la valeur est largement au-dessus de la limite de sensibilité. Par contre, à 20 °C, nous sommes en limite de détection de la méthode du dosage.

IV.1.2. Mesure de l'activité de la xyloglucanase

L'activité de la xyloglucanase a été mesurée sur le XG par le dosage des extrémités réductrices libérées. La valeur moyenne de l'activité mesurée à 40° C en présence d'une solution de XG à 5g L⁻¹ est de 518 nkat mL⁻¹. Cette valeur est environ trois fois plus faible que l'activité théorique donnée par le fournisseur pour le même substrat avec la même concentration de 5 g L⁻¹, à 70°C (1666 nkat mL⁻¹), due à l'utilisation d'une température d'incubation plus faible dans nos conditions d'expérience.

La valeur moyenne de l'activité mesurée à 20°C sur une solution de XG à 1g L⁻¹ est de 12 nkat mL⁻¹. Cette baisse importante d'activité est due à la température utilisée, très inférieure à la température optimale de l'enzyme (40-80°C).

Les activités de la Cellulyve^{TR} et de la xyloglucanase mesurées sur le XG sont utilisées par la suite comme références dans les tests visuels (et pour les expériences QCM-D) afin de repérer le niveau de sensibilité du test de détection d'activité enzymatique sur les films multicouches (CNC-XG). Les activités indiquées après sont donc des activités calculées à partir des dilutions des solutions enzymatiques.

IV.2. Détermination de la sensibilité du test de détection visuelle d'activités enzymatiques sur les films (CNC-XG)

Le test visuel ne peut être réalisé que sur des films (CNC-XG) dont le nombre de bicouches est supérieur à quatre. En effet, pour un nombre de bicouches inférieur à cette valeur, l'épaisseur du film n'est pas suffisante pour donner une couleur structurale permettant la détection visuelle de sa dégradation enzymatique par la suite.

La figure ci-dessous montre la variation de couleur en fonction du nombre de bicouches sur les films (CNC3-XG1)_n et (CNC5-XG1)_n

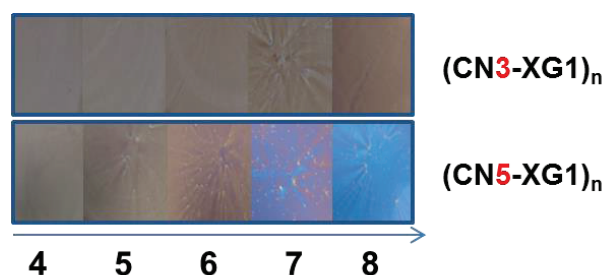


Figure 52. Couleur des films (CNC-XG)_n en fonction du nombre de bicouches et selon la concentration de CNC utilisée (3 ou 5 g l⁻¹). Les chiffres de 4 à 8 indiquent le nombre de bicouches

Le test de détection visuelle de l'activité enzymatique sur les deux films (CNC3-XG1)_n et (CNC5-XG1)_n a été réalisé comme illustré à la **figure 53**.

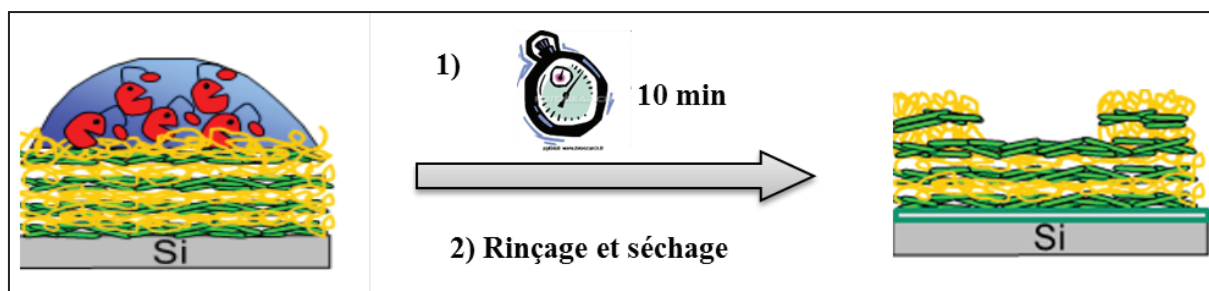


Figure 53. Schéma illustrant les étapes du test de la dégradation enzymatique des films multicouches (CNC-XG) pour la détection visuelle de l'activité enzymatique. Le test consiste à déposer 2 μL de chaque solution enzymatique sur les films pendant 10 minutes avant de les rincer à l'eau millipore et de les sécher sous flux d'azote

L'hydrolyse enzymatique est détectée par l'apparition d'une couleur différente de la couleur initiale des films. Ce changement de couleur structurale est dû à un phénomène interférentiel intrinsèquement lié aux dimensions nanométriques des couches (CNC-XG) déposées sur la surface réfléchissante du support de Silicium. La dégradation des couches et le changement de couleur associé permettent de détecter, simplement à l'œil nu, des activités hydrolytiques des biopolymères constituant le dépôt.

Pour déterminer le seuil de sensibilité de cette méthode, des solutions enzymatiques à des concentrations décroissantes de Cellulyve^{TR} et de xyloglucanase ont été déposées. La limite de sensibilité est déterminée à partir de la valeur de l'activité enzymatique minimale nécessaire à la détection visuelle d'une dégradation du film.

IV.2.1. Détection visuelle de l'activité de la Cellulyve^{TR}

La **figure 54** représente l'aspect des films (CNC3-XG1)_n et des films (CNC5-XG1)_n, avec n=4, n=6 et n= 8, après dépôt des différentes solutions enzymatiques d'activités décroissantes.

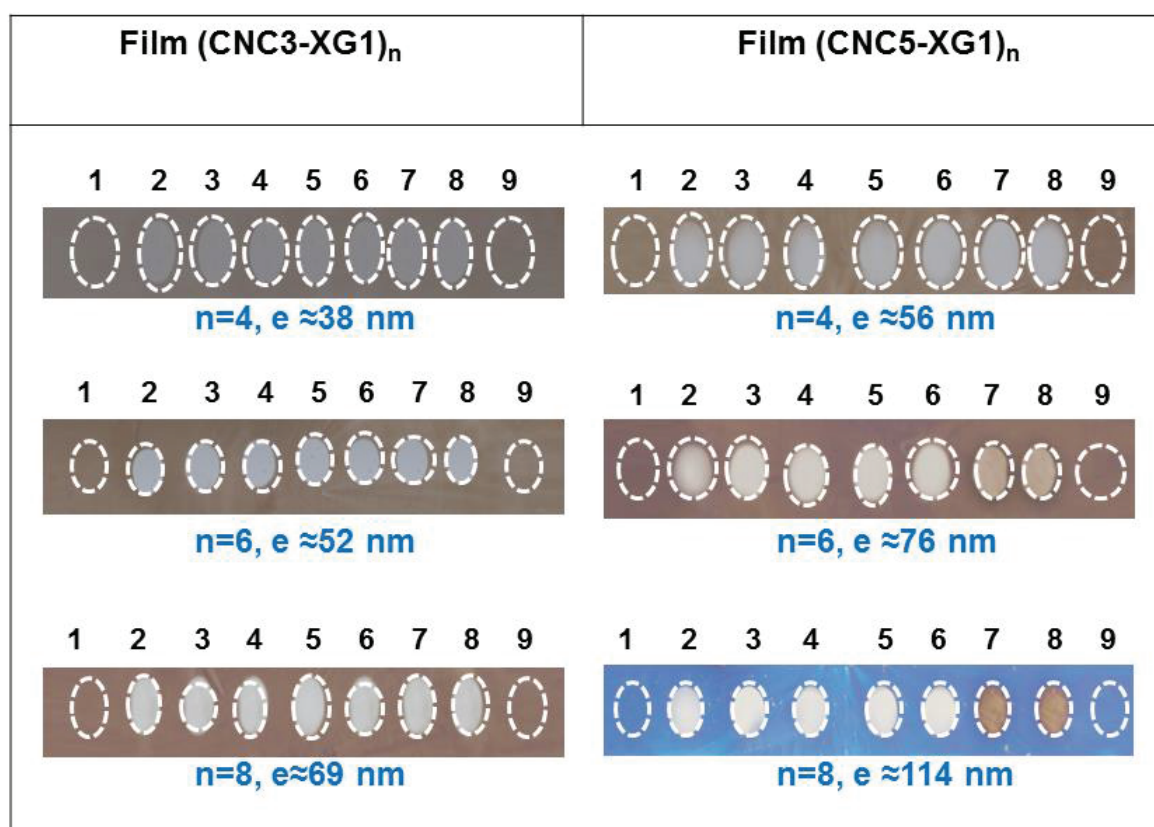


Figure 54. Test visuel de l'activité enzymatique de la Cellulyve^{TR} après 10 min à 20 °C sur différents films (CN3-XG1)_n et (CN5-XG1)_n. Les cercles pointillés indiquent les spots de dépôt des différentes solutions enzymatiques (de 1 à 9). Le spot n° 1 correspond à l'enzyme inactivée (contrôle négatif) et les spots numérotés de 2 à 9 correspondent aux valeurs des activités de l'ordre de $3,4 \cdot 10^{-2}$; $1,7 \cdot 10^{-2}$; $0,8 \cdot 10^{-2}$; $0,68 \cdot 10^{-2}$; $0,51 \cdot 10^{-2}$; $0,34 \cdot 10^{-2}$; $0,17 \cdot 10^{-2}$; $0,08 \cdot 10^{-2}$ nkat mL⁻¹ respectivement. n : nombre de bicouches ; e : épaisseur initiale du film

Pour les spots 2 à 8, une dégradation plus ou moins marquée a été observée sur les deux films $(\text{CNC3-XG1})_n$ et $(\text{CNC5-XG1})_n$. En revanche, pour la solution enzymatique dont l'activité est la plus faible (spot 9), aucune trace de dégradation n'a été détectée quel que soit le nombre de bicouches du film utilisé.

De plus, après 10 minutes, on note également l'absence d'une dégradation avec la Cellulyve^{TR} inactivée (contrôle négatif, spot 1) sur les films (CNC3-XG1) et les films (CNC5-XG1) . Cela confirme que le changement de couleur observé sur les spots 2 à 8 sur les deux types de film, est consécutif à l'action de la Cellulyve^{TR}.

Ces résultats indiquent que la limite « visuelle » de l'activité catalytique de la Cellulyve^{TR} sur ces films correspond à une valeur de $0,17 \cdot 10^{-2} \text{ nkat mL}^{-1}$ (spot 8), en-deçà de laquelle aucune activité ne peut être détectée.

Les spots de dégradation 2 à 8 sur les films $(\text{CNC3-XG1})_n$ sont tous de couleur grise (couleur du support de Silicium) quel que soit le nombre de bicouches. Aucun changement de couleur ni d'intensité n'a été détecté quel que soit l'épaisseur du film et la concentration d'enzyme utilisée. L'absence du changement progressif de l'aspect de la dégradation avec les films à CNC3 peut s'expliquer par leur valeur d'épaisseur (e) relativement faible quel que soit le nombre de bicouche, ce qui mène à atteindre rapidement la limite basse d'épaisseur à laquelle la couleur n'est plus visible.

Sur les films $(\text{CNC5-XG1})_n$, les activités les plus élevées (spots 2 à 6) donnent une couleur grise pour toutes les empreintes de dégradation correspondantes. Cette couleur qui remplace la couleur initiale est observée quel que soit le nombre de bicouches du film indiquant soit une dégradation quasi-totale des films par la préparation enzymatique soit une dégradation partielle jusqu'à une épaisseur du film en dessous de la limite de détection de couleur. Cependant, pour des valeurs d'activités moins élevées (spots 7 et 8), l'intensité de la couleur varie selon le nombre de bicouches (4, 6 ou 8) de l'échantillon. En effet, pour le film $(\text{CNC5-XG1})_4$ initialement de couleur marron clair, les spots de dégradation sont de couleur grise identique à celle obtenue avec des activités plus élevées. Ceci est également indicatif soit d'une dégradation totale du film soit d'une dégradation partielle menant à une épaisseur très faible pour donner une couleur visiblement distinguée. Avec les films $(\text{CNC5-XG1})_6$ de couleur initiale marron foncé, la couleur beige des spots de dégradation 7 et 8 traduit une dégradation partielle du film.

Sur les films (CNC5-XG1)₈ de couleur bleue, les spots de dégradation observés sont de couleur marron clair, également indicative d'une dégradation partielle.

Ainsi, pour les films (CNC5-XG1)_n, leur dégradation partielle est visiblement détectable par un changement de couleur en augmentant le nombre de bicouches *n* au-delà de 4 tandis qu'à *n* = 4 on ne peut pas distinguer si la dégradation est totale ou partielle car l'épaisseur du film devient très faible pour donner une couleur structurale.

L'absence totale de changement d'aspect du film à 0,08. 10⁻² nkat mL (spot 9) suggère une évolution non linéaire de la dégradation du film en fonction de la concentration. Cela était déjà démontré par Cerclier, et al.(2011) en évaluant l'épaisseur d'un film (CNC-XG) à 8 bicouches après son hydrolyse par des concentrations décroissantes en Cellulyve^{TR}. En effet, à des concentrations élevées en enzyme, la diffusion des enzymes à travers les couches s'effectue rapidement, générant ainsi une déstructuration de l'intégralité du film. La diminution de la concentration en enzyme résulte en un arrêt brusque de l'hydrolyse probablement due à un nombre insuffisant de chaînes de XG rompues dans l'intervalle de temps choisi pour permettre une dégradation totale du film.

En conclusion de ce test on peut noter que :

Quelque soit le type et l'épaisseur des films utilisés l'activité enzymatique de la Cellulyve^{TR} est détectable visuellement. En se basant sur l'extrapolation des résultats de mesure de l'activité par la méthode de dosage des extrémités réductrices libérées, une activité de la Cellulyve^{TR} d'environ 0,17. 10⁻² nkat mL⁻¹ est détectable sur les films CNC3 et CNC5 dans ces conditions, en particulier T=20°C pendant 10 min. Rappelons que la résolution limite de la méthode de dosage est de l'ordre de 4 nkat mL⁻¹, la sensibilité de la détection du film est donc de plus de 2000 fois plus élevée que celle de la méthode classique du dosage enzymatique.

