

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ECOLE DOCTORALE  
Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Films multicouches à base de  
polymères végétaux :  
Elaboration et application  
à la détection d'activités enzymatiques

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Chimie  
Spécialité : Chimie des matériaux

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Carole CERCLIER**

*Le 20 octobre 2010, devant le jury ci-dessous*

Président	M. Olivier CHAUVET
Rapporteurs	M. Laurent HEUX M. Emmanuel BELAMIE
Examineurs	Melle Karine GLINEL M. Simon HAWKINS M. Bernard CATHALA
Membres invités	Mme Estelle BONNIN M. Fabrice COUSIN

*Directeur de thèse : M. Bernard CATHALA*



*Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'unité de recherche Biopolymères, Interaction, Assemblages du centre INRA Angers-Nantes. Je remercie son directeur, Jacques Guéguen, de m'y avoir accueillie.*

*J'adresse tout particulièrement ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Bernard Cathala, pour toutes les qualités avec lesquelles il a encadré ces travaux. Je lui suis reconnaissante du soutien qu'il m'a témoigné tout au long de ce projet et de sa disponibilité malgré un emploi du temps très chargé.*

*Je suis très reconnaissante à Emmanuel Belamie, maître de conférence de ICG de Montpellier, et Laurent Heux, chargé de recherche CNRS au CERMAV (Grenoble), d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également à Estelle Bonnin, ingénieur de recherche à l'INRA d'Angers-Nantes, Olivier Chauvet, professeur à l'université de Nantes, Fabrice Cousin, ingénieur au CEA de Saclay, Karine Glinel, chargé de recherche à l'université catholique de Louvain, et Simon Hawkins, professeur à l'université de Lille 1, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de participer à ce jury.*

*Cette thèse n'aurait certainement pas pu aboutir sans le soutien et les nombreux conseils avisés de toutes les personnes que j'ai eu la chance de croiser et avec qui j'ai eu le plaisir d'apprendre et de collaborer.*

*Je tiens à exprimer à cet égard ma sincère gratitude à Fabrice Cousin pour sa participation au comité de thèse et pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée pendant ces trois années, tant sur le plan expérimental que pour l'interprétation de données de réflectivité de neutrons. Je remercie également Alain Menelle (LLB) pour sa disponibilité et son aide technique. Je remercie Karine Glinel d'avoir participé aux différents comités de thèse. J'adresse également tout ma reconnaissance à Bruno Jean (CERMAV) pour nos discussions scientifiques, son aide lors des expériences de deutération de la cellulose et tout le « service après vente ». Je remercie Nicolas Delorme (Université du Maine, LPEC) pour la réalisation des expériences d'AFM et Nicole Langlois (IMN) pour sa formation et ses conseils en profilométrie.*

*A l'INRA, j'adresse mes remerciements à Marie-Jeanne Crépeau et Marie-Christine Ralet (équipe PVPP), Geneviève Llamas (équipe ISD) et Brigitte Boucher (plate-forme BIBS) pour leur aide respective dans les expériences de chromatographie, de mesures de viscosité et*

*en microscopie. Je tiens à remercier également Estelle Bonnin et Sylviane Daniel (équipe PVPP) pour les expériences en dégradation enzymatique. Je remercie vivement Patrice Papineau et Alain Sire (CRAIS) pour la conception du spin-coater et tous les services rendus.*

*J'adresse ma profonde gratitude à Hervé Bizot et Céline Moreau (Equipe Nano) pour leur encadrement et leurs conseils. Je tiens également à remercier Romain Chauvin, Méline Planté et Jacques des Roseaux que j'ai eu plaisir à encadrer et qui ont fourni un travail de qualité.*

*Je tiens également à adresser toute ma sympathie à toutes les personnes que j'ai côtoyées au quotidien, pour les bons moments partagés au cours de ces trois années passées en leur compagnie : j'aimerais remercier chaleureusement mes collègues de bureau Mélanie et Heiko, ma collègue de la thématique « surfaces » Aurélie ainsi que Jane et Christine pour le soutien logistique réalisé avec efficacité. Je tiens à associer à ces remerciements l'ensemble des membres des équipes Nano, MC2 et PME : Agnès, Aiping, Alain, Anne-Laure R., Benoît, Denis, Emilie, Emmanuelle, Guy, Hubert, Isabelle, Joëlle, Laurent, Marion, Roselyne, Saïd, Sofiane, Solène, Sophie et Vincent. Pour leurs conseils et leur bonne humeur, je tiens à saluer mes collègues thésards : Aamir, Anne-Laure F., Arnaud, Christophe, Cyril, Georges, Lotfi et Magali.*

*Enfin, je tiens à remercier de tout mon cœur mes proches, ma famille et Alexandre pour leur patience et leur soutien permanent.*





# Sommaire

INTRODUCTION GENERALE .....	1
-----------------------------	---

## Chapitre I : Etude bibliographique

<b>1 LA PAROI VEGETALE .....</b>	<b>6</b>
1.1 FONCTIONS ET COMPOSITION DE LA PAROI PRIMAIRE .....	6
1.1.1 Les polysaccharides .....	7
1.1.2 Les protéines structurales .....	9
1.1.3 Les acides phénoliques.....	10
1.2 FONCTIONS ET COMPOSITION DE LA PAROI SECONDAIRE .....	10
1.2.1 Cellulose de la paroi secondaire.....	11
1.2.2 La lignine.....	11
<b>2 LA PAROI PRIMAIRE.....</b>	<b>12</b>
2.1 ORGANISATION DE LA PAROI PRIMAIRE : LE MODELE MULTI-RESEAUX .....	12
2.2 LA CELLULOSE .....	14
2.2.1 Structure chimique .....	14
2.2.2 Structure cristallographique .....	14
2.3 LES XYLOGLUCANES .....	15
2.4 LE RESEAU CELLULOSE/XYLOGLUCANE .....	17
2.4.1 Généralités .....	17
2.4.2 Compréhension des interactions Cellulose-XG .....	19
2.5 VALORISATION DE LA CELLULOSE ET DES XYLOGLUCANES COMME MATERIAUX .....	24
2.5.1 Fabrication de la pâte à papier.....	24
2.5.2 Matériaux composites à base de cellulose et XG.....	24
2.5.3 Les dérivés de cellulose.....	25
2.5.4 Nanocristaux de cellulose .....	28
<b>3 LES FILMS MULTICOUCHES NANOSTRUCTURES.....</b>	<b>32</b>
3.1 PRINCIPE GENERAL.....	32
3.1.1 Interactions mises en jeu .....	33
3.1.2 Les principales techniques d'élaboration des films .....	33
3.1.3 Particularités du spin-coating.....	35
3.2 ASSEMBLAGES MULTICOUCHES PAR LIAISONS HYDROGENE .....	39
3.2.1 Principaux paramètres influençant la construction des films.....	39
3.2.2 Applications à l'élaboration de surfaces adaptatives .....	41
3.3 FILMS MULTICOUCHES A BASE DE CELLULOSE.....	43
3.3.1 Construction via des interactions électrostatiques .....	43
3.3.2 Constructions via les interactions spécifiques cellulose/XG.....	46
3.3.3 Obtention de films nanométriques colorés.....	46

## Chapitre II : Elaboration des films multicouches

<b>1</b>	<b>CARACTERISATION DES BRIQUES ELEMENTAIRES .....</b>	<b>53</b>
1.1	CARACTERISATION DES NANOCRISTAUX DE CELLULOSE DE COTON.....	53
1.1.1	<i>Observation des nanocristaux par MET .....</i>	<i>54</i>
1.1.2	<i>Détermination de la densité de charge de surface des nanocristaux.....</i>	<i>55</i>
1.2	CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DU XG .....	56
1.2.1	<i>Détermination des masses molaires moyennes .....</i>	<i>56</i>
1.2.2	<i>Régimes de concentration du XG.....</i>	<i>57</i>
1.3	CINETIQUE D'ADSORPTION DU XG SUR UNE COUCHE DE NANOCRISTAUX DE CELLULOSE.....	58
1.4	CONCLUSION .....	60
<b>2</b>	<b>ETUDE DE LA CROISSANCE DES FILMS .....</b>	<b>61</b>
2.1	STRATEGIES RETENUES POUR LA CONSTRUCTION DES FILMS. ....	61
2.2	CONSTRUCTION DES FILMS PAR TREMPAGE .....	62
2.2.1	<i>Influence du rinçage et de la concentration en XG.....</i>	<i>63</i>
2.2.2	<i>Influence du séchage .....</i>	<i>64</i>
2.2.3	<i>Conclusion.....</i>	<i>65</i>
2.3	CONSTRUCTION DES FILMS PAR SPIN-COATING.....	65
2.3.1	<i>Influence de la concentration en XG et du rinçage.....</i>	<i>66</i>
2.3.2	<i>Influence de la concentration en cellulose et du rinçage.....</i>	<i>69</i>
2.3.3	<i>Discussion sur l'effet du rinçage et sur les facteurs clés du mode de croissance.....</i>	<i>70</i>
2.3.4	<i>Conclusion.....</i>	<i>72</i>
2.4	ETUDE PRELIMINAIRE SUR LA FORMATION DE FILMS A BASE DE MELANGE DE XG ET NANOCRISTAUX DE CELLULOSE .....	73
<b>3</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>74</b>

## Chapitre III : Analyse de la structure interne des films multicouches

<b>1</b>	<b>PRINCIPE DE LA REFLECTIVITE DE NEUTRONS .....</b>	<b>78</b>
1.1	LA DENSITE DE LONGUEUR DE DIFFUSION.....	78
1.2	PRINCIPE D'UNE MESURE ET AJUSTEMENT DES COURBES.....	79
1.3	LE CONTRASTE NEUTRONIQUE.....	80
<b>2</b>	<b>INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE XG SUR LA STRUCTURE DES FILMS C1-XG .....</b>	<b>82</b>
2.1	XG EN REGIME DILUE.....	83
2.2	XG EN REGIME SEMI-DILUE ENCHEVETRE .....	86
2.3	CONCLUSION SUR LA CROISSANCE DES FILMS.....	87
<b>3</b>	<b>INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE NANOCRISTAUX DE CELLULOSE SUR LA STRUCTURE DES FILMS C-XG1.....</b>	<b>89</b>
3.1	COMPARAISON DE L'ORGANISATION DES FILMS SECS .....	89
3.2	ORGANISATION DES FILMS C-XG EN SOLUTION .....	90
3.2.1	<i>Films en solution dans D<sub>2</sub>O .....</i>	<i>90</i>

3.2.2	<i>Etude de l'organisation du XG dans les films par variation de contraste</i> .....	90
<b>4</b>	<b>STRUCTURE INTERNE DES FILMS PAH-C5/XG1</b> .....	<b>94</b>
4.1	FILM SEC .....	94
4.2	STRUCTURE DES FILMS DANS D <sub>2</sub> O.....	95
4.3	EXTINCTION DES NANOCRISTAUX DEUTERES ET STRUCTURE DU XG.....	95
<b>5</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>96</b>

## **Chapitre IV : Films multicouches comme détecteurs d'activité enzymatique**

<b>1</b>	<b>CARACTERISATIONS PRELIMINAIRES</b> .....	<b>102</b>
1.1	STABILITE CHIMIQUE DES FILMS DE CELLULOSE-XG .....	102
1.2	CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE CELLULYVE TR PAR LA METHODE DE NELSON.....	103
1.2.1	<i>Droite d'étalonnage</i> .....	103
1.2.2	<i>Mesure de l'activité de la cellulose TR</i> .....	104
<b>2</b>	<b>ANALYSE DES CINETIQUES DE DEGRADATION PAR QCM-D</b> .....	<b>104</b>
2.1	INFLUENCE DE L'ACTIVITE DE LA SOLUTION ENZYMATIQUE .....	109
2.2	INFLUENCE DU TYPE DE FILM.....	110
2.3	CONCLUSION .....	111
<b>3</b>	<b>DETECTION VISUELLE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE SUR LES FILMS MULTICOUCHES DE CELLULOSE-XG</b> .....	<b>112</b>
3.1	DEGRADATION ENZYMATIQUE DES FILMS (C5-XG1) <sub>8</sub> .....	113
3.2	DEGRADATION ENZYMATIQUE DES FILMS (PAH-C5/XG1) <sub>4</sub> .....	114
3.3	SPECIFICITE DE LA DETECTION VISUELLE SUR LES FILMS MULTICOUCHES .....	114
<b>4</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>115</b>

## **Chapitre V : Résultats préliminaires sur la détection d'activité enzymatique d'un autre système enzyme/biopolymère**

<b>1</b>	<b>CONSTRUCTION ET STABILITE DES FILMS</b> .....	<b>122</b>
1.1	INFLUENCE DE LA NATURE DE L'AX UTILISE.....	123
1.2	INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE RESINE .....	124
<b>2</b>	<b>MESURE DE L'ACTIVITE DE LA XYLANASE PAR LA METHODE DE NELSON</b> .....	<b>125</b>
2.1	SENSIBILITE DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE .....	125
2.2	CONCLUSION .....	127

## Chapitre VI : Partie expérimentale

<b>1</b>	<b>PREPARATION DES SOLUTIONS ET CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES .....</b>	<b>131</b>
1.1	PRODUITS INTERVENANT DANS LA REALISATION DES FILMS .....	131
1.2	ENZYMES .....	131
1.3	SUSPENSIONS DE NANO-CRISTAUX DE CELLULOSE .....	132
1.3.1	<i>Préparation des suspensions de whiskers .....</i>	<i>132</i>
1.3.2	<i>Préparation de la cellulose deutérée .....</i>	<i>135</i>
1.3.3	<i>Caractérisations des whiskers de cellulose.....</i>	<i>136</i>
1.4	LE XYLOGLUCANE .....	137
1.4.1	<i>Purification du XG .....</i>	<i>137</i>
1.4.2	<i>Détermination des masses molaires moyennes par chromatographie d'exclusion stérique.....</i>	<i>138</i>
1.4.3	<i>Détermination des régimes de concentration par mesure de la viscosité.....</i>	<i>140</i>
<b>2</b>	<b>ELABORATION ET CARACTERISATION DES FILMS MULTICOUCHES ..</b>	<b>142</b>
2.1	REALISATION DES FILMS NANOSTRUCTURES .....	142
2.1.1	<i>Préparation des surfaces pour la construction des films.....</i>	<i>142</i>
2.1.2	<i>Construction des films multicouches.....</i>	<i>142</i>
2.1.3	<i>Cas particulier des films d'arabinoxylane .....</i>	<i>143</i>
2.2	MESURE DES EPAISSEURS PAR PROFILOMETRIE MECANIQUE.....	143
2.3	MORPHOLOGIE DE SURFACE DES FILMS .....	144
2.3.1	<i>Principe de la microscopie à force atomique.....</i>	<i>144</i>
2.3.2	<i>Mesures AFM des films .....</i>	<i>146</i>
2.4	ANALYSE DE LA STRUCTURE DES FILMS PAR REFLECTIVITE DE NEUTRONS .....	147
2.4.1	<i>Interaction neutron-matière .....</i>	<i>147</i>
2.4.2	<i>Réflexion des neutrons sur une surface plane .....</i>	<i>148</i>
2.4.3	<i>Réalisation d'une mesure et traitement des données .....</i>	<i>151</i>
2.4.4	<i>Conditions expérimentales utilisées .....</i>	<i>152</i>
<b>3</b>	<b>DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.....</b>	<b>153</b>
3.1	METHODE DE NELSON .....	153
3.1.1	<i>Préparation des gammes étalon.....</i>	<i>153</i>
3.1.2	<i>Dosage des activités enzymatiques .....</i>	<i>153</i>
3.2	DETECTION D'UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE A PARTIR DES FILMS MULTICOUCHES..	154
3.2.1	<i>Détection visuelle .....</i>	<i>155</i>
3.2.2	<i>Microbalance à cristal de quartz avec dissipation (QCM-D).....</i>	<i>155</i>
	<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>161</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>164</b>





## Introduction générale

Les nanosciences, presentées en 1959 par Richard Feynman<sup>1</sup> ("There is plenty of room at the bottom"), se consacrent à l'élaboration, l'observation et le contrôle d'objets nanométriques et constituent aujourd'hui un champ de recherches particulièrement prometteur pour la conception de matériaux fonctionnels miniaturisés.

Deux principales approches sont utilisées pour l'élaboration de dispositifs tels que les surfaces fonctionnalisées à l'échelle nanométrique. La première technique, dite « top-down », correspond par exemple aux techniques lithographiques dont la résolution est inférieure à la centaine de nanomètres. Ces méthodes imposent alors une structure ou un motif sur le substrat à traiter. Au contraire, les techniques « bottom-up » visent l'assemblage de briques élémentaires (molécules, atomes,...) qui aboutit à la construction d'architectures complexes par des procédés inhérents au système étudié.

La technique de couche par couche (ou layer-by-layer (LbL)), développée dans les années 1990 par Gero Decher [Decher 1997], s'inscrit dans cette démarche de construction « bottom-up ». Elle est basée sur l'adsorption alternée sur un support solide de deux composés présentant des affinités l'un pour l'autre. Il en résulte des films stables et fonctionnels qui peuvent atteindre des épaisseurs de plusieurs micromètres.

De tels assemblages peuvent également être réalisés à partir de molécules issues de la biomasse. En effet, la cellulose, biopolymère le plus abondant de la biomasse terrestre, forme un réseau avec d'autres polysaccharides (par exemple le xyloglucane (XG)) qui constitue l'armature des parois des cellules végétales. Les affinités entre la cellulose et le xyloglucane sont très spécifiques [Hayashi *et al.* 1987] et sont assurées par des interactions de Van der Waals et des liaisons hydrogène [Hayashi *et al.* 1987] intermoléculaires. Il est donc envisageable d'élaborer des films multicouches à partir de ces deux composés.

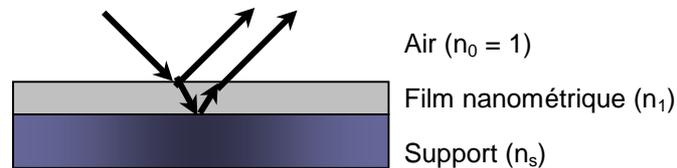
Une des applications de films réalisés par LbL est la création de revêtements actifs pour l'obtention de surfaces adaptatives [Quinn *et al.* 2007]. Ces surfaces ont pour but de répondre à l'application de stimuli externes (variations de pH, de température ou d'humidité), réversiblement si possible. Ces films sont souvent conçus pour le relargage de composés actifs consécutivement à une variation de pH, de température ou encore de lumière. Une autre classe de surfaces adaptatives concerne des films « bio-interactifs » basés sur l'interaction ligand/récepteur faisant intervenir des processus de reconnaissance moléculaire. Ainsi, les

---

<sup>1</sup>Conférence annuelle de l' « American Physical Society », CA décembre 1959

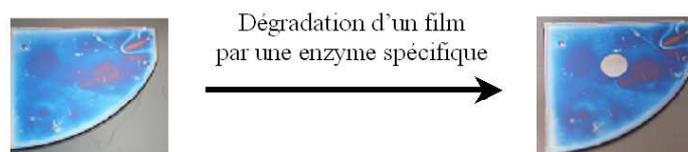
films peuvent être rendus immuno-sensibles dans le cas de reconnaissance antigène/anticorps ou encore catalytiques dans le cas d'interaction enzyme/substrat.

Sur le même principe, nous avons mis au point une méthode de détection d'activité d'enzymes hydrolytiques. Le principe de ce test est de repérer une activité enzymatique au moyen d'un film de biopolymère déposé sur un support (tel que le film multicouche de cellulose-XG) de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur. En effet, les films nanométriques dont l'épaisseur optique est de  $m\lambda/4$  (avec  $m$  entier impair et  $\lambda$  la longueur d'onde du rayon réfléchi) présentent une coloration liée à des interférences lumineuses générées par le film (Figure 1). Une partie du rayon incident est réfléchi sur la première interface air-film, puis l'autre partie est réfractée puis réfléchi sur la deuxième interface film-support. Les rayons vont interférer ce qui engendre une couleur qui varie en fonction de l'épaisseur du film et de l'indice de réfraction.



**Figure 1:** Schéma représentant le phénomène d'interférence lié au dépôt d'un film sur une surface réfléchissante.

Ainsi, lorsqu'une enzyme hydrolytique est mise en contact avec le film, celle-ci le dégrade et fait diminuer son épaisseur, ce qui induit un changement de couleur détectable à l'œil nu. Par conséquent, un changement de couleur est indicatif d'une activité enzymatique (Figure 2).



**Figure 2:** Représentation d'un film de biopolymère déposé sur un support avant et après la dégradation par une enzyme spécifique.

Des films nanométriques colorés ont déjà été obtenus par des assemblages multicouches de cristaux de cellulose et de polycation [Cranston et Gray 2006; Wagberg *et al.* 2008]. Par conséquent, il est tout à fait envisageable d'obtenir des films colorés par le dépôt de multicouches de cellulose et de XG.

L'objectif général de cette thèse a consisté à élaborer et caractériser des films multicouches composés de cellulose et de xyloglucane dans le but de détecter l'activité de cellulases.

Ce mémoire de thèse est composé de six chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une revue bibliographique présentant tout d'abord quelques généralités sur la paroi des cellules végétales, puis l'organisation du réseau cellulose-xyloglucane au sein de celle-ci et les interactions existantes entre ces deux composés. Nous aborderons ensuite les différents usages par l'homme de la cellulose et du xyloglucane. Enfin, nous traiterons du principe d'élaboration des films multicouches et des propriétés qu'ils présentent.

Le deuxième chapitre aborde l'étude des croissances de films cellulose-xyloglucane (C-XG) en fonction de la méthode de dépôt utilisée et des concentrations de solutions utilisées. Cette étude a permis de déterminer les conditions opératoires les mieux adaptées pour la construction de films multicouches de C-XG colorés. Les films multicouches C-XG ont été comparés avec des films multicouches PAH-C/XG dont la structure est différente.

Le troisième chapitre décrit l'étude de la structure interne des films qui a permis à la fois d'améliorer la compréhension des croissances des films C-XG et de déterminer les différences de structure et de composition chimique entre C-XG et PAH-C/XG à l'état sec. La structure de ces deux films a aussi été étudiée en solution afin d'observer leur gonflement, dans l'objectif de la compréhension des phénomènes impliqués dans les dégradations enzymatiques.

Le quatrième chapitre traite de la dégradation enzymatique des films C-XG et PAH-C/XG par des cellulases qui a été comparée à une méthode classiquement utilisée pour la détermination de l'activité d'enzymes hydrolytiques. Dans une étude préliminaire, les cinétiques enzymatiques ont été suivies par QCM-D.

Le cinquième chapitre décrit les résultats préliminaires de la dégradation enzymatique de films nanométriques constitués d'un autre polysaccharide : l'arabinoxylane.

Enfin, les aspects expérimentaux, tels que la préparation des solutions et des échantillons, ainsi que le principe des techniques de caractérisation utilisées sont abordés dans un sixième chapitre.



**Chapitre I**  
**Etude bibliographique**

## **1 La paroi végétale**

Les cellules végétales se différencient des cellules animales par la présence à la périphérie intracellulaire, d'une enveloppe dynamique appelée paroi végétale [Carpita et McCann 2000] (Figure 3). Celle-ci constitue un matériau composite qui résulte de l'assemblage de différents polymères. Il existe deux types de parois : la paroi primaire et la paroi secondaire. La paroi primaire, caractéristique des cellules jeunes, joue un rôle structural en leur conférant leur morphologie et en contrôlant leur croissance. Elle les protège également de certaines contraintes physico-chimiques telles que la pression osmotique, et des infections par des pathogènes bactériens ou fongiques. Elle joue enfin le rôle d'interface d'échange entre les cellules. La composition et les propriétés de la paroi végétale s'adaptent constamment à la croissance, la différenciation et à l'environnement de la cellule. Lorsque la croissance de la cellule est terminée, la paroi incorpore de nouveaux composés : la paroi primaire se transforme en paroi secondaire. Celle-ci devient plus épaisse, plus rigide et plus hydrophobe que la paroi primaire. Elle joue alors le rôle de tissu conducteur et de soutien.

### **1.1 Fonctions et composition de la paroi primaire**

La **paroi primaire** se forme durant la division cellulaire et permet la croissance de la cellule. Elle constitue la seule enveloppe des cellules jeunes et indifférenciées, en phase de croissance. Elle est composée majoritairement de polysaccharides (cellulose, pectines et hémicelluloses) ainsi que de quelques protéines, minéraux et pigments. La Figure 3 représente l'organisation de tous ces constituants au sein de la paroi primaire : celle-ci est constituée d'un réseau de cellulose relié par les hémicelluloses dans lequel s'insère un réseau de pectines ainsi que des protéines structurales. Cette paroi est fine (0,1  $\mu\text{m}$ ), extensible, fortement hydrophile et de faible densité.

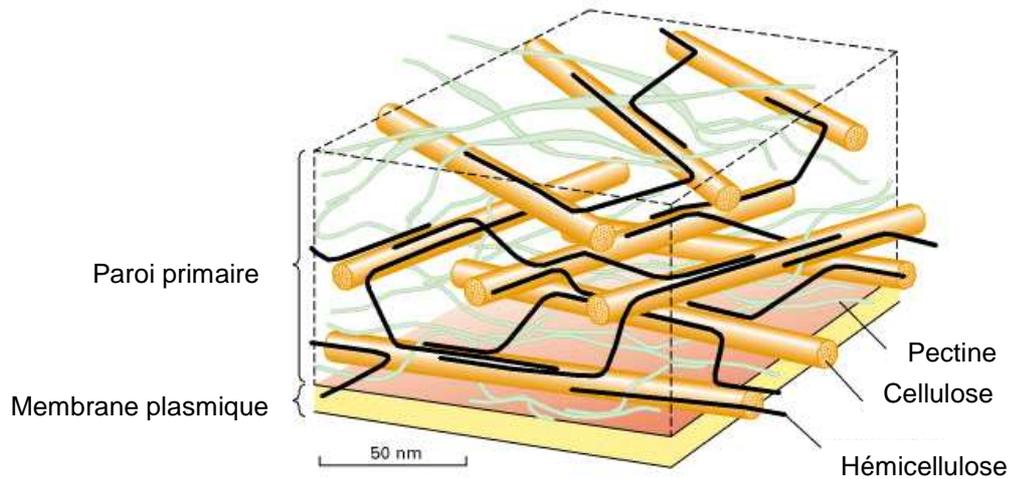


Figure 3 : Représentation schématique de la paroi primaire des cellules végétales.

### 1.1.1 Les polysaccharides

De nombreux polysaccharides sont présents au sein de la paroi des cellules végétales. Leur nature et leur structure sont extrêmement variées, ce qui leur confère un nombre diversifié de fonctions au sein de la paroi. Trois principales classes de polysaccharides peuvent être distinguées : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines.

#### 1.1.1.1 La cellulose

C'est l'élément majeur de la structure pariétale, puisqu'elle représente 15 à 30% de la matière sèche de la paroi primaire et 40 à 90% de la paroi secondaire. La cellulose est un polysaccharide linéaire constitué d'unités  $\beta$ -D-glucopyranosyles liées entre elles par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4. La présence de nombreux groupements hydroxyles permet la création d'un réseau de liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires. Les chaînes polysaccharidiques s'associent pour former une structure très cristalline, que l'on appelle **microfibrilles**. Cette structure semi-cristalline est à l'origine de l'essentiel des propriétés physiques et chimiques de la cellulose, notamment une forte résilience ainsi qu'une résistance importante aux attaques physiques, chimiques ou enzymatiques. Une description plus approfondie de la cellulose sera abordée dans le paragraphe 2.2.

#### 1.1.1.2 Les hémicelluloses

Ce sont des polysaccharides de structures complexes et variées qui sont constitués de pentoses (D-xylose, L-arabinose), d'hexoses (D-glucose, D-galactose, D-fucose, L-rhamnose) et d'acides uroniques (acide D-glucuronique, 4-O-méthyl-D-glucuronique). Les

hémicelluloses présentes dans les parois végétales sont : les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes (galacto- et glucomannanes), les glucomannanes, la callose (polymère de glucose lié en  $\beta$ -1,3) et les glucanes mixtes. La chaîne principale de ces polymères est généralement constituée par un seul monosaccharide sur lequel vient se greffer d'autres saccharides. Leur composition varie en fonction de l'espèce et du type cellulaire considérés.

En général, une hémicellulose est prédominante tandis que d'autres sont présentes en plus faibles quantités [Carpita et McCann 2000]. Ainsi les xyloglucanes sont les hémicelluloses majoritaires dans les parois primaires des dicotylédones ; tandis que ce sont les arabinoxylanes chez les monocotylédones [Carpita et Gibeau 1993]. De même, dans les parois secondaires, les xylanes et les glucomannanes sont respectivement prédominants chez les angiospermes et les gymnospermes [Carpita et McCann 2000]. Tous ces polysaccharides sont amorphes et branchés.

Par la suite, nous détaillerons plus particulièrement les xyloglucanes (XG) qui constituent la classe d'hémicellulose la plus abondante et la plus étudiée et que nous avons choisis pour cette étude.

### *1.1.1.3 Les pectines*

Ce sont des polysaccharides branchés et chargés car riches en acide  $\alpha$ -D-galacturonique. Ils sont également composés de L-rhamnose, L-arabinose et D-galactose. Les domaines structuraux des pectines sont :

- les homogalacturonanes (HGA) : homopolymère de (1-4) $\alpha$ -D-GalA ;
- les rhamnogalacturonanes de type I (RG I) ;
- les rhamnogalacturonanes de type II (RG II).

Bien qu'il soit admis que les pectines sont constituées de zones « lisses » (non-substituées) et de zones « hérissées » (ramifiées) successives, l'arrangement des différents motifs est toujours controversé. Il existe deux modèles de pectines (Figure 4) :

- le premier fait état d'une chaîne principale constituée de RG et substituée par deux types de chaînes latérales composées d'oses neutres (arabinane et arabinogalactanes) pour le premier et d'HGA pour le second [Vincken *et al.* 2003].
- le deuxième rapporte une chaîne principale composée d'un copolymère de RG et d'HGA substituée au niveau des RG par des chaînes latérales d'oses neutres [Mohnen 2008].

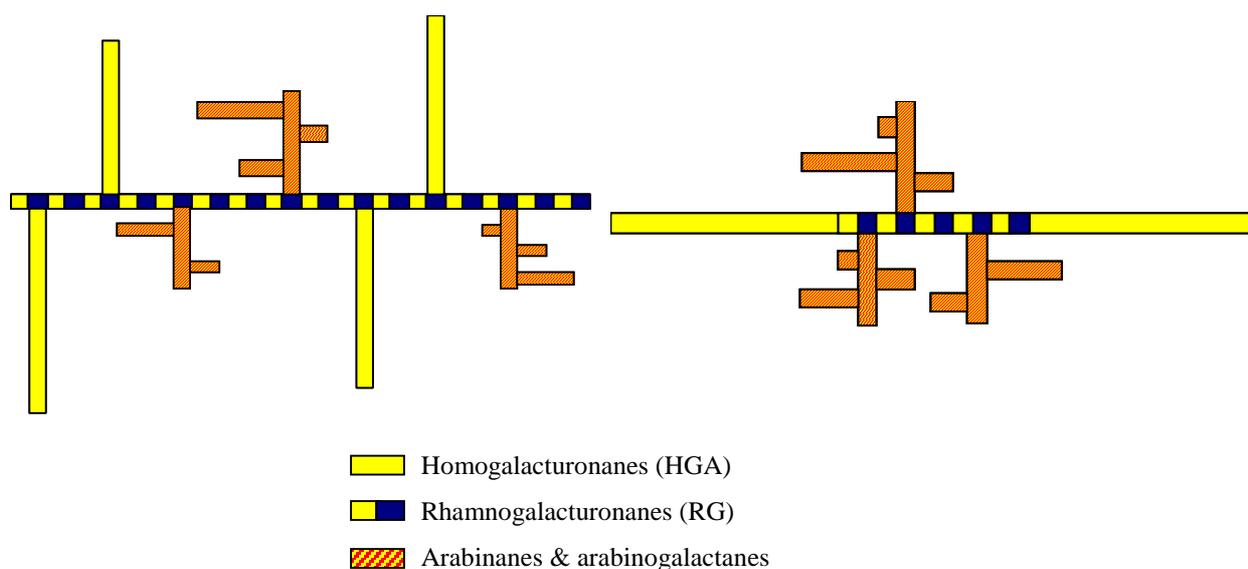


Figure 4 : Représentation schématique des deux modèles de structure des pectines.

Les acides carboxyliques des pectines peuvent être méthyl-esterifiés, ce qui permet de moduler la charge globale du polymère. Ces polysaccharides sont capables de former des gels : les parties non estérifiées des chaînes d'HGA peuvent se réticuler grâce à des interactions avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . En outre, l'étude des liaisons pectines-cellulose a montré une affinité des chaînes latérales constitutives des pectines pour la cellulose, contrairement à leur chaîne principale [Zykwinska *et al.* 2005].

Les pectines sont présentes principalement dans la lamelle moyenne et dans la paroi primaire des Dicotylédones [Carpita et Gibeaut 1993]. Elles ont essentiellement un rôle de régulation, que ce soit en terme de pH, de force ionique mais également de porosité et d'activité enzymatique. Elles possèdent aussi un rôle signalétique, en alertant les cellules de la présence d'organismes étrangers tels que des agents pathogènes [Carpita et McCann 2000].

### 1.1.2 Les protéines structurales

Bien que l'architecture structurale de la paroi végétale soit largement constituée de polysaccharides, des protéines structurales sont également impliquées dans la formation des réseaux de la paroi. Leur abondance varie de manière considérable selon le type cellulaire, la maturation et les stimulations éventuelles (attaque de pathogènes, blessures,...). Ces protéines sont, pour la plupart, des glycoprotéines que l'on peut diviser en 4 classes [Johnson *et al.* 2003] :

- Les protéines riches en hydroxyproline (HRGP)
- Les protéines riches en proline (PRP)
- Les protéines riches en glycine (GRP)
- Les arabinogalactanes protéines (AGP)

Les HRGPs constituent la classe de glycoprotéines pariétales la plus étudiée. Une des sous-familles des HRPGs est appelée « extensine » et consiste en la répétition des séquences Sérine-Hydroxyproline (Ser-(Hyp)<sub>4</sub>) et Tyrosine-Lysine-Tyrosine qui sont importantes dans les structures secondaires et tertiaires. Elles sont aussi constituées d'environ 50% de glucides, dont 96% d'arabinose présent sous forme de chaînes latérales. Leur conformation serait de type bâtonnet rigide. Les extensines sont localisées principalement dans les parois primaires des dicotylédones.

### **1.1.3 Les acides phénoliques**

D'autres composés phénoliques existent au sein de la paroi secondaire et appartiennent à la famille des acides hydroxycinnamiques (acide *p*-coumarique, acide *p*-hydroxybenzoïque, acide férulique). Ils sont présents en faibles quantités mais sont d'une importance majeure puisqu'ils sont impliqués dans les liaisons inter-polysaccharidiques des hétéroxylyanes [Saulnier *et al.* 1999] et des pectines [Ralet *et al.* 2005].

## **1.2 Fonctions et composition de la paroi secondaire**

La **paroi secondaire** se forme postérieurement à la croissance cellulaire et correspond à la morphologie finale de la cellule. Elle est constituée des éléments de la paroi primaire dans laquelle se sont intercalés des **composés phénoliques**, dont la lignine. Ce sont des composés aromatiques portant un groupement hydroxyle directement lié au cycle benzénique. La composition de la paroi secondaire varie en fonction de l'origine botanique, mais globalement elle contient 30 à 40% de cellulose, 30% de lignine, 30% d'hémicelluloses et environ 5% de pectines. Ce domaine est alors plus rigide, beaucoup plus épais et moins hydraté que la paroi primaire et qui présente un caractère inextensible ne permettant plus la croissance cellulaire. La paroi secondaire joue alors le rôle d'un tissu conducteur et de soutien.

### 1.2.1 Cellulose de la paroi secondaire

Les propriétés de la paroi secondaire sont en partie assurées par la présence de microfibrilles de cellulose dont l'organisation est différente de celles de la paroi primaire. En effet, la cellulose de la paroi secondaire est composée de microfibrilles plus épaisses qui comportent une orientation importante. Elle représente par ailleurs 40 à 90 % de la composition de la paroi secondaire selon la plante et le tissu considéré.

### 1.2.2 La lignine

La lignine est un constituant caractéristique des parois secondaires (30% en moyenne). Elle est impliquée dans la structure et la cohésion de la paroi mais également dans la résistance aux microorganismes. Les lignines sont des polymères tridimensionnels amorphes issus de la copolymérisation de différents alcools phénylpropénoïques, à savoir les alcools *p*-coumarylique, *p*-coniférylique et *p*-sinapylique (Figure 5). La proportion des différents monomères composant les lignines est très variable selon la source considérée.

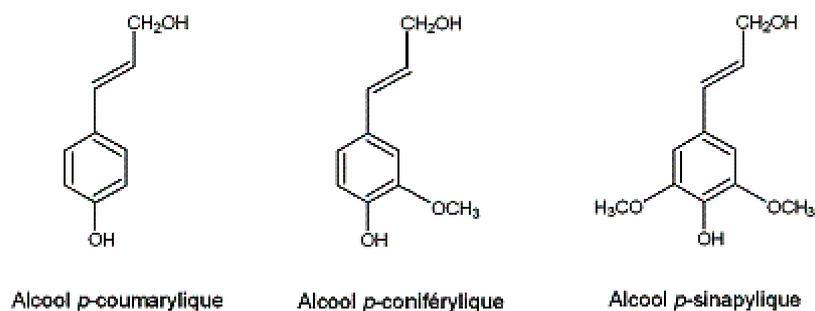


Figure 5 : Principaux précurseurs des lignines.

La nature covalente des liaisons (éther, ester ou carbone-carbone) du réseau confère aux lignines une rigidité et une stabilité importante. Sa polymérisation a lieu tant que la paroi dispose de précurseurs et d'espace. En conséquence, la lignine occupe tout l'espace pariétal disponible et déplace ainsi l'eau. La lignine forme alors un maillage hydrophobe inapte à l'extension, qui stoppe la croissance pariétale.

La cellulose et le XG que nous utilisons pour l'élaboration des films multicouches font partie de la paroi primaire. Nous allons donc décrire dans la partie suivante l'organisation de la cellulose et du XG au sein de la paroi ainsi que les caractéristiques physico-chimiques de ces deux constituants et les interactions cellulose-XG.

## 2 La paroi primaire

### 2.1 Organisation de la paroi primaire : le modèle multi-réseaux

La paroi primaire est donc composée de nombreux polymères possédant chacun des fonctions différentes qui permettent de lui assurer à la fois intégrité mécanique et flexibilité. Ces polymères sont associés en trois réseaux principaux qui sont étroitement liés : le réseau cellulose-hémicelluloses, imbriqué dans le réseau pectines-polysaccharides, auquel s'ajoute un troisième réseau constitués de protéines de structure. Ils forment alors un ensemble à la fois suffisamment rigide pour assurer le maintien de la cellule mais également modulable pour permettre son développement.

Dès 1973 [Keegstra *et al.* 1973], Keegstra *et al.* ont proposé un modèle au sein duquel tous les constituants de la paroi primaire sont associés par des liaisons covalentes et par des liaisons hydrogène entre la cellulose et les XG. La diminution de la force des liaisons hydrogène en milieu acide permettrait alors le glissement des microfibrilles de cellulose, conduisant ainsi la croissance de la cellule. Cependant ce modèle a été remis en question par Valent et Albersheim [Valent et Albersheim 1974] qui ont observé le renforcement des liaisons hydrogène en milieu acide.

Grâce à des études par microscopie électronique haute résolution et à des techniques d'extraction séquentielle de certains polysaccharides pariétaux, un nouveau modèle a été proposé par McCann en 1990 [McCann *et al.* 1990], dans lequel le réseau cellulose-XG est inclus dans une matrice pectique. Carpita et Gibeaut [Carpita et Gibeaut 1993] ont complété ce modèle en considérant un troisième réseau constitué des protéines structurales (Figure 6).

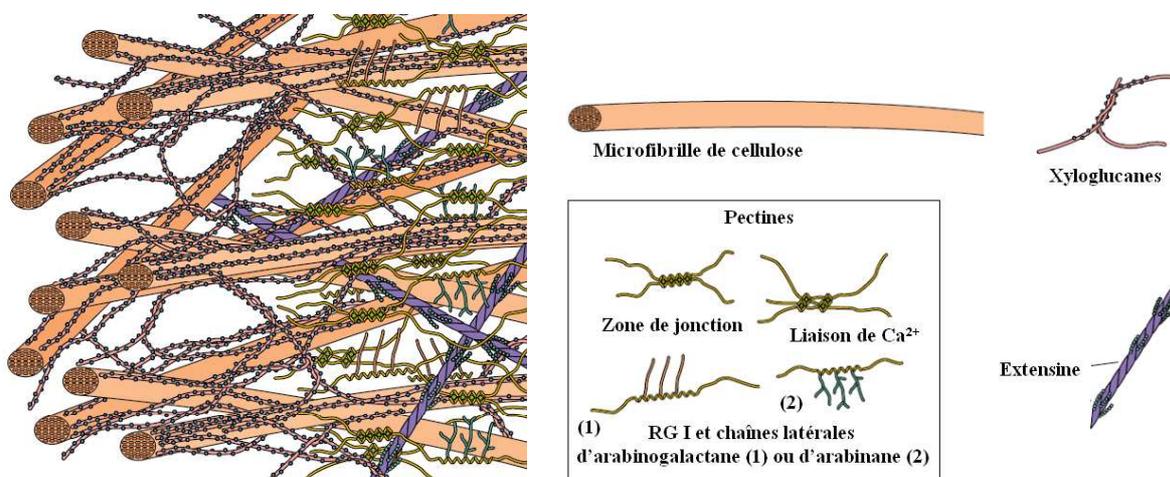


Figure 6 : Modèle de la paroi primaire des cellules végétales de Type I [Carpita et McCann 2000].

Plus récemment, l'étude par RMN-<sup>13</sup>C du solide des parois de haricot mungo (*Vigna radiata* L.) a permis à Bootten *et al.* [Bootten *et al.* 2004] de déterminer la présence de différents domaines de mobilité des XG, suggérant deux populations de XG au sein du réseau. Une fraction rigide présente en faible quantité serait composée des XG adsorbés à la surface des microfibrilles de cellulose alors qu'une seconde fraction moins rigide, plus importante en quantité, représenterait les XG situés entre les microfibrilles (pont, queue ...) ou en interaction avec d'autres polymères pariétaux. Ces observations laissent supposer que la quantité de XG directement liés à la surface de la cellulose est plus faible que ce qui été supposé jusqu'à présent (Figure 7).

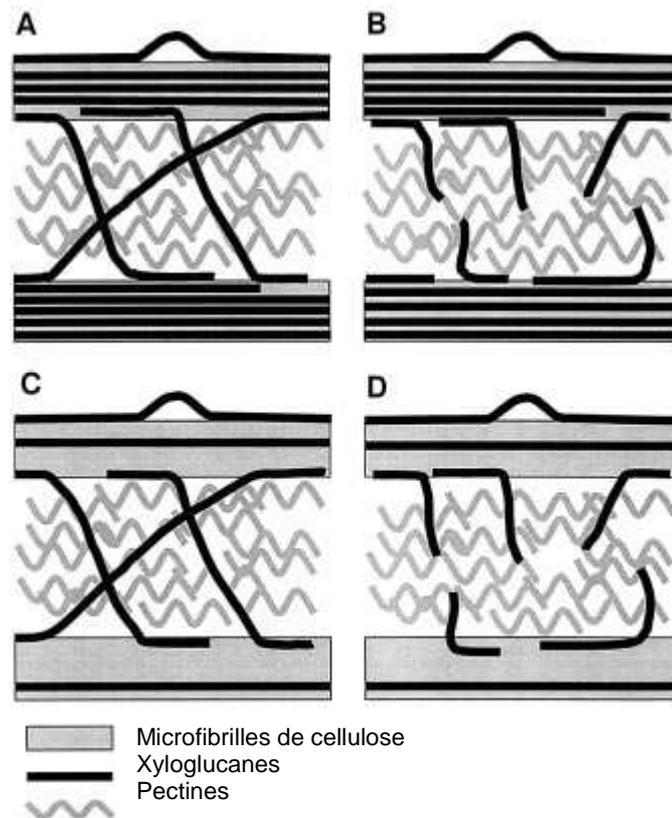


Figure 7 : Représentation schématique des parois primaires de haricot mungo (*Vigna radiata* L.) [Bootten *et al.* 2004]. La quantité de XG liés directement à la cellulose est fortement diminuée dans le modèle de Bootten (C, D) par rapport à l'ancien (A, B) favorisant les pontages (A, C) et les interactions avec les autres polysaccharides pariétaux (B, D).

Le modèle multi-réseaux de Carpita et Gibeau [Carpita et Gibeau 1993] reste cependant le plus accepté actuellement pour décrire la paroi primaire des cellules végétales. Chacun de ces réseaux se formerait de façon indépendante des autres.

Le réseau cellulose-XG est le plus important d'un point de vue structural, puisqu'il assure la résistance de la paroi à la pression osmotique tout en permettant l'expansion

cellulaire grâce à sa flexibilité. Avant de décrire de manière plus détaillée le réseau cellulose-XG, nous allons approfondir la présentation de la cellulose et du XG.

## 2.2 La cellulose

### 2.2.1 Structure chimique

La cellulose est l'une des macromolécules les plus abondantes à la surface de la terre. Cet élément majeur des parois cellulaires représente entre 20 et 30% des polysaccharides de la paroi primaire des Dicotylédones. La cellulose est un homopolysaccharide linéaire constitué d'unités D-glucopyranosyles liées entre elles par des liaisons  $\beta$ -1,4 et dont le motif de répétition est le cellobiose (Figure 8). Cette organisation lui confère une structure en hélice, contenant 2 résidus D-glucopyranose par tour, soit un pas de 1,04 nm. Les chaînes de cellulose possèdent à la fois une extrémité réductrice et une non-réductrice, ce qui permet de définir l'orientation des chaînes (extrémité non-réductrice  $\rightarrow$  extrémité réductrice).

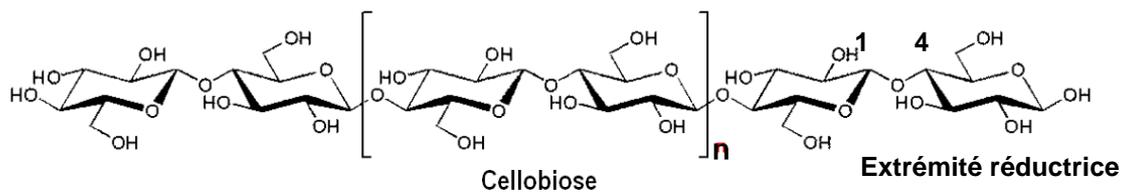


Figure 8 : Structure de la cellulose, dont le motif de répétition est le cellobiose.

### 2.2.2 Structure cristallographique

En dépit de la simplicité de la structure chimique de ce polymère naturel, certaines de ces caractéristiques restent mal connues. En effet, bien que la structure cristalline de la cellulose native ait déjà été examinée dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle par diffraction des rayons X, ce n'est qu'au début du 21<sup>ème</sup> siècle qu'elle a été établie de façon précise [Nishiyama *et al.* 2002; Nishiyama *et al.* 2003b].

La cellulose native est présente quasi-exclusivement sous forme de cellulose I, où les chaînes de cellulose sont parallèles les unes aux autres. Suivant son origine, il existe d'importantes variations de taille des cristaux (Figure 9) (à la fois en terme de longueur et de section), de degré de cristallinité ainsi que de composition en ces deux allomorphes cristallins principaux :  $I\alpha$  et  $I\beta$ . La forme  $I\alpha$  possède une maille cristalline triclinique et contient une seule chaîne [Sugiyama *et al.* 1991], alors que la forme  $I\beta$  est monoclinique et contient deux chaînes. La cellulose du bois ou du coton possède principalement la forme  $I\beta$  [Atalla et

VanderHart 1999], alors que des organismes primitifs comme les bactéries produisent majoritairement de la cellulose Ia.

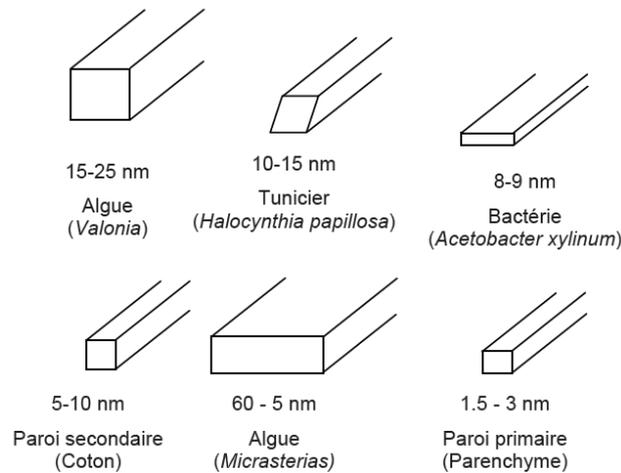


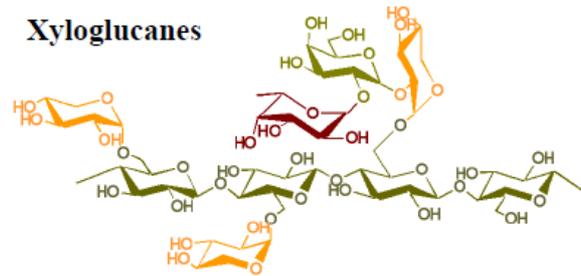
Figure 9 : Variabilité de taille des microfibrilles en fonction de l'origine de la cellulose d'après Chanzy [Chanzy 1990].

Dans la cellulose II, les chaînes de cellulose ne sont plus orientées de façon parallèle mais anti-parallèle. Il n'existe que de très rares exemples de production de cellulose II dans la nature [Canale-Parola 1970]. Cependant, celle-ci peut être obtenue par traitement alcalin de la cellulose I, appelé mercerisation. Au cours de ce traitement, les liaisons hydrogène responsables de l'organisation de la cellulose sont en partie rompues, conduisant à un réarrangement de cette structure. La cellulose II est thermodynamiquement plus stable que la cellulose I, ainsi la transformation de la cellulose I en cellulose II est irréversible.

### 2.3 Les xyloglucanes

Les xyloglucanes (XG) sont les composés hémicellulosiques les plus abondants au sein de la paroi primaire des cellules végétales des Dicotylédones [Carpita et Gibeau 1993]. La chaîne principale, identique à la cellulose, est constituée de résidus D-glucopyranose liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -1,4. Jusqu'à 75% des résidus de la chaîne principale est substitué par des chaînes latérales comportant 1 à 3 résidus, dont la composition varie en fonction de l'origine des XG (Figure 10). Les branchements comprennent des résidus xylosyles liés à la chaîne principale par des liaisons  $\alpha$ -(1,6). Le squelette cellulosique est composé d'un enchaînement de trois glucoses xylosylés consécutifs suivis par un glucose non-substitué. Entre 30 et 50% des résidus D-glucosyles xylosylés sont eux même substitués en position O-2

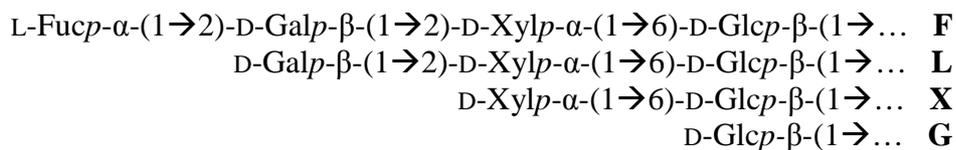
par des unités  $\beta$ -D-galactopyranosyles ou plus rarement par des résidus  $\alpha$ -L-arabinofuranosyles. Dans certains cas, les résidus D-galactosyles peuvent également porter, au niveau de leur position O-2, une unité  $\alpha$ -L-fucopyranosyle. Des résidus  $\alpha$ -L-arabinofuranosyles et  $\beta$ -D-xylopyranosyles peuvent aussi être liés, mais plus rarement, en position O-2.



**Figure 10 : Structure chimique des XG de paroi cellulaire des Dicotylédones.**

Les XG ont été classés en trois catégories suivant leur degré de branchement [York *et al.* 1996]. Les XG de type I, pour lesquels approximativement 75% des résidus D-glucopyranosyles sont substitués, sont présents dans les Dicotylédones non solanacées, les monocotylédones non-graminées et les gymnospermes. Dans les dicotylédones solanacées tels que le tabac, la pomme de terre ou la tomate [Vincken *et al.* 1997], les XG de type II sont prédominants, ils comportent 40 à 45% de résidus glucosyles substitués et présentent une teneur en résidus arabinosyles importante et une absence de résidus fucosyles. Enfin, les XG de type III sont présents en très faible quantité dans les monocotylédones graminées tels que les céréales et ne contiennent que 25 % à 35 % de résidus glucosyles substitués.

