HAL
open science

Elaboration et déformation de systèmes biomimétiques innovants

Antoine Bailly

To cite this version:

Antoine Bailly. Elaboration et déformation de systèmes biomimétiques innovants. Autre [cond-mat.other]. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENY098 . tel-00870354

HAL Id: tel-00870354

https://theses.hal.science/tel-00870354

Submitted on 7 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **NANOPHYSIQUE**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Antoine BAILLY

Thèse dirigée par **Catherine QUILLIET** et **Laurent HEUX**

préparée au sein du **Laboratoire Interdisciplinaire de Physique et du Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales**

dans **l'École Doctorale de Physique de Grenoble**

Elaboration et déformation de systèmes biomimétiques innovants

Thèse soutenue publiquement le **27 Novembre 2012**,
devant le jury composé de :

M. Vance BERGERON
Directeur de Recherche, Lyon, Rapporteur
M. Nicolas TSAPIS
Chargé de Recherche, Paris Sud, Rapporteur
Mme. Catherine PICART
Professeur des Universités, Grenoble, Examinateur
M. Emmanuel BELAMIE
Maître de Conférences, Montpellier, Examinateur
Mme. Catherine QUILLIET
Maître de Conférences, Grenoble, Directeur de thèse
M. Laurent HEUX
Directeur de Recherche, Grenoble, Directeur de thèse

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France / Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP

à mes parents, mes frères, mes grands-parents,
Émilie et les membres de nos familles.

En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche.

Devise Shadoks (Jacques Rouxel)

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés principalement au centre de recherche sur les macromolécules végétales (CERMAV) dirigé par Redouane Borsali, et en partie au laboratoire interdisciplinaire de physique (LIPHY) dirigé par Jacques Derouard. Je tiens à les remercier tous les deux de m'avoir accueilli dans leur laboratoire pour réaliser ma thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers mes deux directeurs de thèse, Catherine Quilliet (LIPHY) et Laurent Heux (CERMAV) pour leur encadrement et leur soutien, leur disponibilité et la confiance qu'ils m'ont témoignée durant ces 3 ans de thèse. Je remercie particulièrement Laurent Heux qui m'a encadré pendant la majeure partie de ma thèse et m'a donné de nombreux conseils et pistes pour la mise en place des mes expériences ainsi que pour les collaborations que nous avons pu avoir.

J'adresse ma reconnaissance à tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à évaluer mon travail et toutes les remarques intéressantes faites lors de la soutenance : Catherine Picart (Grenoble) pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury et pour son rôle d'examinatrice, Vance Bergeron (Lyon) et Nicolas Tsapis (Paris) pour avoir été les rapporteurs de mon travail, et Emmanuel Bélamie (Montpellier) pour son rôle d'examinateur. J'espère qu'ils ont pris plaisir à évaluer mes travaux.

Je tiens à adresser un très grand remerciement aux membres de l'équipe structures et propriétés des glycomatériaux (CERMAV) et dynamique des fluides complexes (LIPHY), pour toutes les discussions et la bonne ambiance qui a régné au laboratoire grâce à eux. Un merci particulier aux ingénieurs du service microscopie Isabelle Paintrand et Amandine Durand-Terrasson pour l'aide qu'elles m'ont apportée sur de nombreuses observations. N'oublions pas les doctorants et les post-doctorants du LIPHY et du CERMAV que je remercie pour leur bonne humeur, leur aide et tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Notamment Pan, Firas, Matthieu, Antoine, Bruno, Sabine, Landry, Nathanaël, Christine, Émilie, Agathe, Déborah, les deux Marion, Géraldine, Axel et Michaël qui, plus des collègues, sont devenus de vrais amis. Merci Déborah pour cette relecture et correction " éclair " que tu as faites de ma thèse quelques jours avant le dépôt, ainsi que pour la répétition du dimanche de ma soutenance.

Je remercie également tous nos collaborateurs et stagiaires qui m'ont apporté une aide précieuse pendant ma thèse. Tout d'abord, Cécile Cottet (LBFA, Grenoble), Alexei Grichine et Mylène Pezet (IAB, Grenoble), pour m'avoir permis d'utiliser leur matériel de microscopie confocale et pour tout leur bon conseil sur l'utilisation de cette technique. Egalement, Annabelle Geze (DPM Grenoble) pour les mesures par granulométrie laser. Pour finir, les stagiaires de master 1 que j'ai pu encadrer Quentin Serra, Romain Heuillette et Camille Cuier qui m'ont été d'une aide précieuse pour l'avancé de mes travaux.

Je tiens à remercier du fond du coeur, ma moitié Émilie pour m'avoir accompagné et supporté pendant les bons et les moins bons moments de ces deux dernières années de thèse, et qui m'a illuminé de sa bonne humeur, et a été d'une aide incroyable notamment pendant la rédaction.