IV.2.2. Détection visuelle de l'activité de la xyloglucanase

Afin de déterminer la limite de détection du test visuel avec la xyloglucanase sur nos films, nous avons testé des solutions enzymatiques d'activités décroissantes. La **figure 55** ci-dessous montre l'aspect des films après dépôt de solutions de xyloglucanase à différentes concentrations sur les films (CNC-XG)_n à n=4, n=6 et n=8.

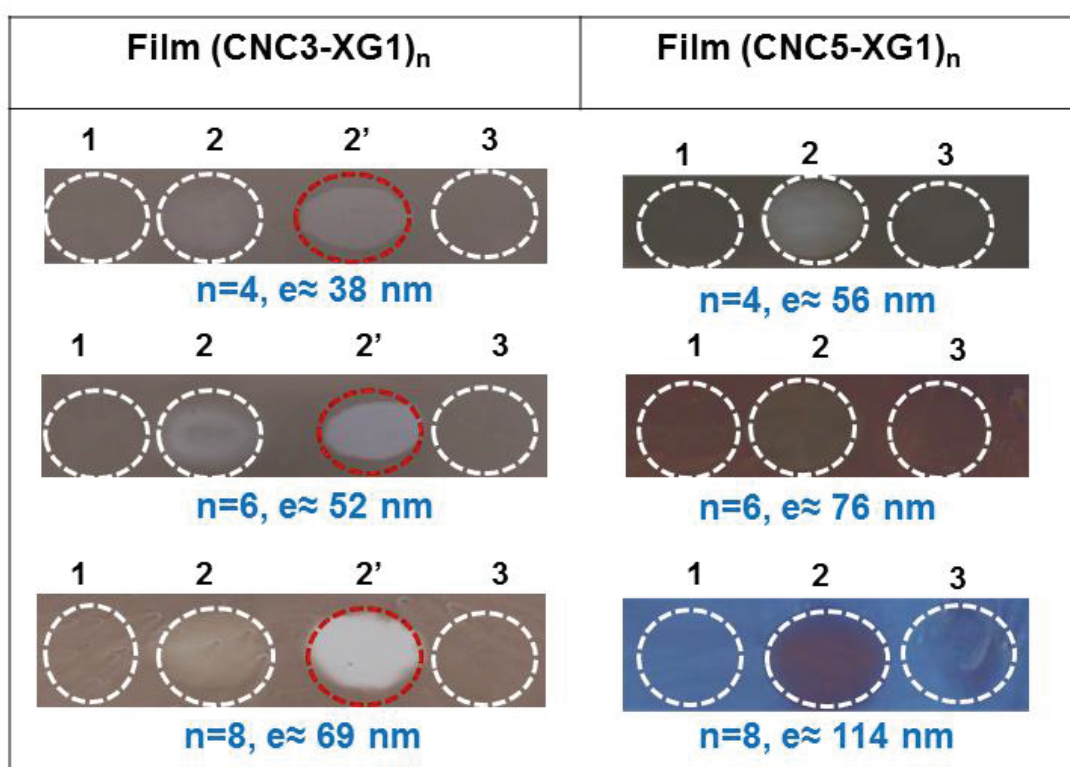


Figure 55. Test visuel de l'activité enzymatique de la xyloglucanase GH74 après 10 min à 20°C sur différents films (CN3-XG1)_n et (CN5-XG1)_n avec n = 4, 6 ou 8 bicouches

Les spots sont numérotés de 1 à 3. Le spot 1 correspond la xyloglucanase inactivée. Le spot 2 correspond à l'activité $6,21 \cdot 10^{-2} \text{ nkat mL}^{-1}$ testée à 20°C. Le spot 2' correspond à l'activité $6,21 \cdot 10^{-2} \text{ nkat mL}^{-1}$ testée à 40°C sur le film. Le spot 3 correspond à l'activité $2,48 \cdot 10^{-2} \text{ nkat mL}^{-1}$ testée à 20°C sur le film.

L'absence de dégradation sur le spot 1 après 10 min de dépôt confirme que le changement de couleur sur les autres spots est uniquement lié à l'action de la xyloglucanase.

Quel que soit le type de film, un changement de couleur est uniquement observé avec le dépôt de solution enzymatique dont l'activité est la plus élevée ($6,2 \cdot 10^{-2}$ nkat mL⁻¹, spot 2).

L'absence de dégradation, même partielle, avec une solution enzymatique d'activité plus faible montre clairement la difficulté de la détection visuelle avec la xyloglucanase comparativement aux tests réalisés avec la Cellulyve^{TR}. Cela pourrait être dû au fait que cette enzyme est très sensible à l'effet de la température puisque l'activité de la xyloglucanase en solution est optimale à 70 °C.

Pour les films (CNC3-XG1)_n, à n=4 n=6, n=8 d'épaisseur 38 nm, 52 nm et 69 nm respectivement, le spot 2 ($6,2$ nkat mL⁻¹) donne une couleur gris clair proche de la couleur du support de Silicium remplaçant la couleur initiale marron. Cette couleur suggère une dégradation du film mais qui n'est probablement pas totale. Ainsi, pour s'assurer de l'impact de l'augmentation de la température de la dégradation du film par la xyloglucanase, nous avons incubé des dépôts de la solution enzymatique à $6,2 \cdot 10^{-2}$ nkat mL⁻¹ (spot 2') sur les films (CNC3-XG1)_n à 40°C. Après 10 min de dépôt, et quel que soit le film (CNC3 ou CNC5), les traces de dégradation sont nettement plus visibles par rapport à celles observées avec la même solution enzymatique à 20°C et la couleur grise apparue est identique à celle de la surface de Silicium indiquant une dégradation totale.

Pour les films (CNC5-XG1)_n, la dégradation enzymatique (spot 2) donne des nuances de couleurs différentes en fonction du nombre de bicouches. En effet, sur le film (CNC5-XG1)₄ initialement de couleur marron clair et dont l'épaisseur est de 56 nm, le spot 2 donne une couleur grise qui s'approche de celle observée sur les spots de dégradation des films à (CNC3-XG1)_n sur les spots 2'. Ceci indique une dégradation qui s'approche d'une dégradation totale. Pour les films (CNC5-XG1)₆, la couleur marron initialement foncée du spot 2 évolue vers une couleur marron clair après dégradation. Ceci indique une dégradation partielle. Cette couleur marron clair correspond à la couleur initiale des films (CNC5-XG1)₄ dont l'épaisseur est d'environ 56 nm. Pour les films (CNC5-XG1)₈, un spot de dégradation de couleur marron foncé remplace la couleur initialement bleue du film. Ceci est dû à une dégradation partielle du film. Cette nouvelle couleur correspond à une épaisseur d'environ 70-80 nm, c'est à dire équivalent au film (CNC5-XG1)₆.

Ces résultats indiquent qu'en utilisant les films CNC5-XG1, le changement de couleur à l'issue de la dégradation enzymatique est plus visible que dans le cas des films CNC3.

En conclusion de ce test on peut noter que :

- Quel que soit le type de film utilisé (CNC3 ou CNC5) et son nombre de bicouches, la sensibilité de la méthode en utilisant la xyloglucanase est mise en évidence.

- La sensibilité de la détection visuelle de l'activité enzymatique sur ces films est environ 60 fois plus élevée que celle de la méthode classique du dosage enzymatique par mesure du pouvoir réducteur, dont la limite de sensibilité est de l'ordre de 4 nkat mL⁻¹.

- En comparaison avec le test visuel en présence de la Cellulyve^{TR}, le test visuel avec la xyloglucanase est donc environ 30 fois moins sensible. Cela peut s'expliquer par une sensibilité plus grande de la xyloglucanase à la température et également par le spectre d'activité plus large de la Cellulyve^{TR} par rapport à la xyloglucanase.

Les résultats obtenus sur les films multicouches (CNC3-XG1)_n et (CNC5-XG1)_n avec la Cellulyve^{TR} et la xyloglucanase montrent que notre méthode permet de détecter des activités enzymatiques de 60 à plus de 2000 fois plus faibles que celles mesurées par la méthode colorimétrique de Somogyi-Nelson, et ce en utilisant une méthode facile à mettre en œuvre et rapide. L'amélioration importante de la sensibilité par rapport à la méthode colorimétrique est due aux faibles dimensions des couches dans le film et donc aux faibles quantités de biopolymères utilisées.

IV.3. Identification et quantification des oligomères issus de la dégradation enzymatique des films (CNC3-XG1)₅ et (CNC5-XG1)₅

IV.3.1. Quantification des oligomères issus de la dégradation des films (CNC3-XG1)₅ et (CNC5-XG1)₅

Nous avons déterminé, dans l'article n° 2, les concentrations surfaciques des dépôts initiaux de XG et CNC dans chaque type de film (CNC-XG) par réflectivité des neutrons.

Sur ces films, une incubation avec la xyloglucanase a été effectuée pendant 2 h à 20°C et les hydrolysats ont été récupérés. Les films ont été ensuite rincés et séchés et une couleur grise nette a été observée sur toute la surface, correspondant à la couleur du support de silicium et montrant une dégradation totale du film.

Les oligomères issus de l'hydrolyse du XG ont été analysés par HPAEC-PAD et la concentration surfacique de XG hydrolysé a été déterminée. A partir de cette concentration en XG hydrolysés, et celle mesurée sur les films avant hydrolyse, nous avons évalué le pourcentage d'hydrolyse de XG dans les films (*tableau 6*).

Tableau 6. Concentrations surfaciques de XG dans les films (CNC3-XG1)₅ et (CNC5-XG1)₅ spincoatés sur le support de Silicium avant et après hydrolyse par la xyloglucanase et moyennes de pourcentages de chaînes de XG hydrolysées sur trois répétitions

Films	Concentration surfacique en XG dans le film avant hydrolyse ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Concentration XG libéré par l'hydrolyse par unité de surface ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Pourcentage de chaînes XG hydrolysés (%)
(CNC3-XG1) ₅	2, 41	0,27 ± 0,1	11,2 ± 0,5
(CNC5-XG1) ₅	4, 38	0,28 ± 0,2	6,4 ± 0,2

Nous notons que le pourcentage moyen d'hydrolyse des XG par l'action de la xyloglucanase est très faible avec les deux types de films CNC3 ou CNC5 (11,2 % et 6,4%, respectivement) par comparaison au pourcentage théorique estimé de la fraction de XG non adsorbée, qui est de 82 % et 78 % du XG total dans les films CNC3 et CNC5, respectivement.

Les pourcentages obtenus sont également très faibles par rapport aux résultats de l'hydrolyse des boucles au sein des assemblages XG-CNC, lors des incubations menées en suspension (article n° 3). En effet dans ces conditions, la quantification des produits d'hydrolyse donne un pourcentage de XG libéré par action de la xyloglucanase de 48 %. Pauly, et al. (1999) ont également estimé la proportion de la fraction de XG associée ou non associée dans la tige de pois après une extraction séquentielle des XG par des traitements enzymatiques et chimiques. Ils ont trouvé que la fraction de XG accessible à la dégradation enzymatique correspond à 38 % du total de XG fixé, ce pourcentage s'avère important par rapport à nos résultats. Le faible pourcentage de boucles hydrolysées par la xyloglucanase au cours de la dégradation des films CNC-XG est probablement dû à plusieurs facteurs, notamment l'encombrement stérique engendré par la densité de la matière. Ainsi, peu de boucles de XG sont accessibles aux enzymes. D'autres facteurs sont supposés être liés au mode d'incubation avec la solution enzymatique. En effet, le dépôt de l'enzyme dans notre cas est réalisé manuellement en mode statique. Ce mode conduit à une accumulation des produits de réaction à la surface du film, qui pourraient inhiber la réaction enzymatique. Cependant, cette limite d'hydrolyse ne semble pas avoir de conséquence sur la déstructuration du film car il suffit d'hydrolyser quelques boucles de XG pour perturber et affaiblir la structure initiale du film CNC-XG et libérer ainsi de la matière incluant les CNC.

IV.3.2. Distribution des oligomères au sein des chaînes de XG accessibles à l'hydrolyse enzymatique

Nous nous sommes intéressés dans un deuxième temps à l'étude de la distribution des oligomères dans les fractions accessibles à l'hydrolyse enzymatique dans les films CNC3-XG1 et les films CNC5-XG1. Cette analyse de la structure fine permet de comparer la distribution des oligomères dans les chaînes de XG entre les assemblages de CNC3-XG1 et CNC5-XG1.

La **figure 56** montre la variation des proportions des oligomères XXXG, XLXG, XXLG, XLLG normalisés par rapport aux XGOs totaux, libérés suite à l'hydrolyse enzymatique et analysés par HPAEC-PAD. Ces proportions sont comparées à la distribution des XGOs dans une solution de XGs seuls analysée dans les mêmes conditions, comme référence.

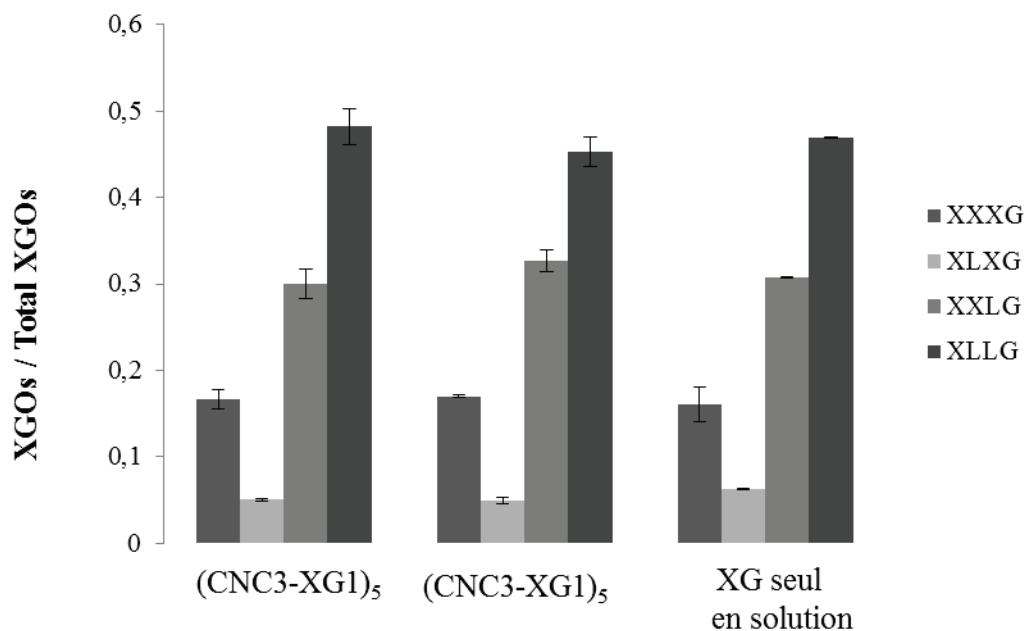


Figure 56. Distribution normalisée des XGOs en fonction du type de film CNC-XG ou de XG1 seuls.. La solution de XG seuls donne la distribution de référence des XGOs déterminée à partir de l'hydrolyse enzymatique de XG en absence de CNC

Comme l'indique **la figure 56** ci-dessus, il n'y a pas de variation significative dans la distribution de XGOs entre la fraction de XG libérée suite à l'hydrolyse des XG associés au CNC dans les films et des XG en solution.