Afin de faciliter leur dénomination, une nomenclature a été établie où chaque chaîne latérale associée à son résidu glucosyle sera désignée par une lettre [Fry *et al.* 1993]. La correspondance entre lettre et groupement saccharidique issue de cette nomenclature est rappelée ci-dessous.



**Figure 11 : Nomenclature associée à la dénomination des chaînes latérales des XG [Fry *et al.* 1993].**

La nature et la substitution des chaînes latérales sont variables en fonction de l'espèce considérée. Par exemple, pour les XG de tamarin qui ne sont pas fucosylés, les différents

blocs constitutifs, sont présents en proportion allant de 9% molaire pour XLXG jusqu'à 50% molaire pour le XLG, les oligosaccharides XXLG et XXXG étant représentés pour leur part à, respectivement, 28% et 13% molaire [Vincken *et al.* 1995; Faik *et al.* 1997] (Figure 12). Malgré la similitude du squelette de la cellulose et des xyloglucanes, la présence de ramifications confère à ces derniers des propriétés différentes et notamment l'incapacité de s'organiser en microfibrilles.

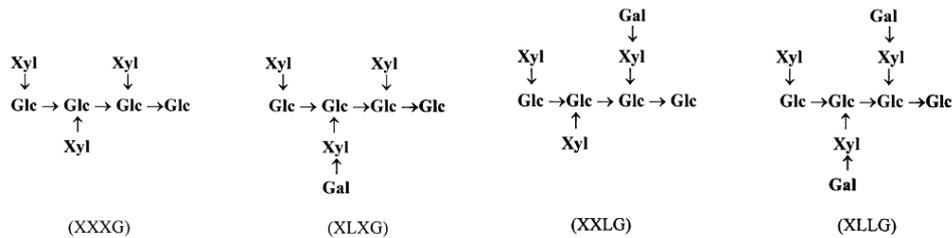


Figure 12 : Représentation des blocs constitutifs des XG de tamarin et nomenclature associée [de Lima et Buckeridge 2001].

Les XG ont plusieurs rôles au sein des végétaux. Ils peuvent servir de substance 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 et 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 [York *et al.* 1984].

Enfin, les XG ont un rôle structural majeur dans les plantes grâce au réseau qu'ils forment avec la cellulose. Ils assurent la cohésion entre les microfibrilles de cellulose et donc le maintien de la cellule au cours de sa croissance.

## 2.4 Le réseau cellulose/xyloglucane

### 2.4.1 Généralités

Les XG sont liés à la cellulose par des liaisons non covalentes, principalement de type liaisons hydrogène [Hayashi et Maclachlan 1984]. Cependant, le mécanisme précis de ces interactions n'est pas encore connu. La structure du réseau, obtenu après exocytose des XG et association avec les microfibrilles, suggère qu'il existe trois domaines xyloglucosidiques en fonction de leur force d'interaction [Pauly *et al.* 1999].

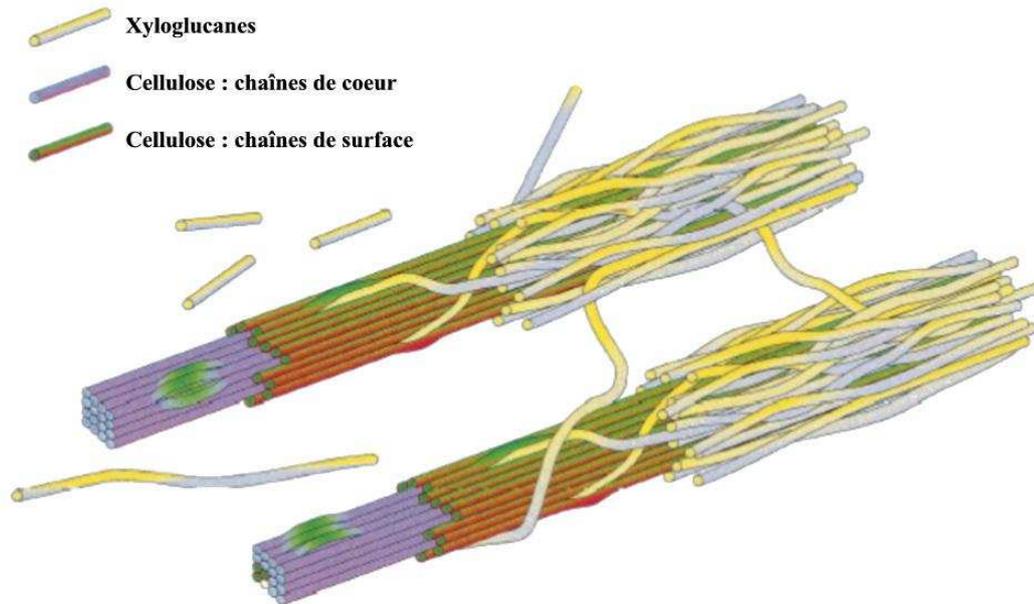


Figure 13 : Réseau cellulose-XG de la paroi primaire des cellules végétales [Rose et Bennett 1999].

Ces trois domaines moléculaires ont été identifiés par extraction séquentielle de parois cellulaires de tiges de pois étiolées (Figure 13).

- un premier domaine est composé des XG qui ne sont pas directement en interaction avec la cellulose tel que les ponts, les boucles ou encore les queues. Ils sont facilement extractibles par utilisation d'une xyloglucane-endoglucanase (XEG).
- une seconde partie des XG est constituée des XG directement en interaction à la surface de la cellulose. Elle peut être extraite avec une solution alcaline concentrée (KOH 24 %), postérieurement au traitement par la XEG.
- le troisième domaine des XG présent au sein de la paroi primaire pourrait être situés au cœur des microfibrilles de cellulose. Ces XG ne peuvent être extraits de la paroi ni par l'utilisation d'une XEG, ni en 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 XG n'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 l'encapsulation de certains XG nécessitant l'utilisation d'une cellulase pour leur extraction. La présence de ces différents domaines laisse néanmoins supposer que les mécanismes d'interaction présentent une certaine variabilité en fonction de la nature des XG étudiés.

La paroi primaire des cellules végétales contrôle la vitesse et la direction de l'expansion cellulaire. Ceci permet la conservation de l'intégrité mécanique des cellules, malgré les variations importantes de taille qu'elles subissent au cours de leur croissance. Le mécanisme d'extension de la paroi doit donc impliquer simultanément un relâchement et une restructuration de la paroi, ainsi que l'incorporation de nouveau matériel. Le métabolisme des XG au sein de la paroi primaire serait stimulé par un pH acide [Hayashi *et al.* 1987]. Les expansines [Cosgrove 1998] participent à ce processus de modification de la paroi, en intervenant au niveau des liaisons entre les XG et la cellulose. La nature exacte du processus de modification de la paroi en milieu acide est cependant encore inconnue.

Le réseau cellulose-XG, structure portante de la paroi primaire, subit également des modifications de nature enzymatique, notamment par les *endo*- et *exo*- glycoside-hydrolases. Une autre classe d'enzymes, appartenant aux glycosides hydrolases et intervenant dans le métabolisme des XG a été décrite au début des années 90 [Fry *et al.* 1992; Nishitani et Tominaga 1992]. Il s'agit des xyloglucane-*endo*-transglycosylases (XET) capables d'assurer le transfert d'un fragment glucosidique sur une autre molécule de XG. Cette classe d'enzyme assure l'expansion de la paroi de façon concomitante à la croissance de la cellule.

## **2.4.2 Compréhension des interactions Cellulose-XG**

Les mécanismes d'interaction, de même que les facteurs influençant la capacité d'adsorption des XG sur la cellulose, ne sont à ce jour pas clairement identifiés. Cependant, plusieurs modèles développés pour permettre une étude des interactions cellulose-XG dans des conditions contrôlées ont déjà permis d'apporter certaines informations. La construction de ces modèles peut se faire de deux façons : mise en présence des deux polysaccharides pariétaux (XG et cellulose) à étudier ou formation d'un composite cellulose-XG par culture de cellulose bactérienne en présence de XG.

### **2.4.2.1 Assemblages Cellulose-XG**

Le simple mélange de XG et de cellulose déjà synthétisés et présentant des caractéristiques de structure ou de composition différentes constitue un moyen simple de déterminer l'affinité entre ces deux composés.

L'assemblage de xylogluco-oligosaccharides (XGOs) de tailles variables avec différents types de cellulose [Hayashi *et al.* 1994b] a mis en évidence une **longueur minimale du squelette glucosidique des XGOs permettant d'observer des interactions**. Des dérivés

glucitol de XGOs, comportant de 3 à 12 résidus glucosyles sur leur chaîne principale, ont été obtenus par hydrolyse partielle et dégalactosylation de XG de tamarin. La comparaison des interactions de ces dérivés avec différentes celluloses a montré que le motif GXXXG est le motif minimal donnant lieu à des interactions quel que soit le type de cellulose (amorphe, micro-cristalline ou bien papier filtre). Il semble par ailleurs qu'il existe une taille optimale pour laquelle l'affinité est maximale. En effet, suite à l'étude de l'adsorption de XG de tamarin partiellement hydrolysé sur de la cellulose microcristalline Avicel [Vincken *et al.* 1995], l'adsorption optimale serait obtenue pour les XGOs comportant de 20 à 44 résidus glucosyles dans la chaîne principale. Ceci va néanmoins à l'encontre des travaux d'Hayashi [Hayashi *et al.* 1994a] qui relatent une adsorption croissante des XG de tamarin non dégalactosylés sur la cellulose amorphe en fonction du degré de polymérisation (DP), pour des XG comportant 64 à 3000 résidus glucosyles sur leur chaîne principale.

L'influence du **degré de galactosylation des XG** a également été analysée par des études *in vitro*. Lima *et al.* [de Lima et Buckeridge 2001] ont dans un premier temps étudié l'adsorption de XG de *Tamarindus indica* et de *Hymenaea courbaril* sur la cellulose microcristalline Avicel puis déterminé les XGOs constitutifs des XG adsorbés. A partir de ces résultats, il a été montré que le degré de galactosylation a une influence défavorable sur la capacité d'adsorption. Les domaines de XG de tamarin adsorbés contiennent plus de motifs XXXG et XLXG mais moins de motifs XXLG et XLLG que les XG natifs. Ceci est en accord avec l'hypothèse de Vincken *et al.* [Vincken *et al.* 1995], selon laquelle la présence de résidus galactosyles serait un obstacle à la pénétration des XGOs dans les pores les plus petits de la cellulose.

Les interactions Cellulose-XG dépendent également du type de cellulose considéré. Les XG de pois comme ceux de tamarin présentent en effet une meilleure affinité pour la cellulose amorphe que pour la cellulose microcristalline de type Avicel [Hayashi *et al.* 1994a] ou les linters de coton [Vincken *et al.* 1995]. Dans le cas de fibres de papier [de Lima et Buckeridge 2001], l'adsorption des XG est encore moindre. Par ailleurs, l'adsorption de XGOs sur la cellulose de papier filtre est plus faible que sur la cellulose amorphe mais plus importante que sur la cellulose microcristalline [Hayashi *et al.* 1994a]. Toutes ces conclusions sont en accord avec les travaux d'Hayashi [Hayashi *et al.* 1987] qui relatent la **dépendance de l'adsorption à la surface spécifique de la cellulose** et donc aux diamètres des fibres. Plus ce dernier diminue, plus la surface spécifique de la cellulose augmente et plus la capacité d'adsorption de XG de pois sur ces différents types de cellulose est importante.

Outre l'influence des caractéristiques des substrats, la nature des interactions a aussi été étudiée. L'influence modérée du pH, pour des valeurs comprises entre 2 et 7, sur les interactions entre des fragments de XG (XXXG et XLLG) et de la cellulose de papier filtre [Valent et Albersheim 1974], mais également sur les interactions entre le XG et la cellulose de pois [Hayashi *et al.* 1987], confirme **l'existence de liaisons hydrogène entre les XG et la cellulose**. Par ailleurs, Stiernstedt *et al.* [Stiernstedt *et al.* 2006] ont montré que **les interactions entre la cellulose et le xyloglucane sont irréversibles**.

Enfin l'utilisation d'assemblages ternaires [Hayashi *et al.* 1987] a permis de mettre en évidence **la spécificité et le caractère non compétitif des interactions cellulose-XG**. La présence d'arabinogalactanes, de pectines ou de  $\beta$ -glucanes non liés par des liaisons  $\beta$ -(1,4) n'affecte pas la capacité d'interactions des XG. Par ailleurs, l'affinité des polysaccharides constitués de  $\beta$ -1,4-glucanes autres que les XG [Mishima *et al.* 1998] laisse supposer un mécanisme d'interaction basé sur leur complémentarité de structure.

Les études *in vitro* d'assemblages cellulose-XG ont donc permis d'apporter des informations pertinentes sur la nature des interactions cellulose-XG présentes au sein des parois végétales, mais ces systèmes sont parfois assez éloignés des complexes présents dans la paroi des cellules végétales. Pour mieux prendre en compte les mécanismes d'interaction présents lors de la biosynthèse, une deuxième voie d'étude *in vitro* utilisant la synthèse de composites cellulose-XG à partir de bactéries a été développée.

#### **2.4.2.2 Composites Cellulose-XG**

Dans la paroi des cellules végétales, les XG sont supposés interagir avec la cellulose au niveau de son site de biosynthèse, après avoir été synthétisés eux-même dans l'appareil de Golgi et transportés via des vésicules de sécrétion. Par analogie à cette obtention du réseau cellulose-XG *in vivo*, la préparation et l'analyse de composites par ajout de XG dans le milieu de culture de bactéries synthétisant de la cellulose a fait l'objet de plusieurs études. Par rapport à la constitution d'assemblages décrite précédemment, l'intérêt de cette approche est d'être plus en adéquation avec ce qui peut se produire dans la plante, tout en connaissant précisément la nature du polysaccharide utilisé, contrairement aux méthodes de déconstruction séquentielle des réseaux existants dans la paroi. En revanche, la limitation de ces systèmes modèles est liée aux différences de conditions de biosynthèse de la cellulose dans la bactérie et *in planta*.

La quantité de XG incorporée lors de la production de cellulose en présence de XG de tamarin (38 %, m/m) est de l'ordre de celle présente dans le réseau cellulose-XG de la paroi primaire. De même, il semblerait qu'en présence de XG, la cellulose bactérienne ait une organisation moléculaire comparable à celle de la cellulose pariétale [Whitney *et al.* 1995]. Les XG induisent une diminution de la cristallinité de la cellulose, en perturbant par leur intercalation l'auto-association des chaînes cellulosiques tout en introduisant un ordre latéral et le maintien de l'organisation spatiale des fibres de cellulose [Whitney *et al.* 1995]. La modification de l'organisation cristalline de la cellulose ainsi que la diminution de la taille des fibres ont également été rapportées.

L'observation de ces composites par microscopie a montré que la proportion de XG contenue dans les ponts reliant deux microfibrilles est nettement plus faible que celle des XG alignés avec la cellulose [Whitney *et al.* 1995; Chanliaud *et al.* 2004]. Ce travail rapporte également des résultats obtenus par analyse RMN-<sup>13</sup>C du solide, montrant qu'une fraction rigide de XG constituerait 80 % des XG adsorbés. Ceci tend à prouver que 80 % des XG sont purement en interaction avec la cellulose ; ces proportions ont aussi été déterminées par extraction enzymatique à partir des composites [Chanliaud *et al.* 2004]. La différence notable entre ces proportions et celles déterminées par extraction séquentielle de la paroi primaire pourrait être due à la masse moléculaire des XG de tamarin utilisés dans les composites, qui est plus importante que celles des composés pariétaux, ou à la plus grande accessibilité des XG à l'enzyme [Chanliaud *et al.* 2004].

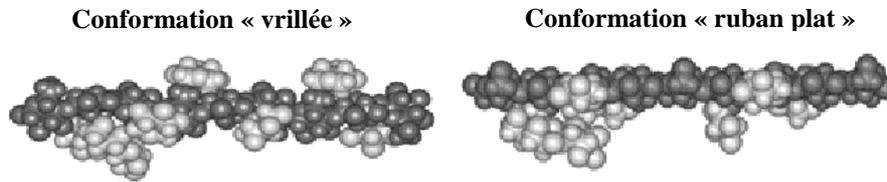
Enfin, l'étude de composites gluco-galactomannanes-cellulose montre une diminution du taux d'incorporation engendrée par une augmentation de la quantité de résidus galactosyles. Ceci peut être rapproché, toute proportion gardée, de la diminution d'affinité des XG pour la cellulose par augmentation du taux de galactosylation, mentionnée précédemment (cf paragraphe 2.4.2.1).

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

#### **2.4.2.3 Etudes *in silico* : des informations conformationnelle et énergétique**

Des études par dynamique moléculaire sur des XGOs suggèrent que, pour se lier à la cellulose, les XG peuvent modifier leur conformation « vrillée » pour adopter une

conformation en « ruban plat » [Levy *et al.* 1991] (Figure 14). Dans cette conformation, toutes les chaînes latérales sont disposées d'un même côté de l'axe glucosidique principal et la surface du ruban est complémentaire de celle de la cellulose.



**Figure 14 : Conformations « vrillée » et « ruban plat » des XG. La conformation « vrillée » serait celle des XG en solution, qui serait ensuite modifiée en conformation « ruban plat » lors des interactions avec la cellulose.**

Les différents résultats obtenus par modélisation moléculaire concernant l'importance du rôle, direct ou indirect, des chaînes latérales des xyloglucanes au niveau de ses interactions avec la cellulose sont 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 des études plus récentes [Hanus et 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. Par ailleurs, il semblerait que l'orientation de la chaîne principale du XGO par rapport à la chaîne de cellulose n'ait pas d'influence, ce qui remettrait en question la localisation des interactions au niveau des résidus glucosyles.

Cependant, les hypothèses nécessaires à de telles études excluent nécessairement certains paramètres d'influence comme la présence de solvant ou l'existence d'entropie de réaction.

L'utilisation de ces approches complémentaires a permis d'acquérir d'importantes connaissances sur la structure et les interactions du réseau cellulose-XG présent dans la paroi primaire des cellules végétales. Cependant certains aspects restent controversés, et notamment l'influence des chaînes latérales, tant au niveau de leur nature que de leur répartition.

## **2.5 Valorisation de la cellulose et des xyloglucanes comme matériaux**

La production mondiale de ressources issues de la biomasse à partir de plantes terrestres est de 170 à 200 milliards de tonnes, dont 70% est composé de parois végétales. Toutes ces ressources sont principalement utilisées par l'homme sous forme de bois pour le chauffage ou la construction, de pulpe dans l'industrie papetière et de matériau brut pour l'industrie textile. Plus récemment, de nouvelles applications ont été développées comme l'élaboration de matériaux bio-composites ou la production de bio-éthanol. Dans cette partie, les principales utilisations des ressources végétales vont être abordées.

### **2.5.1 Fabrication de la pâte à papier**

L'application majeure des fibres de cellulose est la fabrication de la pâte à papier. Le papier peut être décrit comme un réseau tridimensionnel de fibres enchevêtrées. Les interactions entre les fibres ont une influence sur les propriétés mécaniques du papier et la présence de liants est parfois nécessaire. Actuellement, les dérivés d'amidon ou les galactomannanes sont les principaux additifs utilisés comme liant. Ils permettent d'améliorer les propriétés mécaniques du papier, en réduisant la floculation de la suspension de fibres pendant le procédé d'élaboration des feuilles.

Des études ont été réalisées sur l'influence de l'ajout de XG dans la pulpe de papier par Lima *et al.* [Lima *et al.* 2003]. Il a été montré que la présence de XG permet d'améliorer les propriétés du papier qui devient plus lisse et dont la résistance à la traction augmente de 20 à 30%. Ceci peut être expliqué par la formation de ponts entre les fibres de cellulose [McCann *et al.* 1990; Whitney *et al.* 1995; Fujino *et al.* 2000] et donc une meilleure liaison des fibres. De plus, Stiernstedt *et al.* [Stiernstedt *et al.* 2006] ont démontré que la présence de XG permet une meilleure adhésion entre les fibres de cellulose ainsi qu'une réduction de la friction entre elles. Le xyloglucane interagit donc fortement avec les fibres de pulpe de bois et améliore la formation du papier ainsi que ses propriétés mécaniques.

### **2.5.2 Matériaux composites à base de cellulose et XG**

Les matériaux composites renforcés par des fibres végétales sont apparus depuis une vingtaine d'années et ont été déclinés sous diverses formes en fonction des matrices synthétiques déjà existantes et de la grande diversité de fibres naturelles associées. La qualité de l'interface fibre/matrice est un facteur clé pour l'obtention de matériaux performants. Elle est classiquement gérée par modification chimique de surface des fibres. Celle-ci repose sur

l'utilisation de la réactivité des groupements hydroxyles de surface pour le greffage d'oligomères mono- ou poly-fonctionnels ou même de polymères. D'autres voies ont été utilisées telles que le dépôt de multicouches sur des fibres de cellulose pour permettre une meilleure adhésion avec la matrice [Lin *et al.* 2008]. Cet aspect sera décrit dans une partie ultérieure.

Le XG peut également servir de vecteur pour introduire de nouvelles fonctionnalités chimiques à la cellulose [Zhou *et al.* 2007] et éventuellement synthétiser des matériaux bio-composites. Il est notamment possible de modifier chimiquement des xyloglucosaccharides (XGO) par amination réductrice ou greffage de molécules fluorescentes par exemple. Les XGO modifiés sont ensuite incorporés dans un XG de plus grande masse molaire via des XETs. L'adsorption subséquente du XG modifié sur la cellulose confère une fonctionnalisation de surface spécifique au matériau. Par conséquent, si le XG est modifié avec un initiateur de polymérisation, le greffage d'un polymère synthétique comme le poly(méthacrylate de méthyle) [Zhou *et al.* 2005] est envisageable.

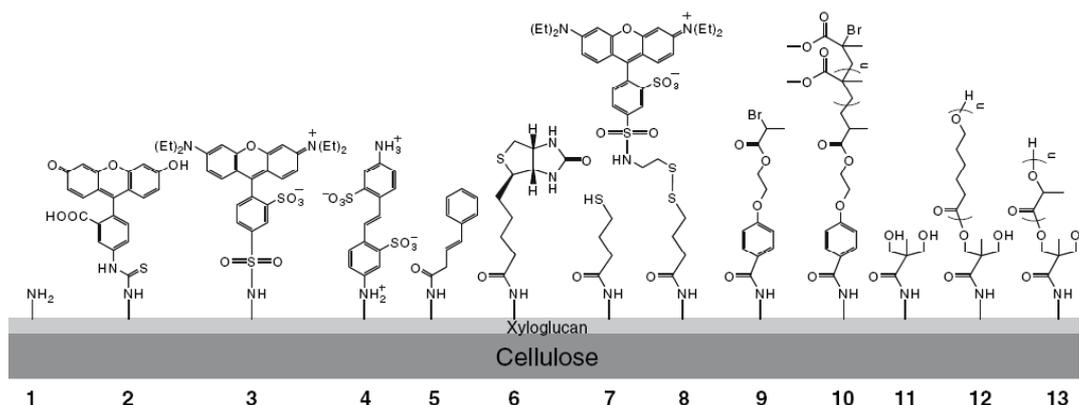


Figure 15 : Groupes fonctionnels introduits sur la fibre de cellulose via le XG modifié par les XETs [Zhou *et al.* 2007]

### 2.5.3 Les dérivés de cellulose

Les nombreux groupements hydroxyles de la cellulose peuvent réagir partiellement ou totalement avec différents réactifs chimiques pour donner des dérivés cellulosiques possédant des propriétés propres [Klemm *et al.* 2005]. Il est nécessaire de casser les liaisons hydrogène pour rendre les groupements hydroxyles accessibles et permettre la synthèse du dérivé de cellulose. Un des moyens les plus classiques pour y parvenir est la dissolution de la cellulose dans une solution de soude concentrée (Figure 16). Une forte proportion des -OH est transformée en -ONa.

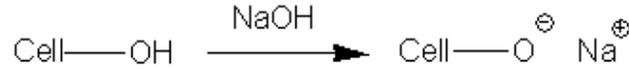


Figure 16 : Transformation de la cellulose I en alcali-cellulose par dissolution dans une solution de soude concentrée.

Ce traitement est appelé mercerisation et l'alcali-cellulose obtenue (Figure 17, Figure 18) permet la synthèse des principaux dérivés de cellulose : la cellulose régénérée, les esters de cellulose et les éthers de cellulose.

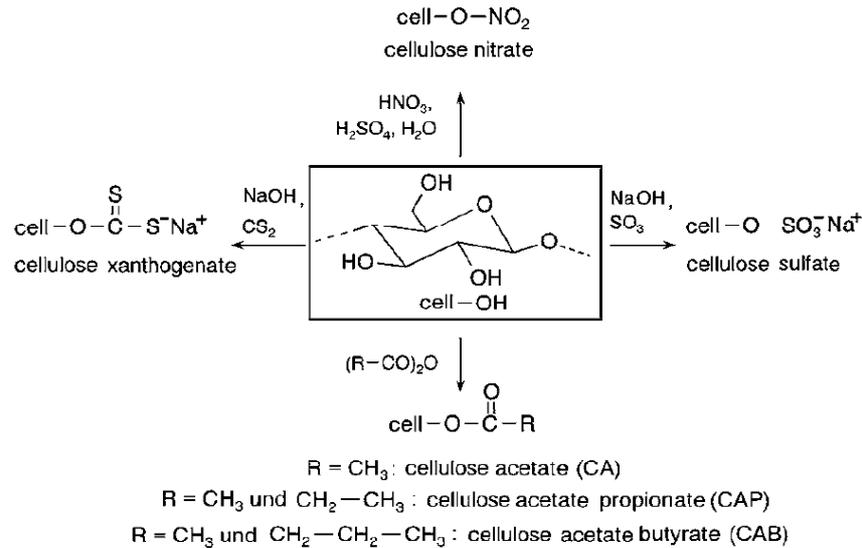


Figure 17 : Dérivés de cellulose techniques typiques [Klemm *et al.* 2005].

### 2.5.3.1 La cellulose régénérée

L'alcali cellulose obtenue est soluble dans le sulfure de carbone pour donner le xanthate de cellulose. La cellulose est régénérée sous la forme de films ou de fibres, par neutralisation avec de l'acide sulfurique. Ce traitement permet la fabrication de filaments appelés viscose qui pourra être utilisée dans la fabrication de tissus (rayonne), de films (cellophane) ou d'éponges dites végétales.

### 2.5.3.2 Les esters de cellulose

L'acétylation de la cellulose est obtenue par réaction de la cellulose avec l'anhydride acétique, catalysée par l'acide sulfurique. Cependant, pour obtenir des dérivés de degré de substitution (DS) élevé, il convient d'opérer en présence d'un diluant. L'acétylation peut être réalisée en phase homogène ou hétérogène et est catalysée par des acides minéraux (acides de Lewis ou Brönsted). L'acétate de cellulose est essentiellement utilisé pur pour donner des

fibres textiles de ténacité moyenne (jusqu'à 60 MPa) mais de grand confort (forte capacité d'adsorption d'eau) et du meilleur aspect pour les tissus qui en sont constitués. A l'état de solution, ce polymère artificiel est utilisé dans l'industrie du vernis. La production mondiale annuelle d'acétates de cellulose de DS varié est de l'ordre du million de tonnes. Des esters mixtes peuvent être obtenus par traitement d'un ester de cellulose par un autre acide ou anhydride.

### 2.5.3.3 Les éthers de cellulose

Les principaux éthers de cellulose sont les carboxyméthylcelluloses (CMC), les méthylcelluloses (MC) et les hydroxyalkyléthers celluloses.

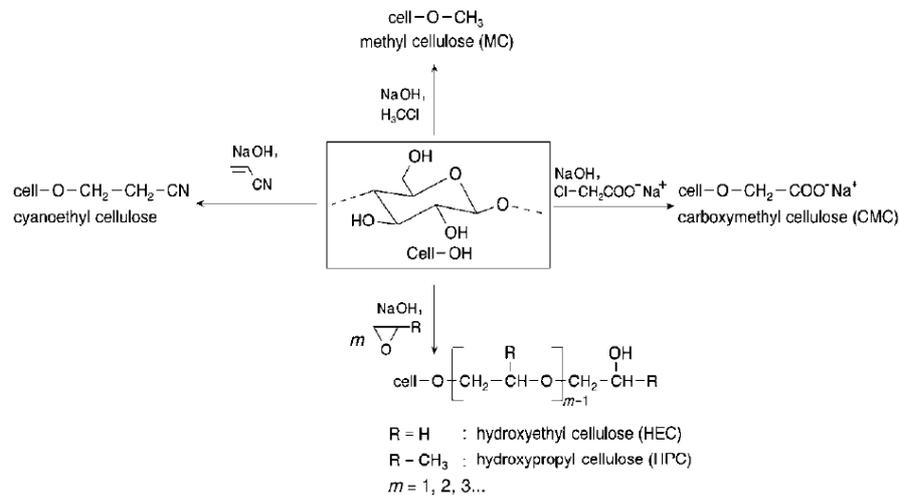


Figure 18 : Exemples d'éthers de cellulose commerciaux. [Klemm *et al.* 2005]

Les CMC sont hydrophiles et totalement hydrosoluble. Ses nombreuses applications font appel à cette propriété ainsi qu'à sa capacité à former des agrégats qui augmentent considérablement la viscosité de ses solutions aqueuses (industries papetière, cosmétique, pharmaceutique, alimentaire,...).

Les méthylcelluloses (MC) sont obtenues par réaction du chlorure de méthyle sur l'alcali-cellulose et possèdent des solubilités différenciées selon le DS obtenu. A partir d'un DS = 1,5, les MC sont solubles dans l'eau puis dans des solvants organiques pour des DS plus élevés.

Les hydroxyalkyléthers celluloses (hydroxyéthyl (HEC) et hydroxypropyl cellulose) sont plus (HEC) ou moins (HPC) solubles dans l'eau selon la nature du groupe alkylène. Dans les deux cas cependant, il s'agit de polymères fortement hydrophiles.

## 2.5.4 Nanocristaux de cellulose

### 2.5.4.1 Préparation par hydrolyse acide

L'hydrolyse acide est un traitement chimique qui permet de transformer les polysaccharides en glucose. Le mécanisme réactionnel de l'hydrolyse acide de la cellulose est schématisé sur la Figure 19. Trois étapes peuvent être distinguées. Dans un premier temps, le proton de l'acide (catalyseur) interagit rapidement avec l'oxygène de la liaison  $\beta(1,4)$ -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'). Cependant, la protonation se fait préférentiellement sur l'oxygène de la liaison glycosidique qui présente moins d'encombrement stérique que l'oxygène du cycle. Le cation carbonium, ion instable, libère ensuite un proton par hydratation et il se crée ainsi une nouvelle extrémité réductrice [Philipp *et al.* 1979].

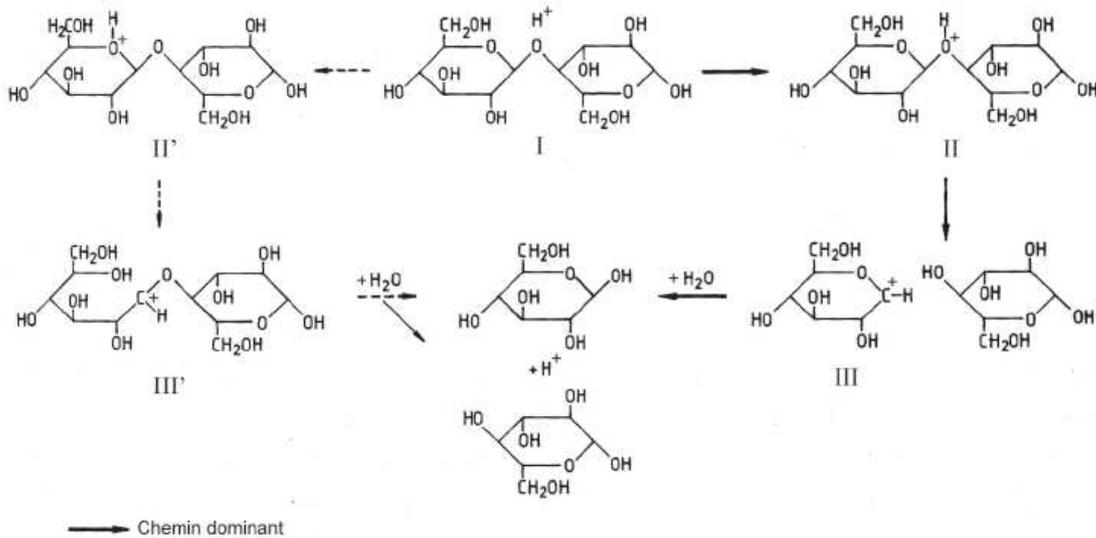


Figure 19 : Mécanisme d'hydrolyse acide de la cellulose.

Ce procédé est également employé pour la dégradation ménagée des microfibrilles de cellulose qui permettent d'obtenir des nanocristaux individuels et allongés, appelés « whiskers ». L'attaque se réalise préférentiellement sur les zones amorphes des microfibrilles puisque les ions hydronium peuvent plus facilement diffuser dans ces zones et couper les liaisons  $\beta$ -glucosidiques. Les zones cristallines sont alors individualisées, conduisant à une suspension aqueuse.

**Influence du type d'acide utilisé**

L'acide le plus souvent utilisé pour réaliser ces hydrolyses est l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) car il permet d'obtenir des suspensions colloïdales stables [Revol *et al.* 1992; Dong *et al.* 1996; Dong *et al.* 1998; Orts *et al.* 1998]. Dans le cas d'hydrolyses réalisées avec de l'acide chlorhydrique, il a été observé que les suspensions obtenues sont généralement peu stables et flocculent rapidement.

En adaptant les conditions d'hydrolyse, Araki *et al.* [Araki *et al.* 1998] ont montré que des whiskers de cellulose obtenus par  $H_2SO_4$  ou HCl ont en moyenne les mêmes dimensions mais avec une densité de charge différente. L'analyse conductimétrique, qui permet le dosage de la densité de charges, révèle que l'hydrolyse par HCl ne donne que des whiskers chargés par une faible quantité de groupements carboxyles (acides faibles). En revanche, l'hydrolyse par  $H_2SO_4$  introduit des groupements sulfates (acides forts) en plus des groupements carboxyles, et ce, en quantité beaucoup plus importante (Tableau 1) [Araki *et al.* 1998].

Pâte de bois hydrolysée par :	Quantité de groupements acides ( $mmol.kg^{-1}$ )	
	Groupements acide fort	Groupements acide faible
$H_2SO_4$	84	26
HCl	0	<18

**Tableau 1 : Quantité de groupements acides forts et faibles sur des whiskers de cellulose de pâte de bois obtenus par hydrolyse par  $H_2SO_4$  ou HCl [Araki *et al.* 1998].**

C'est la présence des esters de sulfate qui garantit la stabilité des suspensions obtenues par  $H_2SO_4$ . En effet, ces groupements, chargés négativement, introduisent des répulsions électrostatiques entre les nanocristaux qui se comportent alors comme une suspension colloïdale. En revanche, lors de l'hydrolyse par HCl, la quantité de groupements carboxyles introduite est trop faible pour éviter la floculation des nanocristaux. Néanmoins, Il est possible de former des suspensions stables pour de faibles forces ioniques que l'on peut atteindre par dialyse [Araki *et al.* 1998]. Ainsi, la stabilité des suspensions est liée à la densité de charge à la surface des nanocristaux.

L'obtention d'une suspension stable à partir de l'hydrolyse par HCl est possible en réalisant une post-sulfatation. Cependant, le taux de groupements sulfates reste plus faible que celui obtenu lors d'une hydrolyse directe par  $H_2SO_4$  [Araki *et al.* 1999; Araki *et al.* 2000].

Il est également possible de préparer des nanocristaux de cellulose par hydrolyse par HCl suivie d'une oxydation par l'hypochlorite de sodium catalysée par le radical TEMPO

(2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle), pour introduire des groupements carboxyles à la surface afin de faciliter la stabilisation dans l'eau [Araki *et al.* 2001; Montanari *et al.* 2005].

### ***Traitement par sonication***

L'hydrolyse et la purification ne suffisent généralement pas à obtenir des cristaux indépendants. En effet, dans la nature, ces objets peuvent comprendre plusieurs unités cristallines qui sont associées via des liaisons hydrogène et/ou des forces de Van der Waals. Ces unités peuvent parfois être séparées par sonication en cassant ces liaisons faibles sans rompre les liaisons covalentes qui forment les cristaux. Ce traitement permet d'améliorer la dispersion et la stabilité des suspensions.

#### ***2.5.4.2 Influence de l'origine de la cellulose***

Le degré de cristallinité de la cellulose dans les organismes ainsi que les dimensions des microfibrilles variant d'une espèce à l'autre, des nanocristaux de morphologies différentes peuvent être préparés [Elazzouzi-Hafraoui *et al.* 2008] (Figure 20). Ainsi, les microfibrilles de cellulose d'algues et de tuniciers sont très cristallines (80 à 95 %) et donnent des nanocristaux de quelques micromètres de long [Elazzouzi-Hafraoui *et al.* 2008]. Au contraire, les microfibrilles de bois ont une cristallinité plus faible (60 à 70 %) et donnent des nanocristaux plus courts, de quelques centaines de nanomètres. La morphologie et les dimensions des nanocristaux sont déterminées en utilisant :

- des techniques d'imagerie : microscopie électronique à transmission (MET) ou microscopie à force atomique (AFM),
- des techniques de diffusion : diffusion de rayons X ou de neutrons aux petits angles.

La Figure 20 présente des images de microscopie électronique à transmission de différents types de nanocristaux obtenus après hydrolyse à l'acide sulfurique et illustre les différentes morphologies de cristaux qui peuvent être obtenues.

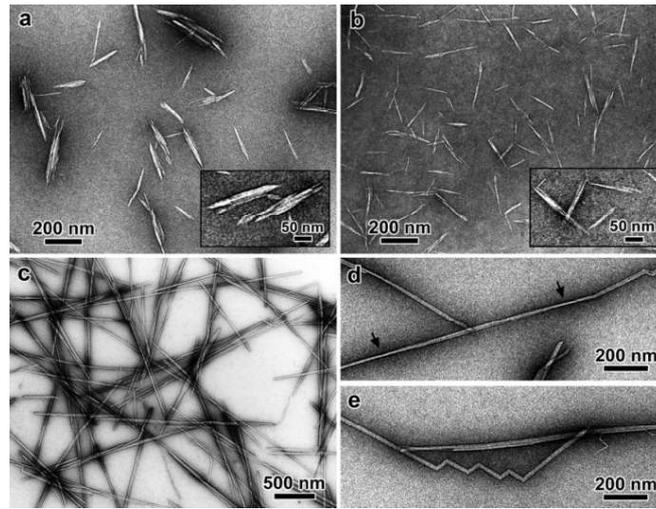


Figure 20 : Images MET de nanocristaux de cellulose colorés négativement obtenus par hydrolyse à l'acide sulfurique de coton (a), d'Avicel (b), et de tunicier [Elazzouzi-Hafraoui *et al.* 2008].

Le Tableau 2 rassemble les tailles mesurées des nanocristaux issus de sources de cellulose les plus couramment employées, en indiquant la technique utilisée. Pour une même source de cellulose, les grandeurs géométriques mesurées en utilisant différentes techniques sont assez proches. Les méthodes de diffusion (globales) sont complémentaires des méthodes d'imagerie (locales).

source	L (nm)	w (nm)	technique
bacterial	100–1000	10–50	TEM
cotton	100–1000	5–10 × 30–50	TEM
	100–150	5–10	TEM
	70–170	~7	TEM
	200–300	8	TEM
cotton linter	255	15	DDL
	150–210	5–11	AFM
	100–200	10–20	SEM-FEG
	25–320	6–70	TEM
MCC	300–500	15–30	AFM
	35–265	3–48	TEM
	250–270	23	TEM
	~500	10	AFM
ramie	150–250	6–8	TEM
	50–150	5–10	TEM
sisal	100–500	3–5	TEM
	150–280	3.5–6.5	TEM
tunicate		8.8 × 18.2	SANS
	1160	16	DDL
	500–1000	10	TEM
	1000–3000	15–30	TEM
	100–1000	15	TFM
Valonia	1073	28	TEM
	>1000	10–20	TEM
soft wood	100–200	3–4	TEM
	100–150	4–5	AFM
hard wood	140–150	4–5	AFM

Tableau 2 : Dimensions de nanocristaux de cellulose de sources diverses : longueur L, section w et technique utilisée pour la détermination des dimensions [Habibi *et al.* 2010].

## 3 Les films multicouches nanostructurés

### 3.1 Principe général

La technique de dépôt « couche par couche » ou layer-by-layer (LbL) a été développée par Decher [Decher 1997] dans les années 1990, bien qu'elle ait déjà été utilisée dès les années 1960, notamment par Iler [Iler 1966]. Cette technique permet de créer des assemblages à partir de différents composés, sans modification chimique particulière, qui donne accès à des films multicouches possédant des fonctionnalités élaborées. Ces films peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur finalité :

- création d'interactions de surface : chaque objet interagit avec son environnement via sa surface. Ainsi, toutes les propriétés qui dépendent de cette interaction sont dictées par la fonctionnalité de surface : par exemple, protection contre la corrosion, revêtements anti-reflets [Podsiadlo *et al.* 2007], revêtements anti-statiques, propriétés d'adhésion, hydrophilie, biocompatibilité, propriétés antibactériennes, reconnaissance de molécules...
- fabrication de matériaux fins auto-supportés : la séquence de dépôt de différents matériaux définit une architecture multicouche et donc des propriétés à l'objet. Ceci mène à la création de nouvelles propriétés macroscopiques en contrôlant au mieux l'arrangement spatial à une dimension de la fonctionnalité dans les nanocomposites multi-matériaux (réacteurs membrane, ...).

La fabrication de films multicomposites par le procédé LbL correspond à l'assemblage nanoscopique de différents matériaux en utilisant des techniques peu chères et respectueuses de l'environnement. L'épaisseur de ces films peut être ajustée avec une précision de l'ordre de l'Ångström (Å) en fonction du nombre de couches, avec une épaisseur qui va de quelques Å à quelques centaines de nanomètres. Les matériaux utilisés peuvent être de petites molécules organiques ou des composés inorganiques, des macromolécules synthétiques (polyélectrolytes) ou biologiques (protéines, polysaccharides, ADN), ainsi que des particules colloïdales (particules de latex, colloïdes métalliques).

Comme ce procédé implique uniquement l'adsorption de molécules à partir de solutions, il n'y a en principe aucune restriction par rapport à la taille du substrat et à sa topologie. Les films multicouches ont donc été étudiés sous plusieurs géométries. L'adsorption peut être réalisée sur des surfaces planes mais aussi sur des particules pour changer les propriétés de suspensions colloïdales [Sukhorukov *et al.* 1998] ou les propriétés de surface des particules [Lin *et al.* 2008]. Cette technique permet d'élaborer des membranes

auto-supportées pour la filtration, des membranes de capsules qui peuvent être utilisées pour la libération contrôlée de principe actif [Tong *et al.* 2008] ou comme micro- ou nano-réacteurs pour des synthèses chimiques [Glinel *et al.* 2007].

### **3.1.1 Interactions mises en jeu**

La très grande majorité des films multicouches sont fabriqués par le biais d'interactions électrostatiques, puisque l'attraction électrostatique entre deux molécules de charges opposées est l'interaction chimique qui est la moins contraignante vis-à-vis de l'encombrement stérique.

Cependant, d'autres interactions ont également été utilisées avec succès comme les interactions par liaison hydrogène [Stockton et Rubner 1997; Sukhishvili et Granick 2002; Kharlampieva *et al.* 2008], par liaisons covalentes [Kohli et Blanchard 2000; Khutoryanskaya *et al.* 2010], ou la formation de complexes par reconnaissance spécifique [Tang *et al.* 2006]. De manière générale, il suffit d'avoir une interaction attractive entre deux espèces réactives pour les incorporer dans un film multicouche.

### **3.1.2 Les principales techniques d'élaboration des films**

La Figure 21 décrit de manière simplifiée le concept de dépôt du film sur un substrat chargé positivement. Les étapes 1 et 3 correspondent à l'adsorption respective d'un polyanion et d'un polycation tandis que les étapes 2 et 4 représentent des étapes de rinçage. Ces dernières permettent principalement d'éliminer les molécules peu ou pas adsorbées sur la surface. La répétition de ces étapes d'adsorption conduit à la formation de structures multicouches basiques de type (A-B)<sub>n</sub>, avec *n* le nombre de cycles de dépôt. Il est ensuite possible de former des structures hiérarchisées plus complexes qui permettent notamment la génération de compartiments.

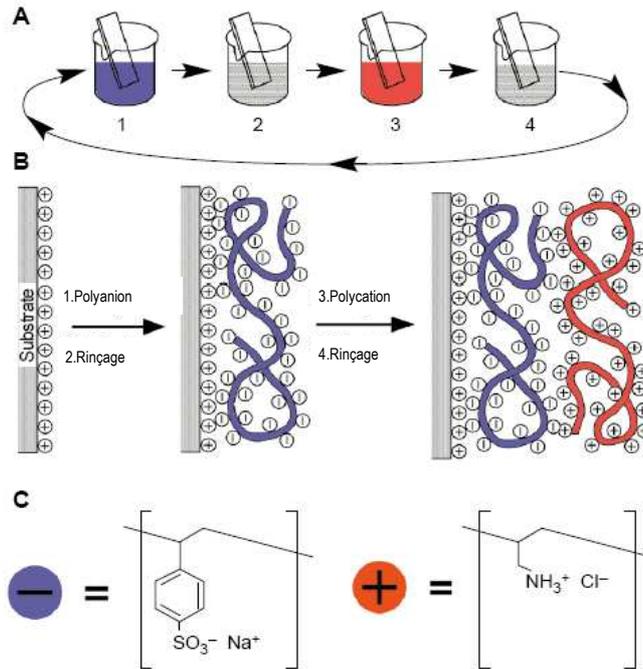


Figure 21 : A, B) Principe simplifié du procédé de dépôt LbL dans le cas d'un assemblage de polyélectrolytes [Decher 1997]. C) Structures chimiques de deux polyions typiques : le poly(styrène sulfonate) de sodium et le chlorhydrate de poly(allylamine).

Il existe différentes techniques qui permettent de réaliser des dépôts de couches nanométriques par LbL. La première technique utilisée est le **trempage** (**dipping** ou dip-coating) qui consiste à tremper le support dans les solutions contenant les molécules d'intérêt (Figure 21). Cette méthode est relativement contraignante puisqu'elle nécessite des phases d'adsorption assez longues (vingt minutes en moyenne) et utilise de grandes quantités de solution.

D'autres procédés sont ensuite apparus, avec l'introduction par Schlenoff [Schlenoff *et al.* 2000] du dépôt de couches par **pulvérisation** (spraying) de la solution contenant le polymère, directement sur la surface du support. Le solvant est évaporé en partie pendant la pulvérisation, puis le reste s'évapore après dépôt.

Enfin, Hong *et al.* [Cho *et al.* 2001; Lee *et al.* 2001] et Wang *et al.* [Chiarelli *et al.* 2001] ont été les premiers à utiliser l'**enduction centrifuge** (**spin-coating**) pour la réalisation de dépôts multicouches. Cette méthode consiste à déposer la solution de polymère sur le support puis à faire tourner celui-ci. L'excédent de liquide est évacué par centrifugation lors de la mise en rotation du support puis le solvant s'évapore ne laissant que la matière sur le support (Figure 22).

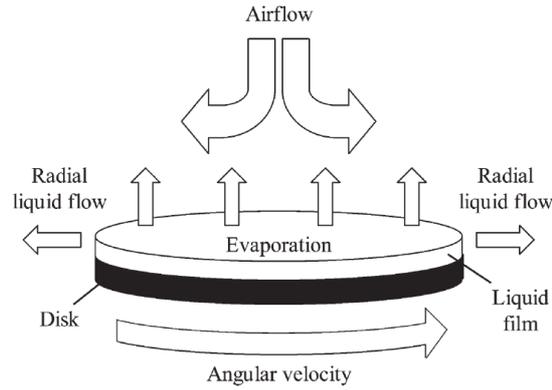


Figure 22 : Schéma représentant les processus majeurs impliqués dans le spin-coating [Norrman *et al.* 2005].

Ces deux techniques ont l'avantage de n'utiliser que de faibles quantités de solutions pour couvrir de larges surfaces. Néanmoins, dans le cas du spin-coating, la réalisation des films multicouches n'est pas uniquement due à l'adsorption moléculaire. D'autres phénomènes physiques interviennent que nous allons décrire plus en détail dans le paragraphe suivant.

### 3.1.3 Particularités du spin-coating

Le spin-coating est une technique particulièrement intéressante puisqu'elle permet d'appliquer un film hautement uniforme sur un substrat plan de grande surface (jusqu'à 30 cm de diamètre) avec une épaisseur reproductible et parfaitement contrôlée. Elle peut être utilisée à partir de solutions organiques, inorganiques et/ou de mélanges organique/inorganique.

Le spin-coating est principalement utilisé pour des applications en microélectronique, pour réaliser le design de circuits par photolithographie sur des wafers de silicium semi-conducteur. Il permet aussi, depuis les années 2000, la réalisation de films multicouches nanostructurés [Cho *et al.* 2001], comme cela a été mentionné précédemment. Les paragraphes suivants vont aborder les mécanismes physiques impliqués dans le processus de spin-coating (Figure 22).

#### 3.1.3.1 Principe

Lorsqu'un fluide visqueux est déposé sur un disque horizontal en rotation, un film liquide et uniforme est obtenu. Lors du dépôt, le substrat doit être statique ou en rotation à faible vitesse angulaire. Le disque est ensuite rapidement accéléré à une vitesse angulaire (vitesse de rotation) élevée. Les forces d'adhésion à l'interface liquide/substrat 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. Ce processus combiné à l'évaporation subséquente du liquide va provoquer la diminution de l'épaisseur du film liquide restant. Dans le cas d'une solution de polymère, l'évaporation va faire augmenter la concentration en polymère (et donc la viscosité) à l'interface liquide/vapeur. Un gradient de concentration se forme donc à l'intérieur du film liquide. Celui-ci va, après l'évaporation de la majeure partie du solvant restant, former un film polymère uniforme pratiquement solide.

Le processus de spin-coating est extrêmement complexe et implique de nombreux mécanismes. Sa modélisation n'est donc pas triviale, et de nombreuses approximations et hypothèses ont été réalisées pour tenter de décrire ce processus [Emslie *et al.* 1958; Acrivos *et al.* 1960]. Emslie *et al.* [Emslie *et al.* 1958] sont les premiers à avoir décrit le flux d'un liquide visqueux sur un disque en rotation. Les auteurs ont fait plusieurs hypothèses :

- le fluide déposé a un comportement newtonien (c'est-à-dire qu'il existe une relation linéaire entre la contrainte de cisaillement et la vitesse de cisaillement) ;
- les forces de Coriolis, les gradients gravitationnels ainsi que les variations temporelles et spatiales de concentration, viscosité et diffusivité verticale ont été négligés.

Malgré ces approximations, Emslie *et al.* [Emslie *et al.* 1958] ont pu faire des prédictions assez générales sur le modèle d'écoulement et sur l'épaisseur des films obtenus. Ils montrent notamment qu'une couche d'épaisseur uniforme peut être obtenue indépendamment du profil du liquide au début de la rotation. L'épaisseur diminue de manière continue avec le temps, tant que la solution s'écoule hors du spin-coater.

Des études plus récentes [Meyerhofer 1978; Lawrence 1988; Bornside *et al.* 1991] ont permis d'améliorer ces modèles puisqu'ils sont en meilleur accord avec les observations expérimentales. En effet, certains paramètres négligés initialement ont été pris en compte comme l'évaporation du solvant et donc les phénomènes physiques qui en découlent (gradient de concentration en polymère, variation de la viscosité).

### *3.1.3.2 Paramètres d'influence sur l'épaisseur 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 de film. [Washo 1977; Jenekhe 1983]. Il est maintenant acquis que **la vitesse angulaire, la viscosité de la solution et 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, l'histoire de l'accélération de rotation avant l'accélération finale, et le temps de rotation ont des effets limités voire 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 du film [Lawrence 1988; Bornside *et al.* 1991]. La relation entre ces paramètres est représentée schématiquement à la Figure 23.

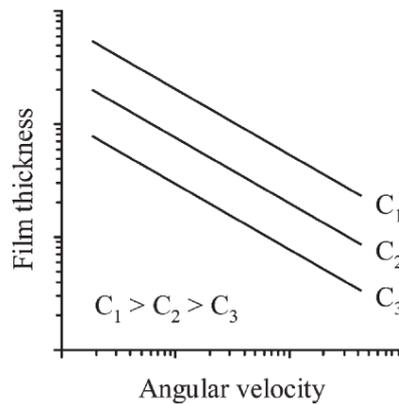


Figure 23 : Représentation schématique de la relation entre l'épaisseur du film, la vitesse angulaire et la concentration ( $C_n$ ) dans le procédé de spin-coating. Les mêmes relations s'appliquent également pour la viscosité des solutions [Norrman *et al.* 2005].