Un grand merci à ma famille pour m'avoir apporté son soutien tout au long de ma thèse. Mes parents et mes frères à Clermont-Ferrand, ma grand-mère, et les cousins grenoblois (Simone et Guy, Serge, Martine, Yaelle, Sarah et David pour tout ces bons repas du vendredi soir). Sans oublier la famille d'Émilie.

NOMENCLATURE

CMC	Carboxyméthyle cellulose
CNC	Nanocristaux de cellulose (Cellulose NanoCrystals)
CPC	Chlorure de Cetlpyridinium.
CESA	Complexe de synthèse de la cellulose (CEllulose SynthAse Complex)
C.V.	Coefficient de variation
D4	Octamethylcyclotetrasiloxane
E/H	Eau dans huile
EtOH	Éthanol
H/E	Huile dans eau
LbL	Couche par couche (layer by layer)
MCBL	Microscopie confocale à balayage laser
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEB-FEG	Microscopie électronique à balayage à canon à émission de champ
MET	Microscopie électronique en transmission.
MFC	Microfibrille de cellulose
MO	Microscopie optique
PAA	Polyacrylamide
PAH	Poly(chlorure d'allilamine)
PP	Paroi primaire
RH	Taux d'humidité (ratio of humidity)
tr/min	Tour/minute
TSIM	Coque fine d'un matériau isotrope (Thin Shell of an Isotropic Material)
XEG	Xyloglucane endoglucanase
XG	Xyloglucanes

Table des matières

Introduction **1**

1 Bibliographie **5**

I La paroi primaire des cellules végétales 7

I.1 La cellule végétale 7

I.2 Composition de la paroi primaire 9

I.2.1 Les microfibrilles de cellulose 9

I.2.2 Les hémicelluloses 10

I.2.3 Les pectines 11

I.3 La paroi primaire : un matériau composite structuré 11

I.3.1 Fabrication de la paroi primaire par les cellules végétales 11

I.3.2 Organisation et élongation de la paroi primaire 12

I.3.3 La porosité de la paroi primaire 14

II La cellulose et les xyloglucanes 14

II.1 La cellulose 14

II.1.1 Structure chimique et cristallographique 14

II.1.2 Les nanocristaux de cellulose (CNC) 15

II.1.2.1 La morphologie des CNC 15

II.1.2.2 L'auto-organisation des CNC 16

II.2 Les xyloglucanes 18

II.3 Les interactions cellulose et xyloglucanes 18

II.4 Les propriétés mécaniques de composites cellulose et xyloglucane 19

II.4.1 Les nanocristaux de cellulose 19

II.4.2 Les films de xyloglucanes 20
II.4.3 Les films composites 21
III État de l'art des procédés d'émulsification 23
III.1 Définition 23
III.2 La stabilité d'une émulsion 24
III.3 Les méthodes d'émulsification 25
III.3.1 L'émulsification mécanique : cisaillement 25
III.3.2 L'émulsification par membrane 25
III.4 Les émulsions de Pickering 27
III.4.1 Notions générales sur les émulsions de Pickering 27
III.4.2 Mécanismes de stabilisation des émulsions de Pickering 28
III.4.3 Les aspects énergétiques 29
III.4.4 Facteurs influencant la stabilité des émulsions de Pickering 29
III.4.4.1 La mouillabilité des particules 30
III.4.4.2 L'état de dispersion des particules 30
III.4.4.3 La concentration en particules 30
III.4.4.4 La taille des particules 31
III.4.5 La coalescence limitée 31
III.4.6 Emulsion Pickering stabilisée par des nanocristaux de cellulose . . 31
IV La méthode de dépôt couche par couche 32
IV.1 Généralités sur la méthode couche par couche 33
IV.2 La croissance des films multicouches 33
IV.3 Multicouches de nanocristaux de cellulose 34
IV.3.1 Cellulose/polyelectrolyte 34
IV.4 Cellulose/xyloglucane 35
IV.5 Les capsules couche par couche 36
IV.5.1 Principe de leur élaboration 36
IV.5.2 Les substrats 37
IV.5.3 Les interactions utilisées pour la construction du multicouche . . 37
IV.5.4 Capsules multicouches de CNC/PAH 38

V Déformation de capsules : méthodes et formes caractéristiques 38
V.1 La déformation d'une coque sphérique, élastique et mince 38
V.2 La morphologie de déformation de coques sphériques 41
V.3 Méthode de déformation de capsule 43