L'absence de variation significative dans la distribution des XGOs peut s'expliquer soit par une affinité similaire entre des XGOs pour la surface de CNC quelle que soit leur structure, ou par leur répartition aléatoire le long de la chaîne de polymère (Hayashi, et al., 1994). Ces résultats convergent avec ceux obtenus quant à la distribution des oligomères de XG adsorbés aux CNC dans les assemblages établis en suspension (article n°3).

Etant donné que des travaux antérieurs indiquent que le profil de substitution pourrait influencer l'affinité d'adsorption des XG sur la cellulose (de Lima and Buckeridge, 2001), il est probable à partir de ces résultats que le XG de tamarin soit un polymère statistique au sein duquel la distribution des XGOs serait donc aléatoire.

En conclusion sur cette troisième partie, nous avons montré que :

- Quel que soit le type de film, peu de chaînes de XG sont hydrolysables par la xyloglucanase.
- Quel que soit le type de film, la distribution des XGOs est la même dans les zones accessibles à l'enzyme et dans le reste du polysaccharide. Elle est également identique sur le XG seul. Cela conforte bien l'hypothèse selon laquelle le XG de tamarin est un polymère statistique dont la distribution des XGOs se fait aléatoirement le long de la chaîne.

IV.4. Suivi de la dégradation enzymatique des films CNC-XG en temps réel par QCM-D

Les réponses des films (CNC3-XG1)₂ et (CNC5-XG1)₂ en à l'action de Cellulyve^{TR} ou de la xyloglucanase ont été comparées par le suivi de leur dégradation enzymatique en temps réel en QCM-D. L'objectif est d'étudier l'impact de la différence d'architecture dans ces deux films sur la réaction enzymatique.

Les films ont été préalablement construits sur la surface du cristal de quartz et sont ensuite soumis au gonflement dans le tampon acétate de l'enzyme. Après stabilisation du signal de fréquence et de dissipation, la solution enzymatique est déposée sur la surface du film.

Les dépôts de la solution tampon ainsi que des solutions enzymatiques ont été réalisés manuellement en mode statique. Ce mode permet de maîtriser la concentration initiale d'enzyme déposée sur le film et donc le rapport enzyme/substrat.

La **figure 57** représente les profils typiques des changements en fréquence et en dissipation pour la 3^{ème} harmonique, enregistrés en fonction du temps.

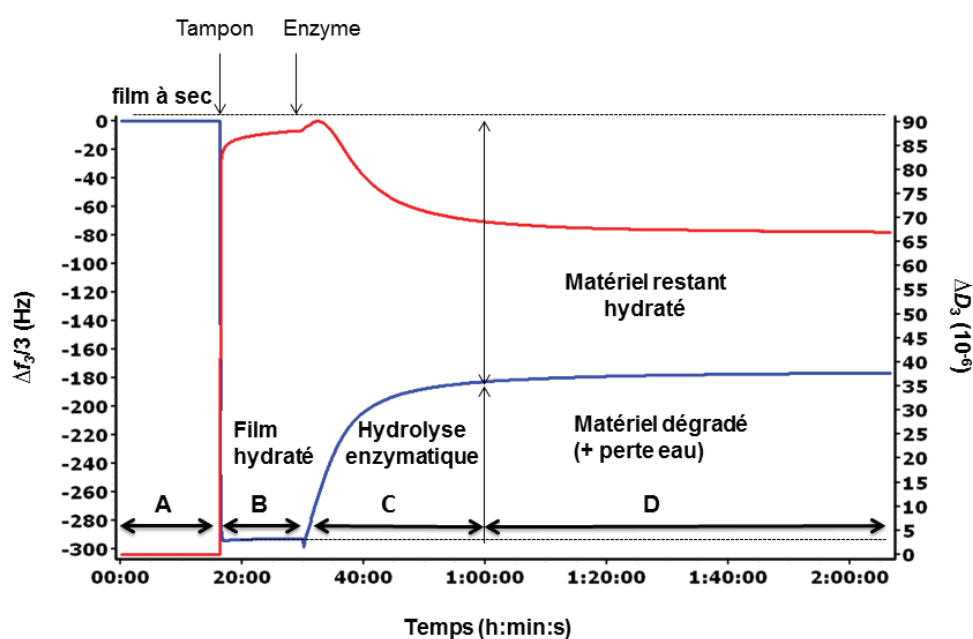


Figure 57. Profil QCM-D typique obtenu lors de la dégradation enzymatique des films (CNC-XG). Changement en fréquence ($\Delta f_3/3$, en bleu) et en dissipation (ΔD_3 , en rouge) en fonction du temps

La phase A correspond au film déposé sur le cristal de quartz lorsqu'il est en contact avec l'air. La phase B décrit l'étape d'hydratation du film dans le tampon, précédant la phase de sa dégradation enzymatique. Les phases C et D, quant à elles, décrivent les deux étapes majeures du processus de dégradation enzymatique :

Phase C : Le phénomène d'hydrolyse enzymatique commence immédiatement après injection de l'enzyme. Cela est indiqué par l'augmentation du signal de fréquence ($\Delta f_3/3$) qui traduit la diminution de masse due à l'action hydrolytique de l'enzyme. Parallèlement, une augmentation du facteur de dissipation ΔD_3 est observée.

Cette augmentation est rapide (3 min), très légère (de 5×10^{-6}) et indique le caractère viscoélastique de la surface qui est dû à une légère perturbation du film. En effet, la pénétration de l'enzyme dans le film et son action catalytique contribue à un relâchement de la structure du film, ce qui favorise de plus en plus la pénétration des molécules d'eau et d'électrolytes à travers les couches qui deviennent plus hydratées.

Phase D : Le processus de dégradation commence à ralentir. Le ralentissement de l'augmentation du signal de fréquence ($\Delta f_3/3$) indique la diminution de la vitesse de la dégradation du film. Parallèlement, ΔD_3 diminue indiquant la déstructuration du film vers une structure plus fine et plus rigide. Au bout de 30 min, les profils de ($\Delta f_3/3$) et ΔD_3 arrivent à un plateau. Cette stabilisation complète du signal indique l'arrêt de l'hydrolyse lié, soit à l'épuisement du substrat dans le film, soit à son inaccessibilité.

Un profil de QCM-D similaire a été obtenu avec la dégradation de films (CNC-XG) menée en flux continu, en présence de la cellulolyse^{TR} (Cerclier, et al., 2013). En plus de ces deux étapes, les auteurs ont observé, suite à l'injection des enzymes dans la cellule QCM, une étape supplémentaire qui correspond à une chute de fréquence très faible (d'environ 2 Hz) pendant un temps court (2-3 min). Cette chute de fréquence est attribuée à une phase d'adsorption de l'enzyme sur le substrat et dépend probablement des conditions utilisées (rapport substrat/enzyme, température...)

Dans le but d'avoir des informations détaillées sur le changement de l'état du film lors de la dégradation enzymatique, nous avons procédé à la détermination des différents paramètres caractéristiques du profil QCM-D à partir des changements du signal de fréquence caractérisant les phases de l'expérience. Ceci se réalise en deux étapes :

- La première étape: correspond à l'état du film à sec et suite à son gonflement dans le tampon.

- La deuxième étape : englobe le processus de dégradation enzymatique.

IV.4.1. Suivi en QCM-D de l'état des films avant et après incubation avec la Cellulyve^{TR}

L'objectif est de comparer le comportement des films CNC3 et CNC5 vis-à-vis de la dégradation enzymatique par la Cellulyve^{TR}.

Nous avons procédé en premier lieu à la caractérisation des deux substrats en QCM-D en déterminant leurs masses sèches et leur facteur de gonflement.

- Détermination des masses sèches sur les films avant hydrolyse

La détermination des masses surfaciques des films à sec a été réalisée pour les deux types de films (*tableau 7*).

A partir des variations de fréquence enregistrées entre le cristal de quartz sans dépôt et après dépôt du film, les masses des films secs ont été déterminées en se basant sur l'équation de Sauerbray : $\Delta m = -C(\Delta f_n/n)$.

L'estimation de ces masses est essentielle pour pouvoir déterminer après l'hydrolyse le pourcentage de matière dégradée du film suite à l'hydrolyse enzymatique

Tableau 7. *Changement en fréquences des films secs préparés pour la dégradation à la Cellulyve^{Tr} avant hydrolyse et détermination des concentrations surfaciques correspondantes. Les résultats correspondent à la moyenne de 2 essais*

Films	Avant hydrolyse	
	$\Delta f_{film\ sec}$ (Hz)	$\Delta m_{film\ sec}$ (ng cm ⁻²)
CNC3	-98 ±16	1735 ±279
CNC5	-119 ±20	2106 ±349

Les masses des films à sec initialement mesurées (avant hydrolyse) sont équivalentes (en prenant compte des barres d'erreurs) : 1735 ± 279 ng cm⁻² pour les films à CNC3 *versus* 2103 ± 349 ng cm⁻² et sont du même ordre de grandeur que les concentrations surfaciques estimées par la réflectivité des neutrons (3468 ng cm⁻² pour les films CNC5 *versus* 1736 ng cm⁻² pour les films CNC3).

- Détermination du taux d'hydratation des films avant hydrolyse

Le comportement de gonflement des films est un facteur important à prendre en compte lors de la description de l'hydrolyse enzymatique en milieu hétérogène car il pourrait influencer la diffusion de l'enzyme à travers les couches du film.

Un moyen indirect pour évaluer le gonflement des deux films est d'estimer leur pourcentage d'hydratation et le facteur de gonflement par rapport aux films secs suite à l'injection du tampon. Pour cela, une fois les mesures réalisées sur le film sec, un volume fixe (45 μL) de tampon acétate est déposé sur le film et la fréquence est à nouveau enregistrée. La variation de fréquence due au gonflement par le tampon/eau est : $\Delta f_{\text{eau}} = \Delta f_{\text{film hydraté}} - \Delta f_{\text{film sec}}$.

A partir de la variation en fréquence mesurée entre les films secs et les films hydratés, nous avons calculé les prises de masse en eau (Δm_{eau}). De la même façon, la masse du film hydraté a été déduite de la variation de fréquence mesurée sur la surface du quartz avant le dépôt du film et celle mesurée sur le film après hydratation ($\Delta m_{\text{film hydraté}}$) (tableau 8).

Tableau 8. Etape d'hydratation des films préparés pour la dégradation à la Cellulyse^{TR} : Estimation du contenu en eau et du pourcentage d'hydratation des films (% Hydratation = $(\Delta m_{\text{eau}} / \Delta m_{\text{film hydraté}}) * 100$; où $\Delta f_{\text{eau}} = \Delta f_{\text{film hydraté}} - \Delta f_{\text{film sec}}$) ainsi que du facteur de gonflement FG qui correspond au rapport de la masse du film sec à la masse du film hydraté ($FG = \Delta m_{\text{film sec}} / \Delta m_{\text{film hydraté}}$). Les résultats correspondent à la moyenne de 2 essais

Films	$\Delta f_{\text{film+tampon}}$ (Hz)	$\Delta m_{\text{film hydraté}}$ (ng cm ⁻²)	Δf_{eau} (Hz)	Δm_{eau} (ng cm ⁻²)	Hydratation %	FG
CNC3	-260	4602	-162	2867	70	2,7
	± 9	± 161	± 7	± 117	± 5	$\pm 0,3$
CNC5	-296	5239	-177	3133	60	2,5
	± 5	± 85	± 24	± 434	± 7	$\pm 0,5$

Les films CNC3 et CNC5 présentent des pourcentages d'hydratation similaires de $70\pm5\%$ et $60\pm7\%$, respectivement.

Les facteurs de gonflement des deux films sont presque identiques ($FG = 2,7 \pm 0,3$ nm pour les films CNC3 *versus* $FG = 2,5 \pm 0,5$ nm pour les films CNC5).

Nous avons montré à l'issue de l'analyse de la structure interne de ces deux types de films par réflectivité des neutrons (article n° 2), une composition différente avec un pourcentage d'air de 35 % dans les films CNC3, 2,5 fois plus élevé que celui obtenu sur les films CNC5 (14%). Le taux de porosité plus élevé dans les films CNC3 laisse supposer une capacité d'hydratation de ceux-ci significativement plus élevée, lorsqu'ils sont en contact avec le tampon. Toutefois, il faut signaler que le facteur de gonflement ne dépend pas uniquement de la fraction en air au sein du film, mais aussi de la composition en polymère et de leur nature à interagir avec l'eau et l'état de réticulation en présence d'eau (cas du XG, par exemple) ainsi que leur arrangement au sein du réseau structural du film. A titre d'exemple, Cerclier et al. (2013) ont montré que le taux de gonflement plus élevé des films (PAH/CNC-XG) par rapport aux films (CNC/XG) est lié à une adsorption moins importante de XG sur la surface des CNC dans le premier cas et donc à une proportion plus élevée de XG pontant les CNC (Cerclier, et al., 2013). Dans le cadre de notre étude, les fractions volumiques de CNC et de XG sont de l'ordre de 40 % et 46 %, respectivement dans le cas des films CNC5 et de 29 % (CNC) et 36 % (XG) dans le cas des films CNC3. L'hydratation similaire des deux films, bien que la structure de CNC5 soit plus dense, est probablement liée à une fraction volumique en polymères plus importante dans ce dernier.