La Figure 23 montre que l'épaisseur du film va diminuer pour les vitesses de rotation les plus élevées et/ou pour les plus faibles concentrations. Cette corrélation a été largement observée expérimentalement et, par conséquent, il est généralement accepté que la relation mathématique empirique est de la forme suivante :

$$\text{Équation 1 : } h = k_1 \omega^\alpha$$

où  $h$  est l'épaisseur du film,  $\omega$  la vitesse angulaire, tandis que  $k_1$  et  $\alpha$  sont des constantes déterminées empiriquement. Ces constantes dépendent de divers paramètres, qui incluent les propriétés physiques du polymère, le solvant et le substrat, les interactions polymère/solvant et solution/substrat et également les propriétés rhéologiques du polymère. Il a été observé que l'exposant  $\alpha$  reste du même ordre pour différents systèmes polymère/solvant, et est établi à une valeur proche de  $-0,5$ . La viscosité initiale de la solution  $\eta_0$  fait partie des paramètres inclus dans la constante  $k_1$ . L'Équation 1 peut être développée en l'Équation 2 :

$$\text{Équation 2 : } h = k_2 \eta_0^\beta \omega^\alpha$$

où  $\eta_0$  est la viscosité initiale de la solution et  $\beta$  a une valeur typiquement comprise entre 0,29 et 0,39 dans le cas de solutions de polymère.

Spangler *et al.* [Spangler *et al.* 1990] ont trouvé que les exposants  $\alpha$  et  $\beta$  étaient complètement indépendants des systèmes polymère/solvant étudiés. En revanche, le coefficient de proportionnalité  $k_2$  varie significativement. Il a été suggéré que des informations sur les interactions polymère/solvant puissent être intégrées dans  $k_2$ .

### 3.1.3.3 Cas des 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, dont le comportement en spin-coating n'est pas nécessairement le même que celui d'une solution de polymère. Rehg et Higgins [Rehg et 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 polymère 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 de spin-coating de suspensions colloïdales. En effet, pour les suspensions colloïdales, de faibles variations de concentration conduisent 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 la porosité du film. Les auteurs [Rehg et Higgins 1992] ont montré que la porosité des films obtenus à partir de suspensions colloïdales de polystyrène augmente avec la force ionique.

Les interactions colloïdales pourraient également être déterminantes dans la relation entre l'épaisseur du film et la vitesse angulaire du substrat : l'exposant  $\alpha$  qui est de l'ordre de  $-0,5$  va diminuer lorsqu'on augmente la force ionique de la suspension.

La cellulose sous forme de suspension colloïdale a déjà été utilisée pour la réalisation de films multicouches. Les différents exemples de la littérature sont présentés dans la partie suivante.

## **3.2 Assemblages multicouches par liaisons hydrogène**

Comme nous l'avons souligné précédemment, les études d'assemblages LbL ont commencé par la construction de films de polyélectrolytes commerciaux [Decher 1997]. Des travaux ultérieurs ont montré qu'un certain nombre d'autres interactions non-électrostatiques peuvent être exploitées pour la construction de multicouches. En particulier, les assemblages LbL non-électrostatiques les plus étudiés sont construits à partir de liaisons hydrogène (H) et constituent un domaine de recherche relativement récent [Stockton et Rubner 1997].

Ce type d'assemblages est rendu possible car de nombreux polymères contiennent des groupements qui peuvent agir comme donneur ou accepteur des liaisons H. Par exemple, le poly(oxyde d'éthylène) (POE) possède des atomes d'oxygène qui peuvent être des accepteurs de liaisons H ou encore le poly(N-isopropyl acrylamide) (PNIPAM) peut être à la fois donneur (amide) et accepteur (carbonyle). Des polyacides comme le poly(acide acrylique) (PAA) ou le poly(acide méthacrylique) (PMAA) peuvent également être utilisés sous leur forme neutre comme donneurs de liaisons H. Une des conditions pour l'élaboration de films multicouches à base de liaisons H réside donc dans la suppression de toute forme d'ionisation. Différents paramètres interviennent sur la construction des films notamment sur l'épaisseur des couches déposées [Kharlampieva *et al.* 2009].

### **3.2.1 Principaux paramètres influençant la construction des films**

#### **3.2.1.1 Force des interactions et masse molaire**

L'épaisseur d'une bicouche d'un film construit par liaison H dépend du nombre de sites de liaisons entre les polymères. Ceux-ci sont déterminés par la force des interactions inter-polymères. Pour des polymères neutres de longueur comparable, les films présentent des épaisseurs de bicouches plus élevées pour des systèmes faiblement liés que pour des systèmes plus fortement liés [Kharlampieva *et al.* 2009]. En effet, lorsque les interactions sont faibles, les polymères adoptent une conformation qui favorise les boucles et il en résulte des films plus épais. Lorsque les interactions sont plus fortes, les chaînes de polymères s'aplatissent et résultent en des épaisseurs de bicouches plus faibles.

La masse molaire des polymères utilisés a un effet significatif sur la croissance des films. Dans le cas du système poly(vinylpyrrolidone)/poly(aniline) (PVP/PAni), de plus grandes quantités de matière sont adsorbées lorsque la masse molaire de PVP est plus élevée.

En revanche, lorsque la masse molaire est inférieure à 25 kM, aucune croissance de multicouches n'est observée [Stockton et Rubner 1997].

Néanmoins, cette influence est très variable en fonction de la force d'interaction du système étudié. Par exemple, le système faiblement lié POE/PAA a une épaisseur sept fois plus importante lorsque la masse molaire du POE passe de 1,5 à 20 kM [DeLongchamp et Hammond 2004]. Pour un système présentant des interactions plus fortes (PVP/PAA), la masse molaire de PVP et /ou PAA a un effet significatif sur l'épaisseur du film uniquement si celle-ci est inférieure à 40 kM. De même, les épaisseurs des bicouches de PVP/PMAA restent similaires en variant la masse molaire de PVP de 55 à 1300 kM [Kharlampieva *et al.* 2009]. L'indépendance de l'épaisseur des bicouches vis-à-vis de la masse molaire est liée à la forte densité des liaisons H intermoléculaires. Celle-ci induit un aplatissement des chaînes qui est cohérent avec les plus faibles valeurs d'épaisseur pour les systèmes fortement liés par des interactions hydrogène.

### *3.2.1.2 Influence du pH*

L'épaisseur des films LbL construits via des liaisons H dépend fortement du pH des solutions, et ce quelles que soient les interactions du système (faibles ou fortes). Le pH peut faire varier l'épaisseur du film de quelques Angströms à des centaines de nanomètres. Comme dans le cas de la masse molaire, l'influence du pH dépend des systèmes utilisés. Dans le cas des systèmes PANi en alternance avec PVP, poly(acrylamide) (PAAm) ou de l'alcool polyvinylique, la diminution du pH de la solution d'adsorption résulte en une augmentation de la quantité de matière incorporée dans le film. Dans le cas du POE, on observe l'inverse : l'épaisseur du film augmente avec le pH [Stockton et Rubner 1997]. L'origine de ces effets n'est pas complètement élucidée, mais plusieurs hypothèses ont été émises :

- des variations du niveau de dopage du PANi qui influence le nombre de sites disponibles pour la formation de liaisons H ;
- l'ionisation ou la protonation des groupes fonctionnels correspondant aux sites de liaison ;
- l'affaiblissement de la force des liaisons H avec la présence des ions OH<sup>-</sup> pour des pH élevés.

Cependant, Stockton et Rubner [Stockton et Rubner 1997] ont montré que la formation de films multicouches à base de liaisons H est possible sur une large gamme de pH. D'autres travaux [Sukhishvili et Granick 2002] ont démontré qu'il est possible, dans certains

cas, de dégrader les multicouches liées par liaisons H pour un pH donné. Il est donc possible en modulant l'état d'ionisation de casser ou créer des liaisons H.

### 3.2.2 Applications à l'élaboration de surfaces adaptatives

Ce paragraphe décrit quelques applications typiques de films construits à partir de liaisons H et qui sont capables de répondre à un stimulus externe.

#### 3.2.2.1 Films répondant au pH

Une des applications des assemblages par liaisons H à base de poly(acides acryliques) est la dissolution contrôlée à une valeur critique de pH ( $pH_{crit}$ ) pour laquelle l'ionisation des polyacides augmente. En effet, l'ionisation des fonctions acides entraîne l'effondrement du réseau de liaisons H, stable à bas pH. La valeur de  $pH_{crit}$  du film dépend de la force des interactions par liaisons H à l'intérieur du film. Cette caractéristique a été exploitée par Sukhishvili et Granick [Sukhishvili et Granick 2002] pour l'élaboration de multicouches dégradables à base de PAA ou PMAA en alternance avec POE ou PVP. Lorsque l'ionisation de PAA (ou PMAA) atteint un certain niveau, les liaisons ne sont plus suffisantes pour maintenir l'intégrité du film qui se désassemble rapidement (Figure 24). Le  $pH_{crit}$  varie en fonction des systèmes étudiés (Tableau 3).

Polymère 1 (donneur)	Polymère 2 (accepteur)	$pH_{crit}$
PMAA	PVP	6,9
PMAA	POE	4,6
PAA	POE	3,6

Tableau 3 : Quelques exemples de  $pH_{crit}$  pour différents systèmes donneurs/accepteurs de liaisons H [Sukhishvili et Granick 2002].

Une telle gamme de  $pH_{crit}$  permet le réglage des propriétés de relâchement du film pour des valeurs de pH proches des conditions physiologiques. Ceci permet de contrôler la libération de composés fonctionnels piégés à l'intérieur des films dissolubles. Cette propriété peut être utilisée pour la libération de principe actif encapsulé via des variations de pH semblables à celles qui existent entre l'estomac et l'intestin.

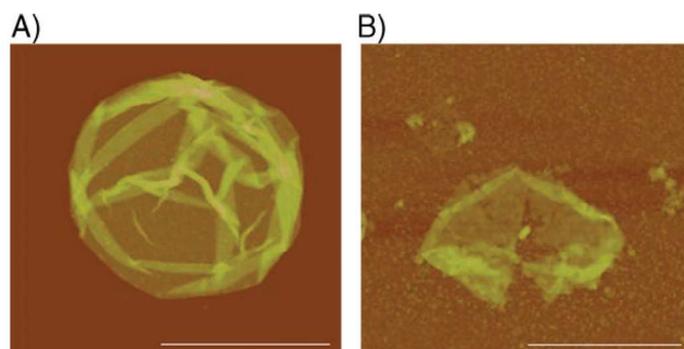


Figure 24 : Images AFM de capsules composées de (PVP/PMAA)<sub>4</sub> à pH 2 (A) et à pH 6,2 (B). La barre d'échelle correspond à une longueur de 3,2  $\mu\text{m}$  [Kharlampieva *et al.* 2009].

Il est possible de stabiliser ces films vis-à-vis des variations de pH en introduisant des liants entre les couches adjacentes. Il existe plusieurs techniques pour stabiliser de tels films [Quinn *et al.* 2007; Kharlampieva *et al.* 2009] :

- La réalisation de films faisant intervenir à la fois des liaisons H et des interactions électrostatiques.
- L'introduction d'ions multivalents [Quinn *et al.* 2007].
- La réticulation chimique, thermique ou par irradiation UV.

En améliorant la stabilité de ces films vis-à-vis du pH, il est possible d'obtenir des films ou des capsules présentant des variations de taille réversible en réponse à des variations de pH. Ce type de films peut être obtenu à partir de PVP et de polyacides. A faible pH, l'ionisation du polyacide va diminuer, ce qui induit un dégonflement du film.

### 3.2.2.2 Films répondant à la température

Les films multicouches à base de liaisons H peuvent présenter des propriétés qui varient en fonction de la température. En effet, l'un des avantages de l'utilisation des liaisons H pour la construction de films multicouches est la possibilité d'incorporer des polymères thermosensibles comme le PNIPAM. Ce polymère est soluble dans l'eau à basse température, mais insoluble au-dessus d'une température critique (low critical solution temperature : LCST) vers 32°C. A cette température, le polymère subit une transition de phase réversible en expulsant des molécules d'eau solvatant initialement les monomères. Des films auto-supportés contenant ces polymères en alternance avec le PMAA présentent des séparations de microphases induites par un changement de température. Ainsi pour des températures proches de la LCST, les chaînes de polymères vont se plier et entraîner des changements de structure dans les membranes, celles-ci pouvant devenir perméables. Récemment, Swiston *et al.*

[Swiston *et al.* 2008] ont démontré que des multicouches PNIPAM/PMAA peuvent être utilisées pour la libération de principes actifs déclenchée par la température, et ce, dans les conditions physiologiques.

### 3.2.2.3 Capteurs d'humidité

L'utilisation potentielle de films LbL à liaisons H comme capteur d'humidité est basée sur de larges variations d'hydratation du film en réponse aux changements d'humidité ambiante. Il a été montré que des films PVP/PAA contiennent seulement 4% d'eau. En alternant des étapes de chauffage et d'humidification, Yang *et al.* [Yang *et al.* 2006] ont constaté un gonflement réversible du film par l'observation de franges d'interférences. Des changements réversibles de l'épaisseur optique (l'épaisseur optique correspond à l'indice de réfraction du film fois l'épaisseur géométrique du film ( $n_1d$ )) ont été observés entre le film déshydraté à 80°C et après avoir été incubé à 25°C sous une humidité relative variant de 30% à 75%. Une relation linéaire a pu être établie entre l'épaisseur optique des films PVP/PAA et l'humidité ambiante. Une augmentation de 10% de l'épaisseur optique du film (PVP/PAA)<sub>16</sub> est mesurée lorsque l'humidité augmente de 50% à 25°C.

## 3.3 Films multicouches à base de cellulose

### 3.3.1 Construction via des interactions électrostatiques

La cellulose a déjà été utilisée sous forme de micro ou nanocristaux pour la réalisation de films multicouches. Dans la majorité des cas, la cellulose utilisée a été dispersée en solution aqueuse par hydrolyse à partir d'acide sulfurique. Les cristaux obtenus possèdent donc à leur surface des groupements négatifs qui peuvent être associés à un polycation pour construire des multicouches via des interactions électrostatiques. Les principales sources de cellulose utilisées sont le coton (sous forme de linter [Jean *et al.* 2008] ou issu de papier filtre sous forme poudre [Podsiadlo *et al.* 2005; Cranston et Gray 2006; Cranston et Gray 2008]), la pulpe de bois [Wagberg *et al.* 2008; Aulin *et al.* 2010; de Mesquita *et al.* 2010] et le tunicier [Podsiadlo *et al.* 2007].

Les polycations utilisés sont pour la plupart synthétiques (Figure 25) : chlorate de poly(diallyldiméthylammonium) (PDDA) [Podsiadlo *et al.* 2005; Wagberg *et al.* 2008], chlorhydrate de poly(allylamine) (PAH) [Cranston et Gray 2006; Podsiadlo *et al.* 2007; Cranston et Gray 2008; Jean *et al.* 2008] ou le poly(éthylène imine) (PEI) [Podsiadlo *et al.* 2007; Wagberg *et al.* 2008; Aulin *et al.* 2010] ; néanmoins quelques travaux font référence à

des films multicouches incorporant un polycation issu de la biomasse, le chitosane [Podsiadlo *et al.* 2007; de Mesquita *et al.* 2010].

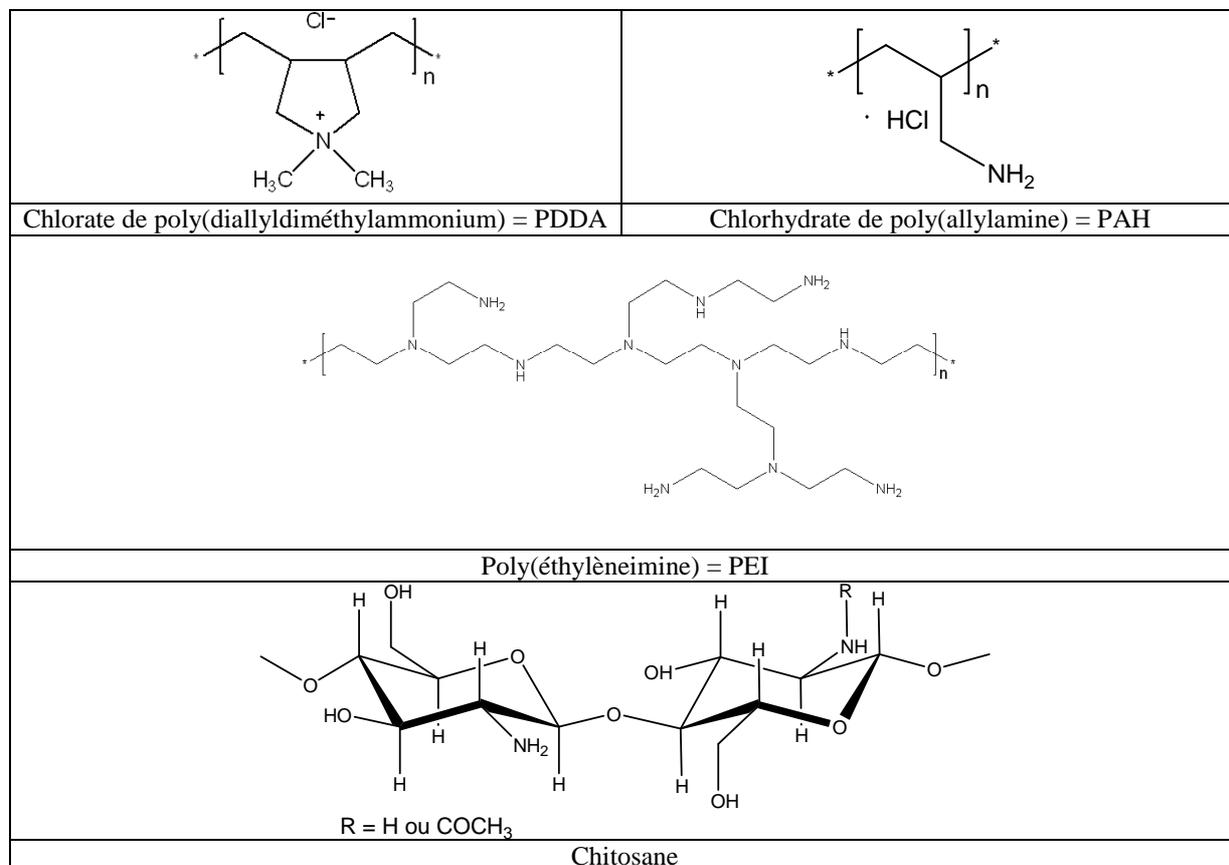


Figure 25 : Formules chimiques des polycations les plus utilisés pour la construction de films multicouches.

Podsiadlo *et al.* [Podsiadlo *et al.* 2005] sont les premiers à avoir réaliser des films multicouches C/PDDA par la méthode du dipping. La croissance des films est de l'ordre de 11 nm d'épaisseur par bicouche déposée, ce qui est cohérent par rapport à la section des whiskers de coton (5 à 10 nm). Les croissances à partir de microfibrilles de cellulose et de différents types de polycations ont été étudiées par Wågberg *et al.* [Wagberg *et al.* 2008] : celles-ci sont très variables d'un polycation à l'autre : les épaisseurs obtenues pour le PAH, le PDDA et le poly(éthylèneimine) (PEI) pour 10 bicouches déposées sont respectivement de 20 nm, 50 nm et 180 nm. Par ailleurs, la présence de force ionique (NaCl) dans le cas de multicouches cellulose/PAH a un effet sur la croissance des films : 10 bicouches ont une épaisseur de 140 nm environ en présence de 0,1 M de NaCl et atteignent 250 nm à 0,5 M NaCl. Les auteurs expliquent que ces différences sont liées à la structure tridimensionnelle des polyélectrolytes. En effet, en écrantant une partie des charges, la structure

tridimensionnelle du polyélectrolyte peut passer d'une conformation de bâtonnet rigide à la formation d'une pelote statistique. Cette conformation est volumineuse et permet d'obtenir des films plus épais.

La structure de films C/PAH a été étudiée par Jean *et al.* [Jean *et al.* 2008] par réflectivité de neutrons. Chaque couche de cellulose serait composée de deux couches de différentes densités : 50% pour la couche inférieure et 25% pour la couche supérieure. Il en résulte une couche globale de 15 nm d'épaisseur, valeur qui semble très élevée par rapport aux résultats de Wågberg *et al.* [Wagberg *et al.* 2008] (2 nm par bicouche). Cependant, les conditions opératoires des deux études sont relativement différentes. En effet, la cellulose utilisée par Wågberg *et al.* [Wagberg *et al.* 2008] est issue de conifères et dispersée par homogénéisation haute pression, tandis que Jean *et al.* [Jean *et al.* 2008] utilisent de la cellulose de linters de coton qui est ensuite hydrolysée par traitement acide. Les longueurs des cristaux de cellulose doivent donc être respectivement de l'ordre du micromètre et de la centaine de nanomètres. Par ailleurs, les concentrations des suspensions de cellulose sont également différentes : environ 2% en masse pour Wågberg contre plus de 5% en masse pour Jean. La quantité de cellulose déposée par Jean doit donc être plus élevée que Wågberg, ce qui conduit à des croissances différentes.

Les travaux décrits précédemment font uniquement référence à des films multicouches construits par dipping. Cranston et Gray [Cranston et Gray 2006] ont comparé la morphologie de films multicouches de cellulose de coton et de PAH construits par dipping ou par spin-coating. Les résultats de cette étude révèlent que les films obtenus par dipping, bien que relativement lisse (rugosité inférieure à 10 nm), ont une rugosité croissante avec le nombre de couches déposées (jusqu'à 9 nm pour 25 bicouches déposées). Dans le cas des constructions par spin-coating, les films ont une rugosité plus faible de l'ordre de 4,5 nm quel que soit le nombre de couches déposées. Ce comportement a déjà été observé par Cho *et al.* [Cho *et al.* 2001] sur des films multicouches de polyélectrolytes PAH/PSS et polyélectrolyte/particules inorganiques PAH/CdS (Figure 26). Par ailleurs, les films obtenus par spin-coating sont nettement plus épais que ceux obtenus par dipping : les épaisseurs par bicouches sont respectivement de 2 nm et 16 nm pour les films préparés par dipping et spin-coating. En effet, le spin-coating permet un recouvrement uniforme du support et la formation d'une monocouche complète, tandis qu'en dipping, pour la même concentration, seules quelques particules colloïdales iront s'adsorber sur le support.

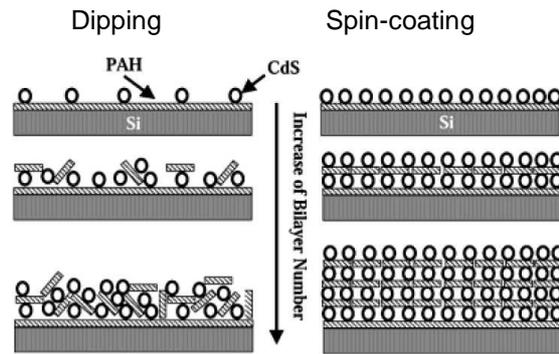


Figure 26 : Schéma de la structure interne obtenue pour des films (PAH/CdS)<sub>n</sub> préparés par dipping et spin-coating.[Cho *et al.* 2001]

### 3.3.2 Constructions via les interactions spécifiques cellulose/XG

Il a été rappelé dans les paragraphes précédents qu'il existe des interactions fortes et spécifiques entre la cellulose et le XG. Il peut donc être envisagé de créer des films multicouches entièrement composés de ressources renouvelables à partir de nanocristaux de cellulose et de XG. Jusqu'à présent, seul Jean *et al.* [Jean *et al.* 2009] ont étudié des films multicouches à base de cellulose et de XG. Ces films ont été réalisés par dipping à partir des suspensions de cellulose très concentrées (jusqu'à 7% en masse). Les films obtenus sont particulièrement lisses (rugosité de l'ordre de 4 nm) et les épaisseurs de bicouches sont comprises entre 7 et 8 nm, ce qui correspond à la formation d'une mono-couche de whiskers sur laquelle se dépose une fine couche de XG.

### 3.3.3 Obtention de films nanométriques colorés

Les films multicouches qui viennent d'être présentés ont une épaisseur comprise entre quelques dizaines et quelques centaines de nanomètres. De tels dépôts peuvent avoir des propriétés de réflexion remarquables et notamment l'apparition de couleurs peut être observée (exemple : bulle de savon ou film mince d'huile). La formation de couleurs a déjà été constatée lors de la construction de films multicouches composés de nanocristaux de cellulose [Cranston et Gray 2006; Wagberg *et al.* 2008]. Celle-ci est liée 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 lumineux réfléchis par la lame. Une partie du rayon incident de longueur d'onde  $\lambda$  est réfléchi à la première interface air-film (A), tandis que l'autre partie

du rayon est réfléchi sur la deuxième interface film-silicium (B). Les rayons réfléchis vont se superposer et interagir sous forme d'interférences lumineuses (voir figure ci dessous).

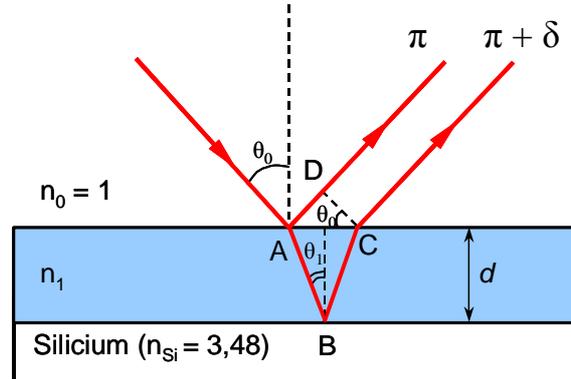


Figure 27: Schéma représentant le phénomène d'interférence lié au dépôt d'un film sur une surface réfléchissante.

Le second rayon parcourt une distance plus importante que le premier rayon car il effectue un aller-retour (différence de marche) dans le film. Ceci produit un déphasage  $\Delta\varphi$  par rapport au premier rayon qui est de  $\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \delta + \pi$ . Ce déphasage dépend de la différence de marche  $\delta$  entre les deux rayons, dont le calcul est présenté ci-dessous :

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

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

$$\delta = n_1 \left( \frac{2d}{\cos(\theta_1)} \right) - 2d \tan(\theta_1) \sin(\theta_0) n_0$$

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

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

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

$$\boxed{\delta = 2n_1 d \cos(\theta_1)}$$

Ainsi le déphasage est de  $\Delta\varphi = \frac{4\pi}{\lambda} n_1 d \cos(\theta_1) + \pi$

En incidence normale ( $\theta_1 \approx 0$ ), on obtient la relation générale :  $\Delta\varphi \approx \frac{4\pi}{\lambda} n_1 d + \pi$

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,

soit  $\Delta\varphi = 2k\pi$ ,  $k$  étant un entier (ordre d'interférence) : les franges brillantes correspondent aux épaisseurs  $d$  telles que  $n_1d = \lambda/4, 3\lambda/4, 5\lambda/4, \dots$  ;

- **destructives** si elles sont en **opposition de phase**, soit  $\Delta\varphi = (2k+1)\pi$ . 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.

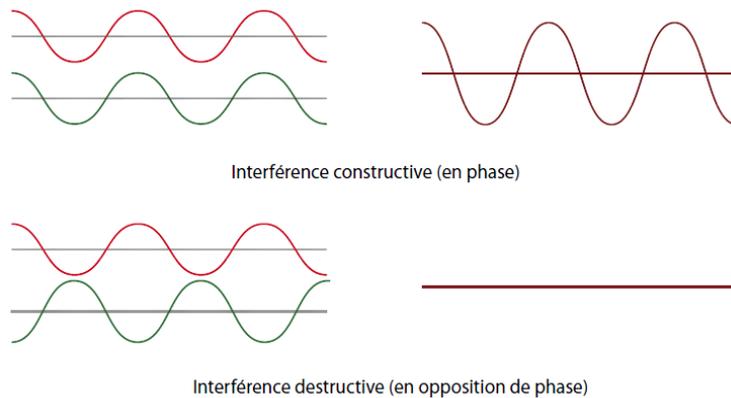


Figure 28: Principe d'interférences entre deux ondes lumineuses.

Les interférences ne sont visibles en lumière blanche que si les films minces ont une épaisseur inférieure à  $1 \mu\text{m}$ . L'épaisseur de ce film peut être mesurée par réflectométrie optique si l'indice de réfraction du film est connu. La Figure 29 présente un exemple de spectre de réflexion d'un dépôt d'oxyde de silicium  $\text{SiO}_2$  sur un support. Le spectre présente 3 maxima à 420, 510 et 660 nm qui sont le résultat des interférences constructives. Ces longueurs d'onde correspondent respectivement aux couleurs bleue, bleu-vert et rouge et dont la combinaison donne un rose. Parallèlement, le spectre présente 4 minima à 370, 450, 580 et 800 nm, longueurs d'onde pour lesquelles les interférences sont destructives.

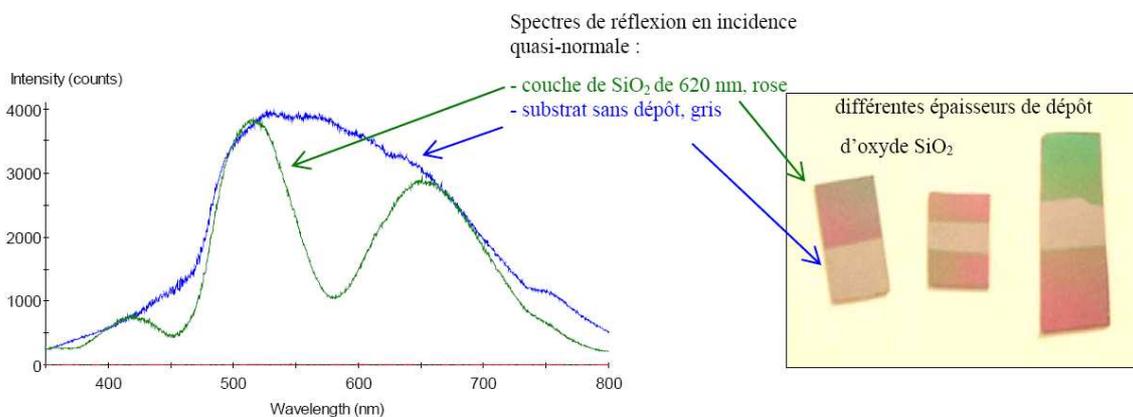


Figure 29 : Exemple de spectre de réflexion obtenu en incidence quasi-normale sur un dépôt d'oxyde  $\text{SiO}_2$ .

Cette étude bibliographique a montré l'importance du réseau cellulose-XG au sein de la paroi végétale et la complexité des interactions qui régissent leur assemblage. La spécificité de ces interactions peut être valorisée par la construction de films multicouches et l'obtention de surfaces fonctionnelles.

Nous allons donc étudier l'élaboration des films multicouches afin de réaliser des films de cellulose et de XG homogènes et colorés. L'objectif à terme est la détection de l'activité d'enzymes hydrolytiques par un changement de couleur.



**Chapitre II**  
**Elaboration des films multicouches**



De nombreux travaux ont montré que la cellulose et le xyloglucane interagissent de manière irréversible [Stiernstedt *et al.* 2006; Ahola *et al.* 2008a] via des liaisons hydrogène [Valent et Albersheim 1974; Hayashi *et al.* 1987] et des interactions de van der Waals [Hanus et Mazeau 2006]. L'existence de ces interactions peut être mise à profit pour l'élaboration de films multicouches nanométriques. Dans l'objectif de former des films colorés, nous avons étudié la construction de tels films composés de nanocristaux de cellulose de coton et de xyloglucane issu de graines de tamarin.

Ce chapitre présente l'étude de différents paramètres qui permettent ou non la réalisation de films multicouches de cellulose-XG. L'influence de la méthode de dépôt et l'effet de la concentration des solutions et de la structure des briques élémentaires sur la construction seront abordés dans cette partie.

## **1 Caractérisation des briques élémentaires**

### **1.1 Caractérisation des nanocristaux de cellulose de coton**

Nous avons choisi le coton comme source de cellulose pour la réalisation de films multicouches modèles de la paroi primaire. Bien que le bois soit la principale source de cellulose, l'extraction de celle-ci est relativement difficile et nécessite de nombreuses purifications. La cellulose de coton est au contraire très pure [Meinert et Delmer 1977] et donc plus facilement accessible. De plus, il existe beaucoup d'exemples d'études réalisées à partir de cellulose de coton [Dong *et al.* 1998; Nishiyama *et al.* 2003a; Montanari *et al.* 2005; Beck-Candanedo *et al.* 2006; Cranston et Gray 2006; Beck-Candanedo *et al.* 2007; Cranston et Gray 2008; Elazzouzi-Hafraoui *et al.* 2008; Jean *et al.* 2008; Jean *et al.* 2009] ce qui nous permettra de pouvoir comparer aisément nos travaux.

La cellulose est un matériau fibreux insoluble dans l'eau et ne peut donc pas être utilisée en l'état. Néanmoins, des suspensions stables de cellulose peuvent être obtenues par hydrolyse acide de la cellulose. Nous avons utilisé des nanocristaux de cellulose issus de l'hydrolyse par acide sulfurique de cellulose de coton. Par ailleurs, l'hydrolyse de la cellulose par l'acide sulfurique introduit des charges à sa surface qui ne semblent pas avoir d'influence sur les interactions cellulose-XG [Jean *et al.* 2009; Lopez *et al.* 2010]. Nous avons vu dans le chapitre précédent que les conditions opératoires d'hydrolyse acide ont une influence sur la morphologie finale des nanocristaux et sur leur densité de charge de surface. Par conséquent, il est important de caractériser les nanocristaux que nous avons obtenus en déterminant ces paramètres.

### 1.1.1 Observation des nanocristaux par MET

La Figure 30 montre deux micrographies de nanocristaux de cellulose de coton colorés négativement à l'acétate d'uranyle. Les nanocristaux ont une forme de bâtonnet dont la longueur est estimée visuellement de l'ordre de 100 à 400 nm et la section de 5 à 10 nm lorsqu'ils sont individualisés et jusqu'à 30 nm dans le cas d'agrégats.

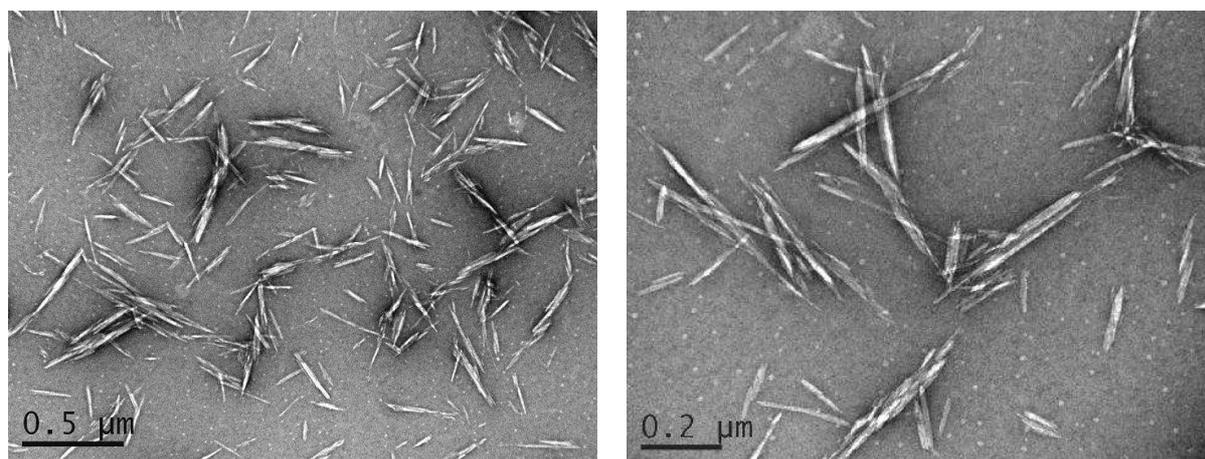


Figure 30 : Micrographies MET de nanocristaux de cellulose de coton préparés par hydrolyse acide (50%  $H_2SO_4$ ) à 70°C.

La longueur d'environ 400 nanocristaux a été mesurée à partir d'une vingtaine de clichés et en utilisant le logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). L'histogramme de distribution en longueur de la Figure 31 est obtenu à partir de ces mesures.

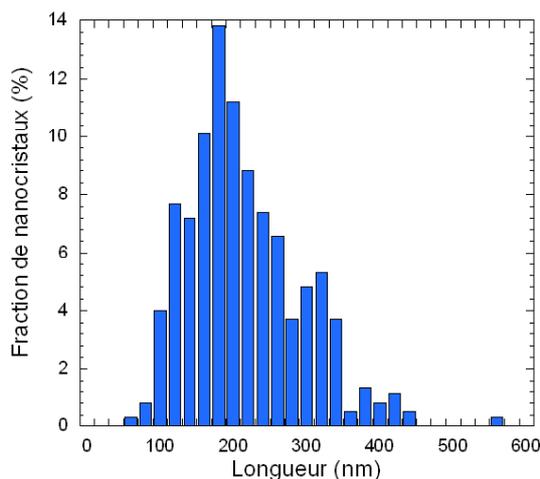


Figure 31 : Histogramme de distribution en longueur des nanocristaux de cellulose, obtenu à partir de mesure de longueurs sur des micrographies MET.

L'histogramme est étendu et les longueurs des nanocristaux sont principalement comprises entre 100 et 400 nm. A partir de ces données, il est possible d'extraire des valeurs

de longueurs pondérées. Ainsi, la longueur moyenne en nombre  $L_n$ , la longueur moyenne en longueur  $L_L$  et l'indice de polydispersité  $I_p$  associé sont déterminés selon les relations suivantes :

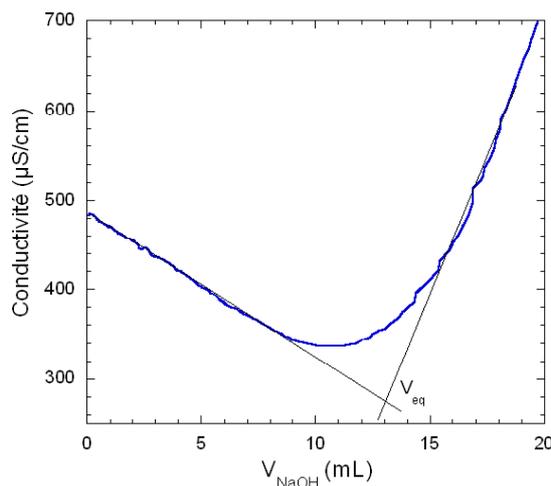
$$\overline{L_n} = \frac{\sum_i n_i L_i}{\sum_i n_i} \quad ; \quad \overline{L_L} = \frac{\sum_i n_i L_i^2}{\sum_i n_i L_i} \quad ; \quad I_p = \frac{\overline{L_L}}{\overline{L_n}}$$

Les nanocristaux de cellulose de coton ont respectivement des valeurs de  $L_n$  et  $L_L$  de 215 nm et 243 nm soit un indice de polydispersité de 1,13. Ces valeurs sont proches, bien que plus élevées, que celles de la littérature [Beck-Candanedo *et al.* 2005; Elazzouzi-Hafraoui *et al.* 2008; Elazzouzi-Hafraoui *et al.* 2009] qui donne des longueurs respectivement de l'ordre de 126 nm et 148 nm ( $I_p = 1,17$ ). Ces différences sont dues principalement au fait que la concentration en acide sulfurique est plus élevée (65% en volume) que celle que nous avons choisie (50% en volume). Cependant, l'indice de polydispersité est faible et du même ordre de grandeur que ceux de la littérature [Elazzouzi-Hafraoui *et al.* 2008]. Les nanocristaux de cellulose que nous avons obtenus sont donc relativement monodisperses. Nishiyama *et al.* [Nishiyama *et al.* 2003a] ont montré que la cellulose issue de la ramie présente des défauts disposés régulièrement : 4 à 5 résidus sont désordonnés tous les 150 nm. Il est probable que le même phénomène se produise pour les fibres de coton. Ainsi, la distribution régulière des zones désordonnées le long des microfibrilles induit la formation de nanocristaux de taille homogène après hydrolyse acide.

### 1.1.2 Détermination de la densité de charge de surface des nanocristaux

Le degré de substitution  $d_s$  des suspensions de nanocristaux de cellulose, soit la quantité de groupements sulfates par unité glucose, est déterminé par dosage conductimétrique (Figure 32).

A partir de ces données, la quantité de charges par unité de surface a été estimée. Le degré de substitution  $d_s$  est de 0,26% d'après la relation donnée dans le chapitre VI. En connaissant les dimensions (longueur et section) des nanocristaux et de la maille cristalline de la cellulose, il est possible de calculer le nombre de glucoses de surface et donc le  $d_s$  de surface [Goussé *et al.* 2002]. Ces données permettent également de calculer l'aire d'un cristal, pour finalement déterminer le nombre de charges par  $\text{nm}^2$ .



**Figure 32 : Courbe de dosage conductimétrique d'une suspension de nanocristaux de cellulose de papier coton Whatman par une solution de NaOH.**

Ainsi, le taux de charges des nanocristaux est de l'ordre de  $0,04 \text{ e/nm}^2$  soit 350 charges par cristallite. Cette valeur est environ 10 fois inférieure aux valeurs données dans la littérature [Cranston et Gray 2006; Jean *et al.* 2008]. Ceci est probablement lié à la différence de concentration en acide utilisée pour l'hydrolyse [Revol *et al.* 1994] ainsi qu'à une différence de rapport cellulose/acide. Malgré cette valeur faible, les suspensions de nanocristaux de cellulose obtenues sont stables.

## 1.2 Caractérisation physico-chimique du XG

### 1.2.1 Détermination des masses molaires moyennes

Le XG que nous avons utilisé est issu de graines de tamarin et a été purifié dans le cadre de la thèse de Virginie Silvestre (2004). L'analyse de la composition en oses a également été réalisée et révèle que le XG est non-fucosylé et constitué d'unités D-galactose, D-xylose et D-glucose dans un rapport molaire donné à 1:2:3. Ceci est en accord avec les données de la littérature [Gidley *et al.* 1991] qui rapportent des ratios de l'ordre de 1:2,25-3:2,8-3. Par ailleurs, le XG de tamarin est un XG de réserve et possède donc, a priori, une masse molaire  $\overline{M}_w$  élevée. Celle-ci a été déterminée par couplage HPSEC-MALLS (Figure 33) et sa valeur est de l'ordre de  $670\,000 \text{ g.mol}^{-1}$  avec un indice de polydispersité  $I_p = 1,7$ . Le couplage de la HPSEC avec des mesures viscosimétriques a permis d'estimer leur rayon de giration de  $51 \pm 4 \text{ nm}$ . Ces valeurs sont semblables à celles déterminées par Freitas *et al.* [Freitas *et al.* 2005].

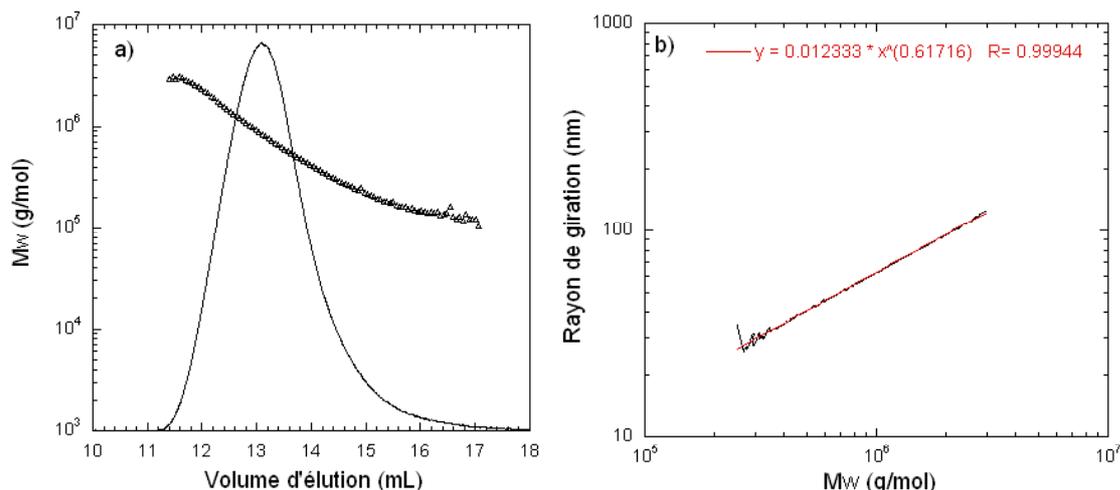


Figure 33 : Distribution de la masse molaire moyenne du XG en fonction du volume d'élution.

### 1.2.2 Régimes de concentration du XG

De manière générale, une solution diluée de polymère est constituée de chaînes isolées dans un solvant. En augmentant progressivement la concentration de polymère, il existe une concentration critique à partir de laquelle intervient le recouvrement (ou enchevêtrement) des chaînes macromoléculaires [Graessley 1980]. Cet enchevêtrement influence la viscosité de la solution [Graessley 1980] et peut avoir un impact sur l'adsorption des polymères. La détermination des régimes de concentrations est donc importante pour déterminer son impact sur l'élaboration de films multicouches.

Par conséquent, nous avons évalué les concentrations limites des différents régimes en déterminant la viscosité de solutions à 20°C pour des concentrations comprises entre  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  et  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . Pour cela, nous avons représenté le logarithme de la viscosité spécifique  $\log(\eta_{sp})$  en fonction du logarithme de la concentration réduite  $\log(C[\eta])$  (Figure 34).

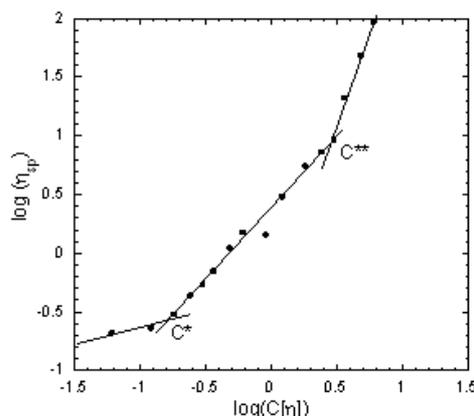


Figure 34 : Représentation du logarithme de la viscosité spécifique  $\log(\eta_{sp})$  en fonction du logarithme de la concentration réduite  $\log(C[\eta])$ .

La tendance de la courbe est similaire à celle déjà observée pour le XG par Gidley *et al.* [Gidley *et al.* 1991] et Ren *et al.* [Ren *et al.* 2004] ainsi que pour d'autres polysaccharides [Ren *et al.* 2003]. La courbe révèle deux ruptures de pente qui sont chacune caractéristiques d'une transition de régime. La première pente ne peut pas être déterminée avec précision car le nombre de points est insuffisant. En revanche, la deuxième pente a été calculée et vaut 1,21 ce qui correspond au régime semi-dilué. Par conséquent, la première rupture représentée par  $C^*$  correspond à la limite entre le régime dilué et le régime semi-dilué non-enchevêtré. La valeur de  $C^*$  est comprise entre 0,2 et 0,3  $\text{g.L}^{-1}$ . La dernière pente a été calculée à une valeur de 3,26 qui est caractéristique du régime semi-dilué enchevêtré. Ainsi, la deuxième rupture correspond à la transition entre le régime semi-dilué non-enchevêtré et le régime semi-dilué enchevêtré. La concentration  $C^{**}$  associée est de 4,6  $\text{g.L}^{-1}$ . Bien que les valeurs des concentrations critiques ne soient pas strictement identiques, l'allure observée est comparable à celle décrite par Gidley *et al.* [Gidley *et al.* 1991] pour le xyloglucane issu de graines de tamarin.

Afin d'évaluer l'effet de la concentration en XG sur l'organisation des films multicouches, nous avons choisi 4 concentrations qui représentent les deux domaines d'enchevêtrements des chaînes macromoléculaires :

- 0,5  $\text{g.L}^{-1}$  proche de  $C^*$  ;
- 1  $\text{g.L}^{-1}$  correspondant au régime semi-dilué ( $C^* < C < C^{**}$ ) ;
- 5  $\text{g.L}^{-1}$  proche de  $C^{**}$  ;
- 10  $\text{g.L}^{-1}$  appartenant au régime semi-dilué enchevêtré ( $C \gg C^{**}$ ).

### **1.3 Cinétique d'adsorption du XG sur une couche de nanocristaux de cellulose**

Le régime de concentration du XG pourrait avoir une influence sur sa manière de s'adsorber sur la cellulose. L'adsorption des XG sur la cellulose a été très étudiée [Hayashi *et al.* 1987; Hayashi *et al.* 1994b; Vincken *et al.* 1995; Ahola *et al.* 2008a] et est connue pour être un processus quasi-infini avec des réarrangements perpétuels. Une cinétique d'adsorption aussi longue est incompatible avec la réalisation de films multicouches. Il est donc important d'évaluer cette cinétique pour déterminer le temps d'adsorption à utiliser en pratique pour l'élaboration des films multicouches.

La cinétique d'adsorption a été suivie par microbalance à cristal de quartz (RQCM de Maxtek) dont le principe est exposé au chapitre VI. Une couche de nanocristaux de cellulose ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) est déposée sur la surface du quartz par spin-coating. Le quartz est ensuite installé dans la cellule de mesure puis immergé dans l'eau déionisée thermostatée. En milieu aqueux, les nanocristaux de cellulose vont adsorber des molécules d'eau et ce phénomène va avoir un impact sur le signal de fréquence. Il est nécessaire d'attendre que la surface soit à l'équilibre dans le solvant avant de commencer la mesure. Une fois que le ligne de base est stable, la surface de cellulose est mise en contact avec la solution de XG puis le signal en fréquence  $\Delta F$  est enregistré en continu. L'adsorption a été analysée pour les quatre concentrations de XG choisies initialement ( $0,5$  ;  $1$  ;  $5$  et  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ).

La Figure 35 représente la variation de fréquence ( $\Delta F$ ) en fonction du temps. La diminution en fréquence observée est d'autant plus importante que la concentration de XG est élevée. En première approximation, cette diminution peut être due à la quantité de XG adsorbé à la surface sur quartz. Selon le régime de concentration du XG (et donc du niveau d'enchevêtrement des chaînes), des chaînes isolées ou des agrégats plus ou moins importants peuvent se déposer sur la surface. Ainsi, les quantités de matière déposée doivent augmenter avec la concentration de XG. Cependant,  $\Delta F$  n'est pas seulement reliée à la quantité de matière adsorbée sur le quartz mais aussi à la viscosité de la solution. N'ayant pas d'informations sur le facteur de dissipation avec le type d'instrument utilisé, il est difficile de dissocier la contribution de la quantité de matière effectivement adsorbée sur le quartz de la contribution de la viscosité de la solution.

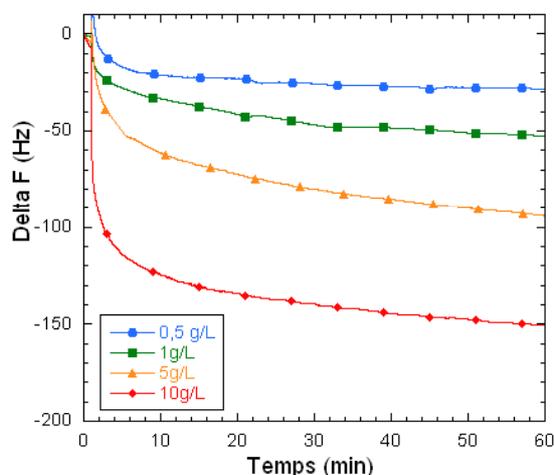


Figure 35 : Cinétique d'adsorption du XG sur une monocouche de nanocristaux de cellulose suivie par QCM pour 4 concentrations de XG :  $0,5 \text{ g/L}$  ;  $1 \text{ g/L}$  ;  $5 \text{ g/L}$  et  $10 \text{ g/L}$ . ( $T = 21^\circ\text{C}$ )

$\Delta F$  diminue fortement pendant les cinq premières minutes pour les quatre concentrations de XG, puis diminue plus doucement sans atteindre de plateau au bout de 24 heures. Ceci pourrait être dû à un réarrangement permanent des chaînes de XG entre la surface de cellulose et le milieu aqueux et l'équilibre ne serait donc jamais atteint. Un tel comportement a aussi été observé par Ahola *et al.* [Ahola *et al.* 2008a] lors de l'étude de l'adsorption du XG sur de la cellulose nano-fibrillaire par QCM-D et par résonance plasmonique de surface. D'un point de vue pratique, il est impossible d'atteindre l'équilibre total d'adsorption dans un temps compatible avec la fabrication de films multicouches. Par conséquent, un temps d'adsorption minimum de 5 minutes, correspondant à l'évolution la plus importante du signal du XG, est choisi pour l'élaboration des films multicouches C-XG.