2 Matériels et méthodes 45

I Préparation et caractérisation des briques élémentaires : nanocristaux de cellulose et xyloglucanes 47
I.1 Préparation de suspension de nanocristaux de cellulose 47
I.2 Caractérisation des nanocristaux de cellulose 47
I.2.1 Distribution en taille des nanocristaux de cellulose 48
I.2.1.1 Mesure en MET 48
I.2.1.2 Mesure en diffusion dynamique de la lumière (DLS) . . . 48
I.2.2 Mesure de la charge des nanocristaux de cellulose 49
I.2.2.1 Dosage conductimétrique 49
I.2.2.2 Mesure de potentiel zeta 50
I.2.3 La coalescence limitée par des nanocristaux de cellulose 50
I.3 Préparation des solutions de xyloglucanes 51
I.4 Marquage fluorescent des CNC et XG pour l'observation en microscopie confocale 51
I.4.1 Informations générales 51
I.4.2 Protocole de greffage 52
I.4.3 Purification des CNC marqués 53
I.4.4 Purification des XG marqués 53
I.4.5 Caractérisation du greffage de fluorophore sur des CNC et XG par absorbance 54
II Les méthodes d'émulsification 56
II.1 Homogénéiseur-disperseur 57
II.2 Filtration sur une grille calibrée 58
III Élaboration des capsules multicouches CNC/XG 60

III.1 Émulsification 60
III.1.1 Coeur "liquide" 60
III.1.2 Coeur "solide" 60
III.2 Dépôt de couches 61
III.3 Caractérisation de la paroi des capsules 63
III.3.1 Dépôt de couches fluorescentes et mesure d'intensité 63
III.3.2 Préparation de capsules pour l'observation en MET 63
III.3.3 Topologie de la paroi : MEB-FEG 64
IV Déformation des capsules 64
IV.1 Déformation de capsules hydratées en milieu aqueux 64
IV.2 Déformation de capsules sèches dans des gels 64
IV.2.1 Inclusion de capsules dans un gel d'acrylamide 64
IV.2.2 Séchage du gel et déformation des capsules 65
IV.2.3 Observation de la déformation en microscopie confocale 66
IV.2.4 Reconstruction en trois dimensions de capsules en MCBL 67
V Films nanocomposites 68

3 Émulsions stabilisées par des nanocristaux de cellulose et films composites cellulose/xyloglucanes 71

I Stabilisation d'une émulsion huile/eau par des nanocristaux de cellulose (CNC) . . 74
I.1 Choix de l'utilisation de CNC pour stabiliser l'émulsion 74
I.2 Les conditions de stabilité pour l'émulsion 74
I.3 Stabilisation d'une émulsion huile dans l'eau par des CNC 75
I.4 Émulsion de Pickering de CNC seul 75
I.4.1 Stabilisation d'une émulsion par CNC et tensioactif 76
I.4.1.1 La stabilisation séquentielle 77
I.4.1.2 La stabilisation par un complexe CPC/CNC 77
I.5 Stabilisation après passage sur grille calibrée 77
I.5.1 Les conditions d'émulsification 78
I.5.2 Reproductibilité de l'émulsification 79

I.5.3 Effet de la concentration en CPC 80
I.6 Nombre de passages 81
I.7 Effet de la maille 83
I.8 Conclusion et Discussion 84
II Films composites cellulose/xyloglucanes 87
II.1 Etude expérimentale des propriétés de traction 88
II.1.1 Influence de l'humidité relative 89
II.1.2 Influence de la quantité de nanocristaux 90
II.2 Discussion 91

4 Élaboration et caractérisation des capsules 93

I Présentation de la fabrication des capsules par la méthode couche par couche . . . 95
II Contrôle du dépôt de couche par microscopie confocale à balayage laser 96
II.1 Étude des artefacts liés à la microscopie confocale à balayage laser 97
II.2 Capsules à coeur liquide 100
II.2.1 Émulsion initiale et dépôt de la première couche de xyloglucanes 100
II.2.2 Croissance de la paroi 101
II.2.3 Pérennité de la croissance du film 104
II.3 Capsules à coeur solide 107
III Évolution des capsules au cours des dépôts 111
III.1 Effet des dépôts sur l'émulsion initiale 111
IV La paroi à l'échelle nanométrique 114
IV.1 Pourquoi le LRW ? 114
IV.2 Mesure de l'épaisseur de la paroi en fonction du nombre de couche 115
IV.3 Organisation de surface 116
V Discussion et conclusion 117

5 Étude des propriétés mécaniques des capsules par flambage 121

I Introduction 123
II Déformation en solution 125
III Déformation dans un hydrogel 127

III.1 Le principe 127
III.1.1 Inclusion et déformation de capsules dans un gel d'acrylamide . . 127
III.1.2 Mise en forme des gels pour l'observation en microscopie confocale à balayage laser (MCBL) 128
III.2 Déformation du gel sans capsules 128
III.3 Dégonflement de capsules dans un gel de polyacrylamide. 132
III.3.1 Les capsules dans le gel avant déshydratation et dégonflement . . 132
III.3.2 Observation des capsules après déshydratation et dégonflement . 134
III.3.2.1 Validation de la méthode 134
III.3.2.2 Orientation de la calotte sphérique retournée 135
III.3.3 Acquisition des données quantitatives. 137
III.3.3.1 Les capsules en coeur d'échantillon 138
III.3.3.2 Les capsules en périphérie d'échantillon 139
III.3.4 Élasticité des capsules multicouches XG/CNC 140
III.3.4.1 Influence de la nature du gel 140
III.3.4.2 Influence de l'épaisseur de la capsule 141
IV Discussion et conclusion : composites CNC-XG et modèle de TSIM 143