- Dégradation des films par la Cellulyve^{TR}

Une fois les films hydratés dans le tampon, un volume déterminé (5 μL) de dilution de Cellulyve^{TR} ($0,17 \cdot 10^{-2} \text{ nkat mL}^{-1}$) est déposé sur la surface du film et les changements en fréquence et en dissipation sont enregistrés (**figure 58**). Le choix des valeurs d'activité enzymatique à utiliser pour cette étude est basé sur les résultats d'activités enzymatiques minimales avec lesquelles une dégradation est visuellement détectable sur les films (CNC-XG)_n.

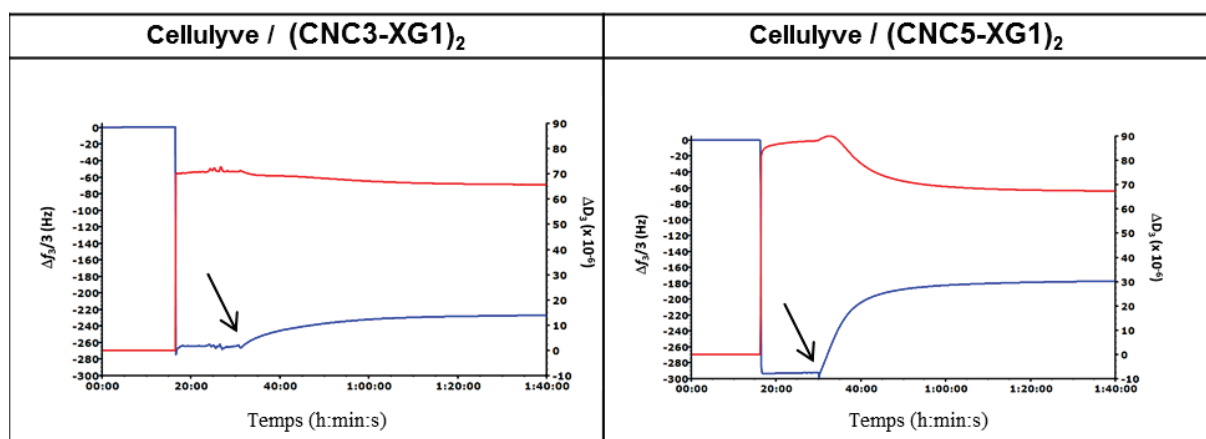


Figure 58. Variation de fréquences ($\Delta F_3/3$, bleu) et de dissipation ($\Delta D_3 \times 10^{-6}$, rouge) pour les films (CNC5-XG1)₂ et les films (CNC3-XG1)₂ traités avec la Cellulyve^{TR} ($0,17 \cdot 10^{-2} \text{ nkat mL}^{-1}$). Les profils de fréquence et de dissipation correspondent aux signaux normalisés de la 3^{ème} harmonique. Les flèches indiquent le point d'injection de la solution enzymatique

L'action de la Cellulyve^{TR} sur les films (CNC3-XG1)₂ et (CNC5-XG1)₂ (profils (1) et (2), **figure 58**) conduit à une dégradation rapide du film. L'hydrolyse commence immédiatement après contact des cellulases avec la surface des films, comme le montre l'augmentation rapide de la fréquence. L'action hydrolytique de la Cellulyve^{TR} sur ces films est donc clairement démontrée par la QCM-D, puisqu'aucun changement en fréquence n'a été observé lorsque les films sont exposés au tampon seul.

L'injection de l'enzyme à t_0 s'accompagne d'une augmentation du facteur de dissipation ΔD sur une courte durée (2 à 3 minutes). Cette augmentation de ΔD est plus élevée dans les films à CNC5 (≈ 3 Hz) que dans les films à CNC3 (≈ 1 Hz). Cette courte augmentation reflète le caractère viscoélastique du film suite à l'injection de la Cellulyve^{TR}.

La pente de dégradation qui correspond à l'augmentation du signal de fréquence en fonction du temps témoigne du processus d'hydrolyse enzymatique. Cette augmentation commence à ralentir au-delà de 8 à 10 minutes et se stabilise au bout de 30 min pour les deux films avec une valeur $\Delta f_{\text{plateau}}$ deux fois plus élevée pour les films (CNC5-XG1)₂ (-115 ± 1 Hz) qu'avec les films (CNC3-XG1)₂ (-60 ± 9 Hz) (**tableau 9**). Cela suppose une perte de masse suite à la dégradation également plus importante dans les films CNC5.

Le ralentissement puis l'arrêt de l'hydrolyse sont accompagnés d'un changement du caractère viscoélastique du film jusqu'à la perte de son intégrité. Ceci se traduit par une diminution de ΔD jusqu'à une valeur plateau, de l'ordre de $18 \pm 6 \times 10^{-6}$ pour les films à CNC5 et de $9 \pm 1 \times 10^{-6}$ pour les films CNC3 (**tableau 9**).

Contrairement à ce qui est décrit dans l'étude de l'hydrolyse des films (CNC-XG)₄ par la Cellulyve^{TR} (Cerclier, et al., 2013), une phase d'adsorption précédant le processus d'hydrolyse n'est pas observée ici. L'absence de cette phase d'adsorption pourrait être due à l'utilisation d'une concentration enzymatique 1000 fois plus faible dans notre étude.

Tableau 9. Changements en fréquence et en dissipation des films lors de l'hydrolyse par la Cellulyve^{TR}. La fréquence du film restant $\Delta\Delta f_{\text{matériel restant hydraté}}$ correspond à la différence en fréquence entre le film hydraté avant hydrolyse et le film hydraté après hydrolyse, donc correspond au matériel perdu suite à l'action de la Cellulyve^{TR}. La masse du film restant $\Delta m_{\text{matériel hydraté restant}}$ est calculée comme étant $\Delta m_{\text{film hydraté}} - \Delta m_{\text{matériel perdu hydraté}}$. % perte = $(\Delta m_{\text{matériel perdu hydraté}} / \Delta m_{\text{film hydraté}}) * 100$. (*) Les résultats correspondent à la moyenne de 2 essais

	$\Delta\Delta f$	ΔD	Δm	Δm	Δm	
	matériel		matériel	matériel	film	
	restant		perdu	restant	hydraté	
	hydraté	$(\times 10^{-6})$	hydraté	hydraté		% perte
	(Hz)		(ng cm^{-2})	(ng cm^{-2})	(ng cm^{-2})	
CNC3	-60	9	3536	1070	4606	77%
	± 9	± 1	± 6	± 155	± 161	± 2
CNC5	-115	18	3196	2043	5239.6	61%
	± 1.0	± 6	± 17	± 102	± 84.7	± 1.0

Les valeurs de $\Delta f_{\text{plateau}}$ des profils QCM-D des films CNC5 plus élevés que celle obtenus avec CNC3 suggèrent une perte de masse plus élevée dans les films CNC5. Contrairement à ce qui est attendu, les pourcentages de perte du matériel hydraté suite à l'hydrolyse des films CNC3 et CNC5 sont du même ordre de grandeur avec une valeur légèrement plus importante pour les films CNC3 (77% ± 2) que pour les films CNC5 (61% ± 1). Ce résultat semble cohérent avec les facteurs de gonflement similaires et une hydratation assez élevée dans les deux films suggérant ainsi un temps de diffusion de l'enzyme assez rapide dans les deux cas.

En conclusion de cette étude de la dégradation par la Cellulyve^{TR} des films CNC3 et CNC5 par QCM-D, nous montrons que les films CNC3 et CNC5 présentent des comportements similaires vis-à-vis de l'hydrolyse par la Cellulyve^{TR} bien que leurs structures internes soient différentes. Le rendement d'hydrolyse est légèrement plus important dans les films CNC3 et pourrait s'expliquer par une accessibilité des chaînes légèrement plus importantes.

IV.4.2. Suivi en QCM-D de l'état des films avant et après incubation avec la xyloglucanase

Nous nous intéressons dans cette partie au comportement des films CNC 3 et CNC5 vis-à-vis de l'hydrolyse par la xyloglucanase. Le deuxième objectif est de comparer la réponse des films vis-à-vis de l'action d'une enzyme purifiée (xyloglucanase) à celle d'un cocktail enzymatique (la Cellulyve^{TR})

- Détermination des masses sèches sur les films avant hydrolyse

Les mesures des masses des films secs avant hydrolyse montrent des valeurs de même ordre de grandeur que celles mesurées précédemment sur des échantillons similaires (*tableau 10*).

Tableau 10. Changement en fréquence des films préparés pour la dégradation à la xyloglucanase avant hydrolyse et détermination des masses surfaciques sèches correspondantes

Films	Avant hydrolyse	
	$\Delta f_{film\ sec}$ (Hz)	$\Delta m_{film\ sec}$ (ng cm ⁻²)
CNC3 (n = 1)	-131	2319
CNC5 (n = 2)	-164 ±4	2903 ±68

- Détermination du taux d'hydratation des échantillons avant hydrolyse

Les films CNC3 et CNC5 montrent des pourcentages d'hydratation similaires (53 % et 46 ±1% respectivement) et des facteurs de gonflement similaires (2,1 pour les films CNC3 *versus* 1,8 pour les films CNC5). Ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus précédemment sur les échantillons préparés pour la dégradation à la Cellulyve^{TR} et confortent l'idée que les deux films gonflent de manière similaire bien que la structure interne soit différente (*tableau 11*).

Tableau 11. Etape d'hydratation des films préparés pour la dégradation à la xyloglucanase. Estimation du contenu en eau et du pourcentage d'hydratation des films ($\% \text{Hydratation} = (\Delta m_{\text{eau}} / \Delta m_{\text{film hydraté}}) * 100$; où $\Delta f_{\text{eau}} = \Delta f_{\text{film hydraté}} - \Delta f_{\text{film sec}}$) ainsi que le facteur de gonflement ($FG = \Delta m_{\text{film hydraté}} / \Delta m_{\text{film sec}}$)

	$\Delta f_{\text{film} + \text{tampon}}$ (Hz)	$\Delta m_{\text{film hydraté}}$ (ng cm ⁻²)	Δf_{eau} (Hz)	Δm_{eau} (ng cm ⁻²)	% Hydratation	FG
CNC3 (n = 1)	-277	4903	-146	2584	53	2,1
CNC5 (n = 2)	-304 ±1	5381 ±18	-139 ±5	2460 ±86	46 ±1	1,8 ±0

- Dégradation des films par la xyloglucanase

L'action de la xyloglucanase spécifique du xyloglucane sur les films (CNC3-XG1)₂ et (CNC5-XG1)₂ (**figure 59**) montre des phases de dégradation similaires à celles observées avec la Cellulyve^{TR}. Pour le film (CNC5-XG1)₂, une étape s'ajoute, notée (E) où on observe une chute de fréquence Δf_{ads} d'environ 20 Hz durant approximativement 2 à 3 minutes. Cette phase correspond à l'adsorption de l'enzyme, observée immédiatement après son dépôt sur la surface des films. Pour les films (CNC3-XG1)₂, la phase d'adsorption n'est pas observée.

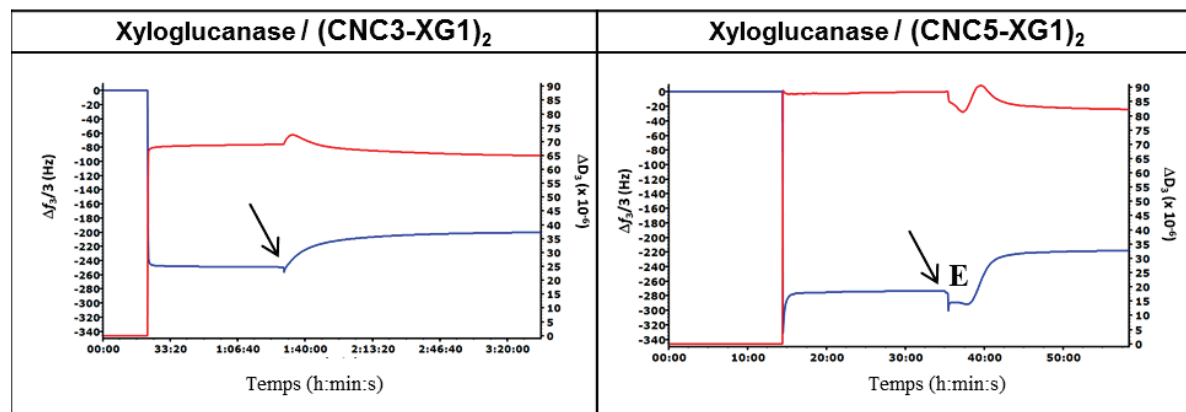


Figure 59. Variation de fréquences ($\Delta F_3/3$, bleu) et de dissipation ($\Delta D_3 \times 10^{-6}$, rouge) pour les films $(CNC5-XG1)_2$ et les films $(CNC3-XG1)_2$ traités par la xyloglucanase (6.10^{-2} nkat mL⁻¹). Les profils de fréquence et de dissipation correspondent aux signaux normalisés de la 3^{ème} harmonique. Les flèches indiquent le point d'injection de la solution enzymatique

La xyloglucanase GH74 possède un module CBM (Yaoi, et al., 2005). Cela suppose donc normalement une phase d'adsorption de l'enzyme à la surface préalablement à l'hydrolyse. Josefsson, et al. (2007) ont détecté la présence de cette phase d'adsorption lors de la dégradation de films de cellulose régénérée par des EG avec CBM (EG I et EG V). Une masse d'enzyme adsorbée de l'ordre de 370 ng cm⁻² a été évaluée. Une masse adsorbée similaire de l'ordre de 354 ng cm⁻² est observée ici avec les films CNC5. La présence d'une phase d'adsorption sur ces films et son absence sur les films CNC3 n'est pas explicable.

Ainsi, des essais supplémentaires de dégradation en présence de la xyloglucanase devraient être effectués sur ces films pour vérifier l'absence ou non d'une phase d'adsorption.

Le profil obtenu ensuite lors de la dégradation des deux films CNC3 et CNC5 par la xyloglucanase est similaire à celui observé précédemment en présence la Cellulyve^{TR} (figure 57).