#### **1.4 Conclusion**

Nous venons de caractériser des nanocristaux de cellulose de coton et du XG issu de graines de tamarin, composés qui vont être utilisés pour l'élaboration de films multicouches. Leurs propriétés en solution et la caractérisation de leurs interactions sont donc des critères importants.

Les nanocristaux de cellulose utilisés ont une longueur moyenne de 243 nm ( $I_p = 1,13$ ) et une section comprise entre 5 et 30 nm. La quantité de charges de surface a été déterminée à  $0,04 \text{ e/nm}^2$ .

Le XG possède une masse molaire moyenne de l'ordre de  $670000 \text{ g.mol}^{-1}$  et un indice de polydispersité de 1,7. Les concentrations critiques, qui caractérisent les régimes de concentration d'un polymère, sont de l'ordre de  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$  pour  $C^*$  (limite entre le régime dilué et le régime semi-dilué non-enchevêtré) et de  $4,6 \text{ g.L}^{-1}$  pour  $C^{**}$  (limite entre le régime semi-dilué non-enchevêtré et le régime semi-dilué enchevêtré).

Enfin, l'analyse des interactions de ces deux composés a permis de déterminer qu'un temps d'adsorption de 5 minutes minimum est nécessaire pour la réalisation des films multicouches.

## 2 Etude de la croissance des films

### 2.1 Stratégies retenues pour la construction des films.

L'objectif de ce chapitre est de déterminer les conditions opératoires qui permettent d'obtenir des films de C-XG d'épaisseur telle que l'apparition de couleurs puisse être observée. Ces films permettront la détection d'activité enzymatique par modification de l'épaisseur de la couche, et donc variation de couleur. Au-delà de l'obtention de ces films, cette étude nous permettra également d'obtenir des éléments de compréhension des règles de construction d'assemblages constitués de cellulose et de xyloglucane. Ces éléments seront discutés également par rapport à la construction de la paroi végétale.

Nous avons choisi deux méthodes d'élaboration des films multicouches nanométriques par l'intermédiaire de deux stratégies (Figure 36) :

- La première stratégie est analogue à la méthode de Layer-by-Layer (LbL) proposé par Decher *et al.* [Decher 1997] puisqu'elle consiste à déposer alternativement des polymères pouvant établir des interactions entre eux. Contrairement à la majorité des travaux de la littérature, les interactions mises en jeu ici sont à la fois de type hydrogène et Van der Waals, ce qui constitue en soi une originalité. Cette méthode conduira donc dans l'idéal à des films présentant des couches alternées de chaque constituant. Nous utiliserons à la fois les méthodes de dépôts par trempage et spin-coating. Dans chaque cas, nous évaluerons l'effet de différents paramètres sur la construction tel que l'effet du rinçage, de la concentration du XG et de la cellulose. Dans le cas du trempage, l'influence du séchage sera également évaluée.
- La seconde méthode utilisée est plus atypique. Elle s'appuie sur la particularité des nanocristaux de cellulose qui peuvent d'une part établir des interactions hydrogène et Van der Waals avec le xyloglucane et d'autre part interagir par des liaisons électrostatiques avec des polycations. Nous déposerons par spin-coating un mélange des deux biopolymères C/XG qui pourra former lors du séchage une couche stable. Sur cette couche pourra alors être déposée une couche d'un polycation (PAH) qui interagira avec les charges portées par les nanocristaux. Cette nouvelle couche servira alors de base au dépôt d'une nouvelle couche de mélange C/XG.

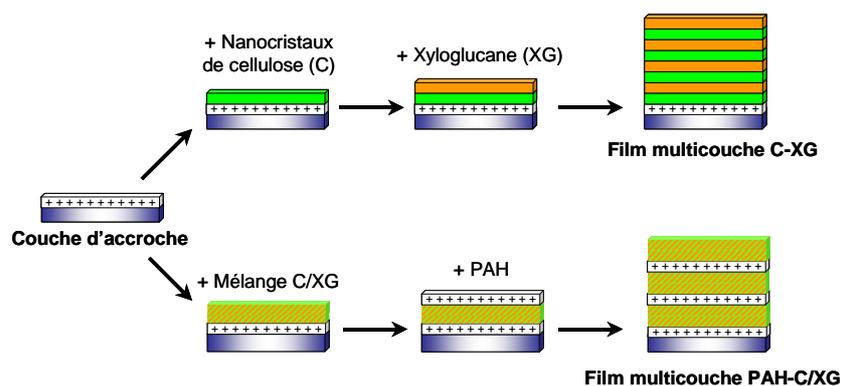


Figure 36 : Schéma représentant les deux types de constructions étudiées :  $(C-XG)_n$  et  $(PAH-C/XG)_n$ .

En utilisant ces deux stratégies, nous souhaitons à la fois obtenir des films ayant des épaisseurs permettant l'apparition de couleur(s) mais également faire varier la structure interne des films pour moduler et optimiser la dégradation enzymatique et donc sa détection.

## 2.2 Construction des films par trempage

Pour nommer de façon claire les différents échantillons, nous avons établi la nomenclature suivante :  $(XC_1-YC_2)_n$  avec X le premier composé déposé à la concentration  $C_1$  (en  $g.L^{-1}$ ), Y le deuxième composé déposé à la concentration  $C_2$  (en  $g.L^{-1}$ ) et n le nombre de bicouches déposées. Ainsi un échantillon composé de 4 bicouches de cellulose à  $5 g.L^{-1}$  alterné avec du XG à  $1 g.L^{-1}$  sera noté  $(C5-XG1)_4$ .

Parmi les différents procédés utilisés pour les constructions LbL, le trempage ou « dipping » est celui qui est le plus répandu. Cette méthode, simple à mettre en œuvre, consiste à immerger un support successivement dans deux solutions de réactifs (dans la plupart des cas, ce sont des polymères) capables d'interagir. Des films multicouches ont déjà été réalisés à partir de nanocristaux de cellulose et de polycations [Podsiadlo *et al.* 2005; Cranston et Gray 2006; Podsiadlo *et al.* 2007; Jean *et al.* 2008; Wagberg *et al.* 2008; Aulin *et al.* 2010]. Dans la technique LbL, les différentes phases d'adsorption des polymères sont séparées par des étapes de rinçage afin d'éliminer les polymères faiblement adsorbés. Ces phases sont classiquement mises en œuvre dans le cas des systèmes polyélectrolytes. Ces systèmes sont très différents de celui étudié dans ce travail de part les interactions mises en jeu. Par ailleurs, les nanocristaux de cellulose constituent des particules colloïdales et, à ce titre, ont des comportements différents des polymères. De plus, Shim *et al.* [Shim *et al.* 2007] ont montré qu'il est possible de s'affranchir des étapes de rinçage tout en améliorant

l'organisation latérale des films, notamment lorsque celui-ci contient des particules colloïdales.

Nous nous sommes donc intéressés à l'influence des étapes de rinçage sur la construction des films multicouches, puis nous étudierons l'influence d'étapes de séchage intermédiaires du film, afin d'optimiser les films C-XG.

### **2.2.1 Influence du rinçage et de la concentration en XG**

Afin d'évaluer l'effet du rinçage et de la concentration en XG sur la construction des films multicouches, des échantillons composés de 8 bicouches ont été réalisés à partir de solutions de XG à 0,5, 1, 5 et 10 g.L<sup>-1</sup> et de suspension de nanocristaux de cellulose à 1 g.L<sup>-1</sup>. Nous nous sommes placés dans les conditions utilisées classiquement pour l'élaboration d'un film multicouche par dipping. Chaque étape d'adsorption a donc été fixée à 10 minutes pour les deux composés. La réalisation de chaque échantillon se termine par un rinçage dans l'eau déionisée et séchage sous flux de N<sub>2</sub>. Pour les expériences qui incluent des étapes intermédiaires de rinçage, celles-ci sont réalisées par trempages multiples dans des bains d'eau déionisée. Les épaisseurs des échantillons ont été mesurées par profilométrie mécanique et leurs valeurs sont répertoriées dans le Tableau 4.

Méthode de préparation	Dipping sans rinçage		Dipping avec rinçage	
	Epaisseur (nm)	Extrapolation Epaisseur par bicouche (nm)	Epaisseur (nm)	Extrapolation Epaisseur par bicouche (nm)
C <sub>XG</sub> (g.L <sup>-1</sup> )				
0,5	Non mesurable	Non mesurable	Non mesurable	Non mesurable
1	Non mesurable	Non mesurable	Non mesurable	Non mesurable
5	9,4	1,2	11,8 ± 1,0	1,5
10	10,6 ± 1,3	1,3	9,4 ± 0,1	1,2

**Tableau 4 : Epaisseurs des films obtenues après le dépôt de 8 bicouches et épaisseurs par bicouche associée pour les deux procédures de dipping et selon la concentration en XG (C<sub>XG</sub>). La concentration en cellulose est fixée à 1 g.L<sup>-1</sup>. L'épaisseur par bicouche est extrapolée en divisant l'épaisseur mesurée par 8.**

Dans le cas des échantillons C1-XG0,5 et C1-XG1 réalisés avec ou sans rinçage, les épaisseurs n'ont pas pu être déterminées par profilométrie mécanique. La résolution de l'appareil étant de 5 nm, les films, s'ils existent, sont plus fins que la limite de détection. Lorsque la concentration en XG est plus élevée, l'épaisseur des échantillons est de l'ordre de 10 nm. Sachant que la section des nanocristaux de cellulose de coton est de l'ordre de 5 à 8 nm et en considérant une couche de XG de 2 à 3 nm, une épaisseur de l'ordre de 56 à 88 nm est attendue pour un film composé de 8 bicouches C-XG. Les épaisseurs obtenues sont très

inférieures à ces valeurs et pourraient correspondre à l'épaisseur d'une bicouche de cellulose-XG. Cependant, les films les plus épais ont été obtenus à partir des solutions de XG en régime concentré. Il est possible que ces films soient constitués d'une couche de XG dans lequel quelques nanocristaux de cellulose sont présents.

Ces résultats semblent contradictoires avec ceux obtenus par Jean *et al.* [Jean *et al.* 2009] qui obtiennent une épaisseur de 7 à 8 nm par bicouche déposée. Bien que les caractéristiques physico-chimiques de la cellulose et du XG utilisés puissent influencer leurs interactions, la principale différence entre les conditions opératoires réside dans la concentration de cellulose employée. En effet, Jean *et al.* [Jean *et al.* 2009] utilisent une concentration de nanocristaux de cellulose de l'ordre de  $70 \text{ g.L}^{-1}$ , bien plus élevée que celle que nous avons choisie ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ). Par ailleurs, la concentration de XG choisie par Jean *et al.* [Jean *et al.* 2009] est de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , ce qui correspond à un régime dilué (ou semi-dilué). Ces conditions sont très différentes de celles que nous avons utilisées.

De plus, Cranston *et al.* [Cranston et Gray 2006] ont obtenu une croissance similaire (2 nm par bicouche) pour des films composés de nanocristaux de cellulose et de PAH réalisés par dipping, observant le comportement déjà décrit par Cho *et al.* [Cho *et al.* 2001]. Ainsi, la concentration en cellulose et plus particulièrement le rapport de concentration C:XG doit avoir un impact sur la réalisation des films multicouches. Ce point sera abordé dans le paragraphe 2.3.2.

Etant donné les résultats obtenus, les dépôts réalisés ne sont pas constitués de monocouches alternées de C-XG. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à l'influence de l'étape de rinçage avec cette procédure de dipping.

### **2.2.2 Influence du séchage**

Le séchage intermédiaire des couches avant une nouvelle étape d'adsorption peut avoir un effet sur la construction des films en permettant un réarrangement structural dans le cas des polyélectrolytes [Cochin et Laschewsky 1999]. Dans le cas du système C-XG, le réseau de liaisons hydrogène peut notamment être renforcé par le phénomène d'hornification. Il est donc possible que le séchage entraîne la formation d'interactions irréversibles au sein du réseau nanocristaux de cellulose/xyloglucane. L'effondrement des chaînes de polymères lié au séchage vient par la suite bloquer les interactions avec les couches suivantes. L'effet du séchage a été étudié sur l'échantillon C1-XG5 construit suivant le procédé de dipping avec étape de rinçage entre chaque couche.

Les mesures réalisées par profilométrie mécanique révèlent que sans étape de séchage, il n'est pas possible de mesurer les épaisseurs des échantillons contenant moins de 8 bicouches. Dans ces conditions de concentration, la méthode de trempage avec rinçage et séchage conduit à des épaisseurs de 11,8 nm (Tableau 4). Ces valeurs ne correspondent pas à l'épaisseur attendue pour un film multicouche de 8 bicouches C-XG. L'étape de séchage n'améliore donc pas la croissance des films. Pour mémoire, Jean *et al.* [Jean *et al.* 2009] parviennent à obtenir des films pour lesquels chaque bicouche mesure environ 8 nm en utilisant des concentrations de nanocristaux plus élevées.

### **2.2.3 Conclusion**

Des dépôts de nanocristaux de cellulose ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) et de XG ont été réalisés en dipping, pour 4 concentrations de XG, couvrant deux régimes de concentrations (semi-dilué et semi-dilué enchevêtré). Les résultats obtenus montrent qu'en régime dilué de XG, aucune épaisseur n'a pu être mesurée. Lorsque la concentration en XG est plus forte (régime semi-dilué enchevêtré), une épaisseur de 10 nm est obtenue pour 8 cycles de dépôts. Cette épaisseur est identique avec ou sans rinçage intermédiaire. Les films obtenus par dipping sont donc beaucoup trop fins pour être constitués de monocouches alternées de nanocristaux de cellulose et de XG. Par conséquent, le dipping n'est pas approprié pour la construction des films multicouches C-XG dans les conditions de concentration que nous utilisons. Nous nous sommes donc intéressés à une autre méthode utilisée pour la réalisation de films multicouches : le spin-coating.

## **2.3 Construction des films par spin-coating**

Le spin-coating est une autre méthode classique pour l'élaboration de films fins à partir de substances dissoutes ou dispersées en solution. Cette technique est également largement utilisée pour l'obtention de films fins multicouches [Cho *et al.* 2001; Lee *et al.* 2001; Lee *et al.* 2003; Cranston et Gray 2006; Patel *et al.* 2007; Cranston et Gray 2008; Kim *et al.* 2008] et permet d'obtenir des films plus épais que par dipping [Cho *et al.* 2001], notamment dans le cas de films Cellulose-PAH [Cranston et Gray 2006]. Cette méthode semble bien adaptée pour l'obtention des dépôts de C-XG plus épais qu'en dipping.

Jusqu'à présent, il n'existe aucune étude dans la littérature sur la formation de multicouches C-XG par spin-coating. Nous abordons ici l'influence du rinçage qui nous paraît être un des paramètres clés pour la construction des films multicouches par spin-coating.

Contrairement au dipping nous n’aborderons pas l’influence du séchage, puisque l’utilisation du procédé de spin-coating implique par essence le séchage de chaque dépôt.

### **2.3.1 Influence de la concentration en XG et du rinçage**

Des échantillons composés de 8 bicouches, équivalents à ceux réalisés en dipping, ont été réalisés par spin-coating à 3600 rpm avec ou sans étapes de rinçage pour les quatre concentrations de XG choisies. Le Tableau 5 répertorie les épaisseurs mesurées pour les 8 échantillons.

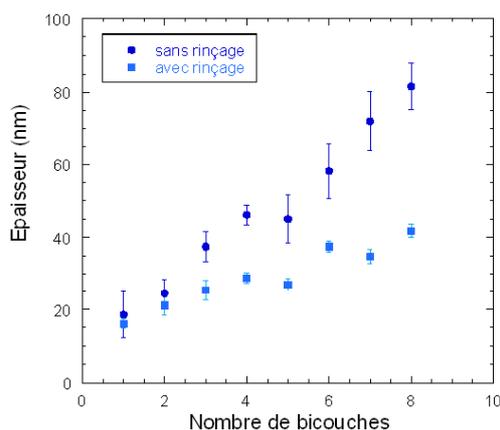
Méthode de préparation	Spin-coating sans rinçage		Spin-coating avec rinçage	
$C_{XG}$ (g.L <sup>-1</sup> )	Epaisseur (nm)	Extrapolation Epaisseur par bicouche (nm)	Epaisseur (nm)	Extrapolation Epaisseur par bicouche (nm)
0,5	85,6 ± 2,1	10,6	27,5 ± 3,5	3,4
1	81,5 ± 6,4	10,2	41,8 ± 1,9	5,1
5	20,2 ± 3,6	2,5	30,9 ± 1,4	3,9
10	94,0 ± 2,2	11,8	43,6 ± 14,3	5,3

**Tableau 5 : Epaisseurs des films obtenus après le dépôt de 8 bicouches et épaisseurs par bicouche associée pour les deux procédures de spin-coating (3600 rpm) et selon la concentration en XG ( $C_{XG}$ ). La concentration en cellulose est fixée à 1 g/L. L’épaisseur par bicouche est extrapolée en divisant l’épaisseur mesurée par 8.**

Quelle que soit la concentration de xyloglucane utilisée, les valeurs d’épaisseurs obtenues par spin-coating avec rinçage varient peu (27 à 44 nm). Elles sont de façon générale inférieures à celles obtenues par spin-coating sans rinçage (81 à 94 nm). Il existe cependant une exception : l’échantillon (C1-XG5)<sub>8</sub> a une épaisseur plus élevée avec la méthode de spin-coating avec rinçage (30,9 nm) que sans rinçage (20,2 nm). Les épaisseurs obtenues par spin coating sans rinçage pour les concentrations 0,5, 1 et 10 g/L sont compatibles avec celles attendues pour un film composé de 8 monocouches de nanocristaux de cellulose recouvertes de XG. De plus, la concentration en XG ne semble pas avoir d’influence (sauf dans le cas de  $C_{XG} = 5$  g.L<sup>-1</sup>) ; celle-ci sera étudiée dans le paragraphe suivant.

Toutefois, les résultats obtenus sont surprenants puisque l’étape de rinçage n’améliore pas la construction des films et la rend même difficile, contrairement à l’immense majorité des travaux menés sur les films multicouches. Afin de confirmer ce résultat, la croissance des échantillons C1-XG1 a été étudiée de 1 à 8 bicouches (Figure 37) pour évaluer l’impact du rinçage en spin-coating. Il apparaît que la croissance est linéaire pour les constructions sans rinçage avec une pente de 8,8 nm. Dans le cas des échantillons réalisés avec rinçage, l’allure de la courbe est plus ambiguë. En effet, elle semble linéaire avec une pente de 3,4 nm ce qui

est une dimension inférieure à l'épaisseur de nanocristaux, mais un plateau pourrait être atteint entre 6 et 8 bicouches déposées. De plus, l'épaisseur de la première bicouche est identique avec ou sans étape de rinçage. Ceci peut être dû à la présence de la couche d'accroche composée de polycation (PLL) qui va maintenir la couche de cellulose à la surface via des interactions électrostatiques. Toutefois, la courbe de croissance de 1 à 8 bicouches confirme bien les premiers résultats indiquant que l'étape de rinçage inhibe la croissance du film alors que celle-ci est observée en l'absence d'étapes de rinçage.



**Figure 37 : Croissance des échantillons C1-XG1 par spin-coating (3600 rpm) avec ou sans rinçage.**

Etant donné la diminution importante des épaisseurs et sachant que les nanocristaux de cellulose sont les principaux contributeurs à l'épaisseur du film, on peut supposer que l'étape de rinçage élimine une partie des nanocristaux de cellulose déposés et détruit l'homogénéité de cette couche. Ce mécanisme sera discuté ultérieurement à l'occasion d'une partie spécifiquement dédiée à cette question.

Afin d'aller plus loin dans l'étude de l'influence de la concentration de XG sur la réalisation des films, nous avons utilisé la méthode de spin-coating avec une vitesse de rotation de 3600 rpm et sans étape de rinçage. La Figure 38 présente l'évolution des épaisseurs des films entre 1 et 8 bicouches pour les 4 concentrations de XG choisies (la concentration de cellulose étant fixée à 1 g.L<sup>-1</sup>).

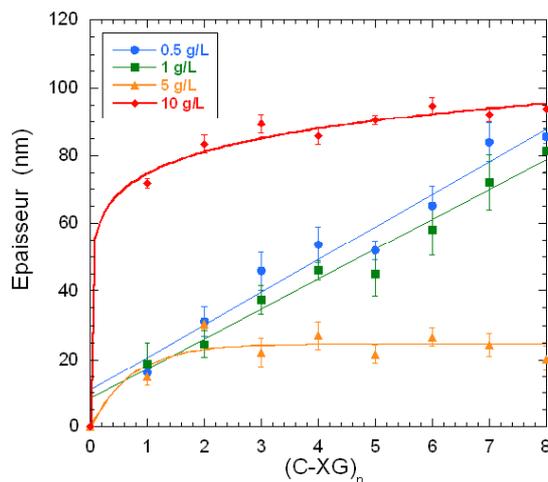


Figure 38 : Evolution de l'épaisseur des films C-XG en fonction du nombre de bicouches déposées. La concentration de cellulose est fixée à  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . 4 concentrations de XG sont testées : (●)  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  ; (■)  $1 \text{ g.L}^{-1}$  ; (▲)  $5 \text{ g.L}^{-1}$  ; (◆)  $10 \text{ g.L}^{-1}$ .

Deux types de comportement peuvent être observés : lorsque la concentration en XG est de  $5$  ou  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , l'épaisseur atteint un plateau au bout de 2 à 3 bicouches tandis qu'une croissance linéaire est observée pour  $0,5$  et  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Les valeurs plateau sont de  $25 \text{ nm}$  pour  $C_{\text{XG}} = 5 \text{ g.L}^{-1}$  et de  $90 \text{ nm}$  pour  $C_{\text{XG}} = 10 \text{ g.L}^{-1}$ . Comme la concentration en cellulose est identique dans les quatre cas, les différences de comportement sont liées à la concentration en XG et donc au régime de concentration (Figure 34) dans lequel on se situe. En effet, les plateaux sont obtenus lorsque le XG est dans le domaine enchevêtré, tandis que les croissances linéaires sont observées lorsque le XG est dans le régime semi-dilué. Ces dernières sont très similaires pour les deux concentrations de XG ( $0,5$  et  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) avec des pentes respectives de  $9,6 \text{ nm}$  et  $8,8 \text{ nm}$  pour  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  et  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Jean *et al.* [Jean *et al.* 2009] obtiennent le même ordre de grandeur d'épaisseur par bicouche déposée comprise entre  $7$  et  $8,3 \text{ nm}$  en réalisant des films C-XG par dipping avec rinçage. Ce résultat peut paraître surprenant puisque nous avons souligné que le spin-coating permettait d'obtenir des films multicouches plus épais que le dipping.

Cependant, Jean *et al.* [Jean *et al.* 2009] utilisent une suspension de cellulose très concentrée ( $70 \text{ g.L}^{-1}$ ) et un rapport de concentration C:XG de 70:1. Il est possible qu'à de telles concentrations la surface du support soit recouverte d'une monocouche de cellulose par dipping. Celle-ci pourrait être identique à celle obtenue par spin-coating avec une concentration plus faible de cellulose.

Pour conclure, des films multicouches C-XG ( $C_C = 1 \text{ g.L}^{-1}$ ) de croissance linéaire ont été obtenus par spin-coating sans rinçage uniquement lorsque le XG est dans le régime semi-dilué. Cependant, une seule concentration de cellulose a été utilisée jusqu'à présent ( $C_C = 1$

g.L<sup>-1</sup>). Nous avons donc voulu évaluer l'impact de la concentration de cellulose sur la croissance des films.

### **2.3.2 Influence de la concentration en cellulose et du rinçage**

Afin d'évaluer l'effet de la concentration de cellulose et le recouvrement de la surface, nous avons étudié la croissance des films C-XG pour deux concentrations de cellulose en intégrant ou non des étapes de rinçage. Le Tableau 6 représente les épaisseurs de films mesurées après le dépôt de 8 bicouches. A partir de cette valeur, nous avons extrapolé l'épaisseur par bicouche équivalente.

Méthode de préparation	Spin-coating sans rinçage		Spin-coating avec rinçage	
C (g.L <sup>-1</sup> )	Epaisseur (nm)	Extrapolation Epaisseur par bicouche (nm)	Epaisseur (nm)	Extrapolation Epaisseur par bicouche (nm)
1	79	9,8	38	4,8
5	141	17,6	138	17,3

**Tableau 6 : Influence de la concentration en cellulose sur la croissance des films C-XG réalisés par spin-coating (3600 rpm). La concentration de XG est fixée à 1 g.L<sup>-1</sup>.**

L'augmentation de la concentration en cellulose a deux effets évidents. En premier lieu, cette augmentation élimine l'effet du rinçage puisque dans les deux cas l'épaisseur obtenue est identique. Au contraire, le rinçage inhibe la croissance du film pour une concentration de nanocristaux de cellulose de 1 g/L (Figure 37).

Deuxièmement, l'épaisseur des bicouches déduites des épaisseurs mesurées à 8 bicouches est plus importante dans le cas de dépôts de cellulose à 5 g.L<sup>-1</sup> que lorsque la concentration de cellulose est de 1 g.L<sup>-1</sup>. L'épaisseur par bicouche est de l'ordre de 17,6 nm alors que dans le cas où la concentration de cellulose est égale 1 g.L<sup>-1</sup> et la construction réalisée sans rinçage, la pente est de 9,8 nm. En première approximation, l'épaisseur de 9,8 nm peut correspondre à une monocouche de nanocristaux similaire aux épaisseurs mesurées par Jean *et al.* [Jean *et al.* 2009] pour des films C-XG construits par dipping. En revanche la valeur de 17,6 nm est plus proche de celle obtenue par ces même auteurs pour la croissance de films de nanocristaux de cellulose et de PAH [Jean *et al.* 2008]. Dans ce cas, les dépôts sont constitués de deux couches de nanocristaux de cellulose.

Toutefois avant de conclure, il faut vérifier que les valeurs obtenues résultent d'un processus de croissance linéaire et non pas d'un dépôt atteignant une valeur plateau. Nous avons donc mesuré les épaisseurs de films composés de 1 à 8 bicouches obtenues en rinçant après chaque dépôt (Figure 39). Nous avons rapporté la croissance des films formés à partir de cellulose à 1 g.L<sup>-1</sup> et la valeur obtenue pour le film à 8 bicouches sans rinçage.

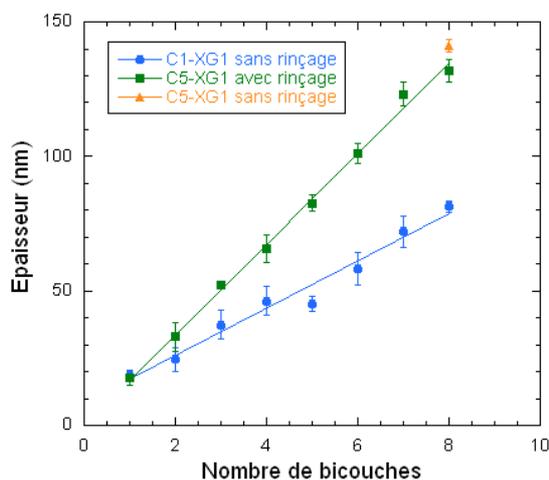


Figure 39 : Influence de la concentration en cellulose sur la croissance des films C-XG réalisés par spin-coating (3600 rpm). La concentration de XG est fixée à 1 g.L<sup>-1</sup>.

Le profil de croissance obtenu est linéaire et confirme que le rinçage n'a plus d'effet lorsque la concentration en cellulose augmente. Ce résultat est cohérent avec les propriétés lubrifiantes du XG. En effet, il semble que toutes les chaînes de XG faiblement liées à la surface soient éliminées lors de la rotation sans nécessité de rinçage.

### 2.3.3 Discussion sur l'effet du rinçage et sur les facteurs clés du mode de croissance.

L'immense majorité des films multicouches est fabriquée par un procédé incluant une étape de rinçage. Nous venons de démontrer que, dans nos conditions de travail, cette étape est inutile dans le meilleur des cas, voire néfaste à la croissance des films. Afin d'aller plus loin dans la compréhension de cette particularité, nous avons dans un premier temps essayé de déterminer si cet effet pouvait être lié à l'un ou l'autre des constituants du film. Pour cela nous avons réalisé des films constitués de 8 bicouches soit en rinçant les films après chaque dépôt, soit en rinçant le film uniquement après l'un ou l'autre des constituants. Les épaisseurs mesurées sont indiquées dans le Tableau 7. Les concentrations en cellulose sont égales à 1 ou 5 g.L<sup>-1</sup> tandis que la concentration en XG est fixée à 1 g.L<sup>-1</sup>.

	Epaisseurs (nm)	Extrapolation Epaisseur par bicouche (nm)
<b>C1<sub>R</sub>-XG1<sub>R</sub></b>	38	4,8
<b>C1<sub>SR</sub>-XG1<sub>SR</sub></b>	79	9,9
<b>C1<sub>R</sub>-XG1<sub>SR</sub></b>	36,3 ± 0,9	4,5
<b>C1<sub>SR</sub>-XG1<sub>R</sub></b>	39,9 ± 3,9	5,0
<b>C5<sub>R</sub>-XG1<sub>R</sub></b>	138	17,3
<b>C5<sub>SR</sub>-XG1<sub>SR</sub></b>	141,3 ± 2,4	17,7
<b>C5<sub>R</sub>-XG1<sub>SR</sub></b>	139,9 ± 12,3	17,5
<b>C5<sub>SR</sub>-XG1<sub>R</sub></b>	142,5 ± 3,2	17,8

**Tableau 7 : Epaisseurs des films composés de 8 bicouches construits soit introduisant une étape de rinçage après le dépôt de cellulose et de xyloglucane C<sub>R</sub>-XG<sub>R</sub>, soit après la cellulose C<sub>R</sub>-XG<sub>SR</sub>, soit après le XG (C<sub>SR</sub>-XG<sub>R</sub>) soit sans aucune étape de rinçage (C<sub>SR</sub>-XG<sub>R</sub>).**

Il faut souligner que tous les échantillons sont réalisés de façon indépendante. Les valeurs obtenues démontrent la très bonne reproductibilité de la construction. Le rinçage sélectif de l'un ou l'autre des constituants donne des résultats identiques à celui obtenu lorsque le rinçage est réalisé après chaque dépôt. Le paramètre important qui semble donc diriger la construction de l'assemblage est donc bien la concentration en cellulose.

Pour évaluer celui-ci, des images AFM ont été réalisées sur des monocouches de nanocristaux déposées par spin-coating à 3600 rpm. Les dépôts sont formés à partir de suspension de nanocristaux de cellulose à 1 ou 5 g.L<sup>-1</sup> avant et après rinçage. Avant rinçage, pour les dépôts réalisés à partir d'une suspension de nanocristaux de cellulose à 5 g.L<sup>-1</sup>, le recouvrement de la surface est presque total (96%), alors qu'il est légèrement plus faible pour le dépôt d'une suspension de nanocristaux de cellulose à 1 g.L<sup>-1</sup> (90%). Le taux de recouvrement diminue fortement (70% ) après rinçage pour le dépôt à 1 g.L<sup>-1</sup> alors qu'il reste quasiment inchangé dans le cas des solutions à 5 g.L<sup>-1</sup>. Le rinçage a donc peu d'effet sur le recouvrement de surface de la couche de cellulose à 5 g.L<sup>-1</sup> alors qu'il est critique à 1 g.L<sup>-1</sup>. On peut donc aisément imaginer que c'est ce paramètre qui est à l'origine des différences de comportement observées.

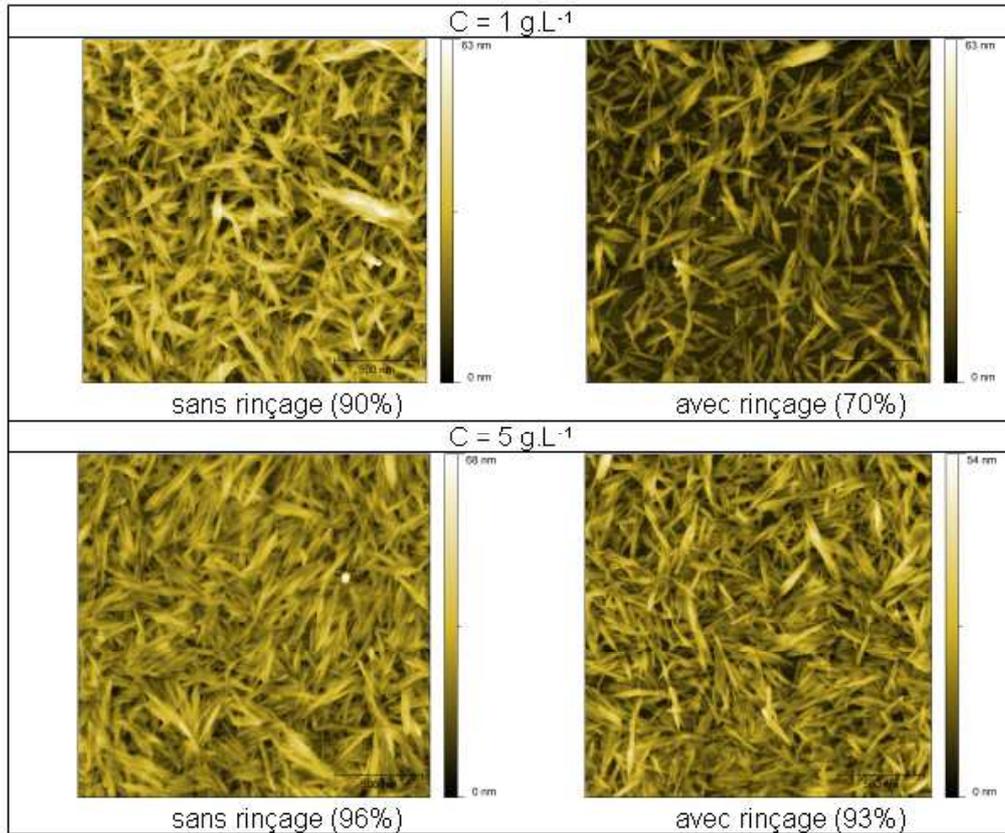


Figure 40 : Images AFM en topographie ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ) de monocouches de nanocristaux de cellulose déposées à 3600 rpm. Les monocouches sont réalisées à une concentration de 1 ou 5  $\text{g.L}^{-1}$ , avec ou sans rinçage. Le taux de recouvrement est indiqué entre parenthèses.

Le taux de recouvrement est donc essentiel à la poursuite de la croissance. La stabilité observée à 5  $\text{g.L}^{-1}$  peut être attribuée à une meilleure cohésion des nanocristaux entre eux. Toutefois, même si cet élément semble central, nous sommes encore loin d'avoir totalement appréhendé tous les éléments sous-jacents à la construction des films.

### 2.3.4 Conclusion

Les concentrations des solutions de nanocristaux de cellulose et de XG ont un rôle crucial pour l'élaboration des films multicouches. Les principales conclusions de cette partie sont que le XG doit être en régime dilué et la suspension de nanocristaux de cellulose suffisamment concentrée afin de recouvrir entièrement la surface et former ainsi une monocouche pour permettre la croissance des films C-XG.

## 2.4 Etude préliminaire sur la formation de films à base de mélange de XG et nanocristaux de cellulose

Pour rappel, notre objectif est d'élaborer des films nanométriques colorés composés de cellulose et de XG. Nous venons d'étudier la manière d'obtenir de tels films par la méthode LbL. Une seconde stratégie (Figure 36, page 62) consiste à déposer une solution composée d'un mélange de nanocristaux de cellulose et de XG en alternance avec une solution de PAH (noté (PAH-C/XG)<sub>n</sub>). Le mélange permet de réaliser des couches épaisses dont la cohésion est assurée par les interactions de Van der Waals et les liaisons hydrogène. La PAH assure la croissance des films en s'adsorbant sur la cellulose via des interactions électrostatiques. Nous présentons ici une étude préliminaire sur le mode de croissance de ces films.

Le mélange C/XG que nous avons utilisé est composé de 5 g.L<sup>-1</sup> de nanocristaux de cellulose et de 1 g.L<sup>-1</sup> de XG. L'étude de la croissance a été réalisée pour 1 à 4 bicouches et a été comparée à celle des films multicouches C-XG (Figure 41). Le rapport de concentrations C/XG est identique à celui utilisé pour les films C-XG, à savoir 5/1. La pente par bicouche est de 28 nm pour les films PAH-C5/XG1 et est donc plus élevée que dans le cas de C5-XG1 (16,8 nm). Par ailleurs, les films PAH-C5/XG1 présentent une croissance par palier, qui est essentiellement gouvernée par le dépôt de mélange de C/XG. Le dépôt de la couche de PAH contribue à l'épaisseur du film mais il est probable que cette couche permette l'accroche du dépôt de mélange C/XG suivant.

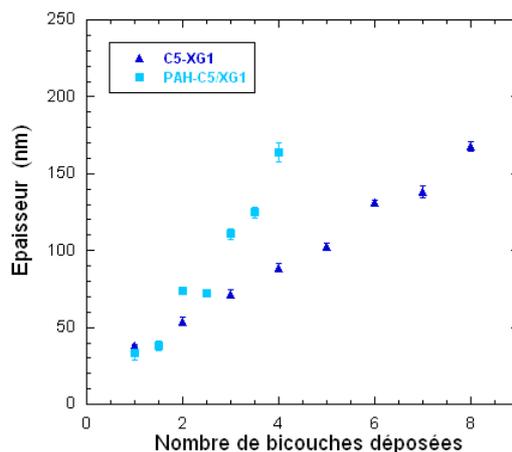


Figure 41 : Croissance pour des échantillons constitués de C5-XG1 ou PAH-C5/XG1.

### **3 Conclusion**

A partir des résultats obtenus dans cette première partie, nous connaissons les paramètres qui nous permettent de construire des films multicouches de cellulose/XG. Le xyloglucane doit être en régime semi-dilué pour permettre une croissance linéaire. Par ailleurs, le taux de recouvrement de la surface par les nanocristaux de cellulose doit être au minimum de 90% pour former des monocouches de cellulose. De tels films sont ainsi peu rugueux et suffisamment épais pour observer des couleurs liées aux phénomènes d'interférence. Enfin, une autre structure composée de l'alternance de couches de PAH et de couches composées d'un mélange de cellulose/XG permet d'obtenir des films épais et peu rugueux. Nous avons donc sélectionné trois types de construction (C1-XG1, C5-XG1 et PAH-C5/XG1) pour lesquels la structure interne va être étudiée.





**Chapitre III**  
**Analyse de la structure interne**  
**des films multicouches**

Ce chapitre aborde l'étude de la structure interne de différents types de films multicouches à l'aide de la réflectivité de neutrons. Une première partie sera consacrée au rappel des grands principes de la technique de réflectivité de neutrons. Dans une seconde partie, nous nous focaliserons sur l'analyse de la structure interne des films en fonction de la concentration en XG pour comprendre comment le régime de concentration du XG intervient dans la structure interne des films fins et quels phénomènes permettent d'avoir une croissance. Dans une troisième partie, nous étudierons l'influence de la concentration de nanocristaux de cellulose sur la structure des films. Enfin, nous comparerons la structure interne des trois types de films sélectionnés pour l'étude des dégradations enzymatiques (C1-XG1, C5-XG1 et PAH-C5/XG1) ainsi que leur comportement en solution.

## **1 Principe de la réflectivité de neutrons**

### **1.1 La densité de longueur de diffusion**

La réflectivité de neutrons permet de déterminer la structure de films fins dont l'épaisseur est comprise entre 1 nm et quelques centaines de nm. Le principe de cette technique est décrit de manière plus approfondie dans le chapitre VI. En outre, cette technique permet d'approcher la composition chimique de l'échantillon étudié. En effet, chaque matériau est caractérisé par une grandeur, appelée densité de longueur de diffusion ( $Nb$ ), qui renseigne sur l'amplitude de l'interaction entre les neutrons et ce matériau. Cette grandeur dépend de la composition chimique élémentaire et/ou isotopique du matériau qui compose le film. (exemples dans le Tableau 8) et peut être calculée à partir de la relation suivante :

$$Nb = \frac{\sum b_i}{V}$$

Avec  $b_i$  la longueur de diffusion cohérente  $b$  des éléments  $i$  qui le composent et  $V$  le volume d'une molécule. Les polysaccharides, par exemple, sont composés des mêmes atomes (C, O, H) et vont donc avoir un  $Nb$  identique. Le calcul du  $Nb$  de la cellulose et du XG donne effectivement une valeur théorique de  $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Il est important de connaître les valeurs de  $Nb$  des différents composés présents dans le film pour permettre de réaliser des ajustements de courbes ayant un sens physique et de déterminer au mieux la composition volumique des échantillons.

Longueur de diffusion cohérente $b$ ( $10^{-12}$ cm)						
$^1\text{H}$	D ( $^2\text{H}$ )	C	O	N	Si	
-0,374	0,667	0,665	0,580	0,936	0,415	
Densité de longueur de diffusion ( $\text{\AA}^{-2}$ )						
$\text{H}_2\text{O}$	$\text{D}_2\text{O}$	$\text{SiO}_2$	Polysaccharides	PLL	PAH	Si (cristal)
$-0,56 \cdot 10^{-6}$	$6,38 \cdot 10^{-6}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$	$1,9 \cdot 10^{-6}$	$0,9 \cdot 10^{-6*}$	$0,7 \cdot 10^{-6*}$	$2,07 \cdot 10^{-6}$

Tableau 8 : longueur de diffusion cohérente de quelques atomes et densité de longueur de diffusion de certaines molécules. (\*) Valeurs déterminées par le calcul.

## 1.2 Principe d'une mesure et ajustement des courbes

La réflectivité de neutrons consiste à envoyer un faisceau de neutrons sur le film fin et à enregistrer l'intensité réfléchi. Tout comme les faisceaux lumineux, une partie du faisceau va être réfléchi à l'interface air/film tandis que l'autre partie va interagir avec le film puis être réfléchi à l'interface film/support (Figure 42).

La courbe de réflectivité obtenue représente l'intensité du faisceau réfléchi en fonction du vecteur de diffusion  $Q$ . Les courbes de réflectivité présentent généralement des franges d'interférence (ou franges de Kiessig) dont la fréquence renseigne sur l'épaisseur globale du film (Figure 42). Lorsqu'il existe une alternance de couches de composition chimique différente, la présence de pics de Bragg peut être observée.

Les courbes sont ajustées à l'aide d'un modèle constitué de plusieurs couches. Pour chaque couche, trois paramètres d'ajustement interviennent : l'épaisseur, la densité de longueur de diffusion ( $Nb$ ) et la rugosité avec la couche adjacente. L'ajustement des courbes de réflectivité permet donc de connaître l'évolution du  $Nb$  (Figure 42) dans le film, à partir de laquelle la fraction volumique des composés peut être calculée.

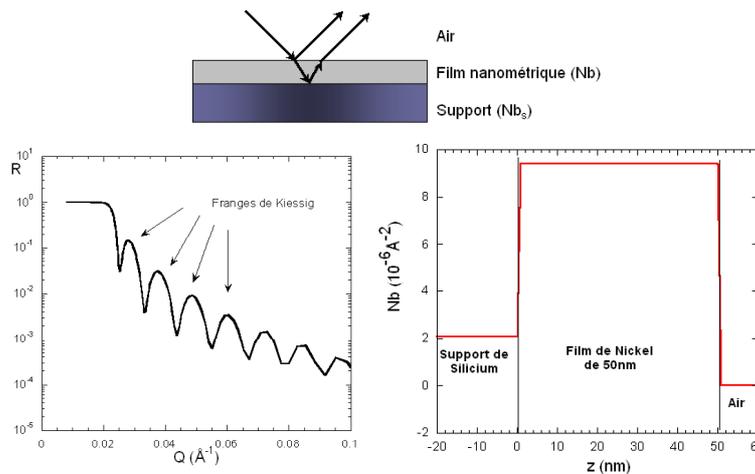


Figure 42 : Exemple de courbe de réflectivité obtenue pour une couche de Nickel de 50 nm déposée sur un support de Silicium et de profil de  $Nb$  associé.

Dans cette étude, les courbes de réflectivité des échantillons sont présentées en représentation  $RQ^4 = f(Q)$ , qui permet d'amplifier les franges de Kiessig. Pour les profils de  $Nb$  associés à chaque courbe, la position  $z = 0$  correspond à l'interface Si/film. Dans tous les cas, le support de silicium ( $Nb(\text{Si}) = 2,07 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ) est recouvert d'une fine couche de  $\text{SiO}_2$  ( $Nb(\text{SiO}_2) = 3,4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ) qui se forme lors du nettoyage des wafers par bain piranha.

### **1.3 Le contraste neutronique**

La mesure du signal d'un objet par réflectométrie de neutrons implique que son indice de réfraction neutronique soit différent du milieu qui l'entoure : cette différence d'indice est appelée contraste neutronique. Dans le cas des nanocristaux de cellulose et de XG, l'indice de réfraction neutronique est le même et ces composés ne peuvent pas être différenciés en l'état. Il n'y a donc pas de contraste neutronique entre la cellulose et le XG. Ce manque de contraste ne permet pas de déterminer les concentrations de chaque espèce dans le film.

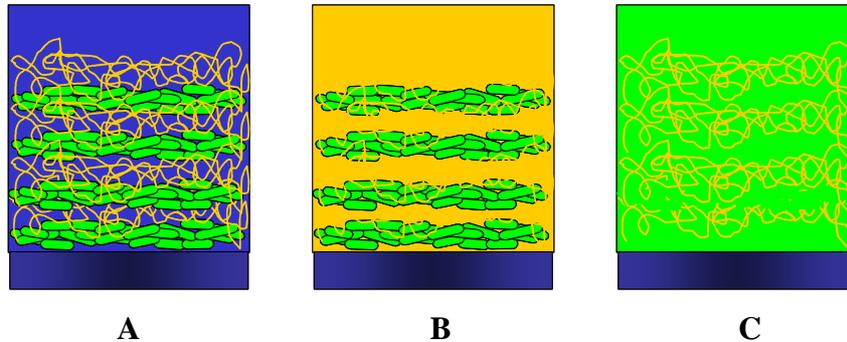
La substitution isotopique, en particulier d'atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium, modifie les indices de réfraction neutronique de façon importante sans changer ses propriétés physiques globales. Cette variation va permettre d'une part d'obtenir de forts signaux de réflectivité et d'autre part de mesurer dans une couche mixte (composée de cellulose et XG, par exemple) le profil de concentration de chaque espèce. Dans le cas de composés de synthèse, les analogues deutérés peuvent être commerciaux ou synthétisés. Cependant, la tâche devient plus complexe dans le cas de biopolymères.

En ce qui concerne les nanocristaux de cellulose et de XG, la différenciation est possible en réalisant la deutériation intracristalline de la cellulose [Nishiyama *et al.* 1999]. La procédure consiste à se placer dans des conditions permettant l'ouverture partielle de la structure cristalline. En présence d'une solution deutérée, les atomes d'hydrogène des groupements hydroxyles de la cellulose sont échangés avec des atomes de deutérium. Les groupements  $-\text{OD}$  obtenus sont piégés à l'intérieur du cristal après retour à température ambiante. La cellulose a été deutérée selon le protocole de Nishiyama *et al.* [Nishiyama *et al.* 1999] et sa deutériation a été mise en évidence par spectroscopie FTIR. Le  $Nb$  des nanocristaux de cellulose (Cd) en solution a été déterminé expérimentalement à une valeur de  $3,3 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  par la technique de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) au Laboratoire Léon Brillouin. Cette valeur est très différente de celle de la cellulose hydrogénée ( $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ) (Tableau 8).

*La technique de variation de contraste*

Dans le cas de mélanges binaires comme ceux étudiés dans ce travail, la technique de variation du contraste permet d'aborder l'organisation d'un des constituants au sein du mélange en solution. Pour cela, il faut ajuster la densité de longueur de diffusion du milieu (l'eau par exemple) à une valeur identique à celle du second constituant. Le signal mesuré correspond alors à celui du premier constituant uniquement. Pour mettre en œuvre cette technique, il faut disposer de composés qui possèdent des densités de longueur de diffusion différentes.

Il est possible de modifier en continu l'indice de réfraction neutronique d'un solvant dans un système complexe en réalisant des mélanges de solvants hydrogénés et deutérés dans le but d'éteindre le signal d'un de ses composants et déterminer l'organisation du composé non-éteint. En ajustant la composition du solvant pour atteindre des valeurs de  $Nb$  égales à celle du XG ou des Cd, nous pourrions déterminer l'organisation de l'un et l'autre composé dans le film. La Figure 43 illustre le principe de la variation de contraste dans le cas des films multicouches C-XG.



**Figure 43 : Illustration de la technique de variation de contraste dans le cas des films multicouches Cd-XG. La cellulose et le XG possèdent respectivement des indices  $Nb_1$  et  $Nb_2$ . A) Le film est en solution dans  $D_2O$ . Le signal enregistré correspond à l'ensemble de la structure. B) Le film est en solution dans un mélange  $D_2O/H_2O$  tel que le  $Nb$  de la solution soit égal à  $Nb_2$ . Le signal enregistré correspond à la structure des nanocristaux de cellulose. C) Le film est en solution dans un mélange  $D_2O/H_2O$  de  $Nb$  égal à  $Nb_1$ . Le signal enregistré correspond à l'organisation du XG dans le film.**

## 2 Influence de la concentration de XG sur la structure des films C1-XG

Nous avons tout d'abord voulu élucider la structure des films en rapport avec la concentration de XG. Pour cela, nous avons analysé les films constitués de 8 bicouches C-XG réalisés par spin-coating (3600 rpm sans étape de rinçage). La concentration en cellulose est fixée à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  tandis que la concentration en XG varie ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  ;  $1 \text{ g.L}^{-1}$  ;  $5 \text{ g.L}^{-1}$  ;  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ). Les échantillons sont réalisés à partir de nanocristaux de cellulose hydrogénés ou deutérés. L'intérêt d'étudier les deux types de films est double :

- les structures déterminées à partir des courbes de réflectivité sont validées par deux échantillons indépendants ;
- il est possible de déterminer les fractions volumiques de chaque espèce chimique présente dans le film (cellulose, XG et air).

Une première information qui peut être obtenue à partir de ces courbes de réflectivité est l'épaisseur du film. Le Tableau 9 présente les épaisseurs des échantillons mesurés par réflectivité de neutrons et par profilométrie mécanique à partir d'échantillons indépendants. L'ajustement des courbes de réflectivité confirme les épaisseurs déterminées par profilométrie ; la construction des films C-XG est donc reproductible.

Echantillon	Profilométrie mécanique		Réflectivité de neutrons	
	Epaisseur (nm)	Ecart type	Epaisseur (nm)	Rugosité (nm)
(C1-XG0,5) <sub>8</sub>	85,6	2,1	93,6	8,1
(C1-XG1) <sub>8</sub>	81,5	6,4	69,8	4,2
(C1-XG5) <sub>8</sub>	20,2	3,6	19,6	4,0
(C1-XG10) <sub>8</sub>	92,2	2,2	94,4	5,5

**Tableau 9 : Epaisseurs des films C1-XG composés de 8 bicouches déterminées par profilométrie et réflectivité de neutrons.**

Afin d'ajuster au mieux les courbes de réflectivité des films multicouches, des mesures ont été réalisées sur des monocouches de XG qui nous ont permis de définir le  $Nb$  de XG à  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Cette différence peut paraître surprenante au premier abord car différente de la valeur théorique attendue ( $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ), cependant il faut rappeler que, comme tous les polysaccharides, le XG possède une affinité importante pour l'eau. Par le calcul, il a été déterminé que les couches de XG contiennent environ 16% d'eau en volume. Cette valeur est cohérente avec la courbe de sorption d'eau du XG réalisée à l'INRA (16% en masse d'eau pour une humidité relative de 60%).

Nous avons vu dans le chapitre précédent, que les croissances des films (C1-XG) sont linéaires lorsque le XG est en régime dilué, alors qu'un plateau est rapidement atteint lorsque le XG est en régime semi-dilué enchevêtré. Nous nous intéresserons dans un premier temps à la structure des films pour lesquels XG est déposé en régime semi-dilué puis nous aborderons la structure des films réalisés en régime semi-dilué enchevêtré.

## **2.1 XG en régime dilué**

Nous commençons cette étude par l'analyse des structures des films (C1-XG0,5)<sub>8</sub> et (C1-XG1)<sub>8</sub> qui correspondent aux films réalisés à partir de solutions de XG en régime dilué. Les courbes de réflectivité de ces échantillons et les profils de  $Nb$  sont représentés à la Figure 44.