Conclusion générale et Perspectives 149

A Méthodes de caractérisation et d'observation 167

I Microscopie optique 167
II La microscopie confocale 167
III La microscopie électronique en transmission 169
III.1 Principe de la microscopie électronique en transmission 169
III.2 L'ultramicrotomie 170
III.3 Inclusion dans de la résine pour l'observation en microscopie électronique en transmission 170
III.3.1 Fixation et post-fixation 171
III.3.2 Déshydratation, Imprégnation et Inclusion 171
IV Microscopie électronique à balayage 171

IV.1 Principe de la microscopie électronique à balayage 171
IV.2 Métallisation pour l'observation en microscopie électronique à balayage . . 172
V Mesure de l'absorbance 173
V.1 Définition de l'absorbance 173
V.2 La spectrophotométrie 173
VI Diffusion dynamique de la lumière 174
VII Potentiel zeta 175

B Calculs détaillés 177

I Calcul du taux de soufre et de la charge de surface de CNC par conductimétrie . . 177
I.1 Mesure du taux de soufre des CNC 177
I.2 Calcul de la charge de surface des CNC 178
II Calcul de la viscosité de la phase aqueuse lors de l'émulsification sur grille calibrée 179

Introduction

Le biomimétisme (dérivé du grec bios signifiant vie, et mímêsis signifiant imiter) est une approche scientifique qui consiste à observer et imiter les propriétés spécifiques de système biologique - l'efficacité énergétique de la photosynthèse, la résistance des fils de soie de l'araignée, l'hydrophobicité de la feuille de lotus - pour les adapter au service de l'homme.

Les cellules végétales sont les unités élémentaires, très nombreuses, constituant les organismes végétaux. Elles se distinguent des cellules appartenant aux autres organismes eucaryotes, par la présence d'une paroi extracellulaire. Celle-ci est une structure organisée, complexe, semi-rigide et dynamique, composée de polysaccharides. Elle est formée de couche de faisceaux de microfibrilles de cellulose parallèles et pontées par les hémicelluloses, maintenus dans une matrice polymère de pectines. Cette organisation particulière de la paroi végétale est responsable de la croissance unidirectionnelle des cellules chez les plantes. L'origine de cette structure si particulière est encore mal connue de nos jours.

L'hydrolyse acide contrôlée de ces microfibrilles permet d'isoler les parties cristallines qui les constituent et d'obtenir ainsi des nanocristaux isolés d'une largeur de 3 nm à 50 nm et d'une longueur de 100 nm à quelques micromètres suivant l'origine de la cellulose. Ces nanocristaux se présentent sous forme de bâtonnets rigides formant dans les milieux aqueux des suspensions colloïdales. Il a été montré, au début des années 90, que l'on pouvait reproduire des structures ordonnées in vitro de type cristal liquide nématique ou nématique chiral (cholestérique) par séparation de phase à partir d'une concentration critique [Revol et al., 1992]. Plus récemment, l'ordre nématique de ces cristaux liquides a pu être transposé sur une surface plane par l'utilisation de la technique de dépôt couche par couche de poly(chlorure de polyallilamine) et de nanocristaux de cellulose [Jean et al., 2008]. Les structures ainsi obtenues présentent une conformation similaire à celle des microfibrilles de cellulose dans la paroi végétale.

La méthode couche par couche, développée par Decher dans les années 90, a d'abord été utilisée pour créer des films dont l'épaisseur, les propriétés et la composition sont contrôlées à l'échelle nanométrique. 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. Cette technique a rapidement été adaptée pour élaborer des microcapsules. Si la méthode couche par couche a d'abord été utilisée avec des polyélectrolytes, l'utilisation de polymères naturels tels que les polysaccharides a rapidement vu le

jour pour développer des systèmes plus "verts" et biocompatibles. Très récemment, les fortes interactions entre la cellulose et les xyloglucanes (hémicelluloses) ont été utilisées pour construire des films par la méthode couche par couche.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été de concevoir et d'étudier des propriétés de déformation des systèmes biomimétiques analogues aux parois végétales, sous forme de capsules. Pour ce faire, nous avons élaboré des microcapsules biomimétiques possédant une structure et une composition similaires à celles des parois végétales, et exploré leur déformation en dégonflement. Afin de former de tels systèmes, nous avons mis à profit les interactions fortes entre les nanocristaux de cellulose et le xyloglucane pour construire des capsules couche par couche sur un substrat liquide : une émulsion huile dans eau stabilisée par des nanocristaux de cellulose. Il nous a fallu pour cela à la fois comprendre les mécanismes physico-chimiques de formation et de stabilisation de ces émulsions, puis trouver les conditions expérimentales et caractériser les capsules élaborées à partir de ces émulsions. Puis, pour étudier les propriétés mécaniques de ces capsules, nous avons mis au point un processus reposant sur leur inclusion dans un hydrogel, qui permet de séparer la déshydratation de la paroi des capsules, de leur dégonflement. Pour présenter notre démarche scientifique, cette thèse a été divisée en cinq chapitres.