Afin de pouvoir comparer de manière détaillée les différents comportements des films $(CNC3-XG1)_2$ et $(CNC5-XG1)_2$ au cours de la dégradation par la xyloglucanase, nous nous sommes basés sur la même approche utilisée précédemment.

Nous avons déterminé les différents paramètres QCM-D caractéristiques de la phase d'hydrolyse : à partir du changement en fréquence entre l'état hydraté et l'état dégradé des films, nous avons déterminé les pentes de dégradation et estimé le pourcentage de perte du matériel hydraté (basé sur le changement en fréquence). Enfin, la quantité surfacique de matériel hydraté résiduel après hydrolyse est calculée en utilisant l'équation de Sauerbrey.

Tableau 12. Changement en fréquence et en dissipation des films lors de l'étape d'hydrolyse par la xyloglucanase. La fréquence du film restant $\Delta\Delta m_{\text{matériel restant hydraté}}$ correspond à la différence en fréquence entre le film hydraté avant hydrolyse et le film hydraté après hydrolyse, donc correspond au matériel perdu suite à l'action de la xyloglucanase (6.10^{-2} nkat/mL). La masse du film restant $\Delta m_{\text{film hydraté restant}}$ est calculée comme étant $\Delta m_{\text{film hydraté}} - \Delta m_{\text{matériel perdu hydraté}}$. % perte = $(\Delta m_{\text{matériel perdu hydraté}} / \Delta m_{\text{film hydraté}}) * 100$

	$\Delta\Delta f$ matériel restant hydraté	ΔD ($\times 10^{-6}$)	Δm matériel perdu hydraté	Δm matériel restant hydraté	Δm film hydraté	% perte
	(Hz)		(ng cm^{-2})	(ng cm^{-2})	(ng cm^{-2})	
CNC3	-82	18	5746	1451	7215	80
CNC5	-126 ± 4.7	25 ± 19	3153 ± 81	2230 ± 99	5383 ± 18	58 ± 2

Les pourcentages de perte de matériel à l'issue de la dégradation par la xyloglucanase sont du même ordre de grandeur pour les deux films, quoique légèrement plus élevés dans les films CNC3. Cela pourrait s'expliquer par une accessibilité des chaînes de XG légèrement plus importante dans les films CNC3.

D'autre part, le pourcentage de perte du matériel issu du film suite à l'hydrolyse par la xyloglucanase est très important en comparaison au pourcentage de chaînes de XG hydrolysés sur les deux films que nous avons précédemment obtenus à l'issue de l'analyse des produits de dégradation par la xyloglucanase ($11,2 \pm 0,5$ % et 6,4% pour CNC3 et CNC5 respectivement.). Rappelons que dans nos conditions, aucune activité enzymatique n'a été détectée à 20°C sur la suspension de CNC durant 10 minutes (durée qui correspond au temps d'hydrolyse d'une expérience en QCM-D). Ainsi, la perte de masse observée en QCM-D pourrait être interprétée par la libération des CNC suite à l'hydrolyse des chaînes de XG qui assurent leur pontage. En effet, il suffit de rompre quelques chaînes de XG pour affaiblir la structure du film et libérer des nanocristaux de cellulose sans que ces derniers soient hydrolysés. Ainsi, l'hydrolyse de la totalité des chaînes de XG n'est pas indispensable pour la dégradation des films.

Les pourcentages de perte par la xyloglucanase ou par la Cellulyve^{TR} sont très similaires, que ce soit pour les films CNC3 (80% pour la xyloglucanase *versus* 77 % pour la Cellulyve^{TR}) ou pour les films CNC5 (58 ± 2 % pour la xyloglucanase *versus* 61% pour la Cellulyve^{TR}). Ce résultat montre que les comportements des films quelque soit leur architecture, sont similaires vis-à-vis de l'action d'une EG purifiée ou un mélange de cellulase.

En conclusion sur cette partie, on peut dégager les points suivants :

- Le calcul de la masse des films CNC3 et CNC5 a validé les résultats obtenus en réflectivité des neutrons sur les concentrations surfaciques.
- L'étude de l'étape d'hydratation du film par le tampon indique un gonflement similaire sur les deux films.

- L'étude qualitative de la dégradation enzymatique des films a montré des profils de dégradation similaires sur les essais réalisés et quelle que soit l'enzyme utilisée. La présence ou non d'une étape d'adsorption devrait être vérifiée par des essais supplémentaires.

- L'étude quantitative de la dégradation a montré un rendement de dégradation satisfaisant pour les deux films avec un pourcentage de perte à la dégradation du film légèrement plus élevé dans le cas des films CNC3, que ce soit en présence de la xyloglucanase ou en présence de la Cellulyve^{TR}. Ce résultat est attribué à une accessibilité des chaînes de XG légèrement plus importante, induisant probablement la coupure d'un nombre plus élevé de chaînes et la libération d'une quantité plus élevée de matière incluant les CNC.

- La réalisation du processus de dégradation enzymatique selon le mode statique nous a permis de mettre au point un nouveau protocole pour bien maîtriser le volume et donc la quantité d'enzymes déposée sur la surface. Toutefois, ce mode induit l'accumulation de produits d'hydrolyse à la surface qui pourrait limiter en partie le processus d'hydrolyse.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'organisation complexe des assemblages de polysaccharides pariétaux constitue souvent un verrou majeur à leur conversion en monosaccharides fermentescibles pour la transformation en biocarburants. Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse a eu pour but la compréhension des phénomènes mis en jeu lors de la dégradation enzymatique de polysaccharides pariétaux en milieu dense et hétérogène. La relation structure/organisation des assemblages et leur susceptibilité à l'hydrolyse a été abordée.

Nous nous sommes basés dans notre étude sur un nouveau système de détection enzymatique qui pourrait répondre à un double enjeu :

- la mise au point d'un système de détection d'activité enzymatique sensible, rapide et qui peut être intégré à moyen terme dans les tests de criblage haut débit d'activités enzymatiques.
- la mise au point de systèmes biomimétiques, modèles d'assemblages de la paroi végétale pour la compréhension du processus de leur dégradation enzymatique.

Nous nous sommes donc attachés au cours de ce travail à l'élaboration et à la caractérisation de ces substrats modèles qui consistent en deux types de films multicouches incluant des CNC combinés soit avec des CX soit avec des XG. Ensuite, nous nous sommes attachés à l'étude de leur dégradation enzymatique.

Dans un premier temps, nous avons exploité les propriétés physicochimiques d'arabinoxylanes modifiés chimiquement par le greffage de motifs cationiques pour construire des films à base d'interactions électrostatiques entre les charges positives des CX et les charges négatives des CNC.

L'étude du profil de croissance associée à l'analyse de leur morphologie de surface a montré que ces films sont composés d'une double couche de CNC ancrée dans une matrice de CX. Le test visuel de détection d'activité enzymatique a montré que ce système est dégradé par la xylanase et révèle une sensibilité du même ordre que celle d'une méthode de référence de dosage colorimétrique des extrémités réductrices libérées. Cela indique que la présence d'agrégats de CX ne semble pas être un obstacle à leur dégradation. Toutefois, le suivi *in situ* de la dégradation enzymatique de ces films en QCM-D a démontré que bien que l'hydrolyse ait lieu, il n'est pas actuellement maîtrisable.

En effet, la coupure de quelques chaînes au sein des agrégats de xylanes ne permet pas probablement de décrocher toute la structure de la surface mais engendre un relâchement du réseau et la pénétration de l'eau, ce qui conduit au gonflement du film. Ces résultats semblent être contradictoires avec la dégradation des CX détectée en solution par dosage colorimétrique ou sur les films par test visuel. Le suivi en temps réel de la dégradation de ces derniers en QCM-D donne lieu à des profils difficilement interprétables dus probablement à l'instabilité de la structure suite à l'hydrolyse. Ceci est supposé être lié à la présence d'agrégats de xylanes. Afin d'aider à l'interprétation de ces travaux, il serait intéressant en perspectives, de déterminer le comportement de ces films en solution notamment par la réflectivité des neutrons.

Dans un deuxième temps, nous avons focalisé nos efforts sur le système CNC/XG via l'élaboration de deux types de films, en variant la concentration des CNC. L'objectif était d'obtenir des films avec des structures contrôlées et modulables pouvant servir par la suite comme substrats modèles à l'étude de la dégradation enzymatique.

Nous avons montré que la variation de la concentration de CNC aboutit à un changement dans le profil de croissance. Une transition dans la pente de croissance a été observée à une concentration de 3-4 g L⁻¹. Nous avons constaté un effet similaire en augmentant la force ionique dans les suspensions de CNC suggérant l'implication d'interactions électrostatiques lors du dépôt des CNC. Ces résultats associés à l'étude de l'effet de la concentration sur les interactions inter-particules des CNC par diffusion de la lumière ont conforté l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la concentration aboutirait à l'augmentation de la force ionique intrinsèque due aux charges propres aux CNC. Cela a pour conséquence le changement du comportement colloïdal des CNC lié à la diminution de la taille hydrodynamique globale des nanocristaux. Cette diminution est le résultat de la condensation de la double couche électrique entourant les particules de CNC. Ainsi, l'adsorption d'une double couche de CNC est favorisée dans ce cas. L'analyse de la structure interne de ces films a confirmé cette hypothèse. En effet l'augmentation de la concentration des CNC de 3 à 5 g L⁻¹ conduit à l'obtention de films deux fois plus denses. L'impact positif de l'augmentation de la concentration des CNC sur la densification de l'adsorption des CNC a été démontré. Un effet similaire a été obtenu par augmentation de la force ionique bien que le mécanisme d'adsorption ne soit pas identique.

A l'issue de cette partie de travaux de la thèse, nous avons montré qu'il est possible d'élaborer des films multicouches avec des caractéristiques structurales différentes en jouant simplement sur la concentration des CNC.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'adsorption de XG sur des CNC en suspension et de leur dégradation enzymatique afin de déterminer l'architecture des complexes. Cette étude a été mise en relation avec la dégradation des couches. L'analyse des différents domaines d'adsorption de XG a montré des comportements d'adsorption de XG différents. A un ratio de concentration XG/CNC faible, les XG sont peu dégradés par l'enzyme suggérant que les XG sont adsorbés en trains à la surface de CNC. En revanche, en augmentant le ratio de concentration XG/CNC, la fraction de XG en boucles et queues semble augmenter jusqu'à stabilisation à 50 % en atteignant la capacité maximale d'adsorption. Par comparaison, le pourcentage de ces boucles a été évalué à 78 et 82 % respectivement dans les films CNC3 et CNC5 en se basant sur les résultats de la réflectivité des neutrons. Cela suppose une susceptibilité à l'hydrolyse plus importante dans les films.

Enfin, pour vérifier cette hypothèse nous avons étudié la dégradation enzymatique sur les films CNC3 et CNC5 pour comprendre l'effet de l'organisation sur l'hydrolyse enzymatique. La quantification de boucles de XG hydrolysés par analyse des produits de dégradation en HPAEC a montré des pourcentages très faibles par rapport à ce qui est attendu. Ainsi, la présence de boucles de XG ne signifie pas que celles-ci soient systématiquement accessibles à l'hydrolyse. En effet, à l'opposé des complexes XG/CNC en suspension, la densité de matière caractérisant les assemblages lorsqu'ils sont incorporés dans le film semble affecter d'une manière non négligeable l'accessibilité des chaînes de XG à l'hydrolyse. Toutefois, les pourcentages de pertes de matière obtenus par analyse de la dégradation enzymatique de ces films en temps réel par QCM-D ont montré des pourcentages de pertes significatifs que ce soit suite à l'action d'un cocktail enzymatique (cellulases) ou d'une xyloglucanase purifiée. Un pourcentage légèrement plus élevé a été obtenu avec les films CNC3 suggérant une accessibilité de chaînes et un taux de porosité plus élevé dans ceux-ci (*Tableau 13*).

Tableau 13. Comparaison des pourcentages de dégradation des films CNC3 et CNC5 par la Cellulyve^{TR} et la xyloglucanase

Enzymes	Cellulyve ^{TR}	Xyloglucanase
	Films	% Dégradation
CNC3	77 ±2 %	80 %
CNC5	61±1 %	58 ±2 %

La perte de masse importante obtenue en QCM-D pourrait être interprétée par la libération des CNC suite à l'hydrolyse des chaînes de XG qui assurent leur pontage. En effet, il suffit de rompre quelques chaînes de XG pour affaiblir la structure du film et libérer les nanocristaux de cellulose bien que ces derniers soient réfractaires à l'hydrolyse.

A l'issue de cette partie de travaux de thèse, nous avons réussi la mise au point d'un nouveau protocole pour la quantification de la dégradation enzymatique en se basant sur l'injection en mode statique. Ce travail a nécessité une part non négligeable du développement méthodologique qui nous a empêché d'approfondir les aspects d'interaction et de dégradation des couches par l'enzyme en proposant par exemple des modèles mathématiques pour décrire le processus. Ceci pourrait faire l'objet d'une prochaine étude.

En complément à l'analyse de la dégradation enzymatique des couches par QCM-D, une analyse par résonance plasmonique de surface pourrait également être réalisée pour apporter des informations sur les cinétiques d'interaction et de dégradation des couches par l'enzyme en temps réel (affinité, constante d'association et de dissociation).

Il serait également intéressant en associant ces deux techniques, d'analyser la morphologie de la surface par AFM avant et après dégradation enzymatique des films pour aider à mieux comprendre le processus de la dégradation enzymatique en milieu dense et hétérogène.