Le profil de (C1-XG0,5)<sub>8</sub> est relativement homogène jusqu'à 40 nm avec un  $Nb$  de l'ordre de  $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Ensuite, le  $Nb$  diminue jusqu'à  $0,7 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  entre 40 et 85 nm puis progressivement jusqu'à 0. La fraction volumique de polysaccharides présents dans le film (C1-XG0,5)<sub>8</sub> est de 74% puis de 37%. Ce profil révèle que cet échantillon est très rugueux entre 40 et 85 nm puisque la fraction de polysaccharides diminue de moitié dans cette zone. Ce profil pourrait être attribué à des monocouches denses de nanocristaux de cellulose séparées par de fines couches de XG jusqu'à 40 nm. La courbe de réflectivité du film (Cd1-XG0,5)<sub>8</sub> ne présente pas de franges d'interférences. Ceci doit être dû au manque de contraste entre le film dont le profil donne un  $Nb$  de  $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  et le support en Silicium dont le  $Nb$  est de  $2,07 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ .

Le profil de (Cd1-XG0,5)<sub>8</sub> est similaire au film composé de nanocristaux de cellulose hydrogénée, quoique beaucoup moins rugueux. C'est un profil homogène avec un  $Nb$  de  $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  entre 0 et 70 nm. Bien que les contributions des nanocristaux de cellulose et du XG soient différenciées, la courbe de réflectivité ne présente pas de pic de Bragg, il n'est pas possible de distinguer les couches de cellulose des couches de XG. En effet, le XG faiblement concentré doit former des couches extrêmement fines et il a été observé par AFM que les nanocristaux de cellulose induisent une rugosité de l'ordre de 4 à 6 nm. Par conséquent, puisqu'il n'y a globalement pas de variation de  $Nb$ , un profil homogène est observé. Cependant, en supposant que le film contienne la même quantité d'air que le film hydrogéné (24%), sa composition est de 43% de cellulose et de 31% de XG.

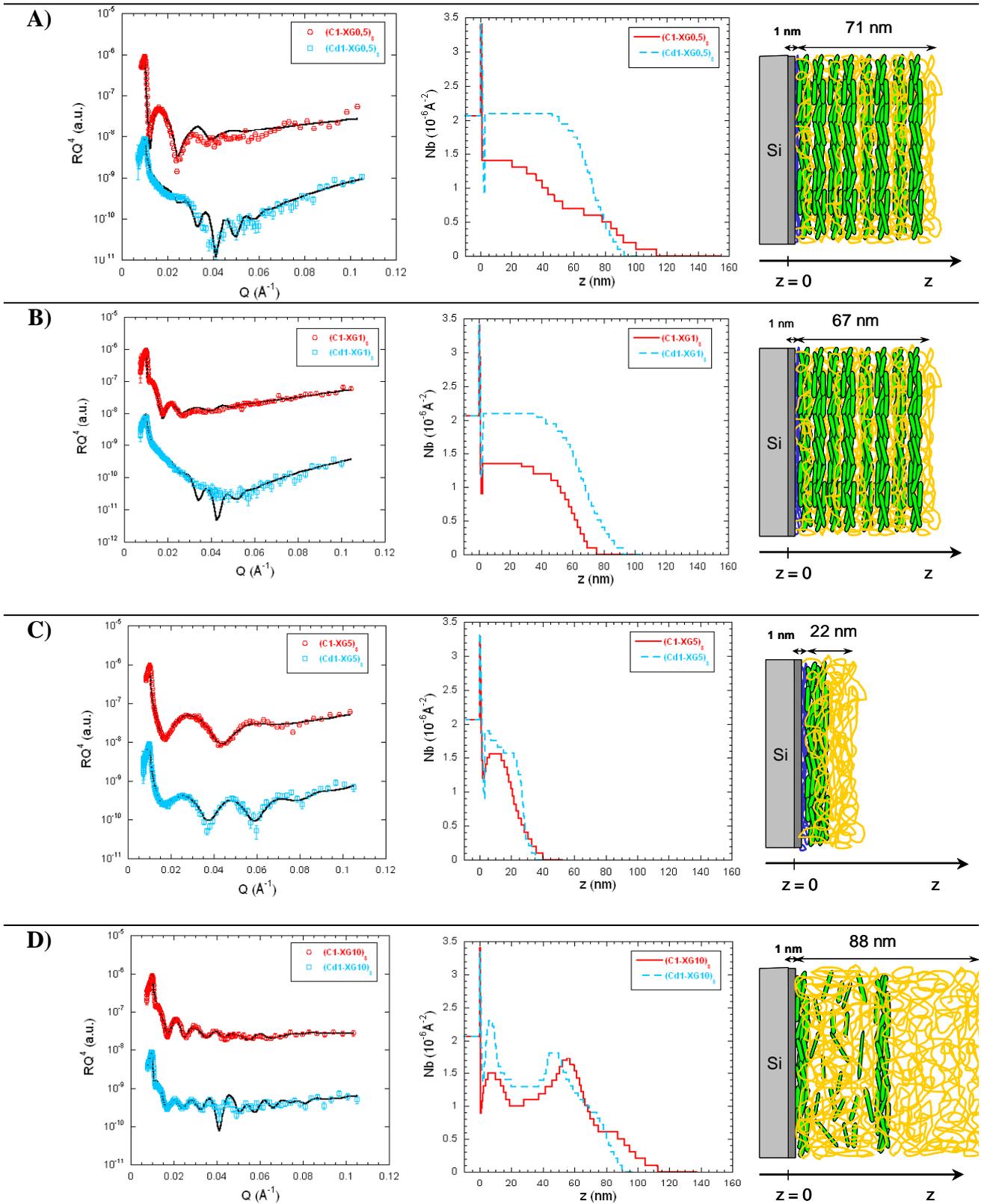


Figure 44 : Courbes de réflectivité ajustées, profils de Nb perpendiculaires à l'interface et schéma associé au profil. La couche gris foncé correspond à une couche de SiO<sub>2</sub> qui se forme pendant le traitement de la surface de Si. A) (C1-XG0,5)<sub>8</sub>; B) (C1-XG1)<sub>8</sub> ; C) (C1-XG5)<sub>8</sub> ; D) (C1-XG10)<sub>8</sub>.

N°zone	Films hydrogénés				Films deutérés			
	Épaisseur (nm)	$Nb$ ( $10^{-6} \text{Å}^{-2}$ )	$\Phi_{Polysac}$ (%)	$\Phi_{air}$ (%)	Épaisseur (nm)	$Nb$ ( $10^{-6} \text{Å}^{-2}$ )	$\Phi_C$ (%)	$\Phi_{XG}$ (%)
(C1-XG0,5) <sub>8</sub>								
1	40	1,4	74	26	71	2,1	43	31
2	45	0,7	37	63				
(C1-XG1) <sub>8</sub>								
1	70	1,35	71	29	67	2,1	54	17
(C1-XG5) <sub>8</sub>								
1	20	1,55	82	18	11	1,9	24	58
2					14	1,6	3	79
(C1-XG10) <sub>8</sub>								
1	15	1,5	79	21	10	2,3	57	22
2	25	1	53	47	29	1,3	21	32
3	15	1,7	89	11	14	1,9	31	58
4	30	0,7	47	53	30	0,9	0	47

**Tableau 10 :** Épaisseurs et composition des films en fonction de leurs profils de  $Nb$ . À gauche, informations obtenues à partir des films hydrogénés (fraction volumiques en polysaccharides et en air). À droite, fractions volumiques en cellulose et en XG obtenues à partir des films deutérés.

Echantillon	Épaisseur moyenne (nm)	$\Phi_{Cd}$ (%)	$\Phi_{XG}$ (%)	$\Phi_{air}$ (%)
(C1-XG0,5) <sub>8</sub>	71	43	31	26
(C1-XG1) <sub>8</sub>	68,5	54	17	29
(C1-XG5) <sub>8</sub>	22	12	70	18
(C1-XG10) <sub>8</sub>	88	22	35	43

**Tableau 11 :** Épaisseur des films et fraction volumique globale de chaque composé (cellulose, XG et air).

En ce qui concerne les courbes de réflectivité de l'échantillon (C1-XG1)<sub>8</sub> (Figure 44, page 84), celles-ci ont une allure similaire aux courbes enregistrées pour les films (C1-XG0,5)<sub>8</sub>. La courbe de réflectivité de (Cd1-XG1)<sub>8</sub> ne possède pas de franges de Kiessig, contrairement à la courbe de (C1-XG1)<sub>8</sub>. Ceci doit être dû, comme pour l'échantillon (C1-XG0,5)<sub>8</sub> au faible contraste entre le film lui-même et le support en silicium. Les profils de  $Nb$  obtenus par l'ajustement des courbes expérimentales montrent que les épaisseurs des échantillons hydrogénés et deutérés sont de l'ordre de 67 nm. Ils présentent également une allure homogène avec un  $Nb$  de  $1,35 \cdot 10^{-6} \text{Å}^{-2}$  pour l'échantillon hydrogéné et  $2,1 \cdot 10^{-6} \text{Å}^{-2}$  pour l'échantillon deutéré. Ces valeurs sont semblables à celles du film (C1-XG0,5)<sub>8</sub> et nous permettent de conclure que l'échantillon est composé de 54% de cellulose, 17% de XG (soit 71% de polysaccharides) et 29% d'air en volume.

Les échantillons (C1-XG0,5)<sub>8</sub> et (C1-XG1)<sub>8</sub> présentent des profils monotones pour les films hydrogéné et deutéré. La différenciation des couches de nanocristaux de cellulose et de XG est difficile du fait de la rugosité des couches de nanocristaux de cellulose ; la structure interne précise n'a donc pas pu être prouvée. Néanmoins les profils obtenus ainsi que la croissance linéaire révélée dans le chapitre précédent laissent supposer que cet échantillon est composé de monocouches alternées de nanocristaux de cellulose et de XG.

## **2.2 XG en régime semi-dilué enchevêtré**

Les courbes de réflectivité des échantillons (C1-XG5)<sub>8</sub> et (C1-XG10)<sub>8</sub> sont représentées à la Figure 46 (page 92) Ces films révèlent une organisation différente et confirment l'effet de la concentration en XG sur l'assemblage des films multicouches.

Le film (C1-XG5)<sub>8</sub> présente également un profil homogène avec un  $Nb$  maximum de  $1,55 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  mais dont l'épaisseur est plus faible que les autres échantillons (20 nm). En considérant  $Nb(C) = 1,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  et  $Nb(XG) = 1,5 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ , les fractions volumiques sont de 12% de nanocristaux de cellulose, 70% de XG et 18% d'air.

Le film (Cd1-XG5)<sub>8</sub> donne des informations supplémentaires par rapport à son équivalent hydrogéné : il présente un maximum à  $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  sur une épaisseur de 11 nm puis diminue faiblement à  $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  pour  $z = 25 \text{ nm}$  (soit une couche de 14 nm). Après calculs (Tableau 10), la première couche est constituée de 24% de nanocristaux de cellulose deutérés et 58% de XG tandis que la deuxième couche contient 3% de nanocristaux de cellulose deutérés et 79% de XG. Ceci suggère un film composé d'une monocouche de nanocristaux de cellulose enduits de XG de 11 nm et d'une seconde principalement composée de XG, avec une épaisseur de 14 nm. En moyennant ces compositions chimiques sur toute l'épaisseur du film, on retrouve les mêmes proportions de nanocristaux de cellulose et de XG (73%).

La courbe de réflectivité associée à l'échantillon (C1-XG10)<sub>8</sub> n'a pas pu être modélisée de la même manière que les deux échantillons précédents. Le meilleur ajustement de la courbe donne un profil très différent des deux autres puisque 4 zones distinctes peuvent être observées (Figure 44) :

- deux maxima à  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  et  $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  compris respectivement entre 0 et 15 nm et entre 50 et 65 nm ;

- deux minima à  $1 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  et  $0,7 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  compris entre 20 et 45 nm et entre 65 et 95 nm.

Le même type de profil est obtenu à partir de la courbe de réflectivité du film deutéré :

- deux maxima à  $2,3 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  et  $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  dont les positions sont identiques à celles du profil hydrogénés (comprises respectivement entre 3 et 13 nm et entre 40 et 55 nm) ;
- deux minima à  $1,3 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  et  $0,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  compris entre 20 et 40 nm et entre 55 et 85 nm.

Ce profil est très différent des autres puisqu'il est composé de 2 maxima alternés avec 2 minima. Il pourrait correspondre à l'alternance de couches de nanocristaux de cellulose avec des couches de XG de 15 nm et de 30 nm d'épaisseur respective. D'après le calcul des fractions volumiques pour chaque zone (Tableau 10), il apparaît que le film contient du XG sur toute son épaisseur en proportion variable. En outre, il est formé de zones enrichies en nanocristaux de cellulose (maxima) et de zones enrichies de XG (minima), la couche la plus proche de l'interface film/air ne contenant que du XG. Cette architecture n'est pas triviale et nous ne comprenons pas exactement comment elle est obtenue.

Les échantillons (C1-XG5)<sub>8</sub> et (C1-XG10)<sub>8</sub> sont réalisés à partir de XG en régime enchevêtré et ne présentent pas de croissance. Cependant, ces échantillons présentent des épaisseurs très différentes, de l'ordre de 20 nm et 85 nm respectivement. Ces différences doivent être liées à l'utilisation du spin-coating comme méthode de dépôt. En effet, l'épaisseur des films réalisés par spin-coating augmente avec la viscosité de la solution de polymère. Ainsi, en régime semi-dilué enchevêtré et donc lorsqu'il n'y a pas de croissance, l'épaisseur du dépôt semble être principalement gouvernée par la viscosité et/ou la concentration de la solution de XG.

### **2.3 Conclusion sur la croissance des films**

Les échantillons obtenus lorsque le XG est en régime dilué possèdent des profils de *Nb* homogènes. L'alternance entre les couches de nanocristaux de cellulose et de XG n'a pas pu être démontrée du fait de la rugosité des couches de nanocristaux de cellulose. Néanmoins, cette analyse combinée à l'étude de la croissance des films semble valider l'hypothèse de films constitués de monocouches alternées de nanocristaux de cellulose et de XG.

En revanche, les profils des échantillons (C1-XG5)<sub>8</sub> et (C1-XG10)<sub>8</sub> réalisés à partir de XG en régime enchevêtré sont très différents et plus difficiles à interpréter. Les échantillons sont constitués de zones plus ou moins enrichies en nanocristaux de cellulose au-dessus de laquelle (ou desquelles) se trouve une zone essentiellement constituée de XG. Les épaisseurs obtenues sont, dans ce cas, dirigées par la concentration en XG.

Lorsque le XG en est régime semi-dilué, ce sont des molécules isolées de XG qui interagissent avec la couche de nanocristaux de cellulose sous-jacente. Le XG doit donc s'adsorber sous forme d'une monocouche de molécules à la surface des nanocristaux de cellulose. Lorsque la suspension de nanocristaux de cellulose est déposée sur cette couche de XG, les nanocristaux interagissent avec le XG déjà adsorbé sur la couche inférieure de nanocristaux de cellulose. Le XG joue donc le rôle de liant entre les couches de nanocristaux de cellulose inférieure et supérieure. La croissance de film multicouche peut donc être observée.

Lorsque la concentration en XG est augmentée (régime semi-dilué enchevêtré), les films ne croissent pas. 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, une force de cisaillement va éliminer la couche supérieure composée de nanocristaux de cellulose et de XG.

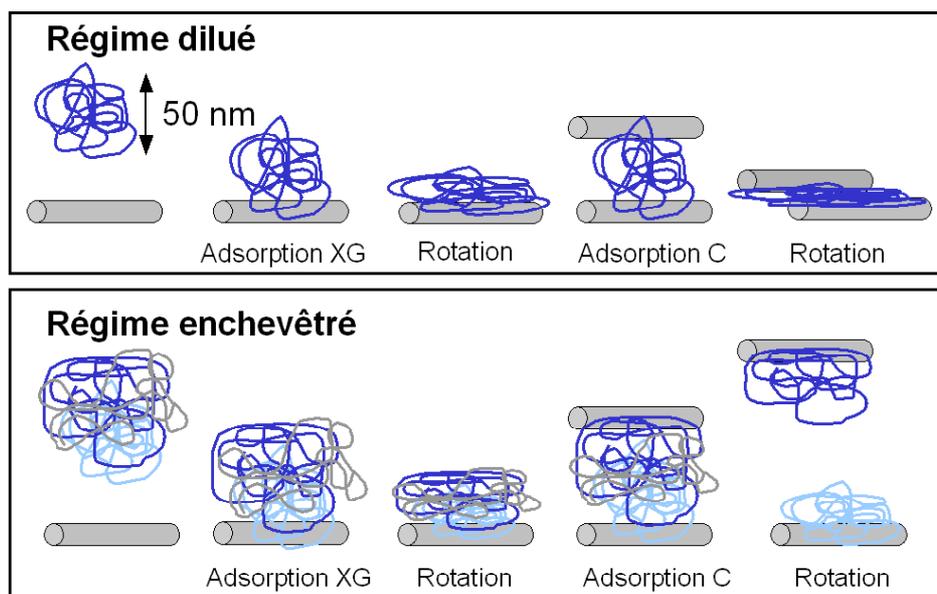


Figure 45 : Représentation schématique de l'interaction des chaînes de XG avec les nanocristaux de cellulose selon le régime de concentration du XG

### 3 Influence de la concentration de nanocristaux de cellulose sur la structure des films C-XG1

Dans le chapitre précédent, l'étude de la croissance des films a montré que celle-ci est plus forte lorsque la concentration de nanocristaux de cellulose augmente. La structure interne des films doit donc également être influencée par la concentration de nanocristaux de cellulose. Nous avons donc choisi d'analyser des échantillons dont le nombre de bicouches permet obtenir des épaisseurs comprises dans la gamme d'analyse de la réflectivité de neutrons soit 8 bicouches de C1-XG1 et 4 bicouches de C5-XG1.

#### 3.1 Comparaison de l'organisation des films secs

Les courbes de réflectivité des échantillons hydrogénés et deutérés des films (C1-XG1)<sub>8</sub> et (C5-XG1)<sub>4</sub> et les profils de  $Nb$  associés sont présentés à la Figure 46 (page 92). Le  $Nb$  d'un dépôt de nanocristaux de cellulose deutérée à 5 g.L<sup>-1</sup> a été mesuré au préalable et vaut  $2,2 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Cette valeur est très différente de la valeur déterminée par DNPA ( $3,3 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ). Par conséquent, une telle monocouche de nanocristaux contient en réalité 67% de cellulose en volume (soit 33% de porosité).

La structure de C1-XG1 a déjà été décrite précédemment (page 83). Pour rappel, ce film est constitué de 54% de nanocristaux de cellulose et de 17% de XG.

L'échantillon (C5-XG1)<sub>4</sub> possède un  $Nb$  homogène de  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  qui représente 79% de polysaccharides en volume. De même, le profil de (Cd5-XG1)<sub>4</sub> présente un profil monotone avec une valeur globale de  $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Les épaisseurs des films sont de l'ordre de 60 nm dans les deux cas et correspondent aux épaisseurs déterminées par profilométrie. Le film (Cd5-XG1)<sub>4</sub> est donc globalement composé de 43% de cellulose « dense », 21% d'air et 36% de XG, soit 64% de nanocristaux de cellulose et 36% de XG (Figure 46).

Les films (C1-XG1) et (C5-XG1) ont donc des compositions chimiques similaires sur l'ensemble du film mais présentent quelques différences en terme de structure. Le film (C1-XG1) est homogène sur toute son épaisseur et est composé de couches alternées de nanocristaux de cellulose et de XG difficiles à différencier à cause la rugosité probable des couches de cellulose.

## 3.2 Organisation des films C-XG en solution

### 3.2.1 Films en solution dans D<sub>2</sub>O

La Figure 47 représente les courbes de réflectivité ajustées des échantillons (Cd1-XG1)<sub>8</sub> et (Cd5-XG1)<sub>4</sub> en solution dans D<sub>2</sub>O ainsi que leur profil de *Nb*.

L'ajustement de la courbe de (Cd1-XG1)<sub>8</sub> indique que le film a une épaisseur de 116 nm dans D<sub>2</sub>O alors que l'épaisseur du film sec est de 67 nm. Le gonflement du film est donc de 69% et doit être principalement dû au gonflement des chaînes de XG. Par ailleurs, le profil de *Nb* du film (Cd1-XG1)<sub>8</sub> est formé d'un gradient de *Nb* de  $4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  vers l'interface Si/film à  $6 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  vers l'interface film/D<sub>2</sub>O. La solution de D<sub>2</sub>O hydrate donc progressivement le film Cd1-XG1.

Le profil de *Nb* de l'échantillon (Cd5-XG1)<sub>4</sub> montre un film d'une épaisseur totale de 122 nm ce qui correspond à un gonflement global de 85%. Ce gonflement est du même ordre de grandeur que celui des films (Cd1-XG1)<sub>8</sub>. Ce profil peut être divisé en deux zones :

- une première zone qui possède un *Nb* homogène à  $4,2 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  sur 84 nm, soit un gonflement de 27%.
- une deuxième zone qui correspond à une transition entre le film et le solvant d'une épaisseur de 50 nm. Cette épaisseur est du même de grandeur que le rayon de giration du XG (51 nm). Il est donc possible qu'il s'agisse d'une couche de XG très hydratée.

### 3.2.2 Etude de l'organisation du XG dans les films par variation de contraste

Nous avons utilisé la technique de variation de contraste afin d'obtenir des informations sur la structure des chaînes de XG en solution. Cette méthode consiste à éteindre le signal d'un des composants d'indice *Nb* du film en l'immergeant dans un solvant de *Nb* identique (paragraphe 1.3). Pour observer le XG uniquement, nous avons éteint le signal des nanocristaux de cellulose deutérés ( $Nb = 3,3 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ) en utilisant un mélange D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O dans un rapport volumique 56/44. Par ailleurs, le XG est constitué de nombreux groupements hydroxyles dont l'atome d'hydrogène peut s'échanger avec un atome de deutérium. Le *Nb* du XG passe donc de  $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  à sec à  $2,8 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  dans le mélange D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O. Il est ainsi possible de déterminer la fraction volumique du XG dans le film.

Les courbes de réflectivité ajustées et les profils de *Nb* associés des films (Cd1-XG1)<sub>8</sub> et (Cd5-XG1)<sub>4</sub> sont représentées à la Figure 47 (page 93). Les courbes de réflectivité ne

présentent pas de franges de Kiessig et le signal est bruité à grands  $Q$ . Il est possible que l'ajustement des courbes soit faussé ; par conséquent, l'interprétation des profils doit être réalisée avec précaution.

Les épaisseurs des deux échantillons sont semblables à celles déterminées dans  $D_2O$ , soit 113 nm pour les  $(Cd1-XG1)_8$  et 144 nm pour  $(Cd5-XG1)_4$ .

En présence du mélange  $D_2O/H_2O$ , le profil de  $(Cd1-XG1)_8$  est homogène entre 10 et 100 nm pour un  $Nb$  de  $3 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  et augmente progressivement jusqu'à l'interface film/solvant. Ainsi, la fraction de XG est homogène sur tout le film et représenterait 60% du volume du film. Cette fraction volumique semble très élevée si l'on considère les proportions des composants déterminées dans le film sec. De plus, le profil de  $(Cd1-XG1)_8$  présente un gradient de  $Nb$  dans  $D_2O$  et ne nous permet pas de calculer la fraction volumique de nanocristaux de cellulose. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à l'organisation du film en solution pour cet échantillon.

En ce qui concerne  $(Cd5-XG1)_4$ , le profil est homogène sur 84 nm avec un  $Nb$  de  $3,17 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  puis augmente progressivement jusqu'à atteindre le  $Nb$  du mélange  $D_2O/H_2O$  au bout de 140 nm. Le XG doit donc représenter une fraction volumique de 26% avec une répartition uniforme sur toute l'épaisseur du film.

Connaissant les fractions volumiques de XG dans le film en solution, il est possible de déterminer la fraction de nanocristaux de cellulose à partir des courbes de réflectivité obtenues pour les films en solution dans  $D_2O$ . Le profil de  $Nb$  de  $(Cd5-XG1)_4$  dans  $D_2O$  est relativement homogène avec une valeur de  $4,2 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  sur 120 nm. Puisque cet échantillon contient 26% en volume de XG, alors la fraction volumique de nanocristaux de cellulose serait de 52% (soit 22% de  $D_2O$ ). Ces résultats sont cohérents avec les concentrations déterminées dans les films à sec. Par ailleurs, en comparant les deux profils en solution, il semble que deux types de gonflement interviennent :

- un gonflement général de la structure qui doit être principalement gouverné par le gonflement du XG ;
- un gonflement spécifique de la couche de XG qui est en contact direct avec la solution.

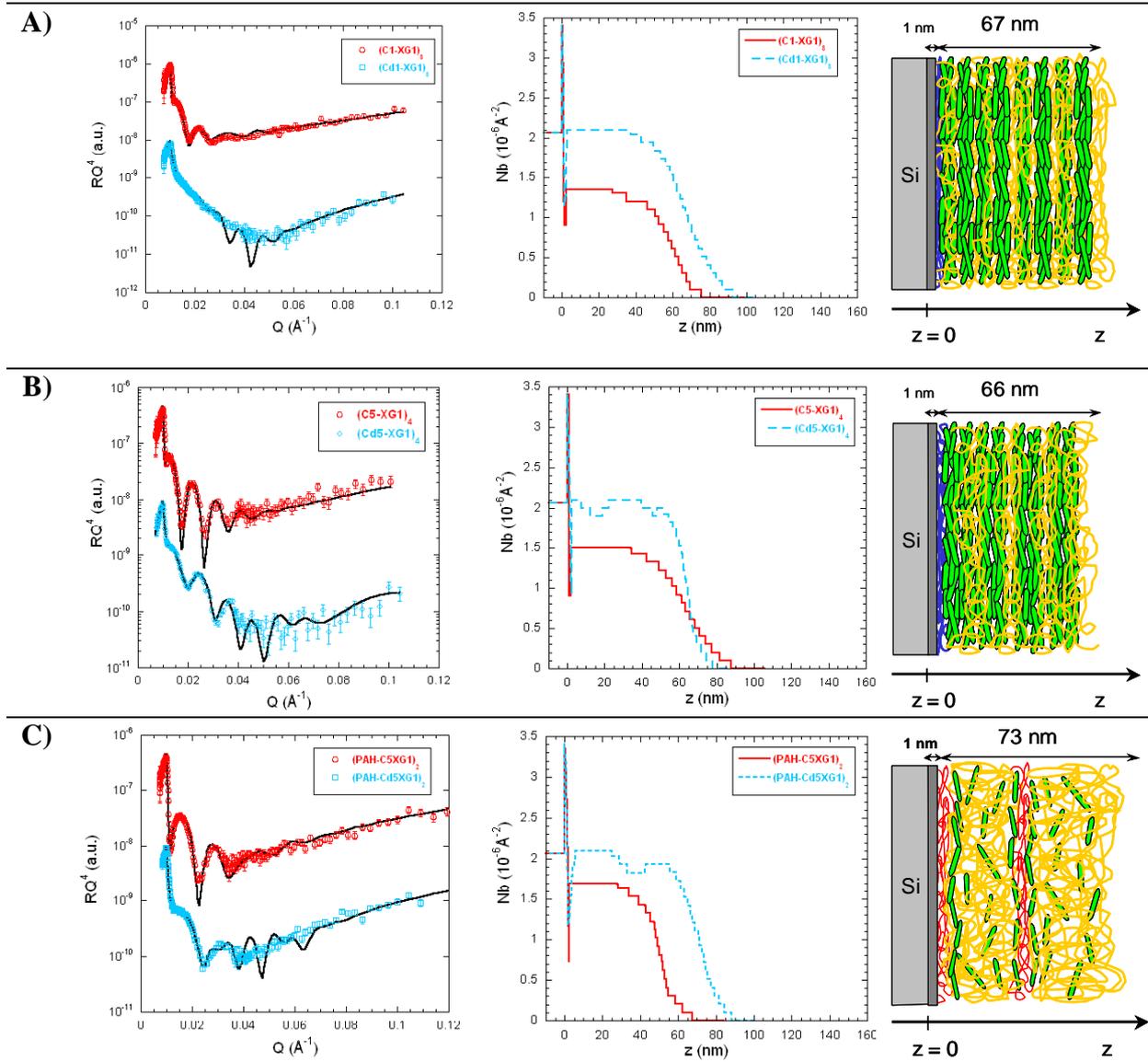


Figure 46 : Courbes de réflectivité ajustées, profils de  $Nb$  perpendiculaires à l'interface et schéma associé au profil. La couche gris foncé correspond à une couche de  $\text{SiO}_2$  qui se forme pendant le traitement de la surface de Si. A)  $(\text{C1-XG1})_8$ ; B)  $(\text{C5-XG1})_4$ ; C)  $(\text{PAH-C5/XG1})_2$ .

N° zone	Films hydrogénés				Films deutérés			
	Epaisseur (nm)	$Nb$ ( $10^{-6} \text{\AA}^{-2}$ )	$\Phi_{\text{Polysaccharides}}$ (%)	$\Phi_{\text{air}}$ (%)	Epaisseur (nm)	$Nb$ ( $10^{-6} \text{\AA}^{-2}$ )	$\Phi_{\text{cellulose}}$ (%)	$\Phi_{\text{XG}}$ (%)
$(\text{C1-XG1})_8$								
1	70	1,35	71	29	67	2,1	54	17
$(\text{C5-XG1})_4$								
1	64	1,5	79	21	66	2.1	43	36
$(\text{PAH-C5/XG1})_2$								
1	53	1,7	89	11	33	2,1	29	60
2					7	1,8	Non mesurable	
3					33	2,1	29	60
						1,1	15	31

Tableau 12 : Epaisseurs et composition des films en fonction de leurs profils de  $Nb$ .

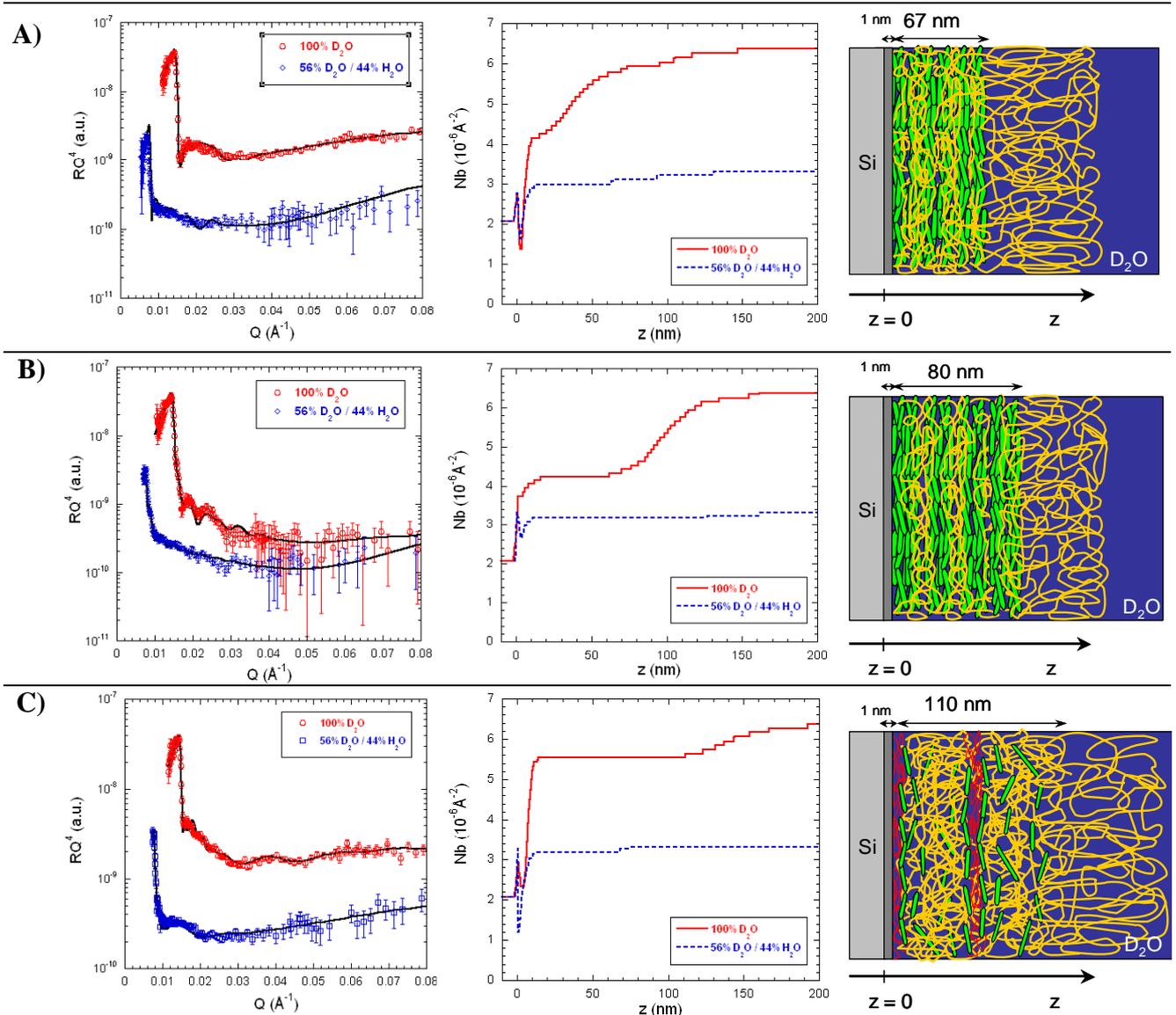


Figure 47 : Courbes de réflectivité ajustées, profils de  $Nb$  perpendiculaires à l'interface et schéma associé au profil. En rouge : films en solution dans  $D_2O$  ; en bleu : films en solution dans un mélange 56% de  $D_2O$  et 44% de  $H_2O$ . La couche gris foncé correspond à une couche de  $SiO_2$  qui se forme pendant le traitement de la surface de Si. A)  $(Cd1-XG1)_8$  ; B)  $(Cd5-XG1)_4$  ; C)  $(PAH-Cd5/XG1)_2$ .

Echantillon	Epaisseur film sec (nm)	Epaisseur dans $D_2O$ (nm)	Gonflement global (%)	$\Phi_C$ (%)	$\Phi_{XG}$ (%)	$\Phi_{D_2O}$ (%)
$(Cd1-XG1)_8$	67	116	69	Non mesurable	(60)	Non mesurable
$(Cd5-XG1)_4$	66	122	85	52	26	22
$(PAH-Cd5/XG1)_2$	73	157	115	11	20	69

Tableau 13 : Epaisseur des échantillons à sec et en solution dans  $D_2O$  et fraction volumique de XG et de cellulose dans les films en solution. La valeur entre parenthèse est incertaine.

## 4 Structure interne des films PAH-C5/XG1

### 4.1 Film sec

Les films PAH-C5/XG1 ne sont pas construits de la même manière que les films multicouches (C5-XG1) et doivent donc avoir une organisation différente. La Figure 46 (page 92) représente les courbes de réflectivité ajustées des échantillons (PAH-C5/XG1) incorporant des nanocristaux de cellulose hydrogénée ou deutérée ainsi que les profils de  $Nb$  associés. Une différence d'épaisseur de l'ordre de 20 nm est observée entre les deux échantillons, qui pourrait être liée à un problème de préparation de la solution C5/XG1. (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> possède un profil monotone d'une valeur de  $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  et l'ajustement donne une épaisseur de 53 nm. Ce film est donc composé à 89% de polysaccharides (nanocristaux de cellulose et XG) et 11% d'air. La teneur en polysaccharide est donc plus élevée que dans les films C-XG.

Dans le cas de l'échantillon deutéré, le profil possède :

- 1 maximum à  $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  sur 33 nm ;
- 1 minimum à  $1,8 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  sur 7 nm qui pourrait être lié à la couche de PAH ;
- 1 maximum à  $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  sur 33 nm.

La zone à  $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  correspond au mélange de nanocristaux de cellulose et de XG. La différence de contraste entre les nanocristaux de cellulose deutérée et le XG permet de déterminer les fractions volumiques de chaque composé. Sachant que la fraction volumique de polysaccharides est de 89%, la couche est composée de 29% de cellulose et de 60% de XG. Le deuxième maximum a été ajusté à l'aide d'un modèle à 2 couches comprenant une couche de 21 nm à  $2,1 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  et une couche de 12 nm à  $1,1 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . La rugosité entre ces deux couches est estimée à 4,7 nm. Cette zone doit donc avoir la même composition que le premier maximum (29% de nanocristaux de cellulose et 60% de XG) et la diminution de  $Nb$  doit être liée à une rugosité de surface élevée. Ainsi, le rapport de concentration C/XG est de 0,48.

Il ressort de cette analyse que les films composés de (PAH-C5/XG1) ont une fraction volumique de polysaccharides plus élevée que pour les films multicouches C-XG (89% contre 79% pour (C5-XG1)). Par ailleurs, la fraction volumique de XG est 2 fois plus grande que celle de nanocristaux de cellulose dans les films (C5-XG1), et la fraction de nanocristaux de cellulose est plus faible.

Les deux types de films révèlent des compositions en polysaccharides très différentes. Il est probable que leur comportement soit également différent en solution.

## 4.2 Structure des films dans D<sub>2</sub>O

Afin d'étudier l'organisation des films en solution, des expériences de réflectivité de neutron ont été réalisées sur le film deutéré (PAH-Cd5/XG1)<sub>2</sub> immergé dans une solution de D<sub>2</sub>O. La Figure 47 présente la courbe de réflectivité ajustée du film (PAH-Cd5/XG1)<sub>2</sub> en solution dans le D<sub>2</sub>O ainsi que son profil de *Nb*. L'épaisseur du film dans D<sub>2</sub>O est 157 nm, soit un gonflement total de 115%. Ce gonflement est supérieur à celui observé pour les films C-XG ce qui est cohérent avec la plus forte proportion de XG retrouvée dans la couche. Le profil de *Nb* est homogène sur les 157 nm avec une valeur de  $5,5 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ . Etant donné le gonflement important du film, la quantité d'eau présente dans le film (PAH-Cd5/XG1)<sub>2</sub> doit être supérieure à celle présente dans les films multicouches C-XG.

## 4.3 Extinction des nanocristaux deutérés et structure du XG

Comme pour les films C-XG, (PAH-Cd5/XG1)<sub>2</sub> a été étudié en présence d'un mélange de 56% de D<sub>2</sub>O et 44% de H<sub>2</sub>O pour acquérir des informations supplémentaires sur l'organisation du XG dans le film. Les courbes de réflectivité obtenues sont représentées à la Figure 47 et présentent des franges peu intenses dans le cas de (PAH-Cd5/XG1)<sub>2</sub>. Le *Nb* est de  $3,2 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  jusqu'à 65 nm. Cette épaisseur est trop faible si on considère les épaisseurs de film mesurées pour le film sec et le film en solution dans D<sub>2</sub>O. Etant donnée que la courbe est très bruitée, il est possible que l'ajustement ne soit pas parfait. Si on considère que le *Nb* de  $3,2 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  est valable pour toute l'épaisseur du film, alors la fraction volumique de XG serait de 20% (rappel :  $Nb = 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ). A partir du profil du film dans D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, la fraction volumique de cellulose a été calculée à 11%. Ainsi, le film (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> contient 69% de molécules de D<sub>2</sub>O lorsque le film est immergé. Ces résultats sont cohérents avec les proportions déterminées dans le film à sec. En effet, on retrouve le même rapport de concentration C/XG que dans les films à sec, soit 0,55.

## **5 Conclusion**

L'analyse de la structure interne des films composés de nanocristaux de cellulose et de XG a permis de comprendre comment le régime de concentration du XG influence la construction des films multicouches C-XG.

En régime concentré, les molécules de XG qui s'adsorbent sur les nanocristaux de cellulose de la couche inférieure sont sous forme d'agrégats pour lesquels il n'a pas d'affinité. Elles n'ont donc d'interactions directes entre les couches de nanocristaux de cellulose inférieure et supérieure. Le nouveau dépôt d'une couche de nanocristaux sur la couche de XG est ensuite éliminé par spin-coating lors de la mise en rotation du support. Dans ce cas, seule la concentration et/ou la viscosité de la solution de XG gouverne l'épaisseur finale du film.

En régime dilué, les molécules de XG interagissent à la fois avec les couches inférieure et supérieure de nanocristaux de cellulose. Les interactions de Van der Waals et les liaisons hydrogène permettent de garder la cohésion du film pendant la rotation du support. La croissance des films multicouches C-XG est donc possible.

Lorsque les conditions de concentration de nanocristaux de cellulose et de XG sont réunies pour permettre une croissance, les profils de *Nb* associés aux échantillons sont homogènes. L'analyse des échantillons contenant des nanocristaux de cellulose hydrogénés ou deutérés a permis de déterminer les fractions volumiques en cellulose et en XG.

Les films multicouches (C1-XG1) et (C5-XG1) contiennent environ 80% de polysaccharides et forment des structures poreuses. Les films C1-XG1 et C5-XG1 sont composés respectivement de 53% de nanocristaux de cellulose et 25% de XG et 64% de cellulose et 20 % de XG. Les films PAH-C5/XG1 contiennent quant à eux 92% de polysaccharides dont 28% de cellulose et 64% de XG et forment une structure plus dense.

Les deux types de film présentent des organisations différentes qui ne se comportent pas de la même manière en solution. En effet, en solution dans D<sub>2</sub>O, les films multicouches C-XG voient leur épaisseur augmenter de 39 à 48% tandis que l'épaisseur du film PAH-C5/XG1 augmente de 134%.

Les deux types de films sont donc de bons candidats pour l'étude de dégradations enzymatiques car pour des épaisseurs et des densités de matière proches, ils offrent des architectures et des compositions contrastées.





**Chapitre IV**  
**Films multicouches comme**  
**détecteurs d'activité enzymatique**



La classe d'enzymes qui dégradent les chaînes de  $\beta$ -1,4-glucane est appelée cellulases. Ces enzymes sont appropriées pour la dégradation de la cellulose et du XG, ce dernier étant composé d'une chaîne principale de résidus glucosyles reliés par des liaisons  $\beta$ -1,4. L'hydrolyse enzymatique de ces molécules implique des actions synergiques de trois catégories de cellulases que sont les endoglucanases, les cellobiohydrolases (CBH ou exoglucanases) et les  $\beta$ -glucosidases [Zhang *et al.* 2006]. Les endoglucanases clivent aléatoirement les liaisons glucosidiques intramoléculaires des chaînes de cellulose et sont donc également adaptées à l'hydrolyse du XG [Hayashi *et al.* 1984; Vincken *et al.* 1997]. Les exoglucanases dégradent progressivement les chaînes de cellulose par les extrémités en libérant du cellobiose ou du glucose. Enfin, les  $\beta$ -glucosidases hydrolysent le cellobiose en glucose pour éliminer l'inhibition des endo- et exoglucanases provoquée par une concentration trop élevée en cellobiose. Par ailleurs, certaines CBH peuvent dégrader la cellulose cristalline mais de manière très lente [Teeri 1997]. Les cellulases commerciales proviennent essentiellement de deux genres de champignons : les espèces *Trichoderma* et les espèces *Aspergillus* [Zhang *et al.* 2006].

La cellulase qui a été utilisée est la Cellulyve TR (Lyven) qui constitue un mélange des différentes cellulases non purifiées issu de *Trichoderma reesei*. Son activité a été testée sur 4 types de films choisis en fonction de leur épaisseur et donc de leur couleur : les échantillons (C5-XG1)<sub>5</sub> et (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> de couleur brune et les échantillons (C5-XG1)<sub>8</sub> et (PAH-C5/XG1)<sub>4</sub> de couleur bleu clair qui ont des épaisseurs respectives de l'ordre de 90 et 160 nm. Ces films doivent cependant être robustes et ne pas se dégrader lorsqu'ils sont en contact avec des solutions contenant des tampons ou des sels afin de pouvoir être utilisés lors de tests de criblage de milieux de culture par exemple.

Dans une première partie, nous allons donc étudier la stabilité chimique de ces films et déterminer l'activité de la Cellulyve TR par la méthode de Nelson [Nelson 1944], classiquement utilisée pour déterminer l'activité des glycosyle hydrolases. Puis, la cinétique de l'hydrolyse des différents films sera suivie pour plusieurs activités enzymatiques par une étude préliminaire de QCM-D. Ensuite, la détection visuelle de la dégradation des films sera étudiée en fonction de la concentration d'enzymes utilisée et de la nature des films.

## 1 Caractérisations préliminaires

### 1.1 Stabilité chimique des films de cellulose-XG

Il est important de vérifier, préalablement aux tests enzymatiques, que la couleur des films n'évolue pas en fonction du pH et de la force ionique. Ceci permet de confirmer que la dégradation du film n'est pas liée au solvant utilisé mais bien à l'action de l'enzyme. Les films sélectionnés ((PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>, (PAH-C5/XG1)<sub>4</sub>, (C5-XG1)<sub>5</sub> et (C5-XG1)<sub>8</sub>) ont été immergés à mi-hauteur pendant 1 heure dans quatre types de solutions :

- de l'eau déionisée seule (pH 6) ;
- une solution de NaCl à 0,1 M ;
- une solution acide : HCl à pH 2,1 ;
- une solution basique : NaOH à pH 12,7 ;

L'aspect des films obtenu après les tests est présenté à la Figure 48.

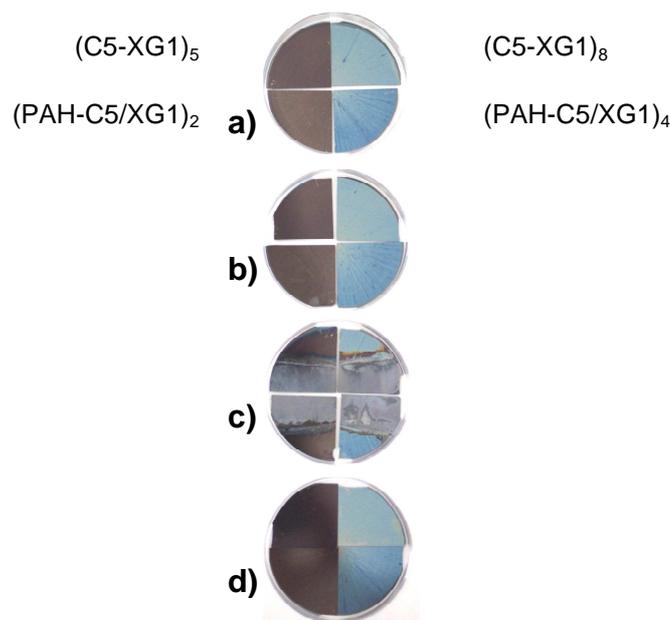


Figure 48 : Aspect des échantillons C5-XG1 et PAH-C5/XG1 après passage dans différentes solutions. a) NaCl 0,1 M ; b) HCl pH 2 ; c) NaOH pH 12 ; d) eau déionisée (pH 6).

Pour la solution acide ou en présence de sel, il est constaté que les films gardent leur coloration initiale et sont donc stables dans ces conditions. En revanche, les films perdent leur coloration en présence d'une base forte et sont donc instables en milieu basique. Cette dégradation peut être expliquée par la cassure du réseau de liaisons hydrogène en milieu basique, à la fois entre le XG et les nanocristaux de cellulose et entre les chaînes de cellulose qui forment les nanocristaux. Des solutions basiques sont couramment utilisées pour

l'extraction des hémicelluloses de la paroi végétale [Hayashi *et al.* 1987], ce résultat n'est donc pas surprenant.

Ainsi, les films multicouches sont stables pour un pH acide et pour une force ionique de 0,1 M alors qu'ils sont instables en milieu basique. Par ailleurs, les films sont également stables en présence de tampon acétate 10 mM à pH 5 (résultat non montré), solvant utilisé pour la préparation des solutions enzymatiques.

## **1.2 Caractérisation de l'activité enzymatique de Cellulyve TR par la méthode de Nelson**

Les glycosyle hydrolases sont des enzymes qui clivent les liaisons glycosidiques des polysaccharides et libèrent des extrémités réductrices. La méthode de Nelson [Nelson 1944] permet de déterminer l'activité de cette enzyme par un dosage indirect des extrémités réductrices libérées. Le dosage de Nelson se déroule en deux étapes :

- détermination d'une droite d'étalonnage qui établit la valeur de l'absorbance mesurée en fonction de la concentration en extrémités réductrices. Cette étape est réalisée sur des sucres monomères.
- dosage de l'activité d'une enzyme sur un polymère (en excès) en solution.

Pour rappel, le katal (kat), unité d'expression de l'activité enzymatique, correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la libération d'1 mol de produit par seconde. Comme nous connaissons la quantité de produit obtenu (= nombre d'extrémités libérées) pendant un temps  $t$ , il est possible de retrouver la valeur de l'activité de l'enzyme.

### **1.2.1 Droite d'étalonnage**

L'activité du mélange d'enzymes Cellulyve TR a été déterminée sur deux substrats : le XG et la carboxy méthyl cellulose (CMC). Comme ces deux composés sont constitués d'une chaîne principale de glucose liée en  $\beta$ -1,4, une gamme étalon a été réalisée à partir du glucose pour établir la droite d'étalonnage de référence pour le XG. La droite d'étalonnage obtenue (Figure 49) va nous permettre de déterminer le nombre d'extrémités réductrices libérées (donc les coupures effectuées par l'enzyme) en 10 minutes. Cette donnée correspond à l'activité de la solution enzymatique testée et va permettre de calculer l'activité du cocktail d'enzymes Cellulyve TR.

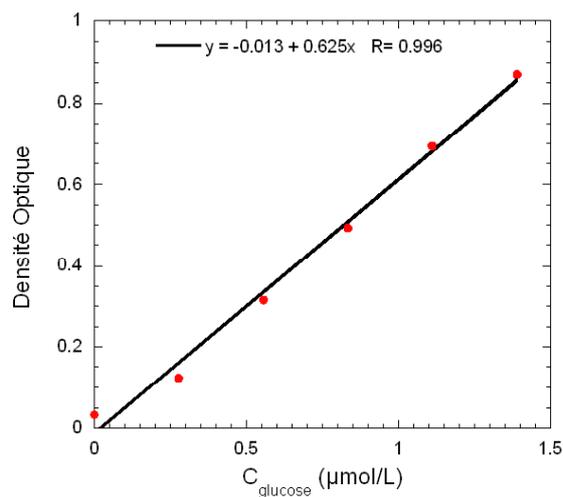


Figure 49 : Courbe de calibration de la densité optique mesurée en fonction de la concentration en glucose.

### 1.2.2 Mesure de l'activité de la cellulose TR

La solution enzymatique est préparée à partir de la Cellulose TR (Lyven). Son activité a été déterminée sur le XG et la CMC uniquement car la cellulose, sous forme de nanocristaux, est beaucoup plus difficile à hydrolyser que le XG.

Une solution enzymatique de Cellulose TR a été préparée à 0,5 mg/mL et, d'après les données du fournisseur, son activité est d'environ 2,4 nkat/mL. Les activités qui ont été déterminées sur le XG et la CMC par la méthode de Nelson sont respectivement de 7 et 12 nkat/mL. Il y a au moins un facteur 3 entre la donnée du fournisseur et les valeurs d'activité déterminées. Néanmoins, nous n'avons pas d'informations sur la nature du substrat utilisé par le fournisseur pour la valeur de 2,4 nkat/mL. Nous pouvons donc considérer que les deux données sont du même ordre de grandeur.

Par ailleurs, la valeur de DO minimum acceptable pour que la mesure soit valable est de 0,1. D'après la droite d'étalonnage (Figure 49), une telle valeur correspond à une concentration de 0,2 µmol/L, c'est-à-dire que l'activité minimale qui peut être détectée, est d'environ 3 nkat/mL. Nous allons utiliser cette donnée ainsi de comparer les sensibilités des deux méthodes : test de Nelson et détection visuelle d'activité enzymatique sur les films.

## 2 Analyse des cinétiques de dégradation par QCM-D

Les cinétiques des hydrolyses enzymatiques ont été suivies par QCM-D pour comprendre comment l'enzyme agit sur les deux types de films. La QCM-D permet

d'enregistrer la fréquence de vibration  $F$  de la surface du quartz et le facteur de dissipation  $D$  associé. La variation de fréquence  $\Delta F$  enregistrée dépend de la masse de matière présente sur la surface du quartz. Dans le cas d'un dépôt fin et rigide, la relation:  $\Delta F_n = -nk\Delta m$  (avec  $k$  une constante qui dépend des propriétés du quartz et  $n$  l'harmonique étudiée) permet de calculer aisément la masse adsorbée ou dégradée à la surface du film. En revanche, dans le cas d'un dépôt viscoélastique, la masse est déterminée par l'ajustement des courbes par le modèle de Voigt [Voinova *et al.* 1999]. De manière générale, une diminution de  $F$  indique une prise de masse à la surface du quartz ; réciproquement, une augmentation de  $F$  est liée à une perte de masse. Le facteur de dissipation  $D$  donne quant à lui des informations sur la nature du dépôt : rigide ou viscoélastique. Dans le cas d'un dépôt rigide et fin, le facteur  $D$  n'évolue pas alors qu'une augmentation de  $D$  est caractéristique d'un dépôt viscoélastique.