Le premier chapitre est consacré à une revue bibliographique présentant tout d'abord quelques généralités sur la paroi pectocellulosique, sa composition et son organisation. Nous y aborderons également la description des nanocristaux de cellulose et des xyloglucanes, leurs interactions, et leurs propriétés mécaniques. Après ces quelques rappels, nous allons présenter un état de l'art sur les systèmes que nous avons utilisés afin d'élaborer nos objets : émulsions, multicouches et donner quelques élements de compréhension des propriétés d'élasticité de coques fines et de leur déformation.

Le deuxième chapitre présente les aspects expérimentaux, qui ont permis de concevoir nos objets et de les caractériser. Tout d'abord la fabrication du substrat et des différents éléments impliqués permettant d'élaborer les capsules multicouches, puis les techniques de caractérisation utilisées.

Le troisième chapitre aborde l'élaboration d'émulsions de Pickering stabilisées par des nanocristaux de cellulose. Une attention particulière a été portée sur la stabilité du système et le contrôle que nous pouvions avoir sur la taille des gouttes formées. Ceci est essentiel car l'émulsion est le substrat de la construction des capsules. Nous aborderons également dans ce chapitre, l'étude de films composites nanocristaux et xyloglucanes, afin de déterminer un ordre de grandeur des propriétés mécaniques des systèmes multicouches développés dans cette thèse.

Le quatrième chapitre décrit l'élaboration et la caractérisation de capsules multicouches de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes par différentes techniques de microscopie. Nous avons également prêté attention aux effets de la méthode couche par couche sur les dimensions des capsules, par un contrôle de l'évolution de leur taille moyenne au cours de la croissance de la paroi.

Le cinquième et dernier chapitre présente la méthode développée pour dégonfler les capsules, permettant d'évaluer leurs propriétés mécaniques. Dans un premier temps les déformations en phase aqueuse seront abordées, puis, après avoir valider la technique d'inclusion et de dégonflement des capsules dans un hydrogel, nous nous intéresserons à leur comportement élastique en observant par microscopie optique les caractéristiques de leurs morphologies après déformation. Nous tenterons de relier ces observations aux grandeurs physiques du système dans le cadre de la mécanique de déformation des coques minces.

Chapitre 1

Bibliographie

I La paroi primaire des cellules végétales

I.1 La cellule végétale

La cellule végétale est l'unité élémentaire des organismes végétaux. Comme les autres cellules eucaryotes, elle est constituée d'une membrane plasmique entourant le cytoplasme qui contient le noyau et d'autres organites tels que les mitochondries et l'appareil de Golgi. Elle se distingue par la présence de vacuoles et de chloroplastes au sein du cytoplasme, et par l'existence d'une paroi pectocellulosique entourant chaque cellule. Les plasmodesmes relient les cytoplasmes des cellules adjacentes et permettent les échanges entre elles. Un exemple d'illustration d'une cellule végétale est présenté sur la figure 1.1. La taille des cellules végétales est généralement comprise entre 10 et 100 µm. Toutefois certains organismes possèdent des cellules de tailles supérieures. Par exemple, chez l'algue *Chara corallina* les cellules matures atteignent une longueur de 1 cm pour un diamètre de 2 mm [Toole et al., 2001].