Si cette étude préliminaire de la dégradation enzymatique des films multicouches n'a pas permis d'aboutir à une relation définitive entre l'organisation des polymères au sein des assemblages nanométriques et la susceptibilité à la dégradation enzymatique, elle a néanmoins mis en évidence l'influence de la nature du milieu réactionnel et du comportement d'adsorption XG/CNC sur le rendement d'hydrolyse. Ces influences ont pu être observées grâce à la comparaison avec les systèmes XG/CNC établis en suspension. Bien qu'elle puisse encore être perfectionnée, cette étude de la dégradation enzymatique des couches constitue un outil prometteur pour l'étude de la catalyse hétérogène qui reste un enjeu cognitif important pour la transformation de la biomasse.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

- Abdul Khalil, H., Bhat, A., and Ireana Yusra, A.** (2012). Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: a review. *Carbohydrate Polymers* 87, 963-979.
- Acebes, J.L., Moral, R., and Zarra, I.** (1993). Purification and structure of xyloglucan in pine hypocotyls. *Phytochemistry* 33, 1343-1345.
- Ahola, S., Turon, X., Osterberg, M., Laine, J., and Rojas, O.** (2008). Enzymatic hydrolysis of native cellulose nanofibrils and other cellulose model films: effect of surface structure. *Langmuir* 24, 11592-11599.
- Ai, H., Jones, S.A., and Lvov, Y.M.** (2003). Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell biochemistry and biophysics* 39, 23-43.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., and Staehelin, A.** (2010). *Plant cell walls: from chemistry to biology* (Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC).
- Antoine, C., Peyron, S., Mabilie, F., Lapierre, C., Bouchet, B., Abecassis, J., and Rouau, X.** (2003). Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2026-2033.
- Araki, J., and Kuga, S.** (2001). Effect of trace electrolyte on liquid crystal type of cellulose microcrystals. *Langmuir* 17, 4493-4496.
- Araki, J., Wada, M., and Kuga, S.** (2001). Steric stabilization of a cellulose microcrystal suspension by poly (ethylene glycol) grafting. *Langmuir* 17, 21-27.
- Araki, J., Wada, M., Kuga, S., and Okano, T.** (2000). Birefringent glassy phase of a cellulose microcrystal suspension. *Langmuir* 16, 2413-2415.
- Araki, J., Wada, M., Kuga, S., and Okano, T.** (1999). Influence of surface charge on viscosity behavior of cellulose microcrystal suspension. *Journal of wood science* 45, 258-261.
- Aspinall, G.O., Krishnamurthy, T.N., and Rosell, K.-G.** (1977). A fucogalactoxyloglucan from rapeseed hulls. *Carbohydrate research* 55, 11-19.
- Atalla, R., and VanderHart, D.L.** (1999). The role of solid state ¹³C NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 15, 1-19.
- Atalla, R.H., and Vanderhart, D.L.** (1984). Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223, 283-285.
- Aulin, C., Johansson, E., Wågberg, L., and Lindström, T.** (2010). Self-organized films from cellulose I nanofibrils using the layer-by-layer technique. *Biomacromolecules* 11, 872-882.
- Aulin, C., Varga, I., Claesson, P.M., Wågberg, L., and Lindström, T.** (2008). Buildup of polyelectrolyte multilayers of polyethyleneimine and microfibrillated cellulose studied by in situ dual-polarization interferometry and quartz crystal microbalance with dissipation. *Langmuir* 24, 2509-2518.
- Ayrinhac, C., Margeot, A., Ferreira, N.L., Chaabane, F.B., Monot, F., Ravot, G., Sonet, J.-M., and Fourage, L.** (2010). Improved saccharification of wheat straw for biofuel production using an engineered secretome of *Trichoderma reesei*. *Organic Process Research & Development* 15, 275-278.
- Azzam, F., Moreau, C., Cousin, F., Menelle, A., Bizot, H., and Cathala, B.** (2014). Cellulose nanofibril-based multilayered thin films: the effect of ionic strength on porosity, swelling and optical properties. *Langmuir*.
- Baeza, J., and Freer, J.** (2000). Chemical characterization of wood and its components. *Wood and Cellulosic Chemistry*, 2nd ed. (Ed. DNS Hon, N Shiraishi). Dekker, New York, USA, 275-384.

- Battista, O., Coppick, S., Howsmon, J., Morehead, F., and Sisson, W.A.** (1956). Level-off degree of polymerization. *Industrial & Engineering Chemistry* 48, 333-335.
- Beck-Candanedo, S., Roman, M., and Gray, D.G.** (2005). Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions. *Biomacromolecules* 6, 1048-1054.
- Biely, P.** (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* 3, 286-290.
- Bledzki, A., and Gassan, J.** (1999). Composites reinforced with cellulose based fibres. *Progress in polymer science* 24, 221-274.
- Bornside, D., Macosko, C., and Scriven, L.** (1991). Spin coating of a PMMA/chlorobenzene solution. *Journal of The Electrochemical Society* 138, 317-320.
- Brito, B.S., Pereira, F.V., Putaux, J.-L., and Jean, B.** (2012). Preparation, morphology and structure of cellulose nanocrystals from bamboo fibers. *Cellulose* 19, 1527-1536.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L.** (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants* (American Society of Plant Physiologists Rockville).
- Buckeridge, M.S., Pessoa dos Santos, H., and Tiné, M.A.S.** (2000). Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 141-156.
- Bucur, C.B., Sui, Z., and Schlenoff, J.B.** (2006). Ideal mixing in polyelectrolyte complexes and multilayers: entropy driven assembly. *Journal of the American Chemical Society* 128, 13690-13691.
- Caffall, K.H., and Mohnen, D.** (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate research* 344, 1879-1900.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B.** (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic acids research* 37, D233-D238.
- Carpita, N., and McCann, M.** (2000). In *Biochemistry And Molecular Biology of Plants*.
- Caruso, F., Lichtenfeld, H., Donath, E., and Möhwald, H.** (1999). Investigation of electrostatic interactions in polyelectrolyte multilayer films: binding of anionic fluorescent probes to layers assembled onto colloids. *Macromolecules* 32, 2317-2328.
- Cerclier, C., and Cathala, B.** (2010). Méthode de détection d'activités enzymatiques hydrolytiques sans marquage à base de couches réfléchives de biopolymères. (
- Cerclier, C., Cousin, F., Bizot, F., Moreau, C., and Cathala, C.** (2010). Elaboration of Spin-Coated Cellulose-Xyloglucan Multilayered Thin Films. *Langmuir* 26, 17248–11725.
- Cerclier, C., Lack-Guyomard, A., Moreau, C., Cousin, F., Beury, N., Bonnin, E., Jean, B., and Cathala, B.** (2011). Coloured Semi-reflective Thin Films for Biomass-hydrolyzing Enzyme Detection. *Advanced Materials* 23, 3791–3795.
- Cerclier, C.V., Guyomard-Lack, A., Cousin, F., Jean, B., Bonnin, E., Cathala, B., and Moreau, C.** (2013). Xyloglucan-Cellulose Nanocrystal Multilayered Films: Effect of Film Architecture on Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules* 14, 3599-3609.
- Chambat, G., Karmous, M., Costes, M., Picard, M., and Joseleau, J.-P.** (2005). Variation of xyloglucan substitution pattern affects the sorption on celluloses with different degrees of crystallinity. *Cellulose* 12, 117-125.
- Chang, V.S., and Holtzapple, M.T.** (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. In *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. (Springer). pp. 5-37.

- Chanzy, H.** (1990). Aspects of cellulose structure. *Cellulose Sources and Exploitation. Industrial Utilization Biotechnology*, 3-12.
- Cheng, G., Datta, S., Liu, Z., Wang, C., Murton, J.K., Brown, P.A., Jablin, M.S., Dubey, M., Majewski, J., Halbert, C.E., et al.** (2012). Interactions of Endoglucanases with Amorphous Cellulose Films Resolved by Neutron Reflectometry and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Langmuir* 28, 8348-8358.
- Cheng, G., Liu, Z., Murton, J.K., Jablin, M., Dubey, M., Majewski, J., Halbert, C., Browning, J., Ankner, J., and Akgun, B.** (2011). Neutron reflectometry and QCM-D study of the interaction of cellulases with films of amorphous cellulose. *Biomacromolecules* 12, 2216-2224.
- Coughlan, M., and Hazlewood, G.P.** (1993). beta-1, 4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 17, 259-289.
- Cousin, F., Ott, F., Gibert, F., and Menelle, A.** (2011). EROS II: A boosted time-of-flight reflectometer for multi-purposes applications at the Laboratoire Léon Brillouin. *The European Physical Journal Plus* 126, 1-11.
- Cranston, E., Kan, K., Eita, M., Johansson, E., Netrval, J., Salajkova, M., Arwin, H., and Wågberg, L.** (2012). Mechanical testing of thin film nanocellulose materials. In *Tappi International Conference on Nanotechnology for Renewable Materials*. (
- Cranston, E.D., and Gray, D.G.** (2008). **Birefringence in spin-coated films containing cellulose nanocrystals.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 325, 44-51.
- Cranston, E.D., and Gray, D.G.** (2006). Morphological and optical characterization of polyelectrolyte multilayers incorporating nanocrystalline cellulose. *Biomacromolecules* 7, 2522-2530.
- Cranston, E.D., Gray, D.G., and Rutland, M.W.** (2010). Direct surface force measurements of polyelectrolyte multilayer films containing nanocrystalline cellulose. *Langmuir* 26, 17190-17197.
- Dammström, S., Salmén, L., and Gatenholm, P.** (2008). On the interactions between cellulose and xylan, a biomimetic simulation of the hardwood cell wall. *BioResources* 4, 3-14.
- de Lima, D.U., and Buckeridge, M.S.** (2001). Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. *Carbohydrate Polymers* 46, 157-163.
- de Mesquita, J.o.P., Donnici, C.L., and Pereira, F.V.** (2010). Biobased nanocomposites from layer-by-layer assembly of cellulose nanowhiskers with chitosan. *Biomacromolecules* 11, 473-480.
- De Rodriguez, N.L.G., Thielemans, W., and Dufresne, A.** (2006). Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate nanocomposites. *Cellulose* 13, 261-270.
- de Souza Lima, M.M., and Borsali, R.** (2004). Rodlike cellulose microcrystals: structure, properties, and applications. *Macromolecular Rapid Communications* 25, 771-787.
- Dea, I.C.M.** (1989). Industrial polysaccharides. *Pure and Applied Chemistry* 61, 1315-1322.
- Debzi, E., Chanzy, H., Sugiyama, J., Tekely, P., and Excoffier, G.** (1991). The $I\alpha \rightarrow I\beta$ transformation of highly crystalline cellulose by annealing in various mediums. *Macromolecules* 24, 6816-6822.
- Decher, G., Hong, J., and Schmitt, J.** (1992). Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin solid films* 210, 831-835.
- Dervilly-Pinel, G., Rimsten, L., Saulnier, L., Andersson, R., and Åman, P.** (2001). Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation. *Journal of Cereal Science* 34, 207-214.

Références bibliographiques

- Desai, S.G., and Converse, A.O.** (1997). Substrate reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology and bioengineering* 56, 650-655.
- Dick-Pérez, M., Zhang, Y., Hayes, J., Salazar, A., Zabotina, O.A., and Hong, M.** (2011). Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two-and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry* 50, 989-1000.
- Ding, H., and Xu, F.** (2004). Productive cellulase adsorption on cellulose. In *ACS symposium series*. (Oxford University Press). pp. 154-169.
- Doco, T., Williams, P., Pauly, M., O'Neill, M.A., and Pellerin, P.** (2003). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate polymers* 53, 253-261.
- Dodd, D., and Cann, I.K.** (2009). **Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production.** *GCB Bioenergy* 1, 2-17.
- Dong, X.M., Kimura, T., Revol, J.-F., and Gray, D.G.** (1996). Effects of ionic strength on the isotropic-chiral nematic phase transition of suspensions of cellulose crystallites. *Langmuir* 12, 2076-2082.
- Dong, X.M., Revol, J.-f., and Gray, D.G.** (1998). Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose. *Cellulose* 5, 19-32.
- Draude, K., Kurniawan, C., and Duff, S.** (2001). Effect of oxygen delignification on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. *Bioresource technology* 79, 113-120.
- Dufresne, A.** (2013). Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. *Materials Today* 16, 220-227.
- Ebringerova, A., and Heinze, T.** (2000). Xylan and xylan derivatives—biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular rapid communications* 21, 542-556.
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z., Burchard, W., Dolega, R., and Vorwerk, W.** (1994). Solution properties of water-insoluble rye-bran arabinoxylan. *Carbohydrate polymers* 24, 161-169.
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z., Kačuráková, M., and Antal, M.** (1994). Quaternized xylans: synthesis and structural characterization. *Carbohydrate Polymers* 24, 301-308.
- Elazzouzi-Hafraoui, S., Nishiyama, Y., Putaux, J.-L., Heux, L., Dubreuil, F.d.r., and Rochas, C.** (2008). The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. *Biomacromolecules* 9, 57-65.
- Enari, T.-M.** (1983). Microbial cellulases.
- Eronen, P., Åsterberg, M., Heikkinen, S., Tenkanen, M., and Laine, J.** (2011). Interactions of structurally different hemicelluloses with nanofibrillar cellulose. *Carbohydrate Polymers* 86, 1281-1290.
- Fincher, G., and Stone, B.** (1986). Cell walls and their components in cereal grain technology. *Advances in cereal science and technology (USA)*.
- Fry, S., York, W., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J., Kato, Y., Lorences, E., MacLachlan, G., Mort, A., et al.** (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol Plant* 89, 1 - 3.
- Fry, S.C.** (1988). *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis* (Longman Group Limited).
- Fry, S.C.** (1989). The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany* 40, 1-11.