Plusieurs études de QCM-D ont été réalisées sur la dégradation de films de cellulose par des cellulases [Ahola *et al.* 2008b; Josefsson *et al.* 2008; Turon *et al.* 2008; Hu *et al.* 2009] avec des finalités différentes : détermination des cinétiques d'hydrolyse des cellulases [Turon *et al.* 2008], compréhension de leur mode d'action [Josefsson *et al.* 2008] ou encore étude de l'influence de la structure de surface de la cellulose sur l'activité de l'enzyme [Ahola *et al.* 2008b]. La Figure 50 présente les courbes obtenues classiquement par QCM-D pour l'hydrolyse enzymatique d'un film de cellulose.

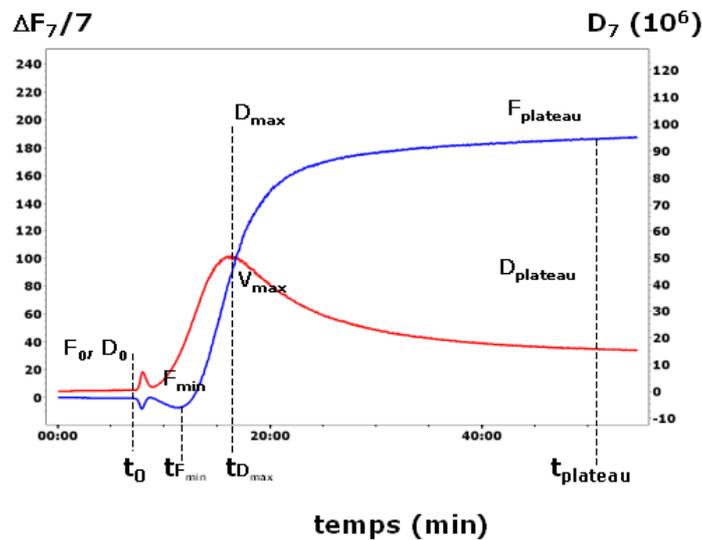


Figure 50 : Courbes caractéristiques de  $\Delta F$  (bleu) et  $D$  (rouge) obtenues dans le cas de l'hydrolyse d'un film de cellulose par des cellulases. La solution enzymatique est injectée à  $t_0$ .

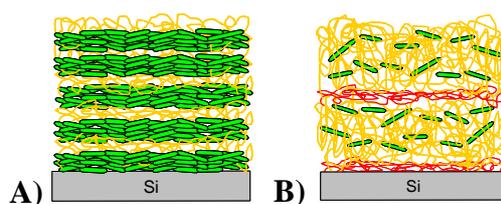
Après l'injection de l'enzyme ( $t_0$ ), la courbe de  $\Delta F$  présente un minimum  $F_{\min}$  à  $t_{F\min}$  puis la tendance s'inverse et la variation en fréquence augmente jusqu'à atteindre un plateau ( $F_{\text{plateau}}$ ). Parallèlement,  $D$  augmente dès l'injection de l'enzyme, puis atteint un maximum

( $D_{\max}$ ) à  $t_{D\max}$  qui coïncide avec le point d'inflexion de  $\Delta F$  ( $V_{\max}$ ) et enfin diminue vers une valeur asymptotique.

La diminution de  $\Delta F$  indique une prise de masse du film qui peut être attribuée à l'adsorption des enzymes à la surface du film immédiatement après l'injection. Ensuite, l'hydrolyse du substrat débute jusqu'à devenir le phénomène dominant par rapport à la liaison de l'enzyme sur le substrat (augmentation de  $\Delta F$ ). A la fin de l'hydrolyse,  $\Delta F$  se stabilise à une valeur  $F_{\text{plateau}}$  qui donne une indication sur la masse de matière totale qui a été dégradée. Le film est alors soit totalement dégradé, soit le substrat restant ne peut pas être dégradé (problème d'accessibilité de l'enzyme par exemple).

Le signal de dissipation donne des informations complémentaires à celles obtenues avec  $\Delta F$ . L'augmentation du  $D$  reflète le caractère viscoélastique de la surface qui est dû à une perturbation du film. L'interaction des enzymes avec la surface induit un relâchement du film (jusqu'à  $D_{\max}$ ) qui coïncide avec la vitesse maximale d'hydrolyse du film ( $V_{\max}$ ). Cette déstructuration peut permettre d'une part aux enzymes de se fixer à nouveau (flux continu d'enzyme lors de l'expérience) et d'autre part au solvant (ions acétates, eau) de pénétrer dans le film rendant cette structure plus accessible aux autres molécules d'enzyme. L'intégrité du film est ensuite détruite ce qui se traduit par une diminution de l'énergie de dissipation.

Nous allons étudier les cinétiques de dégradation enzymatique des films C5-XG1 et PAH-C5/XG1 (rappel des structures à la Figure 51) soumis à 6 solutions enzymatiques de cellulolyse TR présentant des activités différentes.

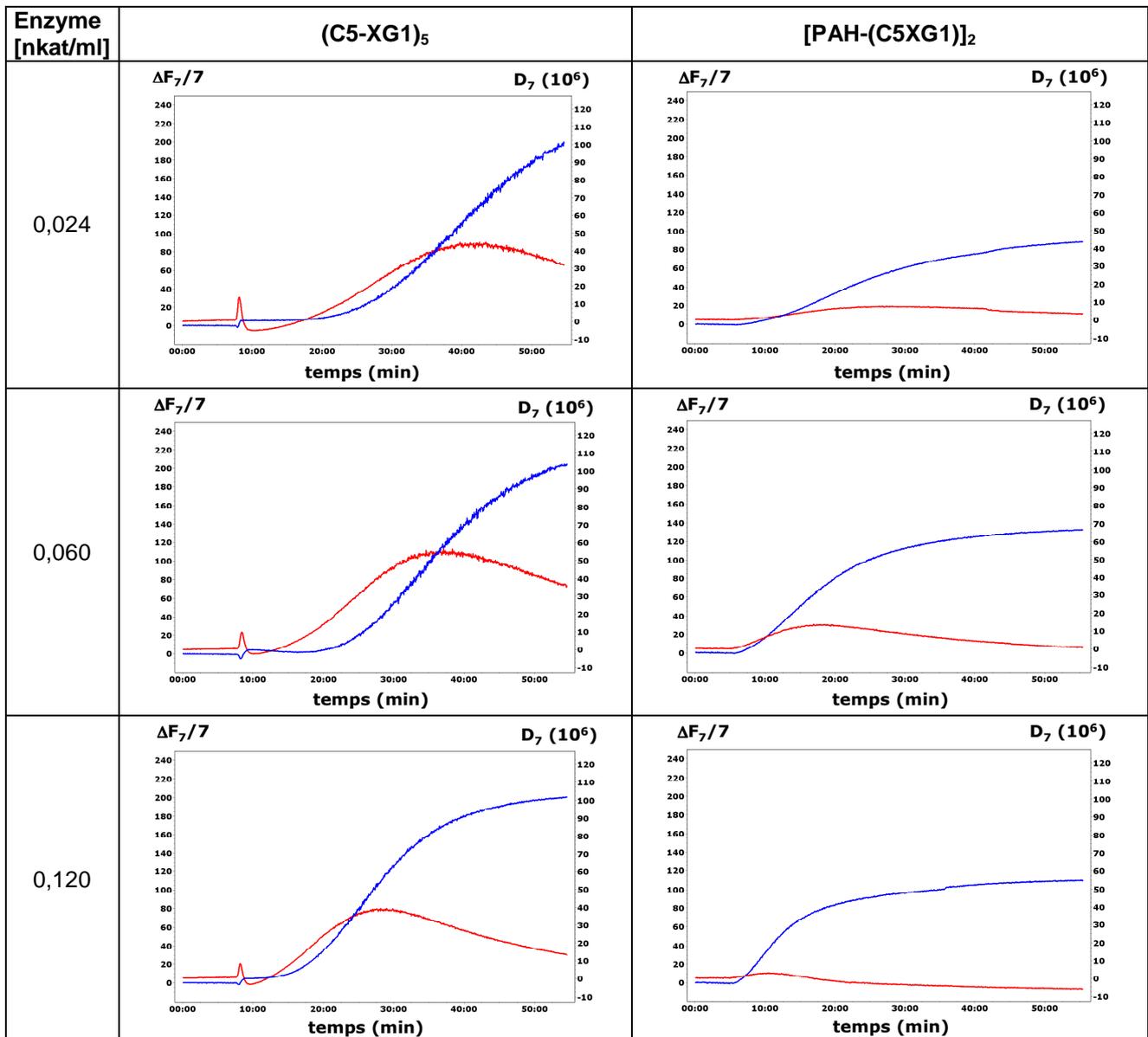


**Figure 51 :** Structure des deux types de films étudiés : A)  $(C5-XG1)_5$  et B)  $(PAH-C5/XG1)_2$ . Les nanocristaux de cellulose sont représentés en vert, le xyloglucane en orange et le PAH en rouge.

Pour ce faire, les films C5-XG1 et PAH-C5/XG1 sont préalablement déposés par spin-coating sur les cristaux de quartz. Ceux-ci sont ensuite placés dans les cellules de la QCM-D thermostatées à 21°C, qui sont laissées sous un flux de solvant pour que le dépôt puisse se mettre à l'équilibre. Cette étape permet de s'affranchir de l'effet de gonflement des films par le solvant qui a une influence sur le signal de dissipation. Après gonflement, les échantillons choisis restent stables dans le solvant utilisé pour les dégradations enzymatiques, l'hydrolyse

enzymatique des films peut donc être étudiée. Une fois la ligne de base stable ( $F_0$ ,  $D_0$ , Figure 50), les solutions enzymatiques sont injectées en flux continu (100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) dans les cellules.

La fréquence et le facteur de dissipation sont enregistrés en fonction du temps pour les 6 solutions enzymatiques dont les activités sont comprises entre 0,600 et 0,006 nkat/mL. La Figure 52 présente l'évolution de la fréquence ( $\Delta F$ ) et du facteur de dissipation ( $D$ ) pour la 7<sup>ème</sup> harmonique en fonction du temps d'hydrolyse pour les films  $(\text{C5-XG1})_5$  et  $(\text{PAH-C5/XG1})_2$ . Ces profils ont la même allure que ceux déjà observés dans la littérature [Ahola *et al.* 2008b; Turon *et al.* 2008]. Le profil de l'activité de 0,006 nkat/mL n'a pas été représenté car le profil en fréquence reste quasiment inchangé sur l'échelle de temps étudié. Ceci indiquerait que l'activité des enzymes sur ce film est trop faible pour être détectée à cette échelle de temps.



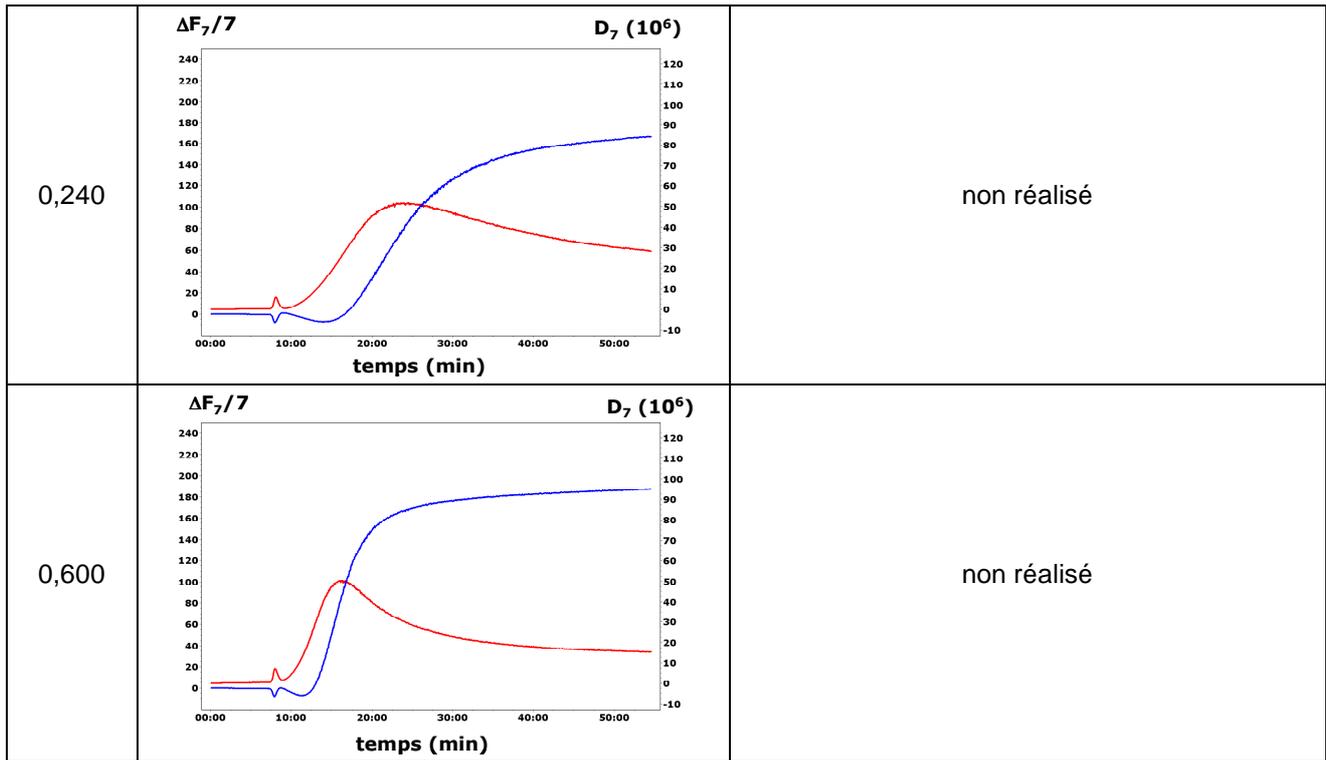


Figure 52 : Variation de fréquence ( $\Delta F_7/7$ , bleu) et de dissipation ( $\Delta D_7 \times 10^6$ , rouge) pour les films (C5-XG1)<sub>5</sub> et (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> traités avec la Cellulve TR dont l'activité est comprise entre 0,024 nkat/mL et 0,600 nkat/mL. Les profils de la fréquence et de la dissipation sont les 7<sup>èmes</sup> harmoniques (35 MHz) normalisées. Les solutions d'enzymes sont injectées à  $t_0 = 7$  min.

Activité enzymatique (nkat/mL)	$F_{\min}$ (Hz)	$t_{F\min}$ (min)	$\Delta F_7/7$ au plateau (Hz)	$D_{7\max}$ ( $\times 10^6$ )	$t_{D\max}$ (min)	$D_7$ ( $\times 10^6$ ) au plateau
0,024	-	-	194,2*	51,5	29,4	31,0*
0,060	2	9,0	202,6*	43,3	33,4	35,0*
0,120	-	-	200,0*	38,2	20,0	13,0*
0,240	-7,45	7,5	169,0*	51,0	17,1	28,0
0,600	-7,45	4,5	189,0	49,7	9,5	15,0

Tableau 14 : Valeurs caractéristiques des profils de QCM-D pour les 5 activités enzymatiques testées sur les films (C5-XG1)<sub>5</sub> pour la 7<sup>ème</sup> harmonique.  $\Delta F$  (plateau) est mesuré à 82 minutes environ. (\*) plateau presque atteint.

Activité enzymatique (nkat/mL)	$F_{\min}$ (Hz)	$t_{F\min}$ (min)	$\Delta F_7/7$ au plateau (Hz)	$D_{7\max}$ ( $\times 10^6$ )	$t_{D\max}$ (min)	$D_7$ ( $\times 10^6$ ) au plateau
0,024	-	-	98,0	7,4	22,7	6,0
0,060	-	-	139,5	13,2	13,6	1,0
0,120	-	-	116,2	2,9	5,7	-5,0
0,240	-	-	-	-	-	-
0,600	-	-	-	-	-	-

Tableau 15 : Valeurs caractéristiques des profils de QCM-D pour les 5 activités enzymatiques testées sur les films (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> pour la 7<sup>ème</sup> harmonique.  $\Delta F$  (plateau) est mesuré à 89 minutes environ.

## **2.1 Influence de l'activité de la solution enzymatique**

La Figure 52 montre que l'allure de courbes de  $\Delta F$  et  $D$  évolue en fonction de l'activité et/ou la concentration des solutions enzymatiques. En premier lieu,  $F_{\min}$  n'est pas observée pour les activités plus faibles et apparaît uniquement au-delà de 0,120 nkat/mL. Le minimum se situe alors vers des temps plus courts (Tableau 14) lorsque la concentration en enzyme augmente. Ceci indique qu'à forte concentration, la surface du film est rapidement saturée ( $F_{\min}$ ) par l'adsorption d'enzymes. Lorsque la concentration diminue, il faut plus de temps pour recouvrir la totalité du film, ce qui se traduit par l'apparition de  $F_{\min}$  à des temps plus longs. Enfin, aux plus faibles concentrations, la quantité d'enzymes adsorbée semble trop faible pour être détectée et/ou le signal de fréquence lié à l'adsorption de l'enzyme est contrebalancé par le phénomène de dégradation du film.

En ce qui concerne les valeurs de  $F_{\text{plateau}}$ , il apparaît que celles-ci sont du même ordre de grandeur (respectivement de 191 Hz pour C5-XG1 et de 118 Hz pour PAH-C5/XG1, en moyenne) quelle que soit la concentration d'enzymes injectée (Tableau 14 ; Tableau 15). Le plateau n'est pas tout à fait atteint dans certains cas, mais il est probable que les valeurs de plateau associées soient du même ordre sur une échelle de temps plus longue. On peut donc conclure que la concentration d'enzyme ne doit pas avoir d'influence sur la quantité de matière finale dégradée. Le substrat est alors le produit limitant pour la dégradation enzymatique.

Par ailleurs, pour un type de film donné, les valeurs de  $D_{\max}$  sont également dans la même gamme pour toutes les concentrations d'enzymes (respectivement environ  $47 \cdot 10^6$  pour C5-XG1 et environ  $7,8 \cdot 10^6$  pour PAH-C5/XG1). Ainsi, les enzymes déstructurent chaque film de la même manière. Parallèlement, lorsque la concentration enzymatique augmente,  $D_{\max}$  est atteint plus rapidement (9 min au lieu de 29 min pour le film C5-XG1). Ainsi, la déstructuration du film liée à l'action des enzymes intervient plus rapidement. Ceci signifie que la cinétique d'hydrolyse est plus rapide lorsque l'activité ou la concentration en enzymes est plus élevée.

Enfin les valeurs de  $D_{\text{plateau}}$  diminuent lorsque la concentration d'enzyme augmente, jusqu'à devenir, dans certains cas, inférieures à leur valeur initiale. Ceci signifie que le film est moins viscoélastique (ou plus rigide) que son état initial, c'est-à-dire avant l'injection de la solution enzymatique. Comme il est peu probable que le film se soit rigidifié (en éliminant des molécules d'eau par exemple), la quantité de film viscoélastique doit alors être plus faible. Ce phénomène va dans le sens d'une dégradation du film.

## 2.2 Influence du type de film

Bien que de construction différente, les films (C5-XG1)<sub>5</sub> et (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> ont des épaisseurs totales similaires, de l'ordre de 90 nm. Néanmoins, les comportements enregistrés vis-à-vis de la dégradation enzymatique sont différents.

Pour les deux types de films,  $F_{\min}$  n'est pas observée lors de l'injection des solutions enzymatiques dont l'activité est inférieure ou égale à 0,120 nkat/mL. Par conséquent, le processus de dégradation des films est prépondérant sur le signal de fréquence par rapport à l'interaction des enzymes avec le substrat. Les données dont nous disposons sont insuffisantes pour permettre de tirer des informations supplémentaires de  $F_{\min}$ .

Par ailleurs, les valeurs de  $F_{\text{plateau}}$  sont environ 2 fois plus élevées pour (C5-XG1)<sub>5</sub> que pour (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>. La quantité de matière dégradée est donc plus importante pour le film (C5-XG1)<sub>5</sub>. Ce phénomène peut être dû à la présence de PAH puisque cette molécule ne possède pas de liaisons glucosidiques. Etant donnée la spécificité de l'action des enzymes [Zhang *et al.* 2006], les cellulases ne peuvent pas franchir la barrière que représente le PAH. La quantité de substrat disponible est donc plus faible sur le film (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> que pour le film (C5-XG1)<sub>5</sub>. Si l'on considère qu'une seule couche de C/XG est dégradée dans le cas de (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>, ces résultats sont cohérents avec l'analyse de la structure interne des films réalisée en réflectivité de neutrons.

En ce qui concerne les valeurs de  $D_{\max}$ , celles-ci sont de l'ordre de  $47 \cdot 10^6$  pour (C5-XG1)<sub>5</sub> tandis que  $D_{\max}$  est de  $7,8 \cdot 10^6$  en moyenne pour (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> : la déstructuration du film par l'enzyme est plus de 5 fois plus importante pour les films (C5-XG1)<sub>5</sub> que pour les films (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>. Puisque les épaisseurs des films sont similaires et la densité de matière est identique, on s'attend à retrouver un facteur 2 entre les  $D_{\max}$ . Cependant, la composition chimique et l'organisation des couches C/XG en mélange impliquerait que le film (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> ait des propriétés de gonflement plus importantes que le film (C5-XG1)<sub>5</sub>. Les processus de dégradation doivent donc être différents :

- pour le film (C5-XG1)<sub>5</sub>, la première étape est la pénétration de l'enzyme dans la structure conduisant à une couche gonflée donc plus viscoélastique. Ce n'est qu'après l'hydrolyse d'un certain nombre de chaînes de XG que la structure est détruite. En effet, il y a un temps de latence pour l'augmentation de F pour (C5-XG1)<sub>5</sub> alors que la dissipation augmente immédiatement après l'injection

d'enzyme. Cela s'explique par une ouverture de la structure et l'hydratation sans perte de matériel.

- Pour le (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>, la dissipation augmente peu car la couche est déjà très gonflée en accord avec les résultats de réflectivité de neutrons et l'hydrolyse ne modifie pas (ou peu) les propriétés mécaniques du film.

Par ailleurs,  $t_{D_{max}}$  peut fournir des données d'ordre cinétique : il s'avère que  $D_{max}$  est atteint plus rapidement pour le film (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> que pour le film (C5-XG1)<sub>5</sub>. Les cinétiques de gonflement du film par l'enzyme pour les films (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> sont donc plus rapides. En effet, dans (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>, les nanocristaux de cellulose et le XG sont déposés sous forme de mélange. Cette couche est principalement composée de XG lorsque le film est sec (60% en volume et 29% de nanocristaux de cellulose), d'après l'analyse des résultats de réflectivité de neutrons. Par ailleurs, l'étude du film (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> en solution a montré que le film gonfle de 115% et contient 69% d'eau. La combinaison de la forte proportion de XG, plus facile à dégrader que les nanocristaux de cellulose, et du gonflement important du film en solution rend celui-ci plus accessible aux enzymes. De plus, la quantité de substrat disponible est plus faible sur le film (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> du fait de la présence de couches de PAH intermédiaires (épaisseur de l'ordre de 2 à 3 nm). Ces deux paramètres entraînent une cinétique de dégradation plus rapide.

En revanche, le film (C5-XG1)<sub>5</sub> est composé de couches alternées de nanocristaux de cellulose (43%) et de XG (36%). La proportion de nanocristaux de cellulose est plus importante que dans le film (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>. De plus, le film C5-XG1 gonfle moins que PAH-C5/XG1 (gonflement de 85%), l'enzyme doit donc préalablement désorganiser le film pour pouvoir le dégrader. De plus, puisque la quantité de nanocristaux de cellulose est élevée, le film doit être globalement plus difficile à hydrolyser par l'enzyme, ce qui doit ralentir son action.

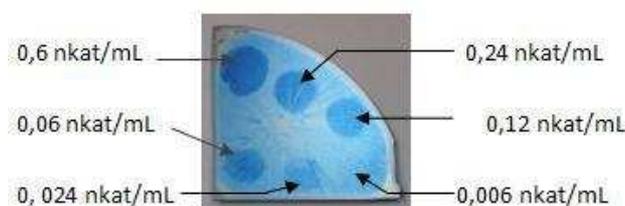
## **2.3 Conclusion**

Il ressort de cette étude deux phénomènes principaux. En premier lieu, la concentration en enzyme influence essentiellement la cinétique d'hydrolyse. En effet, les quantités de matière dégradée sont du même ordre de grandeur pour chaque type de films et pour des temps suffisamment longs.

Deuxièmement, les deux types de structures utilisées (C5-XG1 et PAH-C5/XG1) ont des comportements différents vis-à-vis de l'attaque enzymatique. Les cinétiques d'hydrolyse de (C5-XG1)<sub>5</sub> sont notamment plus longues que celles de (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>. En effet, cette structure est plus compacte et nécessite le clivage de nombreuses chaînes de polysaccharides par les enzymes avant la destruction du film. De plus, la quantité de matière dégradée est plus élevée pour les films (C5-XG1)<sub>5</sub> que pour les films (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>, ce qui conforte l'idée que l'action des cellulases est stoppée par la présence d'une couche de PAH, dans le cas de (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>.

### **3 Détection visuelle de l'activité enzymatique sur les films multicouches de cellulose-XG**

Afin de pouvoir comparer le comportement des deux types de films, nous avons choisis des échantillons de couleur bleue dont l'épaisseur est de l'ordre de 160 nm. Les films utilisés sont composés de 8 bicouches dans le cas de (C5-XG1) et de 5 bicouches dans le cas de (PAH-C5/XG1). Nous avons utilisé les mêmes concentrations de solutions enzymatiques que pour les expériences de QCM-D. L'étude est réalisée dans les conditions qui permettent une activité optimale de l'enzyme (pH 5 et 50°C). 10 µL de chaque solution enzymatique sont donc déposés sur les films, qui sont ensuite placés à l'étuve à 50°C pendant 3, 5, 10 et 15 min puis rincés abondamment. La Figure 53 présente la disposition des gouttes de solutions d'enzyme sur les films selon leur activité.



**Figure 53 : Disposition des gouttes de solution enzymatique selon leur activité.**

L'étude de la dégradation enzymatique a également été effectuée sur les échantillons (C5-XG1)<sub>5</sub> et (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>. Les deux types de films ont une même épaisseur de l'ordre de 90 nm de couleur brune. Ils présentent respectivement le même comportement vis-à-vis des attaques enzymatiques que les échantillons (C5-XG1)<sub>8</sub> et (PAH-C5/XG1)<sub>5</sub>. Nous présentons par la suite uniquement les résultats obtenus sur les films de couleur bleue.

### 3.1 Dégradation enzymatique des films (C5-XG1)<sub>8</sub>

La Figure 54 montre l'aspect des films (C5-XG1)<sub>8</sub> avant et après le dépôt des solutions enzymatiques. L'observation des attaques enzymatiques des échantillons (C5-XG1)<sub>8</sub> montre l'apparition de taches, qui sont liées à l'activité des solutions enzymatiques correspondantes.

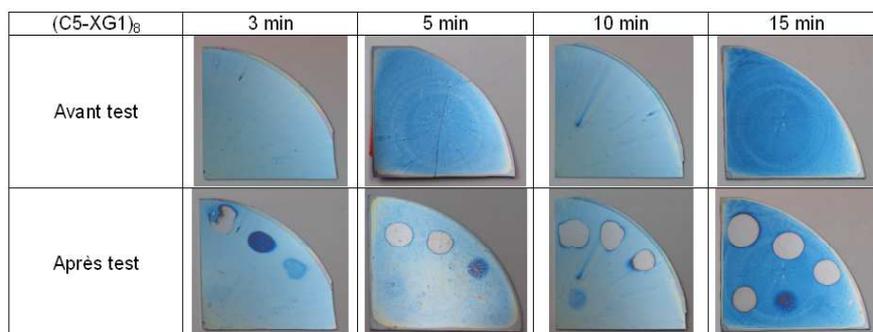


Figure 54 : Photos des films (C5-XG1)<sub>8</sub> avant et après attaques enzymatiques à 3, 5, 10 et 15 min pour les 6 concentrations d'enzyme.

Au bout de 3 min, trois taches sont observées de couleur grise (surface du silicium), bleu foncé et bleu intermédiaire et correspondent respectivement aux activités de 0,600, 0,240 et 0,120 nkat/mL. A 5 min, le support est visible pour les activités à 0,600 et 0,240 nkat/mL tandis que une tache bleu foncé apparaît pour 0,120 nkat/mL et une tache bleue de faible intensité apparaît pour 0,060 nkat/mL. Puis à 10 min, la surface est visible pour les trois premières concentrations et une tache un peu plus intense est observable pour l'activité de 0,060 nkat/mL. Enfin, la surface du silicium est visible pour les 4 activités les plus élevées au bout de 15 min, une tache bleu foncé et une tache peu intense sont observées correspondant respectivement aux activités 0,024 et 0,006 nkat/mL.

Les couleurs observées dépendent de l'activité de l'enzyme et de son temps d'action sur le film. Lorsque l'enzyme dégrade tout le film, la couleur passe du bleu ciel au gris. Cependant, des tâches de couleurs intermédiaires (bleu clair ou bleu foncé) apparaissent lorsque les temps et/ou concentrations ne permettent pas une attaque jusqu'à la surface du support. L'attaque se fait donc sur toute l'épaisseur du film dans le cas des échantillons (C5-XG1)<sub>8</sub> faisant apparaître la surface du support dès 3 min.

Si l'on se place dans les mêmes conditions d'hydrolyse que celles utilisées pour la méthode de Nelson (temps d'hydrolyse de 10 min), la sensibilité du test visuel est jusqu'à 50 fois supérieure. Cette sensibilité peut encore être augmentée en allongeant les temps de contact entre la solution enzymatique et le film. Par exemple, la sensibilité est améliorée de 150% en passant de 10 min à 15 minutes de contact.

### 3.2 Dégradation enzymatique des films (PAH-C5/XG1)<sub>4</sub>

En ce qui concerne les échantillons (PAH-C5/XG1)<sub>4</sub> (Figure 55), le comportement est différent. La surface du support de silicium n'est pas observée quel que soit le temps d'hydrolyse étudié. L'activité enzymatique est détectée par des taches semblables de couleur bleu foncé. Les activités de 0,600 et 0,240 nkat/mL sont détectées au bout de 3 min, puis l'activité de 0,120 nkat/mL est détectée à 5 min d'hydrolyse. Enfin, les activités de 0,060 et 0,024 nkat/mL sont visibles au bout de 15 min. En revanche, l'activité de 0,006 nkat/mL n'est jamais observée sur la durée d'hydrolyse étudiée.

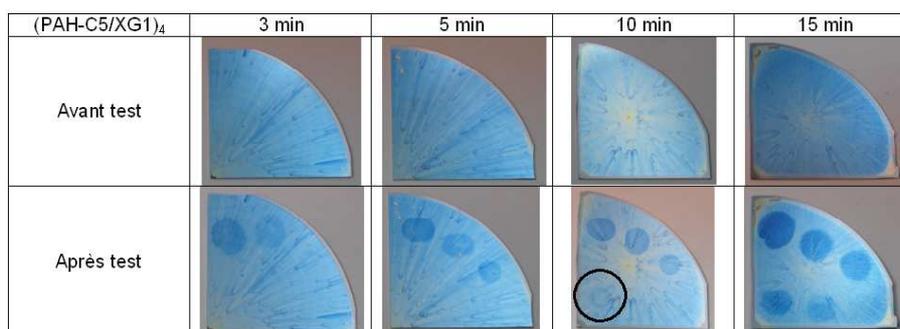


Figure 55 : Photos des films (PAH-C5/XG1)<sub>4</sub> avant et après attaques enzymatiques à 3, 5, 10 et 15 min pour les 6 concentrations d'enzyme. Le cercle noir indique la présence d'une tache liée à une attaque enzymatique.

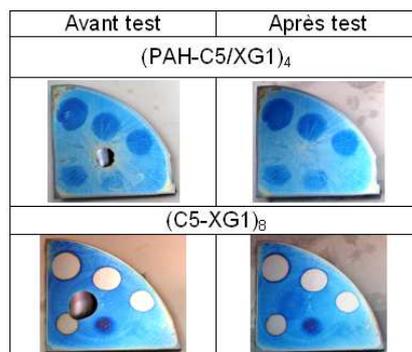
Dans le cas des échantillons (PAH-C5/XG1)<sub>4</sub>, la coloration obtenue après l'attaque enzymatique reste d'un bleu, plus ou moins intense, quels que soient les concentrations et les temps appliqués. Les hydrolyses semblent être stoppées à un même niveau de profondeur de couleur bleu foncé. Cette couleur correspond à une épaisseur de l'ordre de 120 nm, ce qui équivaut à 3,5 bicouches de PAH-C5/XG1 (Chapitre 2). Il semble donc possible que les enzymes soient stoppées par la couche de PAH des films (PAH-C5/XG1)<sub>4</sub>. Cela confirme bien donc le rôle du PAH comme barrière vis-à-vis des enzymes et la surface du support ne serait donc jamais atteinte quel que soit le temps d'hydrolyse étudié.

Comme pour les films (C5-XG1)<sub>8</sub>, la sensibilité de détection est 50 fois supérieure à celle de la méthode de Nelson [Nelson 1944] dans les mêmes conditions d'hydrolyse et peut être augmentée avec les temps de contact enzyme/substrat.

### 3.3 Spécificité de la détection visuelle sur les films multicouches

La Cellulyve TR est constituée d'un mélange de cellulases non purifiées. Il est possible que d'autres composés que les cellulases agissent sur les films et les dégradent. Afin

de vérifier que c'est bien l'enzyme active qui dégrade les films, 10  $\mu$ L d'enzyme inactivée (témoin) sont déposés sur les films pendant 15 minutes. Le témoin est obtenu en chauffant la solution d'enzyme (2,4 nkat/mL) à 110°C pendant 2 heures. Aucune trace liée au témoin n'est observée pour l'échantillon (PAH-C5/XG1)<sub>4</sub> tandis qu'une trace de très faible intensité est visible pour (C5-XG1)<sub>8</sub> (Figure 56). Cette trace est beaucoup moins intense et est négligeable par rapport aux résultats obtenus avec l'enzyme active. Le changement de couleur est donc bien dû à l'activité de l'enzyme.



**Figure 56 :** Test permettant la vérification que la Cellulyve TR désactivée n'agit pas sur des films (PAH-C5/XG1)<sub>4</sub> et (C5-XG1)<sub>8</sub>.

## 4 Conclusion

L'analyse des hydrolyses enzymatiques par QCM-D a montré que les cinétiques de dégradation de (C5-XG1)<sub>5</sub> sont plus longues que celles de (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>. D'une part, la pénétration de cette structure par l'enzyme est plus difficile et nécessite le clivage de nombreuses chaînes de polysaccharides par les enzymes avant la destruction du film. D'autre part, la quantité de matière dégradée est plus élevée pour les films (C5-XG1)<sub>5</sub>. De plus, (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub> contient plus de XG et possède une structure plus viscoélastique, ce qui facilite la dégradation du film par l'enzyme. Par ailleurs, la quantité de matière dégradée plus faible conforte l'idée que l'action des cellulases est stoppée par la présence d'une couche de PAH, dans le cas de (PAH-C5/XG1)<sub>2</sub>.

Les cinétiques observées par QCM-D sont beaucoup plus longues que les tests visuels de dégradation enzymatique des films multicouches. Ceci est dû au fait que les expériences de QCM-D sont réalisées à 21°C qui ne correspond pas à la température d'activité optimale de la Cellulyve TR (50°C).

Les différentes expériences ont montré qu'il est possible de détecter l'activité enzymatique des cellulases sur des dépôts nanométriques composés de nanocristaux de cellulose et de XG. Pour les mêmes conditions de température et de temps d'hydrolyse que celles de la méthode de Nelson, il est possible de détecter une activité de 0,06 nkat/mL, et ce avec les deux types de films. La sensibilité du test visuel est 50 fois supérieure à celle de la méthode de Nelson, classiquement utilisée pour doser les activités des glycosyle hydrolases. Cette sensibilité peut être modulée en faisant varier les temps de contact avec la surface, c'est-à-dire en jouant sur les cinétiques d'hydrolyse.

De plus, les tests visuels montrent une hydrolyse complète des films (C5-XG1), tandis que l'attaque sur les constructions (PAH-C5/XG1) est stoppée à une certaine épaisseur, laissant toujours apparaître la même couleur. Les deux modèles ont donc un comportement différent mais peuvent être complémentaires. La construction PAH-C5/XG1 donne une réponse « oui/non » et offre la possibilité de choisir la couleur désirée après dégradation enzymatique. Parallèlement, la construction C5-XG1 permet d'observer, pour un temps d'attaque donnée, un gradient de couleurs en fonction de l'activité de l'enzyme. En réalisant des études systématiques supplémentaires, il serait possible d'attribuer une couleur à une activité de manière quantitative.





**Chapitre V**  
**Résultats préliminaires sur**  
**la détection d'activité enzymatique**  
**d'un autre système enzyme/biopolymère**



Nous avons vu qu'il est possible de détecter des activités de cellulases sur des films multicouches composés de cellulose et de xyloglucane. La méthode de fabrication des films est fondée sur l'interaction spécifique entre le xyloglucane et la cellulose. Afin de décliner cette méthode de détection à d'autres systèmes biopolymères/enzymes, nous avons souhaité développer une méthode de fabrication de films colorés plus générique. Pour cela, nous souhaitons étudier la construction de films de biopolymères stabilisés par une résine mélamine-formaldéhyde. L'avantage de cette méthode est que les résines sont très peu spécifiques et peuvent réagir avec différents types de fonctions chimiques (alcool, amine, acide). D'autre part, la réticulation ne se produit pas à température ambiante, ce qui permet de mettre en œuvre la couche. La réticulation est induite par augmentation de la température (80-120°C). Bien que cette gamme de température soit élevée, elle n'affecte pas la structure des biopolymères. La méthode est donc potentiellement applicable à une large gamme de biopolymères. Un grand nombre de dispositifs de détection pourront être produits si les trois conditions suivantes sont respectées :

- les couches déposées devront être assez épaisses pour permettre l'apparition de couleur(s) ;
- le film devra être stable dans différentes conditions de milieu ;
- l'enzyme devra être capable d'hydrolyser le biopolymère malgré la présence de la résine.

Afin de démontrer la validité de cette méthode, nous avons choisi comme système modèle la dégradation enzymatique de films d'arabinoxylane. Cette catégorie de polysaccharides fait partie d'une des principales familles d'hémicelluloses : les xylanes. Cette famille représente le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature et constitue un tiers du carbone renouvelable disponible sur Terre [Prade 1995].

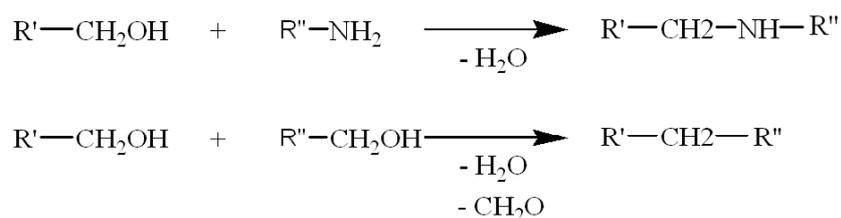
La structure primaire des xylanes est constituée d'un squelette de monomères de xylopyranose liés en  $\beta$ -1,4. Ce squelette peut être substitué, par des groupements 4-O-méthyl-D-glucuronique sur l'O-2 de certains résidus xylosyles (xylanes acides) ou par des résidus  $\alpha$ -L-arabinofuranosyles en O-2 ou O-3 (arabinoxylanes). La proportion des substituants varie en fonction du tissu et de l'origine botanique. En particulier, les arabinoxylanes présents dans les tiges de graminées ou de feuillus sont faiblement ramifiés et ont tendance à s'associer [Courtin et Delcour 2002]. Cependant, les arabinoxylanes présents dans le grain de blé sont fortement ramifiés et donc plus faciles à solubiliser [Courtin et Delcour 2002]. C'est la raison pour laquelle l'arabinoxylane de blé a été utilisé pour la réalisation des films et l'étude de leur dégradation enzymatique.

Les chaînes de xylane peuvent être dégradées par des glycosidases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons 1,4-  $\beta$ -D-xylosidiques pour produire du xylose. En particulier les *endo*-1,4- $\beta$ -D-xylanases, qui ont des origines essentiellement fongiques [Belancic *et al.* 1995] ou bactériennes [Sunna et Antranikian 1997], clivent les chaînes de xylane de manière aléatoire. Ces enzymes sont donc appropriées pour la dégradation des arabinoxyanes. Pour cette étude, l'enzyme choisie est la xylanase M1 (Megazyme) issue de *Trichoderma viride*.

Les films que nous allons utilisés sont constitués d'une monocouche d'arabinoxylane neutre mélangés à une résine mélamine formaldéhyde qui permet de stabiliser le film sur un support de silicium. Comme pour les films constitués de cellulose et de xyloglucane, la stabilité du film a été testée visuellement et la sensibilité de l'hydrolyse des films par la xylanase a été comparée à la méthode de Nelson.

## 1 Construction et stabilité des films

La stratégie de stabilisation des films d'arabinoxylane (AX) est différente de celle des films multicouches de C-XG. En effet, dans le cas des films de C-XG, les fortes interactions existant entre la cellulose et le XG font que le film est stable en solution acide ou neutre et en présence de force ionique. Dans le cas des AX, un dépôt est réalisé par spin-coating sur un support de silicium mais aucune interaction entre les chaînes de xylanes et le support ne permet de stabiliser la couche. Ainsi, dès que le dépôt est en solution, l'AX va se solubiliser et entraîner la destruction du film. En revanche, le dépôt d'un mélange d'AX et d'une résine mélamine-formaldéhyde permet, après réticulation de cette dernière, de créer un réseau dans lequel les molécules d'AX vont être immobilisées. Cette méthode a déjà été utilisée pour la fixation de film de chitosane [Schauer *et al.* 2003] ou de dérivés de cellulose [Ducéré *et al.* 2005]. La résine que nous avons utilisée est une résine hydrosoluble mélamine partiellement méthylée en présence de formaldéhyde (<sup>®</sup>Resimene AQ-7550, INEOS Melamines) qui permet de réticuler les chaînes de xylanes en réagissant avec les groupements hydroxyles. Cette réticulation se réalise via des réactions de condensation dans lesquelles se forment des ponts éther et méthylène [Dunky 2004] (Figure 57).

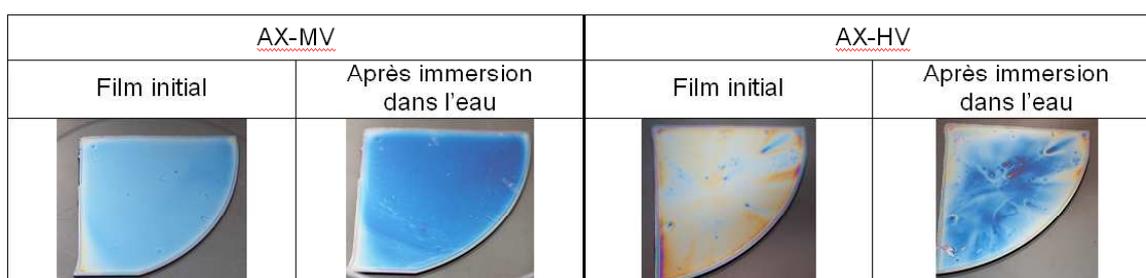


**Figure 57 : Condensation des molécules par la formation de pont éther et/ou de pont méthylène.**

La réticulation doit permettre de stabiliser le film lorsqu’il sera en contact avec la solution test mais devra être dégradé en présence d’enzyme. Il est donc important de déterminer la concentration de résine qui permet de stabiliser le film en solution tout en laissant l’AX accessible à l’enzyme pour visualiser son action.

### 1.1 Influence de la nature de l’AX utilisé

Avant de tester la stabilité des films en fonction du pH et de la force ionique (comme cela a été réalisé précédemment sur les films de C-XG), nous avons vérifié que les films d’AX sont bien stables dans l’eau. Les dépôts ont été réalisés à partir de solutions d’AX à 15 g/L contenant 20% de résine. Deux types d’AX ont été étudiés : un AX de viscosité moyenne (22 cSt, noté AX-MV) et un autre AX de viscosité plus élevée (47 cSt, noté AX-HV). Puisque les films sont réalisés par spin-coating, l’intérêt de faire varier la viscosité est de pouvoir moduler l’épaisseur des films (et donc la couleur du dépôt) pour une concentration donnée [Norrman *et al.* 2005]. La Figure 58 représente l’allure des deux films avant et après immersion dans l’eau déionisée. Avant le passage dans l’eau, le film d’AX-MV présente une couleur bleue et homogène et reste homogène après le passage dans l’eau. Dans le cas du film d’AX-HV, le film est globalement jaune mais moins homogène que le film d’AX-MV. De plus, après le passage dans l’eau, le film a perdu sa couleur jaune pour devenir plus bleu. Cette variation de couleur est certainement due à une diminution de l’épaisseur du film et donc à la perte d’AX.



**Figure 58 : Allure des films composés d’AX à 15 g/L et de 20% résine avant et après immersion dans l’eau. A droite : films d’AX moyenne viscosité ; à gauche : films d’AX haute viscosité.**

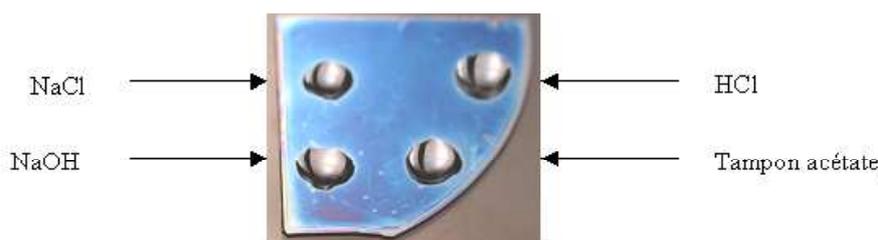
Le film d’AX-HV est donc beaucoup moins stable dans l’eau que le même film réalisé avec AX-MV. Cette instabilité doit être liée à la viscosité plus importante du AX-HV. En effet, puisque la viscosité de l’AX est plus élevée, sa masse molaire doit également être plus importante. Ainsi, pour la même concentration que AX-MV, les molécules d’AX-HV doivent

former de plus gros agrégats, limitant donc la réticulation de la résine. Le film d'AX-HV est alors moins bien stabilisé que le film d'AX-MV. Par conséquent, la suite de l'étude sera réalisée à partir d'AX-MV uniquement.

## 1.2 Influence de la concentration de résine

A l'issu des résultats précédents, nous avons décidé d'étudier les films d'AX-MV et de déterminer la quantité de résine la plus adaptée pour stabiliser les films tout en permettant la détection d'une activité enzymatique. Les tests sont réalisés sur des films contenant 5, 10, 15 ou 20% de résine.

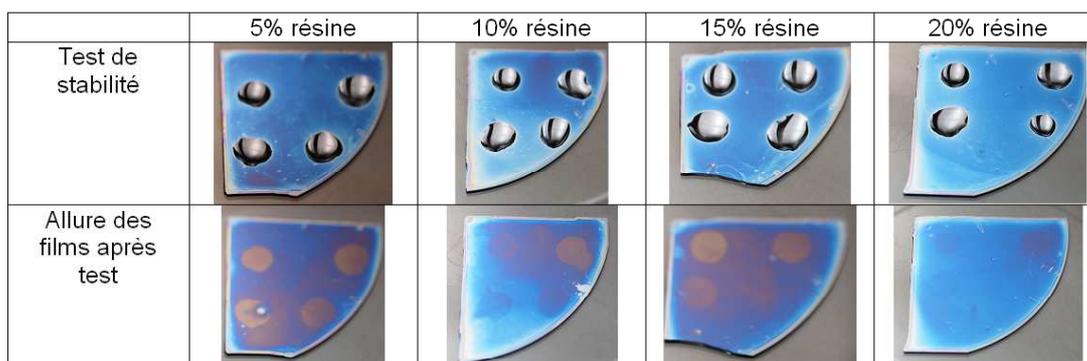
Comme pour les films de C-XG, les films d'AX-MV sont mis en contact avec des solutions de NaCl à 0,1 M, de HCl à pH 2 et de NaOH à pH 12 (Figure 59) pour déterminer leur stabilité vis-à-vis de la force ionique et du pH. Par ailleurs, la xylanase est diluée dans du tampon acétate à 10 mM pH 5 ; ce solvant doit donc aussi être testé pour vérifier qu'il n'est pas à l'origine de la dégradation du film.



**Figure 59 : Disposition des gouttes de solution pour le test de stabilité.**

La Figure 60 représente les tests de stabilité sur des films d'AX-MV à 15 g/L pour différentes concentrations de résine. Pour un pourcentage de résine inférieur ou égal à 15%, un changement de couleur apparaît à l'emplacement des dépôts et devient moins intense lorsque la concentration en résine augmente.

Par ailleurs, quelle que soit la concentration de résine, une tâche persistante est observée au niveau du dépôt de la solution acide. Ceci peut être dû au fait que l'AX est hydrolysé en présence d'acide. Il faut donc prendre des précautions, et utiliser l'enzyme dans un milieu peu acide. Néanmoins, le tampon acétate utilisé pour la dilution de la xylanase ne dégrade pas le film lorsqu'il y a au moins 15 % de résine. L'enzyme peut être diluée dans du tampon acétate à pH 5, pH pour lequel l'activité de l'enzyme est optimale. Les attaques enzymatiques seront donc réalisées sur les films composés d'AX-MV à 15 g/L et de 15% de résine.



**Figure 60 :** Tableau représentant les tests de stabilité des films AX-MV à 15 g/L pour différentes concentrations de résine.

## 2 Mesure de l'activité de la xylanase par la méthode de Nelson

Avant de réaliser les expériences de dégradation des films, l'activité de la xylanase a été vérifiée par la méthode de Nelson sur deux substrats (AX-HV et AX-MV) à partir de deux solutions enzymatiques diluées au 1000<sup>ème</sup> et au 2000<sup>ème</sup>. D'après les données du fournisseur, la xylanase pure a une activité de 38 000 nkat/mL sur l'AX de blé. L'activité a été mesurée pour deux solutions enzymatiques diluées afin de recalculer l'activité de la xylanase pure. La valeur obtenue est d'environ 32 000 nkat/mL qui est du même ordre de grandeur que la valeur donnée par le fournisseur (Tableau 16). L'enzyme est donc bien active et peut être utilisée pour tester les films d'AX.

	Activité mesurée pour chaque dilution (nkat/mL)	Activité de la xylanase pure (nkat/mL)
AX-HV		
Dilution au 1000 <sup>ème</sup>	32	31 889
Dilution au 2000 <sup>ème</sup>	16	31 943
AX-MV		
Dilution au 1000 <sup>ème</sup>	33	32 828
Dilution au 2000 <sup>ème</sup>	19	37 080

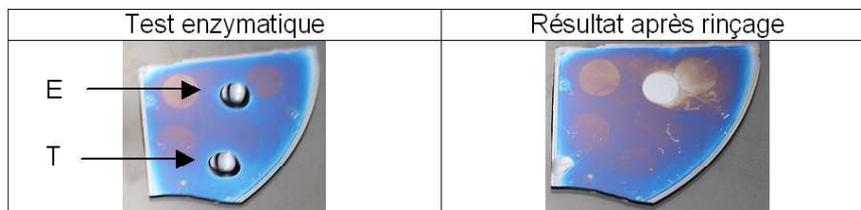
**Tableau 16 :** Activités enzymatiques de la xylanase déterminées par la méthode de Nelson sur les AX-HV et AX-MV.

### 2.1 Sensibilité de la dégradation enzymatique

Pour vérifier que l'enzyme désactivée n'a pas d'effet sur le film de AX-MV, celui-ci est mis en contact avec 10 µL de solution enzymatique et 10 µL de l'enzyme inactivée (témoin) sur les films (Figure 61). Les solutions de xylanase sont diluées au 1/2000<sup>ème</sup> ce qui

**Chapitre V – Résultats préliminaires sur la détection d'activité enzymatique d'un autre système enzyme/biopolymère.**

correspond à une activité de 16 nkat/mL. Le film est bien dégradé au niveau du dépôt de l'enzyme active (Figure 61) et il n'y a pas de trace liée au témoin. Ainsi la dégradation du film est bien liée à une hydrolyse enzymatique.



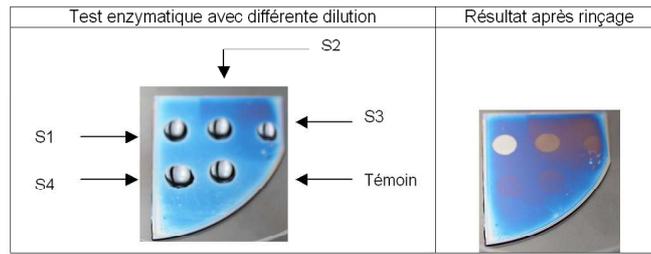
**Figure 61 : Tests enzymatiques réalisés sur les films d'AX-MV à 15 g/L (15% de résine). E = enzyme ; T = témoin.**

Afin de connaître la sensibilité de détection des films d'AX, la solution enzymatique a été diluée de manière à diminuer son activité. Quatre dilutions ont été testées, à savoir 1,6,  $1,6 \cdot 10^{-1}$ ,  $1,6 \cdot 10^{-2}$  et  $1,6 \cdot 10^{-3}$  nkat/mL. Pour plus de commodité, la nomenclature utilisée des solutions est indiquée au Tableau 17.