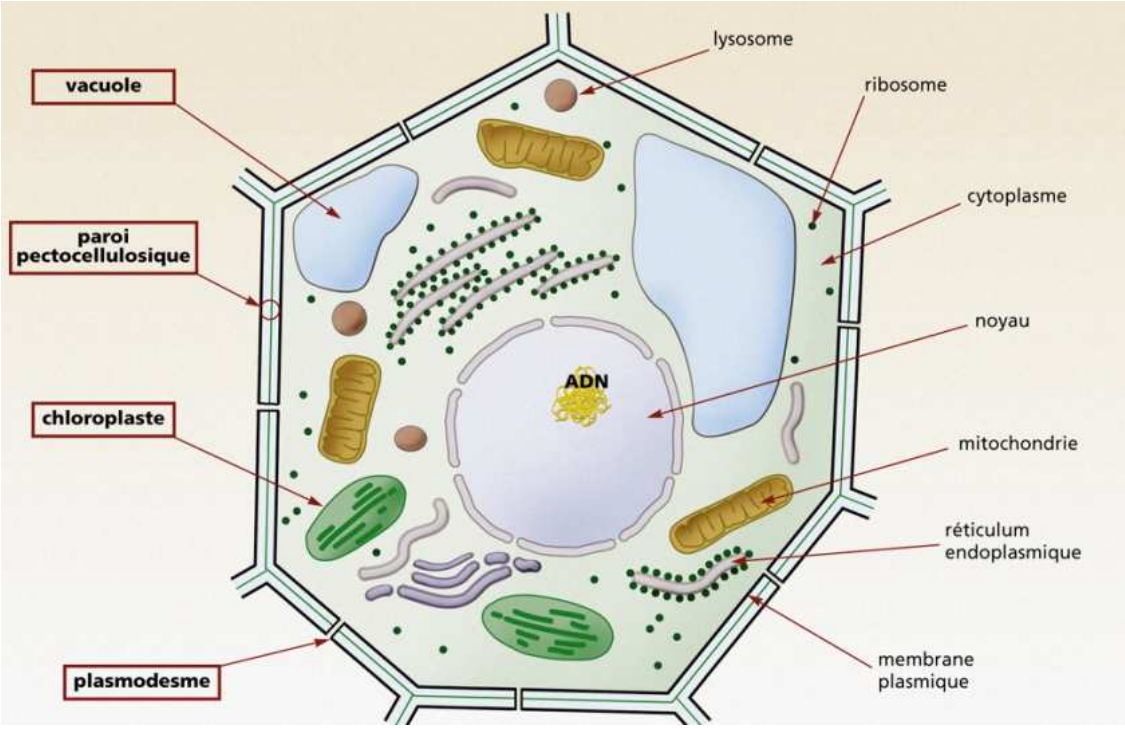


FIGURE 1.1 – Représentation schématique d'une cellule végétale. source internet

Il existe deux types de parois pectocellulosiques appelées respectivement paroi primaire (PP) et paroi secondaire. La première enrobe les jeunes cellules et joue un rôle essentiel dans le maintien et la croissance des cellules végétales. Elle les protège également des contraintes extérieures telles que la pression osmotique ou les infections bactériennes et fongiques. Enfin, elle a le rôle d'interface d'échange entre les cellules. Une fois arrivée à maturation, la paroi secondaire est synthétisée en remplacement de la paroi primaire. Elle est plus épaisse, plus rigide et joue le rôle de tissu conducteur et de soutien.

Chez les végétaux la division cellulaire est localisée dans les méristèmes. Il s'agit de tissus végétaux constitués de cellules indifférenciées qui se divisent activement, permettant ainsi la croissance de la plante et sa différenciation. Les méristèmes se trouvent à l'apex des racines et des tiges ; lors de la croissance de la plante, ils sont poussés vers l'avant par les cellules différenciées sous-jacentes qui s'allongent : c'est la turgescence. La structure d'une racine en croissance est représentée sur la figure 1.2.

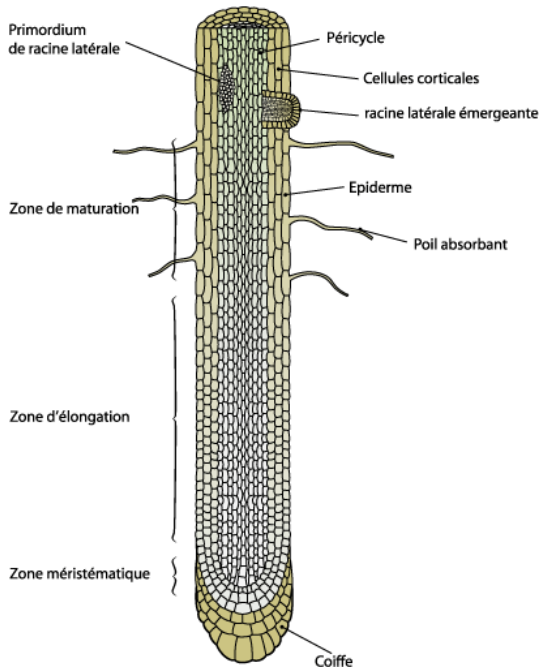


FIGURE 1.2 – Schéma représentatif de la structure d'une racine. Source Internet : http ://www.afd-ld.org/∼fdp_bio.

Chez une cellule saine, un flux d'eau est créé de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule par osmose. Cette eau pénètre dans les vacuoles présentes dans le cytoplasme. Celles-ci vont alors gonfler créant une pression interne sur la paroi primaire de la cellule : c'est la pression de turgescence. Elle est constante [Crowell et al., 2010], et a une valeur comprise entre 0,1 et 1 MPa [Zimmermann et al., 1980]. Sous son effet, la taille des cellules augmente. La paroi primaire transforme cette pression isotrope en déformation anisotrope : la cellule s'allonge dans une direction privilégiée. L'allongement de la cellule sous l'effet de la pression de turgescence est présenté sur la figure 1.3.