- Fujino, T., Sone, Y., Mitsuishi, Y., and Itoh, T.** (2000). Characterization of cross-links between cellulose microfibrils, and their occurrence during elongation growth in pea epicotyl. *Plant and Cell Physiology* 41, 486-494.
- Fålt, S., Wagberg, L., Vesterlind, E.-L., and Larsson, P.** (2004). Model films of cellulose II-improved preparation method and characterization of the cellulose film. *Cellulose* 11, 151-162.
- Gidley, M.J., Lillford, P.J., Rowlands, D.W., Lang, P., Dentini, M., Crescenzi, V., Edwards, M., Fanutti, C., and Grant Reid, J.S.** (1991). Structure and solution properties of tamarind-seed polysaccharide. *Carbohydrate Research* 214, 299-314.
- Glinel, K., Moussa, A., Jonas, A.M., and Laschewsky, A.** (2002). Influence of polyelectrolyte charge density on the formation of multilayers of strong polyelectrolytes at low ionic strength. *Langmuir* 18, 1408-1412.
- Grabber, J.H.** (2005). How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science* 45, 820-831.
- Guyomard-Lack, A., Cerclier, C., Beury, N., Jean, B., Cousin, F., Moreau, C., and Cathala, B.** (2012). Nano-structured cellulose nanocrystals-xyloglucan multilayered films for the detection of cellulase activity. *European Physical Journal-Special Topics* 213, 291.
- Habibi, Y., Lucia, L.A., and Rojas, O.J.** (2010). Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical reviews* 110, 3479-3500.
- Hamad, W.Y., and Hu, T.Q.** (2010). Structure–process–yield interrelations in nanocrystalline cellulose extraction. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 88, 392-402.
- Hanus, J., and Mazeau, K.** (2006). The xyloglucan-cellulose assembly at the atomic scale. *Biopolymers* 82, 59-73.
- Hayashi, T.** (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 139-168.
- Hayashi, T., and Delmer, D.P.** (1988). Xyloglucan in the cell walls of cotton fiber. *Carbohydrate research* 181, 273-277.
- Hayashi, T., and MacLachlan, G.** (1984). Pea xyloglucan and cellulose I. Macromolecular organization. *Plant physiology* 75, 596-604.
- Hayashi, T., Marsden, M.P., and Delmer, D.P.** (1987). Pea xyloglucan and cellulose VI. Xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiology* 83, 384-389.
- Hayashi, T., Ogawa, K., and Mitsuishi, Y.** (1994). Characterization of the adsorption of Xyloglucan to Cellulose. *Plant and Cell Physiology* 35, 1199-1205.
- Henrissat, B.** (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J* 280, 309-316.
- Henrissat, B.** (1994). Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose* 1, 169-196.
- Henrissat, B., and Davies, G.** (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current opinion in structural biology* 7, 637-644.
- Herpoël-Gimbert, I., Margeot, A., Dolla, A., Jan, G., Mollé, D., Lignon, S., Mathis, H., Sigoillot, J.-C., Monot, F., and Asther, M.** (2008). Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. *Biotechnol Biofuels* 1, 18.
- Herrick, F.W., Casebier, R.L., Hamilton, J.K., and Sandberg, K.R.** (1983). Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility. In *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.;(United States)*. (ITT Rayonier Inc., Shelton, WA).

- Hilz, H., de Jong, L., Kabel, M., Verhoef, R., Schols, H., and Voragen, A.** (2007). Bilberry xyloglucan - novel building blocks containing beta-xylose within a complex structure. *Carbohydr Res* 342, 170 - 181.
- Hu, G., Heitmann Jr, J.A., and Rojas, O.J.** (2009). In situ monitoring of cellulase activity by microgravimetry with a quartz crystal microbalance. *The Journal of Physical Chemistry B* 113, 14761-14768.
- Iglesias, N., Abelenda, J.A., Rodino, M.a., Sampedro, J., Revilla, G., and Zarra, I.** (2006). Apoplastic glycosidases active against xyloglucan oligosaccharides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology* 47, 55-63.
- Iler, R.** (1966). Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science* 21, 569-594.
- Ishii, T.** (1991). Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. *Carbohydrate research* 219, 15-22.
- Jean, B., Dubreuil, F., Heux, L., and Cousin, F.** (2008). Structural details of cellulose nanocrystals/polyelectrolytes multilayers probed by neutron reflectivity and AFM. *Langmuir* 24, 3452-3458.
- Jean, B., Heux, L., Dubreuil, F., Chambat, G., and Cousin, F.** (2009). Non-Electrostatic Building of Biomimetic Cellulose-Xyloglucan Multilayers. *Langmuir* 25, 3920-3923.
- Jenekhe, S.A., and Schuldt, S.B.** (1984). Coating flow of non-Newtonian fluids on a flat rotating disk. *Industrial & engineering chemistry fundamentals* 23, 432-436.
- Jeong, C., Maciel, A., Pawlak, J.J., Heitmann, J.A., Argyropoulos, D.S., and Rojas, O.J.** (2005). Following Cellulase Activity by the Quartz Crystal Microbalance Technique. In *59th Appita Annual Conference and Exhibition: Incorporating the 13th ISWFPC (International Symposium on Wood, Fibre and Pulping Chemistry)*, Auckland, New Zealand, 16-19 May 2005: *Proceedings*. (Appita Inc.). pp. 495.
- Jiang, F., Kittle, J.D., Tan, X., Esker, A.R., and Roman, M.** (2013). Effects of sulfate groups on the adsorption and activity of cellulases on cellulose substrates. *Langmuir* 29, 3280-3291.
- Johan, L., Atsushi, I., Farid, M.I., Azadeh, N., Harry, J.G., Gideon, J.D., and Harry, B.** (2011). Structural and enzymatic characterization of a glycoside hydrolase family 31 alpha-xylosidase from *Cellvibrio japonicus* involved in xyloglucan saccharification. *Biochemical Journal* 436, 567-580.
- Josefsson, P., Henriksson, G., and Wågberg, L.** (2007). The physical action of cellulases revealed by a quartz crystal microbalance study using ultrathin cellulose films and pure cellulases. *Biomacromolecules* 9, 249-254.
- Junior de Menezes, A., Siqueira, G., Curvelo, A.A., and Dufresne, A.** (2009). Extrusion and characterization of functionalized cellulose whiskers reinforced polyethylene nanocomposites. *Polymer* 50, 4552-4563.
- Kabel, M.A., van den Borne, H., Vincken, J.-P., Voragen, A.G., and Schols, H.A.** (2007). Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydrate polymers* 69, 94-105.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Bertoncini, P., Cathala, B., and Capron, I.** (2013). Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. *Soft Matter* 9, 952-959.
- Kim, B.-S., Takemasa, M., and Nishinari, K.** (2006). Synergistic interaction of xyloglucan and xanthan investigated by rheology, differential scanning calorimetry, and NMR. *Biomacromolecules* 7, 1223-1230.
- Kimura, F., Kimura, T., Tamura, M., Hirai, A., Ikuno, M., and Horii, F.** (2005). Magnetic alignment of the chiral nematic phase of a cellulose microfibril suspension. *Langmuir* 21, 2034-2037.

- Klemm, D., Philipp, B., Heinze T., Heinze, U., Wagenknecht, W.** (1998). Comprehensive cellulose chemistry vol. 1. Weinheim: Wiley-VCH, chapter 2.
- Krässig, H.A.** (1993). Cellulose: Structure, Accessibility and Reactivity, Polymer Monographs. Gordon and Breach Science publisher, New York, vol 11,
- Warwicker, J. O., Jeffries, R., Colbran, R. L., Robinson R. N.** (1966). A Review of the Literature on the Effect of Caustic Soda and Other Swelling Agents on the Fine Structure of Cotton. Shirley Institute Pamphlet 93, St Anns Press, England.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., and Bohn, A.** (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angewandte Chemie International Edition 44, 3358-3393.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., and Dorris, A.** (2011). Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. Angewandte Chemie International Edition 50, 5438-5466.
- Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Heßler, N., Hornung, M., Schmauder, H.-P., and Marsch, S.** (2006). Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. In Polysaccharides II. (Springer), pp. 49-96.
- Kotov, N.** (1999). Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions. Nanostructured Materials 12, 789-796.
- Köhnke, T., Östlund, Å., and Brelid, H.** (2011). Adsorption of arabinoxylan on cellulosic surfaces: influence of degree of substitution and substitution pattern on adsorption characteristics. Biomacromolecules 12, 2633-2641.
- Krebs, F.C.** (2009). Fabrication and processing of polymer solar cells: A review of printing and coating techniques. Solar Energy Materials and Solar Cells 93, 394-412.
- Kroon-Batenburg, L., and Kroon, J.** (1997). The crystal and molecular structures of cellulose I and II. Glycoconjugate journal 14, 677-690.
- Lang, P., and Kajiwara, K.** (1993). Investigations of the architecture of tamarind seed polysaccharide in aqueous solution by different scattering techniques. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 4, 517-528.
- Lawrence, C.** (1988). The mechanics of spin coating of polymer films. Physics of Fluids (1958-1988) 31, 2786-2795.
- Levy, S., York, W.S., Stuike-Prill, R., Meyer, B and Staehelin, L.A.** (1991). Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. Plant Journal 1(2), 195-215
- Levy, S., Maclachlan, G., and Staehelin, L.A.** (1997). Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. The Plant Journal 11, 373-386.
- Lewis, N.G., and Yamamoto, E.** (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. Annual review of plant biology 41, 455-496.
- Lima, D.U., Loh, W., and Buckeridge, M.S.** (2004). Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. Plant Physiology and Biochemistry 42, 389-394.
- Linder, Å., Bergman, R., Bodin, A., and Gatenholm, P.** (2003). Mechanism of assembly of xylan onto cellulose surfaces. Langmuir 19, 5072-5077.

Références bibliographiques

- Lopez, M., Bizot, H., Chambat, G., Marais, M.-F., Zykwska, A., Ralet, M.-C., Driguez, H., and Buléon, A.** (2010). Enthalpic Studies of Xyloglucan– Cellulose Interactions. *Biomacromolecules* 11, 1417-1428.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., and Pretorius, I.S.** (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews* 66, 506-577.
- Malherbe, S., and Cloete, T.E.** (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1, 105-114.
- Mandels, M., and Reese, E.T.** (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of Bacteriology* 73, 269.
- Mansfield, S.D., Mooney, C., and Saddler, J.N.** (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology progress* 15, 804-816.
- Marchessault, R., Morehead, F., and Koch, M.J.** (1961). Some hydrodynamic properties of neutral suspensions of cellulose crystallites as related to size and shape. *Journal of Colloid Science* 16, 327-344.
- Martin, C., B, Jean.** (2014) Nanocellulose/polymer multilayered thin films: tunable architectures towards tailored physical properties. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* 2014 29, 19-30.
- Martin-Sampedro, R., Filpponen, I., Hoeger, I.C., Zhu, J., Laine, J., and Rojas, O.J.** (2012). Rapid and Complete Enzyme Hydrolysis of Lignocellulosic Nanofibrils. *ACS Macro Letters* 1, 1321-1325.
- Matsuzawa, T., Saito, Y., and Yaoi, K.** (2014). Key amino acid residues for the endo-processive activity of GH74 xyloglucanase. *FEBS letters* 588, 1731-1738.
- McCann, M., Wells, B., and Roberts, K.** (1990). Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science* 96, 323-334.
- McCann, M.C., and Roberts, K.** (1994). Changes in cell wall architecture during cell elongation. *Journal of Experimental Botany* 45, 1683-1691.
- Miller, A.F., and Donald, A.M.** (2003). Imaging of anisotropic cellulose suspensions using environmental scanning electron microscopy. *Biomacromolecules* 4, 510-517.
- Minic, Z., and Jouanin, L.** (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant physiology and biochemistry* 44, 435-449.
- Mishima, T., Hisamatsu, M., York, W.S., Teranishi, K., and Yamada, T.** (1998). Adhesion of α -D-glucans to cellulose. *Carbohydrate research* 308, 389-395.
- Mishra, A., Clark, J.H., Vij, A., and Daswal, S.** (2008). Synthesis of graft copolymers of xyloglucan and acrylonitrile. *Polymers for Advanced Technologies* 19, 99-104.
- Mishra, A., and Malhotra, A.V.** (2009). Tamarind xyloglucan: a polysaccharide with versatile application potential. *Journal of Materials Chemistry* 19, 8528-8536.
- Missoum, K., Belgacem, M.N., and Bras, J.** (2013). Nanofibrillated cellulose surface modification: A review. *Materials* 6, 1745-1766.
- Mohnen, D.** (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology* 11, 266-277.
- Moreau, C., Beury, N., Delorme, N., and Cathala, B.** (2012). Tuning the architecture of cellulose nanocrystal–poly (allylamine hydrochloride) multilayered thin films: influence of dipping parameters. *Langmuir* 28, 10425-10436.
- Mosier, N.S., Hall, P., Ladisch, C.M., and Ladisch, M.R.** (1999). Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins. In *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. (Springer), pp. 23-40.

- Nelson, N.** (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem* 153, 375-379.
- Nishiyama, Y., Isogai, A., Okano, T., Müller, M., and Chanzy, H.** (1999). Intracrystalline deuteration of native cellulose. *Macromolecules* 32, 2078-2081.
- Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., and Langan, P.** (2003). Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose I α from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *Journal of the American Chemical Society* 125, 14300-14306.
- Norrman, K., Ghanbari-Siahkali, A., and Larsen, N.** (2005). 6 Studies of spin-coated polymer films. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)* 101, 174-201.
- Paananen, A., Österberg, B., Rutland, M., Tammelin, T., Saarinen, T., Tappura, K., and Stenius, P.** (2004). Interaction between cellulose and xylan: an atomic force microscope and quartz crystal microbalance study. In *Hemicellulose: Science And Technology*. pp. 269-290.
- Painter, T.J.** (1983). Algal polysaccharides. *The polysaccharides* 2, 195-285.
- Park, Y., and Cosgrove, D.** (2012). A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases. *Plant physiology* 158, 1933-1943.
- Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W.S.** (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal* 20, 629-639.
- Peng, B., Dhar, N., Liu, H., and Tam, K.** (2011). Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: a nanotechnology perspective. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 89, 1191-1206.
- Peresin, M.S.** (2013). A mini-review on properties of nanocrystalline cellulose and its potential applications. *Revista Investigaciones Aplicadas* 7, 58-73.
- Philipp, B., Jacopian, V., Loth, F., Hirte, W., and Schulz, G.** (1979). Influence of cellulose physical structure on thermohydrolytic, hydrolytic, and enzymatic degradation of cellulose.
- Podsiadlo, P., Choi, S.Y., Shim, B., Lee, J., Cuddihy, M., and Kotov, N.A.** (2005). Molecularly engineered nanocomposites: Layer-by-layer assembly of cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules* 6, 2914-2918.
- Podsiadlo, P., Sui, L., Elkasabi, Y., Burgardt, P., Lee, J., Miryala, A., Kusumaatmaja, W., Carman, M.R., Shtein, M., and Kieffer, J.** (2007). Layer-by-layer assembled films of cellulose nanowires with antireflective properties. *Langmuir* 23, 7901-7906.
- Poutanen, K., Tenkanen, M., Korte, H., and Puls, J.** (1991). Accessory enzymes involved in the hydrolysis of xylans. In *Acs Symposium Series*. (AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036). pp. 426-436.
- Pranger, L., and Tannenbaum, R.** (2008). Biobased nanocomposites prepared by in situ polymerization of furfuryl alcohol with cellulose whiskers or montmorillonite clay. *Macromolecules* 41, 8682-8687.
- Pérez, S.** (2000). Initiation à la chimie et à la physico-chimie macromoléculaires. Groupe Français d'études et d'applications des polymères. Chapitre I : Structure et morphologie de la cellulose. (
- Qiao, B., Cerdà, J.J., and Holm, C.** (2010). Poly (styrenesulfonate)– Poly (diallyldimethylammonium) Mixtures: Toward the Understanding of Polyelectrolyte Complexes and Multilayers via Atomistic Simulations. *Macromolecules* 43, 7828-7838.
- Rabinovich, M., Melnik, M., and Bolobova, A.** (2002). Dedicated to the memory of IV Berezin and RV Feniksova *Microbial Cellulases (Review)*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 38, 305-322.