Nom des solutions	Dilution	Activité enzymatique (nkat/mL)
S1	20 000ème	1,6
S2	200 000ème	$1,6 \cdot 10^{-1}$
S3	$2 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^{-2}$
S4	$2 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^{-3}$

**Tableau 17 : Dénomination des solutions de xylanase en fonction de leur activité enzymatique.**

La Figure 62 représente l'allure du film d'AX-MV à 15 g/L contenant 15% de résine en présence des différentes dilutions de la xylanase qui ont agit pendant 3 minutes et après rinçage. Toutes les dilutions ont laissé une empreinte sur le film, dont l'intensité diminue avec la concentration de l'enzyme. Par ailleurs, la tache correspondant à la solution S4 ( $1,6 \cdot 10^{-3}$  nkat/mL) est de faible intensité et est semblable à celle laissée par le témoin. Par conséquent, le film peut détecter une activité enzymatique de  $1,6 \cdot 10^{-2}$  nkat/mL (solution S3). Pour rappel, la résolution limite de la méthode de Nelson est de l'ordre de 3 nkat/mL. Le test enzymatique sur les films nanométriques est donc jusqu'à 190 fois plus sensible que la méthode de Nelson.



**Figure 62 : Effet des différentes dilutions de la xylanase sur les films d'AX-MV à 15 g/L contenant 15% de résine.**

## 2.2 Conclusion

Les résultats obtenus montrent que notre méthode permet de détecter des activités enzymatiques 50 à 190 fois plus faibles que celles mesurées par la méthode de Nelson, et ce en utilisant une méthode robuste et rapide à mettre en oeuvre. De plus, des tests préliminaires ont été réalisés sur d'autres types de polysaccharides et des protéines (pectine, albumine de sérum bovin (BSA)). En ajustant la quantité de résine à incorporer dans le film pour chaque macromolécule, une activité enzymatique a été détectée.



**Chapitre VI**  
**Partie expérimentale**



Ce chapitre comporte 3 parties : la première partie présente les matériaux utilisés, les protocoles expérimentaux de préparation des nanocristaux de cellulose hydrogénée et deutérée ainsi que les techniques de caractérisation physico-chimiques et morphologiques des matériaux utilisés. Nous nous focaliserons ensuite sur les techniques de caractérisation des films multicouches, puis sur la caractérisation des dégradations enzymatiques.

## **1 Préparation des solutions et caractérisations physico-chimiques**

### **1.1 Produits intervenant dans la réalisation des films**

La poly-L-lysine (PLL ;  $M_w = 40000 - 60000$  g/mol ; DP = 200–280) et le chlorhydrate de poly(allylamine) (PAH ;  $M_w \sim 56000$  g/mol) sont commercialisés par Sigma-Aldrich et ont été utilisés sans purification supplémentaire. Toutes les solutions de polymères ont été réalisées à une concentration de 0,5 g/L à partir d'eau déionisée à 18,2 M $\Omega$  obtenue par le système de purification Milli-Q (Millipore).

La résine mélamine formaldéhyde <sup>®</sup>Resimene AQ-7550 (78%), fournie par Ineos Melamines, est utilisée pour la stabilisation des dépôts d'arabinoxylane. Les deux arabinoxylanes utilisés sont issus du blé et proviennent de Megazyme. Un des arabinoxylanes possède une viscosité moyenne (22 cSt) et l'autre une viscosité élevée (47 cSt).

### **1.2 Enzymes**

Les différentes enzymes qui ont été utilisées pour détecter une activité enzymatique sur les dépôts en couche mince sont :

- une  $\beta$ -endo-xylanase M1 (210 U/mg sur l'arabinoxylane de blé ; 2300 U/mL ; Megazyme) ;
- une  $\beta$ -endo-glucanase issue d'espèces de *Trichoderma* (47 U/mg ; 500 U/mL ; Megazyme) ;
- un mélange commercial : Cellulyve TR sous forme de poudre constituée de 1,4  $\beta$ -endo-D-glucanase, de cellobiohydrolase et de cellobiase issues de *Trichoderma reesei* (4880 nkat/g, 49 mg/g de protéine ; Lyven).

Les solutions enzymatiques sont préparées dans du tampon acétate 10 mM dont le pH est fixé de manière à obtenir le maximum d'activité enzymatique (pH 5).

## **1.3 Suspensions de nano-cristaux de cellulose**

### **1.3.1 Préparation des suspensions de whiskers**

La préparation des nanocristaux de cellulose est inspirée d'un protocole décrit par Revol *et al.* [Revol *et al.* 1992] et a été réalisée à partir de feuilles de papier Whatman de type 20CHR, constitué de coton extrêmement pur.

#### **1.3.1.1 Repulpage de la cellulose**

Une feuille de papier représente environ 25 g de cellulose. Celle-ci est préalablement repulpée dans de l'eau MilliQ avant hydrolyse. Pour ce faire, une feuille de papier est coupée en petits morceaux et mélangée à 900 mL d'eau déionisée. Le tout est ensuite mixé au Waring blender jusqu'à l'obtention d'un ensemble homogène. La concentration en cellulose repulpée est d'environ 2,8 % en masse.

#### **1.3.1.2 Hydrolyse de la cellulose**

250 mL (soit 7 g) de cellulose repulpée sont placés dans un ballon, auxquels sont ajoutés goutte à goutte 175 mL d'acide sulfurique à 95% sous agitation et dans un bain de glace. La concentration finale en acide sulfurique est d'environ 52% en volume. Le mélange est ensuite laissé sous forte agitation et chauffé dans un bain d'huile à 70°C pendant 40 minutes. La suspension change de couleur au cours de l'hydrolyse : elle passe du blanc à une teinte ivoire en fin d'hydrolyse. L'hydrolyse est stoppée en diluant la solution 10 fois avec de l'eau ultrapure.

#### **1.3.1.3 Dispersion en milieu aqueux et purification**

La cellulose hydrolysée est ensuite centrifugée à 10 000 tours/min pendant 10 minutes à 20°C, afin d'éliminer la plus grande quantité d'acide. Le culot obtenu est ensuite re-dispersé dans de l'eau déionisée par sonication puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Cette étape est répétée jusqu'à ce qu'une suspension colloïdale soit obtenue.

La suspension est alors placée dans une membrane de dialyse MWO 14000 (préalablement lavée à l'eau chaude puis à l'eau ultrapure à température ambiante) et dialysée jusqu'à ce que le pH des eaux de dialyse soit stable (c'est-à-dire sensiblement égale à celle de l'eau ultrapure ajoutée, soit pH 5,5). Cette opération dure 5 jours et nécessite deux changements de bain d'eau distillée par jour. La suspension est ensuite soniquée par lot de 200 mL pendant 4 minutes. Le sonicateur utilisé est le modèle Ultrasonic Liquid Processor XL2020 de Misonix, dont la puissance maximale est de 550 W et sa fréquence de 20 kHz. La sonotrode utilisée possède un diamètre de 13 mm.

La purification de la suspension se termine par le passage sur une résine échangeuse d'ions (Sigma TMD-8) qui permet l'élimination des ions résiduels et notamment les dernières traces d'acide. Environ 1 g de résine est nécessaire pour traiter 400 g de suspension à déioniser. Cette résine est préalablement lavée à l'eau ultrapure, déposée au fond du flacon pendant au moins 48 h, puis éliminée par passage sur un fritté n°1. De l'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) est ajouté à la suspension qui est ensuite stockée à 4°C.

#### *1.3.1.4 Observation des whiskers par microscopie électronique à transmission*

##### ***Principe de la microscopie électronique à transmission :***

La microscopie électronique à transmission (MET) permet d'observer des échantillons à l'échelle nanométrique. Un faisceau d'électrons fortement accélérés (typiquement 80-200 keV) traverse un échantillon très mince (quelques centaines de nm 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. Cette image peut être enregistrée sur une plaque photo ou numérisée.

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 de l'objectif ne laissant passer que les électrons transmis par l'échantillon et éliminant une certaine proportion d'électrons diffusés génère des contrastes dans l'image entre les objets épais/lourds, qui apparaîtront sombres, et ceux minces/légers, qui apparaîtront 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. Si le diaphragme d'objectif ne sélectionne que les électrons transmis par le spécimen, les objets cristallins en position de Bragg apparaissent en sombre.

- *le contraste de phase.* Des interférences sont générées aux interfaces entre des zones du spécimen de 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. Les polysaccharides étant composés d'atomes légers, ils n'engendrent qu'un faible contraste de diffusion. Le contraste de

phase joue donc un rôle très important. Les échantillons cristallins, tels que les whiskers de cellulose, sont essentiellement visibles grâce au contraste de diffraction. Cependant, durant l'observation et l'enregistrement des images, du fait de leur grande sensibilité, leur cristallinité diminue rapidement sous irradiation.

***Préparation des échantillons :***

Nos échantillons se présentent sous la forme de suspensions plus ou moins diluées de nanocristaux de cellulose. Les suspensions de whiskers observés par MET sont déposées sur des grilles de cuivre recouvertes d'un mince support de carbone amorphe qui est transparent aux électrons. Ce carbone est généralement hydrophobe ce qui empêche une bonne distribution des objets sur sa surface. Le traitement que nous avons utilisé est l'*effluage*, qui consiste à placer les grilles carbonées dans une enceinte en présence d'une très faible pression d'air. Une haute tension est appliquée entre deux électrodes. L'air est ionisé et les ions « décapent » la surface du film, laissant des charges résiduelles. L'*effluage* est une étape très rapide (environ 30 secondes). La suspension à étudier peut être ensuite déposée sur la surface décapée.

Étant donné la nature organique des whiskers, ils n'engendrent qu'un contraste très faible vis-à-vis du support de carbone. D'autre part, ils sont particulièrement sensibles à l'irradiation électronique et se dégradent rapidement dès lors qu'ils sont observés à fort grossissement. Pour limiter ces problèmes, une technique de préparation spécifique a été utilisée pour renforcer le contraste : la *coloration négative*. Elle consiste à appliquer sur l'échantillon une solution aqueuse d'un sel d'atomes lourds à 2%, comme l'acétate d'uranyle, qui augmente le contraste. Cette technique est rapide à mettre en œuvre : une goutte de suspension de whiskers est d'abord déposée sur une grille de MET préalablement rendue hydrophile. Après une minute, l'excès de liquide est absorbé lentement avec du papier filtre. Avant séchage, une goutte de colorant est déposée. Après une minute, l'excès de colorant est absorbé et l'échantillon est laissé à sécher. Un mince dépôt de colorant s'est formé sur le carbone et vient souligner les contours des objets. Ceux-ci apparaissent donc en clair sur un fond plus foncé : la coloration est dite "négative".

***Observation et analyse des images :***

L'observation par MET a été effectuée à l'aide d'un cryo-microscope JEOL JEM-1230 fonctionnant à une tension de 80 kV (Figure 63). Les échantillons ont été observés sous faible illumination afin de limiter les dégâts d'irradiation.

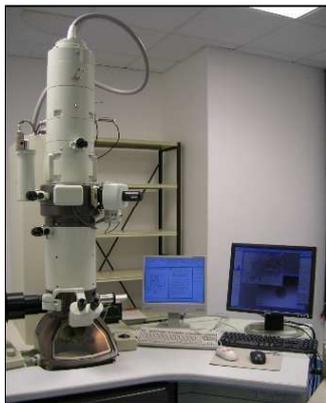


Figure 63 : Microscope électronique à transmission JEOL JEM 1230.

### 1.3.2 Préparation de la cellulose deutérée

#### 1.3.2.1 Deutération intracristalline de la cellulose

Le cellulose a été deutérée selon le protocole de Nishiyama *et al.* [Nishiyama *et al.* 1999]. Environ 6 g de feuille de papier Whatman sont placés dans un tube en pyrex. L'ensemble est placé dans une bombe en acier puis rempli avec une solution de NaOD/D<sub>2</sub>O à 0,1 M (Figure 64).

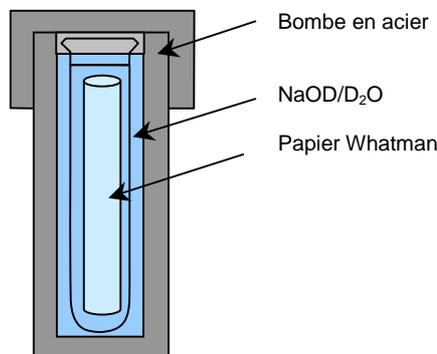


Figure 64 : Schéma du montage utilisé pour la deutération.

La bombe est alors fermée hermétiquement et immergée dans un bain d'huile thermostaté à 210°C pendant 2 h. A l'issue de la deutération, le papier a une coloration jaune/marron. Le papier est ensuite placé dans un bécher auquel 500 mL d'eau ultrapure sont ajoutés. Le mélange est laissé sous agitation pendant quelques minutes, puis filtré sur Büchner. Cette étape est répétée jusqu'à ce que le filtrat soit clair (soit 3 à 4 rinçages).

La cellulose deutérée est alors hydrolysée deux fois suivant le protocole décrit au paragraphe 1.3.1 pour obtenir les whiskers de cellulose deutérée.

### 1.3.2.2 Mise en évidence de la deutération par spectroscopie infrarouge

Un moyen de savoir si la cellulose est effectivement deutérée est l'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). En effet, la deutération remplace les groupements OH des cristaux de cellulose par des groupements OD. Ces derniers possèdent une bande de vibration d'élongation caractéristique comprise entre 2800 et 2150  $\text{cm}^{-1}$  tandis que la bande de vibration d'élongation des groupements OH se situe entre 3800 et 2950  $\text{cm}^{-1}$ . Ainsi l'apparition d'une bande d'absorption entre 2800 et 2150  $\text{cm}^{-1}$  permet de conclure que la deutération a bien eu lieu.

La mesure FTIR est réalisée sur pastille de KBr. La poudre de KBr est préalablement placée à l'étuve à 70°C pendant 5h30 puis placée dans un dessiccateur sous atmosphère sèche ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). 350 mg de KBr ont été utilisés pour l'analyse de 2 à 3 mg de cellulose deutérée lyophilisée. Les spectres sont normalisés et traités via le logiciel OPUS. Néanmoins, il est difficile de quantifier de cette manière le rapport de OD/OH puisque le KBr est hygroscopique et que la présence d' $\text{H}_2\text{O}$  contribue également à l'intensité de la bande OH.

## 1.3.3 Caractérisations des whiskers de cellulose

### 1.3.3.1 Masse sèche

La concentration massique de suspensions de whiskers peut être connue en estimant la masse de matière sèche. L'échantillon est placé dans une boîte à tare en verre sèche et propre et la masse est déterminée après déshydratation dans une étuve à 103°C pendant au moins 2 h. La pesée est réalisée après que le produit soit revenu à température ambiante dans un dessiccateur.

### 1.3.3.2 Dosage des charges de surface

La quantité de charges de surface des whiskers a été évaluée par conductimétrie. Nous avons utilisé un conductimètre Metter Lab de type CDM 230 et une électrode CDC 749. Le titrage est réalisé à l'aide une solution de NaOH de concentration  $10^{-4}$  M. A l'équivalence, la relation suivante est vérifiée :

$$\text{Équation 3 : } V_{eq} C_{NaOH} = n_{cellulose} d_s$$

avec  $V_{eq}$  le volume équivalent de NaOH,  $C_{NaOH}$  la concentration en NaOH,  $n_{cellulose}$  la quantité de résidus de glucose et  $d_s$  le degré de substitution, c'est-à-dire le nombre d'atomes de soufre par unité glucose. Or  $n_{cellulose}$  est connu d'après la relation :

$$\text{Équation 4 : } n_{cellulose} = \frac{m_{cellulose}}{M_{moy}}$$

où  $m_{cellulose}$  est la masse sèche de nanocristaux dosés et  $M_{moy}$ , la masse molaire moyenne d'un résidu de glucose substitué. Celle-ci est donnée par la relation suivante :

$$\text{Équation 5 : } M_{moy} = 162 (1 - d_s) + 242 d_s$$

où  $162 \text{ g.mol}^{-1}$  et  $242 \text{ g.mol}^{-1}$  sont respectivement les masses molaires d'une unité glucose seule et d'une unité glucose sulfatée. Les équations 4 et 5 nous permettent d'écrire :

$$\text{Équation 6 : } d_s = \frac{V_{eq} C_{NaOH} M_{moy}}{m_{cellulose}}$$

On obtient donc un système de deux équations (Équation 6 et Équation 7) à deux inconnues ( $d_s$  et  $M_{moy}$ ). La masse molaire moyenne est calculée d'après la relation suivante :

$$\text{Équation 7 : } M_{moy} = \frac{162}{1 - 80 \frac{V_{eq} C_{NaOH}}{m_{cellulose}}}$$

Le degré de substitution peut ainsi être calculé grâce à l'Équation 7. Enfin, le taux de soufre,  $\tau_s$ , est donné par la relation suivante :

$$\text{Équation 8 : } \tau_s = \frac{32 d_s}{M_{moy}}$$

où  $32 \text{ g.mol}^{-1}$  est la masse molaire du soufre.

## 1.4 Le Xyloglucane

### 1.4.1 Purification du XG

Le xyloglucane, extrait de graines de tamarin (*Tamarindus indica*), a été fourni par Dainippon Pharmaceutical (Osaka, Japon) et purifié selon la méthode de Gidley *et al.* [Gidley *et al.* 1991]. 10 g de poudre de tamarin sont ajoutés progressivement à 1 L d'eau déionisée contenant 0,02% d'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ). Ce mélange est agité pendant 16 à 24h à température ambiante. Cette solution est ensuite centrifugée à 20000 g pendant 30 min à 20°C. Le surnageant est ensuite récupéré, mis à dialyser de façon extensive contre de l'eau distillée contenant 0,02%  $\text{NaN}_3$  lors des dix premières dialyses, les deux dernières s'effectuant contre de l'eau déionisée seule ; la dialyse s'étend sur 4 jours. La solution résultante est congelée à  $-40^\circ\text{C}$  et lyophilisée. Les xyloglucanes obtenus sont stockés à température ambiante. Le XG est dissout en solution dans l'eau à la concentration voulue, soit sous

agitation forte pendant 12 h, soit sous agitation forte à 50°C pendant 6 h pour des concentrations élevées.

### **1.4.2 Détermination des masses molaires moyennes par chromatographie d'exclusion stérique**

#### *1.4.2.1 Définitions des masses molaires moyennes*

De manière générale, les polymères en solution sont caractérisés par plusieurs paramètres tels leur masse molaire, leur viscosité, leur conformation ainsi que leur polydispersité. Les masses molaires moyennes en nombre ( $\overline{M}_n$ ) et les masses molaires moyennes en masse ( $\overline{M}_w$ ) sont définies par les relations suivantes:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$
$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

avec  $N_i$  le nombre de molécules de masse molaire  $M_i$ .

Ces moyennes donnent des informations sur la polydispersité de l'échantillon étudié. Ainsi, leurs valeurs sont égales pour un composé totalement monodisperse mais différent d'autant plus que l'échantillon est hétérogène. L'indice de polydispersité  $I_p$  permet de quantifier et de comparer aisément les hétérogénéités moléculaires de divers composés. Il est défini comme suit :

$$I_p = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$$

Cet indice, égal à 1 pour un ensemble isomoléculaire, est toujours supérieur à 1 pour les systèmes polydisperses, et ceci d'autant plus que l'hétérogénéité est grande.

Toutes les caractéristiques décrites ci-dessus peuvent être déterminées par chromatographie d'exclusion stérique, dont le principe est expliqué dans le paragraphe suivant.

#### *1.4.2.2 Principe de la chromatographie d'exclusion stérique*

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique de séparation de macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Elle donne donc des informations sur la distribution de masses molaires de l'échantillon analysé. Cette méthode consiste à injecter l'analyte en phase liquide dans une colonne contenant une phase

stationnaire. Celle-ci peut être composée d'un réseau tridimensionnel organique ou d'un support inorganique (silice) et est caractérisée par une distribution de pores. En traversant cette phase stationnaire, les macromolécules parcourent un chemin plus ou moins long selon leur aptitude à pénétrer dans les pores. Ainsi, les plus petites molécules ont accès à toutes les tailles de pores tandis que les plus grosses ont un volume hydrodynamique trop important pour y pénétrer. Il en résulte que les petites molécules vont être retardées dans la colonne alors que les plus grosses vont la traverser plus rapidement (Figure 65). Le passage des molécules est détecté en sortie de colonne à l'aide d'un réfractomètre (réfractomètre différentiel ERC 7517A).

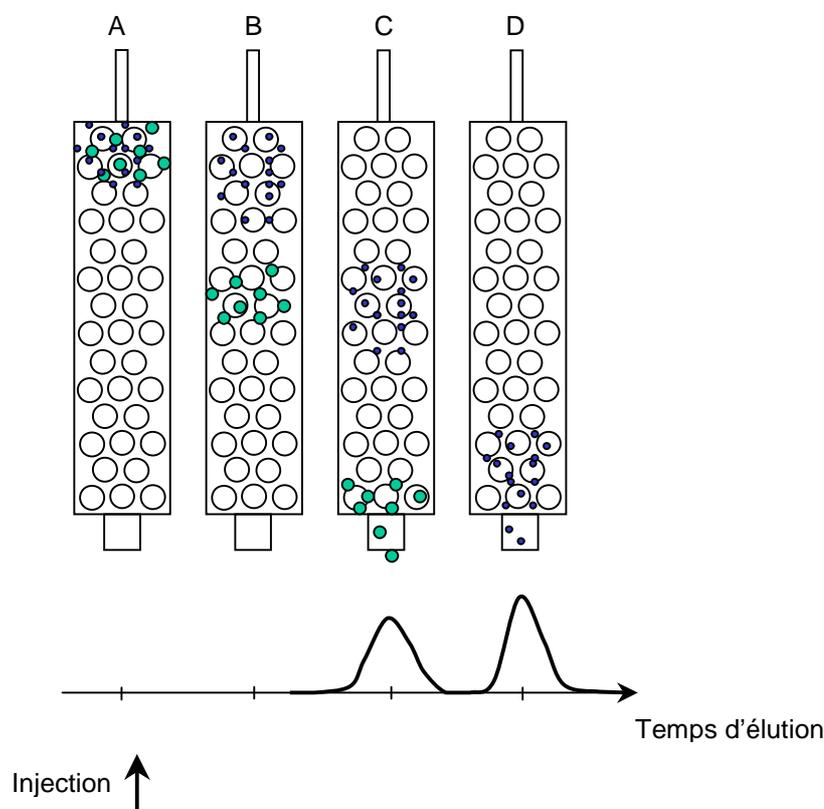


Figure 65 : Principe de séparation des macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique et exemple de chromatogramme obtenu. A : Injection de l'échantillon ; B : Séparation des molécules par leur taille ; C : Elution des gros solutés ; D : Elution des petits solutés.

Pour pouvoir traiter ces données, il est nécessaire d'établir une correspondance entre le volume d'élution des macromolécules et leur masse molaire. Il faut alors établir une courbe d'étalonnage à partir d'échantillons étalons (par exemple le polystyrène ou le pullulane). Cependant, l'utilisation d'un système de triple détection (réfractomètre, diffusion de la lumière et viscosimètre) permet de s'affranchir de cette courbe d'étalonnage en calculant directement les masses molaires moyennes.

Le couplage de la SEC avec un détecteur laser de diffusion de la lumière à angles multiples (Multiple Angle Laser Light Scattering : MALLS) permet de déterminer les masses molaires et les rayons de giration des polymères. Comme la diffusion de la lumière est une méthode absolue, elle mesure les caractéristiques macromoléculaires sans relation avec leur forme et ne nécessite donc pas de calibrage.

Le couplage SEC-viscosimètre permet de mesurer en ligne la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  ( $\text{dL.g}^{-1}$ ). Les masses molaires et les rayons de giration sont alors calculées à partir d'un calibrage à partir de pullulanes de masses molaires connues (5000 à 800000  $\text{g.mol}^{-1}$ ) grâce à la relation de Mark-Houwink:

$$[\eta] = K \times M^\alpha$$

$K$  et  $\alpha$  sont des paramètres empiriques qui sont constants pour une température donnée et pour un solvant. Le coefficient de Mark-Houwink ( $\alpha$ ) indique la conformation du polymère en solution et peut varier entre 0,5 et 1,8. S'il est inférieur à 1, le polymère est une conformation pelote statistique, tandis que s'il est supérieur à 1 il est conformation bâtonnet rigide.

#### **1.4.2.3 Préparation des échantillons et appareils**

Les XG de différentes masses molaires sont solubilisés à une concentration d'environ 3  $\text{mg.mL}^{-1}$  dans une solution de  $\text{NaNO}_3$  0,1 M et contenant 0,02% de  $\text{NaN}_3$ . Les échantillons sont ensuite filtrés sur des membranes de porosité 0,45  $\mu\text{m}$ . 50  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont injectés sur le système chromatographique constitué de deux colonnes analytiques (PL aquagel OH 60 et PL aquagel OH 40) et d'une colonne de garde (PL aquagel OH Guard) montées en série. L'élution est réalisée à 0,7  $\text{mL.min}^{-1}$  avec du nitrate de sodium 50 mM contenant 0,02% de  $\text{NaN}_3$ .

Le système de détection est composé d'un détecteur MALLS MiniDawn Wyatt Technology Corporation comportant 3 angles de mesure de diffusion de la lumière (41°, 90°, et 139°), d'un détecteur viscosimétrique T-50A (Viscotek) et d'un réfractomètre différentiel ERC 7517A. Deux logiciels permettent le calcul des différentes caractéristiques moléculaires : Astra 1.4 (Wyatt Technology) et Trisec (Viscositek).

#### **1.4.3 Détermination des régimes de concentration par mesure de la viscosité**

Pour connaître les différents régimes de concentration du XG utilisé, la viscosité  $\eta$  des solutions a été mesurée pour des concentrations comprises entre 0,1 et 10  $\text{g.L}^{-1}$ . Les solutions ont été réalisées puis filtrées sur une membrane de porosité 5  $\mu\text{m}$ .

Dans le cas d'un fluide newtonien (solution diluée de polymères), la viscosité de la solution est indépendante de la vitesse de cisaillement. Il existe donc une relation linéaire entre contrainte  $\sigma$  et la vitesse de cisaillement  $\dot{\gamma}$  :

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}$$

Une courbe d'écoulement représente la contrainte enregistrée en fonction de la vitesse de cisaillement. La viscosité newtonienne (c'est-à-dire à vitesse de cisaillement nulle) peut ainsi être déterminée par extrapolation de la courbe d'écoulement. Celle-ci a été mesurée à partir des appareils Viscosimètre Low Shear 40 contraves et Rhéomètre RFS II pour des vitesses de cisaillement comprises entre  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  et  $100 \text{ s}^{-1}$ . Les courbes d'écoulement ont été réalisées pour chaque échantillon et la viscosité déterminée grâce à la pente de la courbe. Il existe plusieurs définitions de viscosité :

- la *viscosité relative* :  $\eta_r = \frac{\eta}{\eta_{\text{solvant}}}$  ;
- la *viscosité spécifique* :  $\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_{\text{solvant}}}{\eta_{\text{solvant}}}$  qui mesure l'augmentation de la viscosité que provoque l'ajout de polymère ;
- la *viscosité intrinsèque* par la relation :

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C}$$

La viscosité intrinsèque a été déterminée par extrapolation à dilution infinie des équations de Huggins et Kraemer :

- Equation de Huggins :  $\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H [\eta]^2 C$
- Equation de Kraemer :  $\frac{\ln(\eta_r)}{C} = [\eta] + k_K [\eta]^2 C$

où C est la concentration en polymère exprimée en  $\text{g.mL}^{-1}$ , et  $k_H$  et  $k_K$  les constantes de Huggins et Kraemer, respectivement. La viscosité intrinsèque est obtenue par l'intersection des deux droites sur l'axe des ordonnées, ce qui permet une double extrapolation et donc une précision plus grande et a été déterminée précédemment dans la thèse de V.Sylvestre (2004) à  $[\eta] = 6 \text{ dL.g}^{-1}$ . Les courbes de viscosité/concentration peuvent être normalisées en représentant la viscosité spécifique ( $\eta_{sp}$ ) en fonction de la concentration réduite  $C[\eta]$ .

## 2 Elaboration et caractérisation des films multicouches

### 2.1 Réalisation des films nanostructurés

#### 2.1.1 Préparation des surfaces pour la construction des films

Deux types de support ont été utilisés pour la réalisation des films multicouches :

- des disques de Silicium (wafer) (100) provenant de chez ACM ;
- des cristaux de quartz utilisés pour les expériences de QCM.

La construction de films multicouches nécessite l'utilisation de supports extrêmement propres dont la surface est activée. Les supports sont donc plongés dans un bain piranha qui permet de détruire les impuretés présentes à la surface et de charger négativement celle-ci. Le bain piranha est réalisé *in situ* ( $H_2O_2$  (30%) :  $H_2SO_4$  (95%)) dans un rapport 3:7 v/v. **Attention : ce mélange est extrêmement corrosif et doit être manipulé avec beaucoup de précautions !**. Le nettoyage dure 30 minutes, puis les supports sont rincés abondamment avec de l'eau Milli-Q et séchés sous un flux de  $N_2$ . Les films doivent être réalisés rapidement après que la surface ait été activée.

#### 2.1.2 Construction des films multicouches

Les échantillons sont alors construits soit par dipping soit par spin-coating automatisé. Le spin-coater automatisé est composé d'un spin-coater créé au CRAIS-BIA, de 4 pompes péristaltiques et d'une boîte d'interface qui relie ces 5 éléments à un robot trois axes (Figure 66).

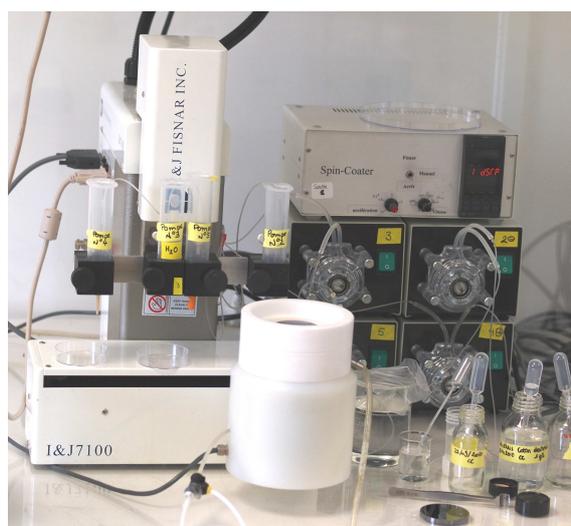


Figure 66 : Photo du spin-coater (construit par le CRAIS-BIA) adapté au robot trois axes I&J7100 (FISNAR).

La Figure 66 est une photo d'un robot trois axes I&J7100 (Fisnar) adapté en spin-coater automatisé. Les pompes péristaltiques permettent d'apporter les différentes solutions, via le robot, sur le support installé dans le spin-coater. Par ailleurs, le robot commande à la fois le spin-coater et les pompes par l'intermédiaire de la boîte d'interface. Ce système va déposer séquentiellement une solution A sur le support puis déclencher la mise en rotation du spin-coater. Le robot se déplace ensuite pour permettre le dépôt de la solution B, puis la pompe péristaltique se met en route le temps nécessaire et enfin le spin-coater se met sous tension. Ce procédé se répète le nombre de fois voulu.

Après chaque dépôt un temps d'adsorption de 5 minutes est attendu avant la mise en rotation du spin-coater à 3600 rpm pendant une minute

### **2.1.3 Cas particulier des films d'arabinoxylane**

Les films d'arabinoxylane sont de simples monocouches d'arabinoxylane (AX) mélangé à de la résine AQ-7550. La préparation des surfaces est identique à celle utilisée pour l'élaboration des films multicouches. Le mélange AX + Résine AQ-7550 qui est déposé par spin-coating est réalisé à partir d'une solution mère d'AX et d'une solution de résine à 10%. La solution de résine à 10% est préparée à partir de la préparation mère diluée avec une solution d'HCl à  $10^{-2}$  M. La solution mère d'AX et la solution de résine à 10% sont ensuite mélangés ; de l'eau déionisée est ajoutée pour obtenir les concentrations voulues en AX et en résine. Les monocouches de ce mélange sont déposées par spin-coating à 2000 rpm (accélération :  $1400 \text{ rpm.s}^{-1}$ ) pendant 3 minutes, puis placées à l'étuve à  $90^{\circ}\text{C}$  pendant 1h pour permettre la réticulation de la résine.

## **2.2 Mesure des épaisseurs par 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 (Figure 67). Le mouvement vertical du stylet est capté par un système inductif et la variation en hauteur  $z$  est enregistrée en fonction de la direction  $x$ . De plus, le rayon de courbure du stylet détermine la résolution latérale de la mesure.

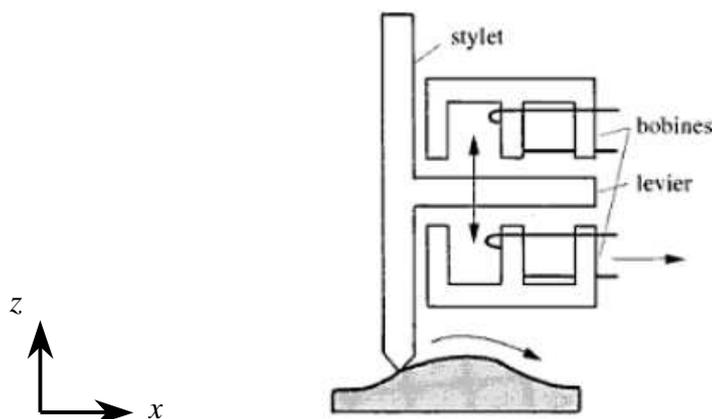


Figure 67 : Principe de fonctionnement d'un profilomètre mécanique muni d'un système inductif.

Pour nos mesures, nous avons utilisé un profilomètre mécanique DEKTAK 8 (VEECO) (Figure 68) équipé d'un stylet de rayon de courbure de  $2,5 \mu\text{m}$ . La résolution verticale de l'appareil est de l'ordre de  $1 \text{ nm}$ . L'épaisseur des échantillons est déterminée par différence de marche entre la surface du film et le support après entaille du film à l'aide d'un scalpel. Chaque valeur est la moyenne de 8 mesures différentes effectuées à différents endroits de l'entaille choisis aléatoirement.



Figure 68 : Photos du profilomètre mécanique Dektak 8 (Veeco) de l'Institut des Matériaux de Nantes (IMN).

## 2.3 Morphologie de surface des films

### 2.3.1 Principe de la microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) est basée sur la mesure des forces d'interaction à courte distance des atomes du stylet fin avec ceux de la surface. Cette technique permet d'imager la surface d'échantillons avec une résolution latérale de  $30 \text{ \AA}$  et une résolution verticale de  $1 \text{ \AA}$ . Le principe de fonctionnement d'un tel microscope est décrit à la Figure 69. Comme pour la profilométrie mécanique, le capteur de

force est un stylet (également appelé « cantilever ») muni d'une pointe extrêmement fine (quelques nm). Les forces d'interaction entre la pointe et la surface modifient la déflexion ou la torsion (statique ou oscillante) du stylet. La mesure des déformations s'effectue grâce à la déviation d'un faisceau laser réfléchi par l'extrémité du stylet.

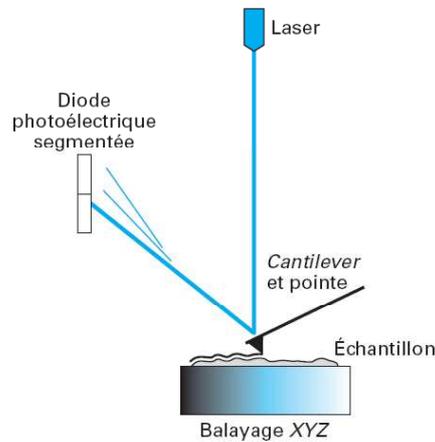


Figure 69 : Schéma du principe du microscope à force atomique [Frétiigny et Rivoal 2005].

Une pointe AFM peut être statique ou mise en mode oscillant. Dans ce dernier cas, on peut faire vibrer le cantilever grâce à une pastille piézo-électrique en contact avec son support. Trois modes de fonctionnement sont souvent exploités en AFM :

- *Le mode contact :*

C'est le premier mode à avoir été développé. Les principales forces mises en jeu entre la pointe et la surface sont des forces répulsives à courte distance. La pointe est statique et « touche » la surface comme dans un dispositif de profilométrie. On peut alors choisir de maintenir une force constante : la déflexion du levier est maintenue constante par une boucle d'asservissement, qui pilote le déplacement de la céramique piézo-électrique sous l'échantillon. Lorsqu'on veut étudier des surfaces fragiles, ce mode présente un grand avantage, car la force est contrôlée par l'expérimentateur. Il permet de travailler sur des surfaces très rugueuses ( $> 1 \mu\text{m}$ ) et avec des balayages larges ( $< 100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ).

Il est également possible de travailler à hauteur constante : la déflexion du levier est enregistrée est une hauteur fixée. Ce mode donne également des informations topographiques mais introduit une limitation dans le choix de l'échantillon qui doit être peu rugueux de manière à ce que le levier puisse suivre la surface sans l'endommager. Sur certains échantillons, l'usure et les déformations engendrées par la pointe perturbent la qualité des images.

- *Le mode contact intermittent ou **tapping** :*

La pointe oscille verticalement à amplitude constante près de la surface de l'échantillon. A chaque cycle, la pointe vient effleurer le mur répulsif de la surface. Le cantilever est excité à une fréquence proche de sa résonance et la réponse du système est suivi en simultané. Ce mode est très utilisé pour connaître la topographie des échantillons. Les forces appliquées sur l'échantillon peuvent être très réduites et le temps de contact très court n'induit pratiquement pas de forces de frottement sur l'échantillon. Les déformations de certains échantillons et l'usure de la pointe sont ainsi évitées. De plus, à cause de la brièveté du contact (inférieure à la microseconde), l'adhésion n'a pas le temps de se développer. Les dimensions du contact sont réduites même sur des échantillons très déformables, conférant à ce mode une bonne résolution latérale. Quand la hauteur de l'échantillon est asservie à une amplitude constante, la phase du système est caractéristique des dissipations du système. Les images de phase sont souvent assez différentes des images de hauteur, elles peuvent révéler de légères hétérogénéités des surfaces correspondant à des propriétés viscoélastiques ou de mouillage différentes.

- *Le mode non-contact résonnant :*

La pointe est mise en oscillations à sa fréquence de résonance, éloignée de la surface et avec de faible amplitude. La force d'interaction, qui dépend de la localisation de la pointe par rapport à la surface, décale la fréquence de résonance du cantilever. Inversement, à une fréquence d'excitation donnée, l'amplitude des oscillations est modifiée et donne des informations sur la force d'interaction. Ce mode permet donc l'analyse de force à longue portée.

### **2.3.2 Mesures AFM des films**

Les mesures sur les surfaces ont été réalisées à l'aide d'un Agilent 5500 AFM au Laboratoire de Physique de l'Etat Condensé (Université du Maine, Le Mans). Toutes les images de topographie ont été obtenues en mode tapping dans l'air en utilisant une pointe PPP-NCHR-W (nanosensor, constante de raideur 40 N/m, fréquence de résonance 297 kHz). Le traitement des images, l'extraction de profils et la détermination de la rugosité des films ont été réalisés avec le logiciel Gwyddion (<http://gwyddion.net/>).

## 2.4 Analyse de la structure des films par réflectivité de neutrons

Les techniques de réflectivité, en particulier la réflectométrie de neutrons, sont bien adaptées pour caractériser les films multicouches. En effet, la réflectivité de 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 quelques centaines de nm. Le principe consiste à mesurer le coefficient de réflexion  $R$  d'un faisceau de neutrons envoyé en incidence rasante sur la surface étudiée.

### 2.4.1 Interaction neutron-matière

Le neutron est une particule neutre 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**. La longueur de diffusion cohérente  $b$  (valeur tabulée) décrit l'amplitude de cette interaction neutron matière qui varie aléatoirement d'un atome à l'autre. Elle est généralement attractive mais peut être répulsive dans certains cas et est donc caractérisée par un chiffre positif ou négatif. Ainsi, chaque matériau est caractérisé par une densité de longueur de diffusion  $Nb$  (ou indice de réfraction neutronique) qui dépend de sa composition chimique et qui peut être calculée à partir de la relation suivante :

$$Nb = \sum_i b_i / V$$

avec  $b_i$  la longueur de diffusion cohérente de l'atome  $i$  et  $V$  le volume de la molécule. Le Tableau 8 présente les valeurs de quelques éléments du tableau périodique. Il apparaît que la valeur de l'hydrogène  $^1\text{H}$  est de signe opposé et très différente des atomes légers constituant les molécules organiques et en particulier du deutérium  $^2\text{H}$  (D).

Longueur de diffusion cohérente $b$ ( $10^{-12}$ cm)					
$^1\text{H}$	D ( $^2\text{H}$ )	C	O	N	Si
-0,374	0,667	0,665	0,580	0,936	0,415
Densité de longueur de diffusion ( $\text{\AA}^{-2}$ )					
$\text{H}_2\text{O}$	$\text{D}_2\text{O}$	$\text{SiO}_2$	Polysaccharides	Si (cristal)	
$-0,56 \cdot 10^{-6}$	$6,38 \cdot 10^{-6}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$	$1,9 \cdot 10^{-6}$	$2,07 \cdot 10^{-6}$	

**Tableau 18 : Longueur de diffusion cohérente de quelques atomes et densité de longueur de diffusion de certaines molécules.**

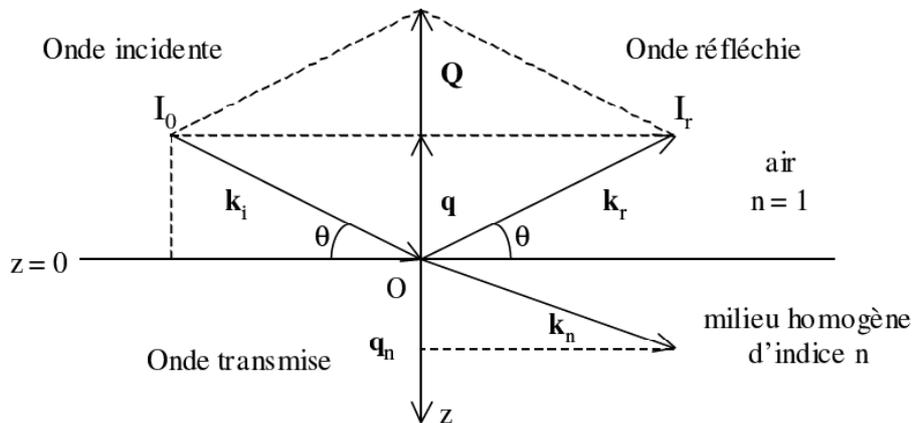
La substitution isotopique, en particulier d'atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium, modifie les indices de réfraction et va permettre d'une part d'obtenir de forts signaux de réflectivité et d'autre part de mesurer dans une couche mixte le profil de concentration de chaque espèce. En particulier, le remplacement de tout ou 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. Il est ainsi possible de modifier en continu l'indice de réfraction neutronique d'un solvant dans un système complexe en réalisant des mélanges de solvants hydrogénés et deutérés pour éteindre un de ses composants (technique de variation de contraste).

### **2.4.2 Réflexion des neutrons sur une surface plane**

Le vecteur d'onde d'un neutron incident de longueur d'onde  $\lambda$  est défini par :

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

Considérons un faisceau de neutrons de longueur d'onde  $\lambda$  et de vecteur d'onde  $\mathbf{k}_i$  se réfléchissant sur une surface plane avec un angle d'incidence  $\theta$  (Figure 70). Cette surface est définie par l'interface entre l'air, milieu d'indice  $n = 1$ , et un échantillon semi-infini d'indice de réfraction  $n$ .



**Figure 70 : Réflexion d'un faisceau de neutrons sur une surface plane.**

La réflectivité,  $R$ , est définie comme le rapport de l'intensité réfléchie de façon spéculaire (c'est-à-dire selon un angle égal à l'angle d'incidence  $\theta$ ) ( $I_r$ ) et de l'intensité incidente  $I_0$ :

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

$R$  dépend uniquement du vecteur de diffusion,  $\mathbf{Q}$ , défini par :

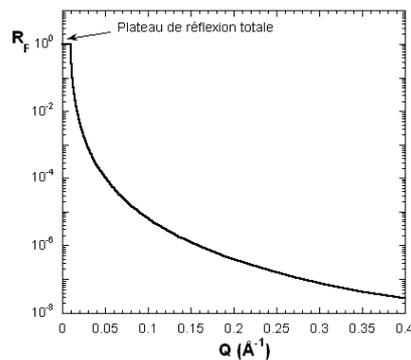
$$Q = k_r - k_i = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda}$$

avec  $\mathbf{k}_r$  vecteur d'onde du faisceau réfléchi.

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

*Cas d'une interface idéale :*

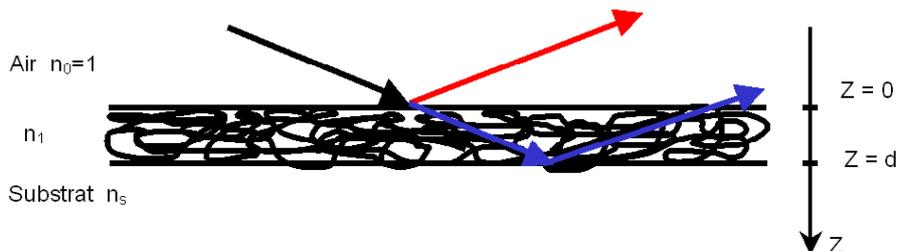
Prenons le cas d'un support solide d'indice  $n$  dans l'air ( $n_0 = 1$ ). Si l'interface air/solide est parfaite sans rugosité, alors le système est appelé dioptré et sa réflectivité correspond à la réflectivité de Fresnel ( $R_F$ ). Une courbe typique de réflectivité de Fresnel est représentée en Figure 71. Un plateau de réflexion totale est présent à des petites valeurs de  $Q$ .



**Figure 71 :** Représentation semi-logarithmique de la réflectivité de Fresnel  $R_F$  en fonction de  $Q$  pour un système air/Silicium.

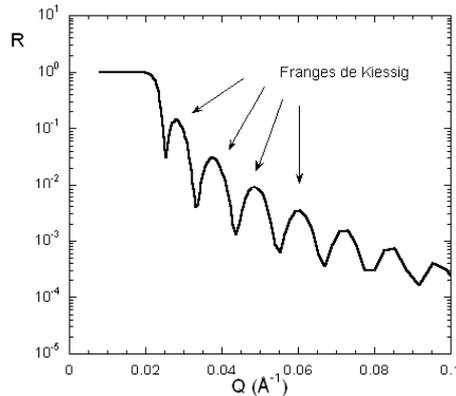
*Cas d'une couche homogène sur un substrat :*

Considérons une couche de polymère d'indice  $n_1$ , d'épaisseur  $d$  et de densité de longueur de diffusion  $Nb_1$  présente sur le support d'indice  $n_s$ , d'épaisseur infinie et de densité de longueur de diffusion  $Nb_s$ .



**Figure 72 :** Schéma d'une couche homogène de polymère sur un support.

Sur un tel système, une partie de l'onde incidente est réfléchiée à l'interface air/couche et l'autre est transmise dans la couche. De la même manière, une partie de l'onde transmise est réfléchiée à la deuxième interface couche/support. Les deux ondes réfléchiées interfèrent de façon constructive ou destructive selon leur déphasage qui est lié à la différence de chemin optique et donc à l'épaisseur de la couche. La courbe de réflectivité associée (Figure 73) va donc présenter des franges d'interférences, appelées franges de Kiessig, dont la périodicité permet la mesure de l'épaisseur de la couche.



**Figure 73 : Réflectivité R en fonction du vecteur de diffusion Q calculée pour une couche de Nickel de 50 nm déposée sur un support de Silicium.**

Jusqu'à présent, nous avons supposé que les interfaces étaient parfaites et présentaient une discontinuité de  $Nb$ . Dans la pratique, les interfaces ne sont pas si abruptes du fait de deux phénomènes distincts :

- la *rugosité interfaciale* : le passage d'une couche à l'autre ne se fait pas à la même distance  $z$  ;
- l'*interdiffusion* : deux matériaux formant deux couches successives diffusent l'un dans l'autre, ce qui crée une transition non-abrupte.

La mesure de la réflectivité spéculaire ne permet pas de distinguer la rugosité de l'interdiffusion si la taille des imperfections est inférieure à la longueur de cohérence de l'onde associée au neutron (de l'ordre de quelques  $\mu\text{m}$ ). Seule la mesure de la réflectivité non-spéculaire, absente en cas d'interdiffusion, permet de différencier ces phénomènes. La Figure 74 montre l'effet de la rugosité sur une courbe de réflectivité calculée pour une couche de Nickel déposée sur un support de Silicium. La rugosité a un effet d'atténuation des franges qui devient de plus en plus important à grandes valeurs de  $Q$ .

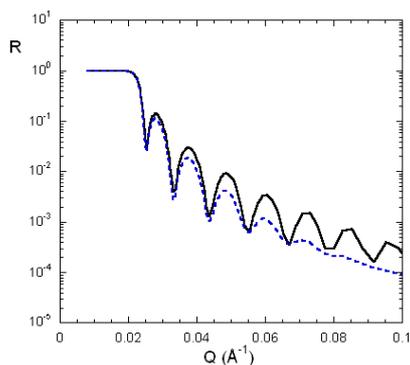


Figure 74 : Effet de la rugosité (courbe en pointillés bleus) sur la courbe de réflectivité du Nickel calculée pour une couche de 50 nm de Nickel déposée sur un support de Silicium.

### 2.4.3 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 (Figure 75) du Laboratoire Léon Brillouin (LLB), du CEA de Saclay.

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  $\lambda$  :

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

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  $\theta$  fixé.

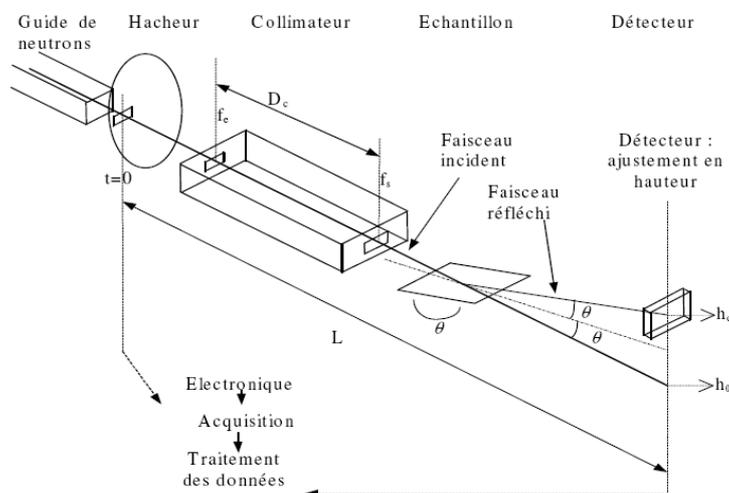


Figure 75 : Principe de fonctionnement du spectromètre EROS.

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  $\theta$  fixé. L'angle maximum utilisable est de  $5^\circ$ , ce qui permet de couvrir un domaine de vecteur 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 ( $1^\circ$  et  $4^\circ$  par exemple). Le faisceau réfléchi est mesuré à l'aide d'un détecteur à Hélium 3 ( $^3\text{He}$ ). La réflectivité minimale qui peut être mesurée est de l'ordre de  $10^{-6}$ .

Le principe de réglage est simple : un angle de travail est choisi tel 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. Quatre types d'interface peuvent être étudiés : air/solide, solide/solide, air/liquide et solide/liquide.

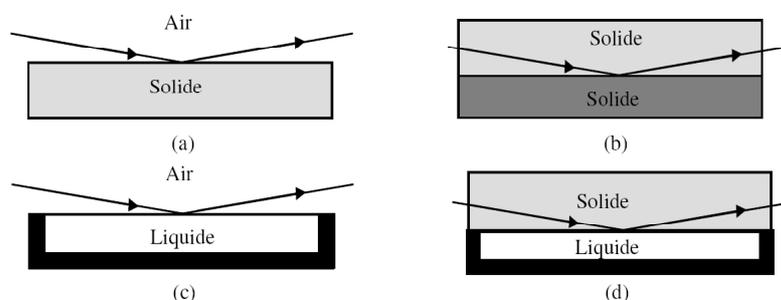


Figure 76 : Représentations des quatre types de géométries utilisables pour une expérience de réflectivité de neutrons.

#### 2.4.4 Conditions expérimentales utilisées

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  $2,2^\circ$  pour les échantillons de type air/solide ;
- $1,34^\circ$  et  $2^\circ$  pour les échantillons de type solide/liquide.