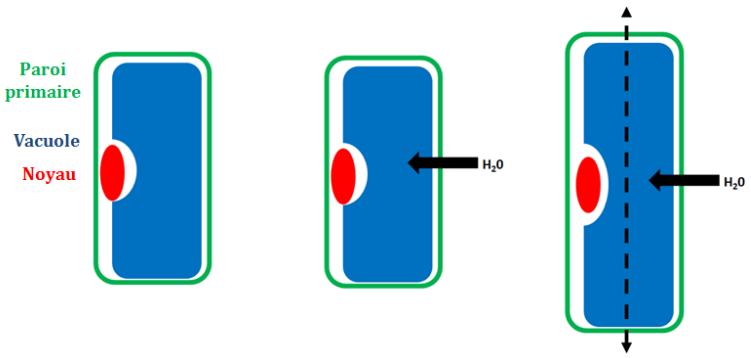


FIGURE 1.3 – Représentation schématique de la croissance d'une cellule végétale par pression de turgescence.

I.2 Composition de la paroi primaire

La paroi primaire (PP) se forme durant la division cellulaire. Elle est fine (0,1 µm), élastique et fortement hydrophile. Sa composition a été déterminée par extraction enzymatique et chimique [Talmadge et al., 1973, Bauer et al., 1973, Keegstra et al., 1973, McCann et al., 1990]. Elle est constituée de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses, pectines), et de protéines structurales. Elle est composée approximativement de 30% de cellulose, 30% d'hémicelluloses, 35% de pectines et 5% de protéines structurales dans la matière sèche [Cosgrove, 1997]. Cependant ces taux sont susceptibles de varier suivant l'origine de la cellule. De plus, la PP est un matériau fortement hydraté qui contient entre 75 et 80 % d'eau [Cosgrove, 1997].

Dans la paroi primaire, la cellulose se trouve sous forme de microfibrille (MFC). Le modèle généralement admis est que ces fibres sont pontées entre elles par des hémicelluloses [Carpita and Gibeaut, 1993]. Les pectines enrobent cette structure et lient les cellules entre elles dans la lamelle moyenne[1]. La structure de la paroi primaire d'une cellule végétale est représentée sur la figure 1.4.

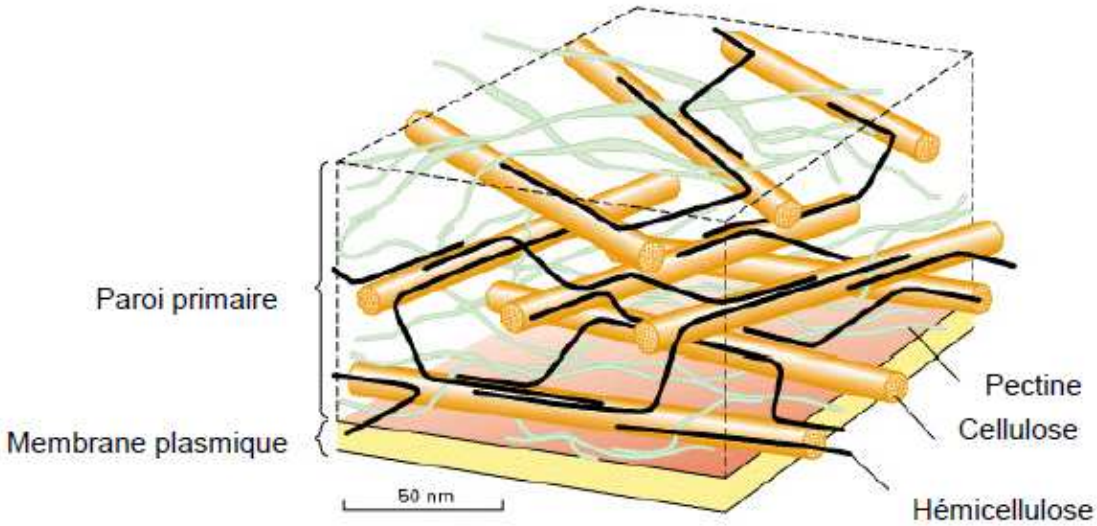


FIGURE 1.4 – Représentation schématique de la paroi primaire des cellules végétales. Source Internet.

I.2.1 Les microfibrilles de cellulose

La cellulose est l'élément principal de la paroi. Elle représente environ 30% de la matière sèche pour la paroi primaire et entre 40 et 90% pour la paroi secondaire. La microfibrille de cellulose est constituée par une association de chaînes de cellulose parallèles les unes aux autres (Fig. 1.5). La présence de nombreux groupements hydroxyles sur les chaînes de cellulose permet la création d'un réseau de liaisons hydrogène intra et intermoléculaires.