Références bibliographiques

- Rebouillat, S., and Pla, F.** (2013). State of the Art Manufacturing and Engineering of Nanocellulose: A Review of Available Data and Industrial Applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 4, 165.
- Reese, E.T., Siu, R.G., and Levinson, H.S.** (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology* 59, 485.
- Rehg, T.J., and Higgins, G.** (1992). Spin coating of colloidal suspensions. *AIChE journal* 38, 489-501.
- Reis, D., and Vian, B.** (2004). Helicoidal pattern in secondary cell walls and possible role of xylans in their construction. *Comptes rendus biologies* 327, 785-790.
- Ren, Y., Picout, D.R., Ellis, P.R., and Ross-Murphy, S.B.** (2004). Solution properties of the xyloglucan polymer from *Afzelia africana*. *Biomacromolecules* 5, 2384-2391.
- Ren, Y., Picout, D.R., Ellis, P.R., Ross-Murphy, S.B., and Reid, J.** (2005). A novel xyloglucan from seeds of *Afzelia africana* Se. Pers.—extraction, characterization, and conformational properties. *Carbohydrate research* 340, 997-1005.
- Revol, J.-F.** (1982). On the cross-sectional shape of cellulose crystallites in *Valonia ventricosa*. *Carbohydrate Polymers* 2, 123-134.
- Revol, J.-F., Bradford, H., Giasson, J., Marchessault, R., and Gray, D.** (1992). Helicoidal self-ordering of cellulose microfibrils in aqueous suspension. *International journal of biological macromolecules* 14, 170-172.
- Revol, J.-F.o., Godbout, L., Dong, X.-M., Gray, D.G., Chanzy, H., and Maret, G.** (1994). Chiral nematic suspensions of cellulose crystallites; phase separation and magnetic field orientation. *Liquid Crystals* 16, 127-134.
- Rinaudo, M., and Joseleau, J.P.** (2008). La biomasse végétale peut-elle concurrencer le pétrole? CERMAV-CNRS.
- Rojas, O.J., Jeong, C., Turon, X., and Argyropoulos, D.S.** (2007). Measurement of cellulase activity with piezoelectric resonators. In *ACS symposium series*. (Oxford University Press). pp. 478-494.
- Ryabova, O., Vršanská, M., Kaneko, S., H. van Zyl, W., and Biely, P.** (2009). A novel family of hemicellulolytic α -glucuronidase. *FEBS Letters* 583, 1457-1462.
- Saake, B., Kruse, T., and Puls, J.** (2001). Investigation on molar mass, solubility and enzymatic fragmentation of xylans by multi-detected SEC chromatography. *Bioresource technology* 80, 195-204.
- Saha, B.C.** (2000). α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology advances* 18, 403-423.
- Scheller, H.V., and Ulvskov, P.** (2010). Hemicelluloses. *Plant Biology* 61, 263.
- Schlenoff, J.B., Dubas, S.T., and Farhat, T.** (2000). Sprayed polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 16, 9968-9969.
- Schwikal, K., Heinze, T., Ebringerova, A., and Petzold, K.** (2005). Cationic xylan derivatives with high degree of functionalization. In *Macromolecular Symposia*. (Wiley Online Library). pp. 49-56.
- Schwikal, K., Heinze, T., Saake, B., Puls, J., Kaya, A., and Esker, A.R.** (2011). Properties of spruce sulfite pulp and birch kraft pulp after sorption of cationic birch xylan. *Cellulose* 18, 727-737.
- Showalter, A.M.** (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5, 9.

- Soga, K., Arai, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., and Hoson, T.** (2007). Modifications of xyloglucan metabolism in azuki bean epicotyls under hypergravity conditions. *Advances in Space Research* 39, 1204-1209.
- Sone, Y., and Sato, K.** (1994). Measurement of oligosaccharides derived from tamarind xyloglucan by competitive ELISA assay. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 58, 2295-2296.
- Subramaniyan, S., and Prema, P.** (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology* 22, 33-64.
- Suchy, M., Linder, M.B., Tammelin, T., Campbell, J.M., Vuorinen, T., and Kontturi, E.** (2011). Quantitative Assessment of the Enzymatic Degradation of Amorphous Cellulose by Using a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Langmuir* 27, 8819-8828.
- Sugiyama, J., Chanzy, H., and Revol, J.F.o.** (1994). On the polarity of cellulose in the cell wall of Valonia. *Planta* 193, 260-265.
- Sugiyama, J., Okano, T., Yamamoto, H., and Horii, F.** (1990). Transformation of Valonia cellulose crystals by an alkaline hydrothermal treatment. *Macromolecules* 23, 3196-3198.
- Sukhorukov, G.B., Donath, E., Lichtenfeld, H., Knippel, E., Knippel, M., Budde, A., and Möhwald, H.** (1998). Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects* 137, 253-266.
- Tammelin, T., Saarinen, T., Åsterberg, M., and Laine, J.** (2006). Preparation of Langmuir/Blodgett-cellulose surfaces by using horizontal dipping procedure. Application for polyelectrolyte adsorption studies performed with QCM-D. *Cellulose* 13, 519-535.
- Taylor, I.E., and Atkins, E.D.** (1985). X-ray diffraction studies on the xyloglucan from tamarind (*Tamarindus indica*) seed. *FEBS letters* 181, 300-302.
- Taylor, J., and Haigler, C.** (1993). Patterned secondary cell-wall assembly in tracheary elements occurs in a self-perpetuating cascade. *Acta botanica neerlandica* 42, 153-163.
- Tollier, M.T., and Robin, J.** (1979). Adaptation de la methode al'orcinol sulfurique au dosage automatique des glucides neutres totaux: conditions d'application aux extraits d'origine vegetale. In *Annales de Technologie Agricole*.
- Turbak, A.F., Snyder, F.W., and Sandberg, K.R.** (1983). Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential. *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym.Symp* 37, 815-827.
- Turon, X., Rojas, O.J., and Deinhammer, R.S.** (2008). Enzymatic kinetics of cellulose hydrolysis: A QCM-D study. *Langmuir* 24, 3880-3887.
- VanderHart, D.L., and Atalla, R.H.** (1984). Studies of microstructure in native celluloses using solid-state carbon-13 NMR. *Macromolecules* 17, 1465-1472.
- Vierhuis, E., York, W.S., Kolli, V., Vincken, J.-P., Schols, H.A., Van Alebeek, G.-J.W., and Voragen, A.G.** (2001). Structural analyses of two arabinose containing oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. *Carbohydrate research* 332, 285-297.
- Vincken, J.P., Keizer, A.d., Beldman, G., and Voragen, A.G.J.** (1995). Fractionation of Xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. *Plant Physiology* 108, 1579-1585.
- Vincken, J.P., York, W.S., Beldman, G., and Voragen, A.G.J.** (1997). Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiology* 114, 9-13.
- Vukusic, P.** (2010). Natural designs for manipulating the appearance of surfaces. *Ophthalmic and Physiological Optics* 30, 435-445.

- Vukusic, P., and Sambles, J.R.** (2003). Photonic structures in biology. *Nature* 424, 852-855.
- Wang, L., Zhang, Y., Gao, P., Shi, D., Liu, H., and Gao, H.** (2006). Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and bioengineering* 93, 443-456.
- Washo, B.** (1977). Rheology and modeling of the spin coating process. *IBM Journal of Research and Development* 21, 190-198.
- Webb, E.C.** (1992). Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes (Academic Press).
- Whitney, S.E., Gothard, M.G., Mitchell, J.T., and Gidley, M.J.** (1999). Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant Physiology* 121, 657-664.
- Winter, H., Barakat, A., Cathala, B., and Saake, B.** (2006). Preparation of arabinoxylan and its sorption on bacterial cellulose during cultivation. In *Macromolecular symposia*. (Wiley Online Library). pp. 74-84.
- Wågberg, L., Decher, G., Norgren, M., Lindström, T., Ankerfors, M., and Axnäs, K.** (2008). The build-up of polyelectrolyte multilayers of microfibrillated cellulose and cationic polyelectrolytes. *Langmuir* 24, 784-795.
- Yamagaki, T., Mitsuishi, Y., and Nakanishi, H.** (1998). Influence of different glycosidic linkages on relative ion intensities in post-source decay fragmentation of a xyloglucan heptaoligosaccharide using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12, 307-311.
- Yang, B., Willies, D.M., and Wyman, C.E.** (2006). Changes in the enzymatic hydrolysis rate of Avicel cellulose with conversion. *Biotechnology and Bioengineering* 94, 1122-1128.
- Yaoi, K., Nakai, T., Kameda, Y., Hiyoshi, A., and Mitsuishi, Y.** (2005). Cloning and characterization of two xyloglucanases from *Paenibacillus* sp. strain KM21. *Applied and environmental microbiology* 71, 7670-7678.
- Yoo, D., Shiratori, S.S., and Rubner, M.F.** (1998). Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules* 31, 4309-4318.
- York, W.S., Darvill, A.G., and Albersheim, P.** (1984). Inhibition of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. *Plant physiology* 75, 295-297.
- York, W.S., Harvey, L.K., Guillen, R., Alberhseim, P., and Darvill, A.G.** (1993). Structural analysis of tamarind seed xyloglucan oligosaccharides using ^2H -galactosidase digestion and spectroscopic methods. *Carbohydrate Research* 248, 285-301.
- York, W.S., van Halbeek, H., Darvill, A.G., and Albersheim, P.** (1990). Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by ^1H NMR spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. *Carbohydrate research* 200, 9-31.
- Zhang, Q., Brumer, H., Ågren, H., and Tu, Y.** (2011). The adsorption of xyloglucan on cellulose: effects of explicit water and side chain variation. *Carbohydrate research* 346, 2595-2602.
- Zhang, Y.H.P., and Lynd, L.R.** (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering* 88, 797-824.

Zhao, X., Zhang, L., and Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6, 465-482.

RESUMÉ

ETUDE DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE DE COUCHES SEMI-REFLECTIVES A BASE DE BIOPOLYMERES.

Les polysaccharides pariétaux (cellulose et les hémicelluloses) peuvent être utilisés pour la production de bioéthanol. L'amélioration de la bio-raffinerie par hydrolyse enzymatique nécessite un effort constant pour la découverte d'enzymes performantes par des outils de criblage rapides, sensibles et robustes. L'objectif a été d'utiliser des films multicouches à base de biopolymères, comme substrats modèles d'assemblages de polysaccharides pariétaux. Nous avons élaboré deux types de films incluant des nanocristaux cellulose (CNC) combinés soit avec des xylanes cationiques (CX) soit avec des xyloglucanes (XG). La particularité de ces systèmes nanométriques est de provoquer l'apparition d'une couleur structurale. L'action d'une enzyme hydrolytique sur ces films peut être détectée par un changement de couleur lié à la diminution de l'épaisseur provoquée par l'hydrolyse. La pertinence de ces systèmes en tant que détecteurs visuels d'activité enzymatique a été validée avec une sensibilité équivalente (CNC-CX) ou meilleure (CNC-XG) que celle d'une méthode colorimétrique de référence. Des films (CNC-XG) avec architectures contrôlées ont été élaborés en jouant sur la concentration des CNC. L'étude de la structure interne de ces films par réflectivité des neutrons a montré que l'augmentation de la concentration induit une densification de l'adsorption des CNC. Les profils de dégradation obtenus en QCM-D et les pourcentages de perte de matière associés ont été comparés sur les films CNC3-XG et CNC5-XG. Un pourcentage de dégradation significatif a été obtenu dans les deux cas bien qu'il soit légèrement plus élevé pour les films CNC3 reflétant une accessibilité de chaînes de XG plus aisée.

Mots clés :

Nanocristaux de cellulose ; Xylanes cationiques ; Xyloglucanes ; Films multicouches colorés ; Dégradation enzymatique

ABSTRACT

STUDY OF THE ENZYMATIC DEGRADATION PROCESS OF BIOPOLYMER-BASED SEMI-REFLECTIVE LAYERS.

Cellulose and hemicellulose are the major constituents of plant cell walls and can be used for the production of bioethanol. The improvement of the enzymatic biorefinery requires a constant search for efficient enzymes and requires rapid, sensitive and robust enzymatic screening tools. The objective was to use biopolymer-based multilayered films as substrate models of plant cell wall polysaccharide assemblies. Two types of films were developed that incorporated cellulose nanocrystals (CNC) combined with either cationic xylan (CX) or with xyloglucan (XG). The most outstanding feature of these nanoscale systems is that they give rise to a structural color. The hydrolytic action of an enzyme on these films may be detected by a change in color due to the decrease in film thickness following hydrolysis. The efficiency of these systems as visual enzymatic activity sensors was validated with a sensitivity that is equivalent to (for CNC-CX) or better than (for CNC-XG) a colorimetric reference method. CNC-XG films with controlled architectures were developed by varying the concentration of CNC. The study of the internal structure of these films by neutron reflectivity showed that the increase in CNC concentration results in the densification of CNC adsorption. The degradation profiles obtained by QCM-D and the associated percentages of matter loss were compared between CNC5-XG and CNC3-XG films. A significant degradation percentage was obtained in both cases although it is slightly higher for CNC3 films, probably due to the greater accessibility of XG chains.

Key Words:

Cellulose nanocrystals; Cationic xylans; Xyloglucans ; Coloured multilayered thin films ; Enzymatic degradation