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 une bonne statistique.

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.

### **3 Détermination de l'activité enzymatique**

#### **3.1 Méthode de Nelson**

##### **3.1.1 Préparation des gammes étalon**

Une solution mère de l'ose constitutif du substrat est préparée à 250  $\mu\text{g/mL}$ . Des solutions de glucose et de xylose seront utilisées respectivement comme référence pour le xyloglucane et l'arabinoxylane. Différentes dilutions de la solution mère sont réalisées entre 0 et 250  $\mu\text{g/mL}$ . La densité optique est mesurée pour chaque concentration afin d'obtenir une gamme étalon.

##### **3.1.2 Dosage des activités enzymatiques**

###### **3.1.2.1 Réaction enzymatique**

135  $\mu\text{L}$  de substrat et 15  $\mu\text{L}$  de solution enzymatique sont mis dans un tube et incubés à 40°C pendant dix minutes. Au bout de 10 minutes l'activité enzymatique est arrêtée quand 100  $\mu\text{L}$  d'un échantillon sont versés dans 100  $\mu\text{L}$  de solution C.

La préparation du blanc permet de mesurer la DO lorsque l'enzyme est désactivée. Le blanc est composé de 100  $\mu\text{L}$  de la solution C, auquel on ajoute 10  $\mu\text{L}$  d'enzyme et 90  $\mu\text{L}$  de substrat.

###### **3.1.2.2 Réaction colorimétrique**

L'hydrolysate est mis en présence d'ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  qui vont réagir avec le groupement pseudo-aldéhydique des extrémités réductrices pour former des ions cuivreux  $\text{Cu}^+$ . 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 qu'il y ait une réaction colorimétrique, les échantillons sont mis 15 min au bain-marie bouillant. Elles sont refroidies et la solution D est ajoutée (100  $\mu\text{L}$ ) permettant d'obtenir

des couleurs différentes entre le blanc et les échantillons. Les plaques sont agitées pendant dix minutes, puis 1 mL d'eau est ajouté. Pour finir 250 µL de chaque puit est transvasé dans une plaque 96 puits. La densité optique est ensuite mesurée sur le lecteur de plaque à 600 nm. Les couleurs de la gamme étalon vont du jaune au bleu et les essais ont une couleur bleue. Pour pouvoir exprimer les résultats, la concentration de la gamme étalon doit être exprimée en µmol/L. La formule suivante est utilisée pour le calcul de l'activité :

$$a = \Delta DO / \text{pente} \times 150 / 15 \times 1000 / t \times \text{dil}$$

Avec : a : activité enzymatique en nkat/mL

$\Delta DO$  : différence de densité optique entre l'échantillon et le blanc

La pente est exprimée en µmol

150 est le volume total de milieu réactionnel

15 est le volume de prise d'essai d'enzyme

t est le temps d'incubation en s (pour cette expérience t = 600 s)

dil est la dilution de l'enzyme à laquelle la réaction enzymatique a été faite.

La variation de DO minimum acceptable pour que la mesure soit valable est de 0.1. Le calcul utilisé pour calculer l'activité minimale est le suivant :

$$\Delta a = \Delta(\Delta DO) / \text{pente} \times 150 / 15 \times 1000 / t$$

Le calcul a été fait pour les gammes étalon du xylose et du glucose. A partir de cela on déduit que la plus faible activité mesurable par cette méthode est de 3 nkat/mL.

Les solutions utilisées pour la réaction colorimétrique sont :

- Solution A : 200 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre ; 25 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhydre ; 25 g de tartrate double Na-K ; 20 g de NaHCO<sub>3</sub> anhydre ;
- Solution B : 30 g de CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O ; 4 gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré ; H<sub>2</sub>O qsp 200 mL ;
- Solution C : 25 mL de la solution A + 1 mL de la solution B réalisée *in situ* ;
- Solution D : 50 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 4H<sub>2</sub>O dissous dans 800 mL H<sub>2</sub>O ; 42 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré, versés rapidement ; 6 g Na<sub>2</sub> HAsO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O dissous dans un peu d'eau ; H<sub>2</sub>O qsp 1 L.

### **3.2 Détection d'une activité enzymatique à partir des films multicouches**

L'activité d'une enzyme correspondant au film multicouche déposé sur un support peut être détectée visuellement ou en temps réel par QCM-D.

### 3.2.1 Détection visuelle

Pour évaluer la possibilité de détecter une activité enzymatique, différents types de films ont été réalisés par spin-coating. Les solutions enzymatiques sont réalisées à partir de préparations commerciales décrites au paragraphe 1.2 diluées aux concentrations choisies dans du tampon acétate. Les tests sont réalisés dans les conditions optimales de pH et de température correspondant à chaque enzyme. 10  $\mu\text{L}$  de chaque solution enzymatique sont déposés sur les films pendant 3, 5, 10 et 15 minutes avant d'être rincés à l'eau millipore et séchés. L'hydrolyse est mise en évidence par changement de coloration du film qui est dû au phénomène d'interférence lumineuse décrit dans le chapitre I.

### 3.2.2 Microbalance à cristal de quartz avec dissipation (QCM-D)

#### 3.2.2.1 Principe de la microbalance à quartz

La technique de microbalance à cristal de quartz (QCM) est utilisée depuis de nombreuses années pour contrôler les dépôts de couches métalliques sur des supports solides. Son principe repose sur les propriétés piézo-électriques du cristal de quartz. En effet le quartz est un matériau qui se déforme sous l'application d'une différence de potentiels électriques (ddp) et réciproquement, une contrainte mécanique entraîne l'apparition d'une polarisation à ses bords. Le cristal se présente sous la forme d'un disque de quartz de 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur environ, entouré de deux électrodes en or de 100 nm d'épaisseur (Figure 77).

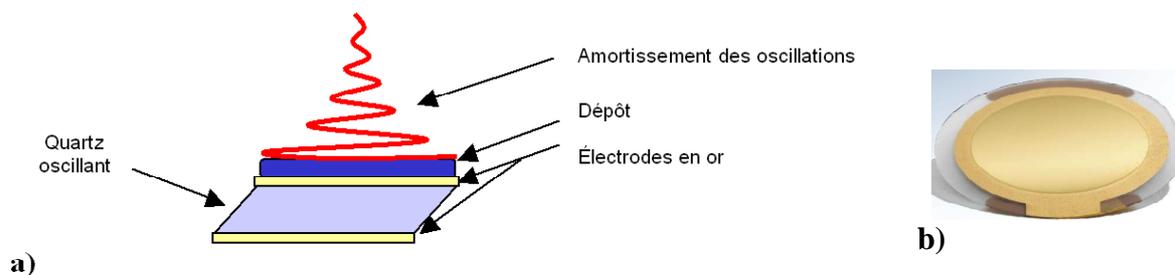


Figure 77: a) Schéma de principe d'un cristal de quartz entouré par deux électrodes en or. La ddp appliquée entre les électrodes induit une contrainte de cisaillement sur le cristal ; b) Photo du cristal de quartz. Le film est déposé sur une des deux faces en or constituant les deux électrodes.

En appliquant une ddp entre les deux faces, un mouvement de cisaillement pur est induit. Si la face inférieure du cristal est fixée sur un support immobile, la face supérieure subira un mouvement de translation horizontale se traduisant par des oscillations mécaniques. La ddp appliquée entre les électrodes est choisie de telle sorte que le quartz est à sa fréquence de résonance  $f_r$ . Ainsi, le dépôt d'une masse  $m$  d'un matériau sur le cristal de quartz induit une variation en fréquence. La différence de fréquence de résonance  $\Delta f$  est donnée par la relation :

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

Où  $C$  est une constante caractéristique du cristal de quartz utilisé appelée constante de Sauerbrey.

Le principe de la microbalance à cristal de quartz consiste à mesurer cette variation de fréquence de résonance  $\Delta f$  après le dépôt d'un matériau de masse  $m$  et permet donc d'avoir accès à la masse déposée par unité de surface avec une précision proche du  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

De plus, un cristal de quartz peut non seulement être mis en résonance à sa fréquence fondamentale (notée  $f$ ), mais également à toutes ses harmoniques impaires ( $f_n = nf$  où  $n$  est un entier impair positif). A chaque harmonique correspondra aussi un changement de fréquence de résonance consécutif au dépôt de matière et  $m$  sera relié à  $\Delta f_n$  par la relation de Sauerbrey :

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

Cette relation n'est valide que pour des films fins, rigides et uniformes. Or, les films multicouches de polymères sont très hydratés et possèdent généralement un comportement semblable à celui d'un gel ou d'un liquide visqueux lorsqu'ils deviennent épais. La relation de Sauerbrey n'est alors plus applicable et un autre modèle qui tient compte des propriétés viscoélastiques des films multicouches est utilisé.

Les récentes évolutions techniques ont permis l'acquisition d'un nouveau paramètre expérimental : le facteur de dissipation d'énergie noté  $D$  qui est lié aux propriétés viscoélastiques du film déposé. Une analyse de l'évolution des fréquences et de la dissipation a été réalisée à partir du modèle proposé par Voinova *et al.* [Voinova *et al.* 1999] pour extraire des propriétés physiques comme l'épaisseur du dépôt, la viscosité et l'élasticité du film.

### 3.2.2.2 Mesures réalisées par QCM-D

L'appareil que nous avons utilisé est le système Q-SENSE E4 AUTO de la marque Q-Sense (Q-Sense AB, Göteborg, Suède). Ce dernier comporte quatre cellules de mesure thermostatées et une unité électronique interfacée à un ordinateur (Figure 78), qui permettent de réaliser quatre mesures simultanément.

Cet appareil fonctionne sur le principe suivant : un générateur de fréquence excite le cristal de quartz avec une tension sinusoïdale de fréquence  $f_1$ . Cette fréquence prend successivement la valeur de la fréquence fondamentale de résonance du cristal (5 MHz) et de ses harmoniques ( $n=3, 5, 7, 9, 11$  et  $13$  correspondant aux fréquences 15, 25, 35, 45, 55 et 65 MHz). L'excitation du cristal est imposée sur une durée très brève (quelques  $\mu\text{s}$ ). Après l'arrêt

de l'excitation, pour chaque résonance ( $n = 1$  à 13), le cristal oscille librement à une fréquence de résonance proche de la fréquence d'excitation du cristal. Ces oscillations mécaniques génèrent des oscillations électriques aux bords du cristal, qui sont enregistrées et traitées informatiquement. Ces oscillations sont amorties à cause de l'énergie dissipée dans le cristal, mais surtout dans le film et dans le fluide au contact du cristal. L'évaluation de cet amortissement nous donne accès au facteur de dissipation visqueuse  $D$  du système.



**Figure 78 : Photographie du système de QCM-D comprenant 4 cellules de mesure et de l'unité électronique interfacés à un ordinateur.**

Nous avons principalement utilisé la QCM-D comme un moyen de suivre *in situ* la dégradation enzymatique de films de polysaccharides. Les quartz utilisés sont du type QSX 301 (Q-Sense) : ils sont recouverts d'un film d'or de 100 nm d'épaisseur et ils possèdent une fréquence fondamentale de résonance à 5 MHz. Avant chaque expérience, le cristal est nettoyé avec une solution de Hellmanex à 2% à température ambiante, puis rincé à l'eau et séché à l'azote. La surface du quartz est ensuite activée à l'aide d'un plasma cleaner (Harrick Plasma) pour permettre de construire le film de biopolymère par spin-coating.

Le cristal est ensuite introduit dans la chambre de mesure thermostatée à 21°C puis mis sous flux de tampon ( $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) jusqu'à la stabilisation du signal ( $\Delta F$  et  $\Delta D$ ). Ensuite, la solution enzymatique est injectée et mise en contact avec le cristal dans la cellule de mesure et laissée le temps nécessaire pour suivre la dégradation enzymatique en temps réel. Une fois celle-ci terminée, la cellule est rincée avec le solvant.

La Figure 79 montre un exemple de graphique qui peut être obtenu dans le cas d'une étude de dégradation enzymatique d'une couche de biopolymère. Lors de l'injection de l'enzyme, la fréquence augmente et la dissipation diminue. Ceci traduit une perte de masse à la surface du cristal et un « dégonflement » de la couche.

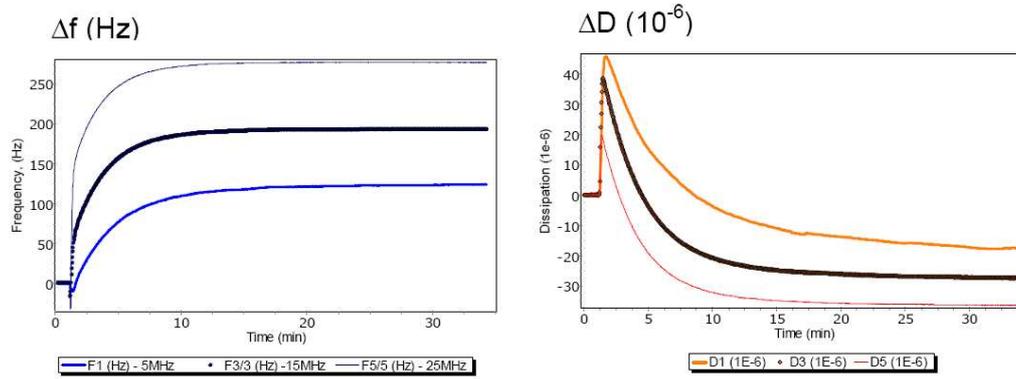


Figure 79 : Exemple de réponse en fréquence et en dissipation en fonction du temps de la dégradation enzymatique de couche de biopolymère (n = 1, 3 et 5).

## **Conclusion générale et perspectives**



## **Conclusion générale et perspectives**

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la construction de films nanostructurés composés de nanocristaux de cellulose et de xyloglucane. L'objectif final est l'élaboration de films nanométriques colorés pour la création de capteurs enzymatiques. Plusieurs techniques et paramètres de construction ont été étudiés et nous avons fait varier les concentrations des solutions de nanocristaux de cellulose et de XG. Deux stratégies ont été choisies dans le but d'obtenir des films colorés :

- les films multicouches composés de nanocristaux de cellulose et de XG qui font intervenir des interactions de Van der Waals et des liaisons hydrogène ;
- les films composés de couches d'un mélange de nanocristaux de cellulose et de XG alternées avec des couches de PAH. La cohésion de ce film est assurée à la fois par les interactions entre nanocristaux de cellulose et XG et par les interactions électrostatiques entre PAH et nanocristaux de cellulose.

Nous avons montré dans une première partie que les concentrations des solutions utilisées sont un paramètre crucial pour la construction de films multicouches. Dans les conditions de concentrations utilisées, la méthode de dipping ne permet pas la construction de film. Nous nous sommes donc focalisés sur la méthode de spin-coating pour laquelle des croissances linéaires sont observées lorsque les concentrations des solutions vérifient les conditions suivantes :

- la solution de XG est dans le régime semi-dilué : le XG déposé peut alors interagir avec les couche inférieure et supérieure de nanocristaux de cellulose ;
- la suspension de nanocristaux de cellulose est suffisamment concentrée pour recouvrir la surface du support.

Une étude préliminaire a été effectuée sur les films composés de PAH et d'un mélange C/XG. La croissance de cet échantillon se réalise par palier et est plus rapide que les croissances des films multicouches C-XG.

Puisque les croissances sont différentes pour les deux types de films, leur structure interne doit également présenter des différences. L'analyse faite par réflectivité de neutrons a permis de comprendre comment la concentration de la solution de XG influence la construction des films composés de nanocristaux de cellulose et de XG. En régime dilué, les

profils de concentration des films sont homogènes, ce qui indique que les films sont constitués de couches alternées de nanocristaux de cellulose et de XG. La croissance est possible grâce à l'interaction de chaînes de XG avec les couches inférieure et supérieure de nanocristaux de cellulose. En régime enchevêtré, les films présentent un gradient de concentration de nanocristaux de cellulose qui diminue à mesure que l'on approche de l'interface film/air. Réciproquement, la concentration de XG augmente lorsque l'interface film/air est atteinte.

Par ailleurs, lorsqu'on augmente la concentration de nanocristaux de cellulose, la concentration globale de polysaccharides reste semblable, mais la fraction de nanocristaux de cellulose est plus élevée. Enfin, en comparant les structures C5-XG1 et PAH-C5/XG1, il est constaté que PAH-C5/XG1 est un film plus dense qui contient deux fois plus de XG que de nanocristaux de cellulose. Enfin, l'analyse des films en solution a révélé un gonflement des films essentiellement dû au déploiement des chaînes de XG de surface. Les films PAH-C5/XG1 contenant plus de XG, ce sont ceux qui présentent le plus fort gonflement.

Dans une troisième partie, nous avons abordé l'étude du comportement des deux types de films C-XG et PAH-C/XG de même épaisseur par rapport à la dégradation enzymatique par QCM-D, et ce pour plusieurs concentrations de solution enzymatique. Pour les deux films, la concentration en enzyme agit uniquement sur la cinétique de l'hydrolyse. Cependant les deux types de structures utilisées (C-XG et PAH-C/XG) ont des comportements différents vis-à-vis de l'attaque enzymatique. Les films (C-XG) contiennent plus de nanocristaux de cellulose et sont moins propices au gonflement en solution. La déstructuration du film par les enzymes est alors plus forte et il en résulte une hydrolyse enzymatique plus longue. Au contraire, les films (PAH-C/XG) contiennent plus de XG et gonflent beaucoup plus en solution ; leur hydrolyse est donc plus rapide. Néanmoins, la quantité de matière dégradée est plus faible pour ces films car les cellulases doivent être stoppées par la présence d'une couche de PAH. Ainsi l'hydrolyse des films C-XG semble être totale tandis que celle de (PAH-C/XG) est seulement partielle.

Par ailleurs, nous avons montré qu'il est possible de détecter visuellement l'activité enzymatique des cellulases sur des dépôts nanométriques composés de nanocristaux de cellulose et de XG. Les tests visuels vont dans le sens des expériences de QCM-D et montrent une hydrolyse complète des films (C-XG), tandis que l'attaque sur les constructions (PAH-C/XG) est stoppée à une certaine épaisseur, laissant toujours apparaître la même couleur. La sensibilité du test visuel est jusqu'à 50 fois supérieure à celle de la méthode de Nelson, classiquement utilisée pour doser les activités des glycosyle hydrolases. Cette sensibilité peut

être modulée en jouant sur les cinétiques d'hydrolyse en faisant varier les temps de contact avec la surface.

Enfin, une étude préliminaire sur des films d'arabinoxylane a montré que cette méthode de détection est applicable à d'autres systèmes enzyme/substrat et reste plus sensible que la méthode de Nelson. La principale difficulté d'élaboration réside dans l'obtention de films stables qui puissent néanmoins détecter une activité enzymatique. Ceci passe notamment par l'ajustement de la quantité de résine à introduire pour chaque système.

L'étude enzymatique réalisée par QCM-D a permis d'évaluer la différence entre les deux types de films. Les résultats obtenus vont dans le sens de comportements déjà observés par Turon *et al.* [Turon *et al.* 2008] et Ahola *et al.* [Ahola *et al.* 2008b]. Cependant, la modélisation des courbes permettrait d'établir des données quantitatives sur la vitesse de dégradation de l'enzyme ou encore la quantité de matière dégradée.

Nous avons démontré la validité de la détection d'activité enzymatique sur des films nanométriques. Cependant, cette méthode peut encore être perfectionnée. En effet, les films nanométriques permettent d'observer, pour un temps d'attaque donné, un gradient de couleurs en fonction de l'activité de l'enzyme. En réalisant des études systématiques supplémentaires et par analyse d'image, il serait possible d'attribuer une couleur à une activité de manière quantitative. Par ailleurs, il serait intéressant de développer cette méthode pour d'autres types de biopolymères tels que les protéines.

## Références bibliographiques

- Acrivos, A., Shah, M. J. et Petersen, E. E. (1960).** On the Flow of a Non-Newtonian Liquid on a Rotating Disk. *Journal of Applied Physics* **31**(6): 963.
- Ahola, S., Myllytie, P., Osterberg, M., Teerinen, T. et Laine, J. (2008a).** Effect of Polymer Adsorption on Cellulose Nanofibril Water Binding Capacity and Aggregation. *BioResources* **3**(4): 1315.
- Ahola, S., Turon, X., Osterberg, M., Laine, J. et Rojas, O. J. (2008b).** Enzymatic Hydrolysis of Native Cellulose Nanofibrils and Other Cellulose Model Films: Effect of Surface Structure. *Langmuir* **24**(20): 11592.
- Araki, J., Wada, M. et Kuga, S. (2001).** Steric Stabilization of a Cellulose Microcrystal Suspension by Poly(Ethylene Glycol) Grafting. *Langmuir* **17**(1): 21.
- Araki, J., Wada, M., Kuga, S. et Okana, T. (1999).** Influence of Surface Charge on Viscosity Behavior of Cellulose Microcrystal Suspension. *Journal of Wood Science* **45**(3): 258.
- Araki, J., Wada, M., Kuga, S. et Okano, T. (1998).** Flow Properties of Microcrystalline Cellulose Suspension Prepared by Acid Treatment of Native Cellulose. *Colloids and Surfaces A* **142**: 75.
- Araki, J., Wada, M., Kuga, S. et Okano, T. (2000).** Birefringent Glassy Phase of a Cellulose Microcrystal Suspension. *Langmuir* **16**: 2413.
- Atalla, R. H. et VanderHart, D. L. (1999).** The Role of Solid State <sup>13</sup>C Nmr Spectroscopy in Studies of the Nature of Native Celluloses. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **15**(1): 1.
- Aulin, C., Johansson, E., Wagberg, L. et Lindstrom, T. (2010).** Self-Organized Films from Cellulose I Nanofibrils Using the Layer-by-Layer Technique. *Biomacromolecules* **11**(4): 872.
- Beck-Candanedo, S., Roman, M. et Gray, D. G. (2005).** Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions. *Biomacromolecules* **6**(2): 1048.
- Beck-Candanedo, S., Viet, D. et Gray, D. G. (2006).** Induced Phase Separation in Cellulose Nanocrystal Suspensions Containing Ionic Dye Species. *Cellulose* **13**: 629.
- Beck-Candanedo, S., Viet, D. et Gray, D. G. (2007).** Triphase Equilibria in Cellulose Nanocrystal Suspensions Containing Neutral and Charged Macromolecules. *Macromolecules* **40**(9): 3429.
- Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Diaz, R., Steiner, J. et Eyzaguirre, J. (1995).** Penicillium Purpurigenum Produces Several Xylanases :Purification and Properties of Two of the Enzymes. *Journal of Biotechnology* **41**: 71.

- Bootten, T. J., Harris, P. J., Melton, L. D. et Newman, R. H. (2004).** Solid-State  $^{13}\text{C}$ -Nmr Spectroscopy Shows That the Xyloglucans in the Primary Cell Walls of Mung Bean (*Vigna Radiata* L.) Occur in Different Domains: A New Model for Xyloglucan-Cellulose Interactions in the Cell Wall. *J. Exp. Bot.* **55**(397): 571.
- Bornside, D. E., Macosko, C. W. et Scriven, L. E. (1991).** Spin Coating of a Pmma/Chlorobenzene Solution. *Journal of Electrochemical Society* **138**(1): 317.
- Canale-Parola, E. (1970).** Biology of the Sugar-Fermenting Sarcinae. *Bacteriol Rev* **34**(1).
- Carpita, N. et McCann, M. (2000).** The Cell Wall. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. B. B. Buchanan, W. Gruissem and R. L. Jones, John Wiley & Sons: 52.
- Carpita, N. C. et Gibeaut, D. M. (1993).** Structural Models of Primary-Cell Walls in Flowering Plants - Consistency of Molecular-Structure with the Physical-Properties of the Walls During Growth. *Plant Journal* **3**(1): 1.
- Chanliaud, E., Silva, J. D., Strongitharm, B., Jeronimidis, G. et Gidley, M. J. (2004).** Mechanical Effects of Plant Cell Wall Enzymes on Cellulose/Xyloglucan Composites. *The Plant Journal* **38**(1): 27.
- Chanzy, H. (1990).** Aspects of Cellulose Structure. Cellulose Sources and Exploitation. Industrial Utilization, Biotechnology and Physico-Chemical Properties. J. J. Kennedy, G. O. Philips and P. A. Williams, Ellis Horwood: 3.
- Chiarelli, P. A., Johal, M. S., Casson, J. L., Roberts, J. B., Robinson, J. M. et Wang, H.-L. (2001).** Controlled Fabrication of Polyelectrolyte Multilayer Thin Films Using Spin-Assembly. *Advanced Materials (Weinheim, Federal Republic of Germany)* **13**: 1167.
- Cho, J., Kookheon, C., Hong, J. D. et Lee, K. B. (2001).** Fabrication of Highly Ordered Multilayer Films Using a Spin Self-Assembly Method. *Advanced Materials (Weinheim, Federal Republic of Germany)* **13**(14): 1076.
- Cochin, D. et Laschewsky, A. (1999).** Layer-by-Layer Self-Assembly of Hydrophobically Modified Polyelectrolytes. *Macromolecular Chemistry and Physics* **200**(3): 609.
- Cosgrove, D. J. (1998).** Cell Wall Loosening by Expansins. *Plant Physiology* **118**(2): 333.
- Courtin, C. M. et Delcour, J. A. (2002).** Arabinoxylans and Endoxylanases in Wheat Flour Bread-Making. *Journal of Cereal Science* **35**(3): 225.
- Cranston, E. D. et Gray, D. G. (2006).** Morphological and Optical Characterization of Polyelectrolyte Multilayers Incorporating Nanocrystalline Cellulose. *Biomacromolecules* **7**(9): 2522.
- Cranston, E. D. et Gray, D. G. (2008).** Birefringence in Spin-Coated Films Containing Cellulose Nanocrystals. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **325**(1-2): 44.

- de Lima, D. U. et Buckeridge, M. S. (2001).** Interaction between Cellulose and Storage Xyloglucans: The Influence of the Degree of Galactosylation. *Carbohydrate Polymers* **46**(2): 157.
- de Mesquita, J. P., Donnici, C. L. et Pereira, F. V. (2010).** Biobased Nanocomposites from Layer-by-Layer Assembly of Cellulose Nanowhiskers with Chitosan. *Biomacromolecules* **11**(2): 473.
- Decher, G. (1997).** Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **277**(5330): 1232.
- DeLongchamp, D. M. et Hammond, P. T. (2004).** Highly Ion Conductive Poly(Ethylene Oxide)-Based Solid Polymer Electrolytes from Hydrogen Bonding Layer-by-Layer Assembly. *Langmuir* **20**(13): 5403.
- Dong, X. M., Kimura, T., Revol, J. F. et Gray, D. G. (1996).** Effects of Ionic Strength on the Isotropic-Chiral Nematic Phase Transition of Suspensions of Cellulose Crystallites. *Langmuir* **12**(8): 2076.
- Dong, X. M., Revol, J. F. et Gray, D. G. (1998).** Effect of Microcrystallite Preparation Conditions on the Formation of Colloid Crystals of Cellulose. *Cellulose* **5**(1): 19.
- Ducéré, V., Bernès, A. et Lacabanne, C. (2005).** A Capacitive Humidity Sensor Using Cross-Linked Cellulose Acetate Butyrate. *Sensors and Actuators B: Chemical*
- ISOEN 2003 - Selected Papers from the 10th International Symposium on Olfaction and Electronic Noses.* **106**(1): 331.
- Dunky, M. (2004).** Adhesives Based on Formaldehyde Condensation Resins. *Macromolecular Symposia* **217**: 417.
- Elazzouzi-Hafraoui, S., Nishiyama, Y., Putaux, J.-L., Heux, L., Dubreuil, F. et Rochas, C. (2008).** The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. *Biomacromolecules* **9**: 57.
- Elazzouzi-Hafraoui, S., Putaux, J.-L. et Heux, L. (2009).** Self-Assembling and Chiral Nematic Properties of Organophilic Cellulose Nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**(32): 11069.
- Emslie, A. G., Bonner, F. T. et Peck, L. G. (1958).** Flow of a Viscous Liquid on a Rotating Disk. *Journal of Applied Physics* **29**: 858.
- Faik, A., Chileshe, C., Sterling, J. et Maclachlan, G. (1997).** Xyloglucan Galactosyl- and Fucosyltransferase Activities from Pea Epicotyl Microsomes. *Plant Physiol.* **114**(1): 245.
- Freitas, R. A., Martin, S., Santos, G. L., Valenga, F., Buckeridge, M. S., Reicher, F. et Sierakowski, M.-R. (2005).** Physico-Chemical Properties of Seed Xyloglucans from Different Sources. *Carbohydrate Polymers* **60**(4): 507.
- Frétiigny, C. et Rivoal, J.-C. (2005).** Microscopie À Force Atomique. *Techniques de l'Ingénieur* **R1394**.

- Fry, S. C., Smith, R. C., Renwick, K. F., Martin, D. J., Hodge, S. K. et Matthews, K. J. (1992).** Xyloglucan Endotransglycosylase, a New Wall-Loosening Enzyme-Activity from Plants. *Biochemical Journal* **282**: 821.
- Fry, S. C., York, W. S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J. P., Kato, Y., Lorences, E. P., Maclachlan, G. A., McNeil, M., Mort, A. J., Reid, J. S. G., Seitz, H. U., Selvendran, R. R., Voragen, A. G. J. et White, A. R. (1993).** An Unambiguous Nomenclature for Xyloglucan-Derived Oligosaccharides. *Physiologia Plantarum* **89**(1): 1.
- Fujino, T., Sone, Y., Mitsuishi, Y. et Itoh, T. (2000).** Characterization of Cross-Links between Cellulose Microfibrils, and Their Occurrence During Elongation Growth in Pea Epicotyl. *Plant and Cell Physiology* **41**(4): 486.
- Gidley, M. J., Lillford, P. J., Rowlands, D. W., Lang, P., Dentini, M., Crescenzi, V., Edwards, M., Fanutti, C. et Grant Reid, J. S. (1991).** Structure and Solution Properties of Tamarind-Seed Polysaccharide. *Carbohydrate Research* **214**(2): 299.
- Glinel, K., Déjournat, C., Prevot, M., Schöler, B., Schönhoff, M. et v.Klitzing, R. (2007).** Responsive Polyelectrolyte Multilayers. *Colloids and Surfaces A* **303**: 3.
- Goussé, C., Chanzy, H., Excoffier, G., Soubeyrand, L. et Fleury, E. (2002).** Stable Suspensions of Partially Silylated Cellulose Whiskers Dispersed in Organic Solvents. *Polymer* **43**(9): 2645.
- Graessley, W. W. (1980).** Polymer Chain Dimensions and Dependence of Viscoelastic Properties on Concentration, Molecular Weight and Solvent Power. *Polymer* **21**(3): 258.
- Habibi, Y., Lucia, L. A. et Rojas, O. J. (2010).** Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chemical Reviews* **110**(6): 3479.
- Hanus, J. et Mazeau, K. (2006).** The Xyloglucan-Cellulose Assembly at the Atomic Scale. *Biopolymers* **82**(1): 59.
- Hayashi, T. et Maclachlan, G. (1984).** Pea Xyloglucan and Cellulose : I. Macromolecular Organization. *Plant Physiol.* **75**(3): 596.
- Hayashi, T., Marsden, M. P. F. et Delmer, D. P. (1987).** Pea Xyloglucan and Cellulose : V. Xyloglucan -Cellulose Interactions in Vitro and in Vivo. *Plant Physiology* **83**: 384.
- Hayashi, T., Ogawa, K. et Mitsuishi, Y. (1994a).** Characterization of the Adsorption of Xyloglucan to Cellulose. *Plant and Cell Physiology* **35**(8): 1199.
- Hayashi, T., Takeda, T., Ogawa, K. et Mitsuishi, Y. (1994b).** Effects of the Degree of Polymerization on the Binding of Xyloglucans to Cellulose. *Plant and Cell Physiology* **35**(6): 893.
- Hayashi, T., Wong, Y.-S. et Maclachlan, G. (1984).** Pea Xyloglucan and Cellulose : ii. Hydrolysis by Pea Endo-1,4- $\beta$ -Glucanases. *Plant Physiol.* **75**(3): 605.

- Hu, G., Heitmann, J. A., Jr. et Rojas, O. J. (2009).** In Situ Monitoring of Cellulase Activity by Microgravimetry with a Quartz Crystal Microbalance. *J Phys Chem B* **113**(44).
- Iler, R. K. (1966).** Multilayers of Colloidal Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **21**: 569.
- Jean, B., Dubreuil, F., Heux, L. et Cousin, F. (2008).** Structural Details of Cellulose Nanocrystals/Polyelectrolytes Multilayers Probed by Neutron Reflectivity and Afm. *Langmuir* **24**(7): 3452.
- Jean, B., Heux, L., Dubreuil, F., Chambat, G. et Cousin, F. (2009).** Non-Electrostatic Building of Biomimetic Cellulose-Xyloglucan Multilayers. *Langmuir* **25**(7): 3920.
- Jenekhe, S. A. (1983).** The Rheology and Spin Coating of Polyimide Solutions. *Polymer Engineering and Science* **23**(15): 830.
- Johnson, K. L., Jones, B. J., Schultz, C. J. et Bacic, A. (2003).** Non-Enzymic Cell Wall (Glyco)Proteins. *The Plant Cell Wall*. J. K. C. Rose, Blackwell Publishing. **8**: 111.
- Josefsson, P., Henriksson, G. et Wagberg, L. (2008).** The Physical Action of Cellulases Revealed by a Quartz Crystal Microbalance Study Using Ultrathin Cellulose Films and Pure. *Biomacromolecules* **9**(1): 249.
- Keegstra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W. D. et Albersheim, P. (1973).** The Structure of Plant Cell Walls : Iii. A Model of the Walls of Suspension-Cultured Sycamore Cells Based on the Interconnections of the Macromolecular Components. *Plant Physiology* **51**: 188.
- Kharlampieva, E., Kovlovskaya, v., Ankner, J. F. et Sukhishvili, S. A. (2008).** Hydrogen-Bonded Polymer Multilayers Probed by Neutron Reflectivity. *Langmuir* **24**(20): 11346.
- Kharlampieva, E., Kozlovskaya, V. et Sukhishvili, S. A. (2009).** Layer-by-Layer Hydrogen-Bonded Polymer Films: From Fundamentals to Applications. *Advanced Materials* **21**(30): 3053.
- Khutoryanskaya, O. V., Potgieter, M. et Khutoryanskiy, V. V. (2010).** Multilayered Hydrogel Coatings Covalently-Linked to Glass Surfaces Showing a Potential to Mimic Mucosal Tissues. *Soft Matter* **6**(3): 551.
- Kim, S.-G., Hagura, N., Iskandar, F., Yabuki, A. et Okuyama, K. (2008).** Multilayer Film Deposition of Ag and Sio<sub>2</sub> Nanoparticles Using a Spin Coating Process. *Thin Solid Films* **516**(23): 8721.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P. et Bohn, A. (2005).** Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**(22): 3358.
- Kohli, P. et Blanchard, G. J. (2000).** Applying Polymer Chemistry to Interfaces: Layer-by-Layer and Spontaneous Growth of Covalently Bound Multilayers. *Langmuir* **16**(10): 4655.

- Lawrence, C. J. (1988).** The Mechanics of Spin Coating of Polymer-Films. *Physics of Fluids* **31**(10): 2786.
- Lee, S. S., Hong, J. D., Kim, C. H., Kim, K., Koo, J. P. et Lee, K. B. (2001).** Layer-by-Layer Deposited Multilayer Assemblies of Ionene-Type Polyelectrolytes Based on the Spin-Coating Method. *Macromolecules* **34**(16): 5358.
- Lee, S. S., Lee, K. B. et Hong, J. D. (2003).** Evidence for Spin Coating Electrostatic Self-Assembly of Polyelectrolytes. *Langmuir* **19**(18): 7592.
- Levy, S., Maclachlan, G. et Staehelin, L. A. (1997).** Xyloglucan Sidechains Modulate Binding to Cellulose During in Vitro Binding Assays as Predicted by Conformational Dynamics Simulations. *Plant Journal* **11**(3): 373.
- Levy, S., York, W. S., Stuikeprill, R., Meyer, B. et Staehelin, L. A. (1991).** Simulations of the Static and Dynamic Molecular-Conformations of Xyloglucan - the Role of the Fucosylated Side-Chain in Surface-Specific Side-Chain Folding. *Plant Journal* **1**(2): 195.
- Lima, D. U., Oliveira, R. C. et Buckeridge, M. S. (2003).** Seed Storage Hemicelluloses as Wet-End Additives in Papermaking. *Carbohydrate Polymers* **52**(4): 367.
- Lin, Z. Y., Renneckar, S. et Hindman, D. P. (2008).** Nanocomposite-Based Lignocellulosic Fibers 1. Thermal Stability of Modified Fibers with Clay-Polyelectrolyte Multilayers. *Cellulose* **15**(2): 333.
- Lopez, M., Bizot, H., Chambat, G., Marais, M. F., Zykwiniska, A., Ralet, M. C., Driguez, H. et Buleon, A. (2010).** Enthalpic Studies of Xyloglucan-Cellulose Interactions. *Biomacromolecules* **11**(6): 1417.
- McCann, M. C., Wells, B. et Roberts, K. (1990).** Direct Visualization of Cross-Links in the Primary Plant Cell Wall. *J Cell Sci* **96**(2): 323.
- Meinert, M. C. et Delmer, D. P. (1977).** Changes in Biochemical Composition of Cell-Wall of Cotton Fiber During Development. *Plant Physiology* **59**(6): 1088.
- Meyerhofer, D. (1978).** Characteristics of Resist Films Produced by Spinning. *Journal of Applied Physics* **49**(7): 3993.
- Mishima, T., Hisamatsu, M., York, W. S., Teranishi, K. et Yamada, T. (1998).** Adhesion of [Beta]-D-Glucans to Cellulose. *Carbohydrate Research* **308**(3-4): 389.
- Mohnen, D. (2008).** Pectin Structure and Biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology Physiology and Metabolism - Edited by Markus Pauly and Kenneth Keegstra* **11**(3): 266.
- Montanari, S., Rountani, M., Heux, L. et Vignon, M. R. (2005).** Topochemistry of Carboxylated Cellulose Nanocrystals Resulting from Tempo-Mediated Oxidation. *Macromolecules* **38**(5): 1665.
- Nelson, N. (1944).** A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for Determination of Glucose. *Journal of Biological Chemistry* **153**: 375.

- Nishitani, K. et Tominaga, R. (1992).** Endoxyloglucan Transferase, a Novel Class of Glycosyltransferase That Catalyzes Transfer of a Segment of Xyloglucan Molecule to Another Xyloglucan Molecule. *Journal of Biological Chemistry* **267**(29): 21058.
- Nishiyama, Y., Isogai, A., Okano, T., Muller, M. et Chanzy, H. (1999).** Intracrystalline Deuteration of Native Cellulose. *Macromolecules* **32**(6): 2078.
- Nishiyama, Y., Kim, U. J., Kim, D. Y., Katsumata, K. S., May, R. P. et Langan, P. (2003a).** Periodic Disorder Along Ramie Cellulose Microfibrils. *Biomacromolecules* **4**(4): 1013.
- Nishiyama, Y., Langan, P. et Chanzy, H. (2002).** Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I-Beta from Synchrotron X-Ray and Neutron Fiber Diffraction. *Journal of American Chemical Society* **124**(31): 9074.
- Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H. et Langan, P. (2003b).** Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose 1(Alpha), from Synchrotron X-Ray and Neutron Fiber Diffraction. *Journal of the American Chemical Society* **125**(47): 14300.
- Norrman, K., Ghanbari-Siahkali, A. et Larsen, N. B. (2005).** Studies of Spin-Coated Polymer Films. *Annual Reports in Prog Chem C* **101**: 174.
- Orts, W. J., Godbout, L., Marchessault, R. H. et Revol, J. F. (1998).** Enhanced Ordering of Liquid Crystalline Suspensions of Cellulose Microfibrils: A Small Angle Neutron Scattering Study. *Macromolecules* **31**(17): 5717.
- Patel, P. A., Dobrynin, A. V. et Mather, P. T. (2007).** Combined Effect of Spin Speed and Ionic Strength on Polyelectrolyte Spin Assembly. *Langmuir* **23**(25): 12589.
- Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A. et York, W. S. (1999).** Molecular Domains of the Cellulose/Xyloglucan Network in the Cell Walls of Higher Plants. *Plant Journal* **20**(6): 629.
- Philipp, B., JACOPIAN, V., LOTH, F., HIRTE, W. et SCHULZ, G. (1979).** Influence of Cellulose Physical Structure on Thermohydrolytic, Hydrolytic, and Enzymatic Degradation of Cellulose. Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY: 127.
- Podsiadlo, P., Choi, S.-Y., Shim, B., Lee, J., Cuddihy, M. et Kotov, N. A. (2005).** Molecularly Engineered Nanocomposites: Layer-by-Layer Assembly of Cellulose Nanocrystals. *Biomacromolecules* **6**(6): 2914.
- Podsiadlo, P., Sui, L., Elkasabi, Y., Burgardt, P., Lee, J., Miryala, A., Kusumaatmaja, W., Carman, M. R., Shtein, M., Kieffer, J., Lahann, J. et Kotov, N. A. (2007).** Layer-by-Layer Assembled Films of Cellulose Nanowires with Antireflective Properties. *Langmuir* **23**(15): 7901.
- Prade, R. A. (1995).** Xylanases : From Biology to Biotechnology. *Biotechn. Genet. Eng. Rev.* **13**: 100.

- Quinn, J. F., Johnston, A. P. R., Such, G. K., Zelikin, A. N. et Caruso, F. (2007).** Next Generation, Sequentially Assembled Ultrathin Films: Beyond Electrostatics. *Chemical Society Reviews* **36**(5): 707.
- Ralet, M. C., Andre-Leroux, G., Quemener, B. et Thibault, J. F. (2005).** Sugar Beet (Beta Vulgaris) Pectins Are Covalently Cross-Linked through Diferulic Bridges in the Cell Wall. *Phytochemistry* **66**(24): 2800.
- Rehg, T. J. et Higgins, B. G. (1992).** Spin Coating of Colloidal Suspensions. *American Institute of Chemicals Engineers Journal* **38**(4): 489.
- Ren, Y., Ellis, P. R., Sutherland, I. W. et Ross-Murphy, S. B. (2003).** Dilute and Semi-Dilute Solution Properties of an Exopolysaccharide from *Escheridia Coli* Strains61. *Carbohydrate Polymers* **52**: 189.
- Ren, Y., Picout, D. R., Ellis, P. R. et Ross-Murphy, S. B. (2004).** Solution Properties of the Xyloglucan Polymer from *Afzelia Africana*. *Biomacromolecules* **5**: 2384.
- Revol, J. F., Bradford, H., Giasson, J., Marchessault, R. H. et Gray, D. G. (1992).** Helicoidal Self-Ordering of Cellulose Microfibrils in Aqueous Suspension. *International Journal of Biological Macromolecules* **14**(3): 170.
- Revol, J. F., Godbout, L., Dong, X. M., Gray, D. G., Chanzy, H. et Maret, G. (1994).** Chiral Nematic Suspensions of Cellulose Crystallites - Phase-Separation and Magnetic-Field Orientation. *Liquid Crystals* **16**(1): 127.
- Rose, J. K. C. et Bennett, A. B. (1999).** Cooperative Disassembly of the Cellulose-Xyloglucan Network of Plant Cell Walls: Parallels between Cell Expansion and Fruit Ripening. *Trends in Plant Science* **4**(5): 176.
- Saulnier, L., Crepeau, M. J., Lahaye, M., Thibault, J. F., Garcia-Conesa, M. T., Kroon, P. A. et Williamson, G. (1999).** Isolation and Structural Determination of Two 5,5'-Diferuloyl Oligosaccharides Indicate That Maize Heteroxylans Are Covalently Cross-Linked by Oxidatively Coupled Ferulates. *Carbohydrate Research* **320**(1-2): 82.
- Schauer, C. L., Chen, M.-S., Chatterley, M., Eisemann, K., Welsh, E. R., Price, R. R., Schoen, P. E. et Ligler, F. S. (2003).** Color Changes in Chitosan and Poly(Allyl Amine) Films Upon Metal Binding. *Thin Solid Films* **434**(1-2): 250.
- Schlenoff, J. B., Dubas, S. T. et Farhat, T. (2000).** Sprayed Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **16**: 9968.
- Shim, B. S., Podsiadlo, P., Lilly, D. G., Agarwal, A., Leet, J., Tang, Z., Ho, S., Ingle, P., Paterson, D., Lu, W. et Kotov, N. A. (2007).** Nanostructured Thin Films Made by Dewetting Method of Layer-by-Layer Assembly. *Nano Letters* **7**(11): 3266.
- Spangler, L. L., Torkelson, J. M. et Royal, J. S. (1990).** Influence of Solvent and Molecular-Weight on Thickness and Surface-Topography of Spin-Coated Polymer-Films. *Polymer Engineering and Science* **30**(11): 644.

- Stiernstedt, J., Brumer, H., Zhou, Q., Teeri, T. T. et Rutland, M. W. (2006).** Friction between Cellulose Surfaces and Effect of Xyloglucan Adsorption. *Biomacromolecules* **7**(7): 2147.
- Stockton, W. B. et Rubner, M. F. (1997).** Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers .4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline Via Hydrogen-Bonding Interactions. *Macromolecules* **30**(9): 2717.
- Sugiyama, J., Vuong, R. et Chanzy, H. (1991).** Electron-Diffraction Study on the 2 Crystalline Phases Occurring in Native Cellulose from an Algal Cell-Wall. *Macromolecules* **24**(14): 4168.
- Sukhishvili, S. A. et Granick, S. (2002).** Layered, Erasable Polymer Multilayers Formed by Hydrogen-Bonded Sequential Self-Assembly. *Macromolecules* **35**(1): 301.
- Sukhorukov, G. B., Donath, E., Lichtenfeld, H., Knippel, E., Knippel, M., Budde, A. et Möhwald, H. (1998).** Layer-by-Layer Self Assembly of Polyelectrolytes on Colloidal Particles. *Colloids and Surfaces A* **137**: 253.
- Sunna, A. et Antranikian, G. (1997).** Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* **17**: 39.
- Swiston, A. J., Cheng, C., Um, S. H., Irvine, D. J., Cohen, R. E. et Rubner, M. F. (2008).** Surface Functionalization of Living Cells with Multilayer Patches. *Nano Letters* **8**(12): 4446.
- Tang, Z., Wang, Y., Podsiadlo, P. et Kotov, N. A. (2006).** Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly : From Biomimetics to Tissue Engineering. *Advanced Materials (Weinheim, Federal Republic of Germany)* **18**: 3203.
- Teeri, T. T. (1997).** Crystalline Cellulose Degradation: New Insight into the Function of Cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology* **15**(5): 160.
- Tong, W., Gao, C. et Möhwald, H. (2008).** Ph-Responsive Protein Microcapsules Fabricated Via Glutaraldehyde Mediated Covalent Layer-by-Layer Assembly. *Colloid and Polymer Science* **286**: 1103.
- Turon, X., Rojas, O. J. et Deinhammer, R. S. (2008).** Enzymatic Kinetics of Cellulose Hydrolysis: A Qcm-D Study. *Langmuir* **24**(8): 3880.
- Valent, B. S. et Albersheim, P. (1974).** The Structure of Plant Cell Walls : V. On the Binding of Xyloglucan to Cellulose Fibers. *Plant Physiology* **54**: 105.
- Vincken, J. P., de Keizer, A., Beldman, G. et Voragen, A. (1995).** Fractionation of Xyloglucan Fragments and Their Interaction with Cellulose. *Plant Physiol.* **108**(4): 1579.
- Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J. et Visser, R. G. F. (2003).** If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Physiol.* **132**(4): 1781.

- Vincken, J. P., York, W. S., Beldman, G. et Voragen, A. G. J. (1997).** Two General Branching Patterns of Xyloglucan, Xxxg and Xxgg. *Plant Physiology* **114**(1): 9.
- Voinova, M. V., Rodahl, M., Jonson, M. et Kasemo, B. (1999).** Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach. *Physica Scripta* **59**(5): 391.
- Wagberg, L., Decher, G., Norgren, M., Lindstrom, T., Ankerfors, M. et Axnas, K. (2008).** The Build-up of Polyelectrolyte Multilayers of Microfibrillated Cellulose and Cationic Polyelectrolytes. *Langmuir* **24**(3): 784.
- Washo, B. D. (1977).** Rheology and Modeling of Spin Coating Process. *Ibm Journal of Research and Development* **21**(2): 190.
- Whitney, S. E. C., Brigham, J. E., Darke, A. H., J.S. Grant Reid et Gidley, M. J. (1995).** In Vitro Assembly of Cellulose/Xyloglucan Networks: Ultrastructural and Molecular Aspects. *The Plant Journal* **8**(4): 491.
- Yang, S. G., Zhang, Y. J., Guan, Y., Tan, S. X., Xu, J., Cheng, S. J. et Zhang, X. L. (2006).** Water Uptake Behavior of Hydrogen-Bonded Pvp-paa Lbl Film. *Soft Matter* **2**(8): 699.
- York, W. S., Darvill, A. G. et Albersheim, P. (1984).** Inhibition of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Stimulated Elongation of Pea Stem Segments by a Xyloglucan Oligosaccharide. *Plant Physiol.* **75**(2): 295.
- York, W. S., Kumar Kolli, V. S., Orlando, R., Albersheim, P. et Darvill, A. G. (1996).** The Structures of Arabinoxylglucans Produced by Solanaceous Plants. *Carbohydrate Research* **285**: 99.
- Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E. et Mielenz, J. R. (2006).** Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Strategies. *Biotechnology Advances* **24**(5): 452.
- Zhou, Q., Greffe, L., Baumann, M. J., Malmstrom, E., Teeri, T. T. et Brumer, H. (2005).** Use of Xyloglucan as a Molecular Anchor for the Elaboration of Polymers from Cellulose Surfaces: A General Route for the Design of Biocomposites. *Macromolecules* **38**(9): 3547.
- Zhou, Q., Rutland, M. W., Teeri, T. T. et Brumer, H. (2007).** Xyloglucan in Cellulose Modification. *Cellulose* **14**(6): 625.
- Zykwinska, A. W., Ralet, M.-C. J., Garnier, C. D. et Thibault, J.-F. J. (2005).** Evidence for in Vitro Binding of Pectin Side Chains to Cellulose. *Plant Physiol.* **139**(1): 397.



## **Films multicouches à base de polymères végétaux : Elaboration et application à la détection d'activités enzymatiques**

La cellulose et le xyloglucane constituent un réseau majeur de la paroi des cellules végétales. Ces molécules sont liées par des interactions de Van der Waals et des liaisons hydrogène que nous avons mis à profit pour l'élaboration de films multicouches nanométriques. En fonction de leur épaisseur et de leur indice de réfraction, les films nanométriques peuvent présenter des couleurs qui sont dues à des phénomènes d'interférences.

De tels films composés de nanocristaux de cellulose et de xyloglucane peuvent être valoriser comme détecteurs d'activité enzymatique de cellulases. En effet, l'action d'une enzyme hydrolytique peut être détectée par une diminution de l'épaisseur du film qui résulte en un changement de couleur.

Les modes de croissance de deux types de films ont été étudiés afin de déterminer les conditions opératoires les plus appropriées pour l'obtention de films colorés. La structure interne de ces films a été déterminée par réflectivité de neutrons à l'état sec et en solution pour évaluer les différences de structures. Les cinétiques de dégradation des films par les cellulases ont également été comparées par QCM-D.

Il s'avère que la détection de l'activité de cellulases avec les films nanométriques est plus rapide et plus sensible qu'une méthode colorimétrique utilisée usuellement. L'utilisation des films nanométriques pour la détection d'activité est également applicable à d'autres systèmes enzyme/substrat.

**Mots-clés** : nanocristaux de cellulose ; xyloglucane ; films multicouches colorés ; dégradation enzymatique ; cellulases.

---

## **Multilayered films composed of plant polymers : Elaboration and application to enzymatic activities detection**

Cellulose and xyloglucan represent a major network from plant cell wall. These molecules are linked by Van der Waals interactions and hydrogen bonds and we have used these interactions in order to elaborate nanometric multilayered films. According to their thickness and refractive index, nanometric films can present bright colours due to interference phenomena.

Such films composed of cellulose nanocrystals and xyloglucan can be used as cellulases enzymatic activities detector. Hydrolytic enzyme action can actually be detected by film thickness decrease and results in a colour change.

Growth mode has been studied for two kinds of film and the better conditions were chosen to obtain coloured films. Films internal structure has been investigated by neutron reflectometry on dry films and films in solution in order to evaluate the structures differences.

Films hydrolysis kinetics has also been compared by QCM-D. Cellulases activities detection using nanometric films is faster and more sensitive than a colorimetric method usually used. We have also proved that this technique can be used for other enzyme/substrate systems.

**Keywords**: cellulose nanocrystals; xyloglucan; coloured multilayered films; enzymatic degradation; cellulases.