1. fine couche reliant les cellules végétales entre elles

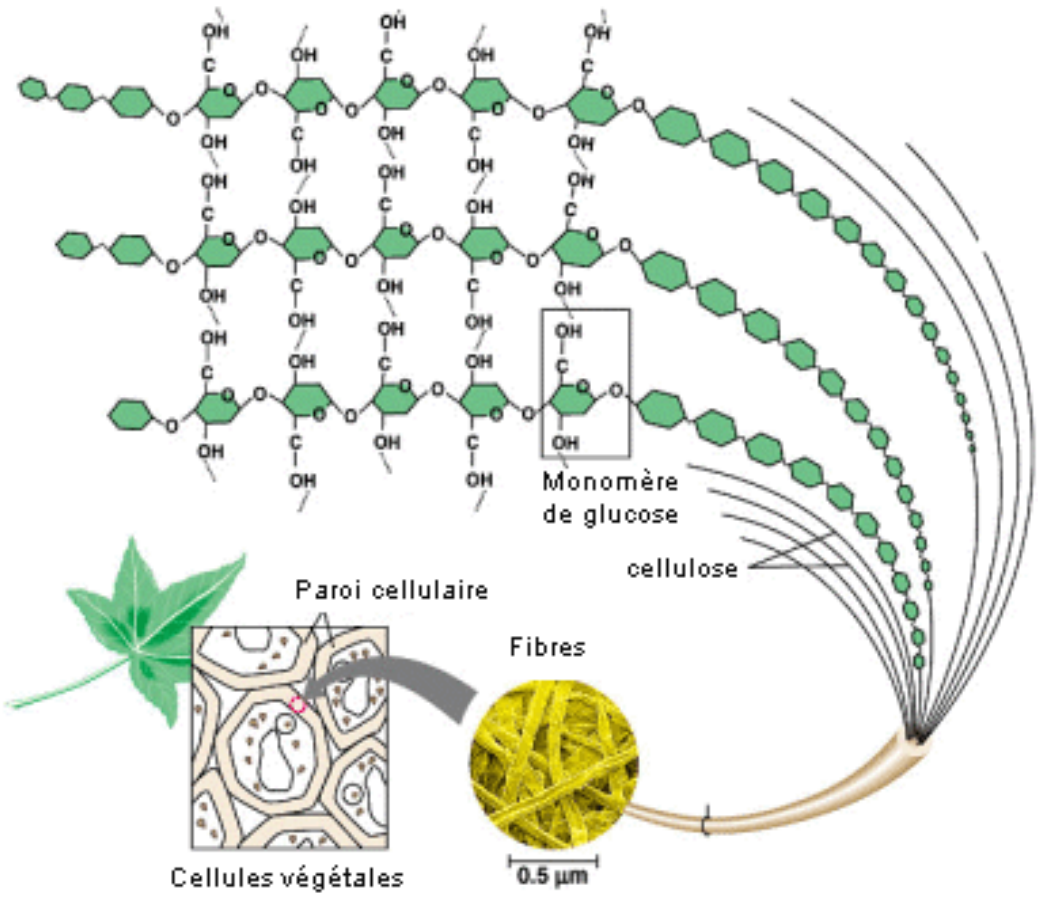


FIGURE 1.5 – Schéma représentatif de la cellulose à l'intérieur de la paroi végétale.

Les microfibrilles possèdent une structure semi-cristalline formée de parties cristallines reliées entre elles par des parties amorphes. Dans la cellule végétale, les microfibrilles de cellulose ont une largeur de 4 à 10 nm et une longueur de quelques micromètres [McCann et al., 1990, Somerville, 2006].

I.2.2 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides de structures complexes et variées. 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. Les hémicelluloses présentes dans les parois végétales, différentes selon les espèces, sont : les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes (galacto- et glucomannanes), les glucuromannanes, la callose et les glucanes mixtes.

En général, une hémicellulose est prédominante dans la paroi pectocellulosique, les autres sont présentes mais en plus faibles quantités. Ainsi les xyloglucanes sont les hémicelluloses majoritaires dans les parois primaires des dicotylédones [2], tandis que ce sont les arabinoxylanes chez les mono-

2. Plante angiosperme dont la graine possède deux cotylédons (Organe embryonnaire commun à toutes les espèces de plantes à graines) généralement égaux (Larousse).

cotylédones [3] [Carpita and Gibeaut, 1993]. De même, dans les parois secondaires, les xylanes et les glucomannanes sont respectivement prédominants chez les angiospermes [4] et les gymnospermes [5]. Tous ces polysaccharides sont amorphes et branchés.

Par la suite, nous détaillerons plus particulièrement les xyloglucanes (XG) qui constituent la classe d'hémicellulose utilisée pour la fabrication des capsules multicouches présentées dans ce document.

I.2.3 Les pectines

Ce sont des polysaccharides branchés et chargés car riches en acide α D-galacturonique. Il est admis que les pectines sont constituées de zones "lisses" (non-substituées) et de zones "hérissées" (ramifiées) successives, cependant l'arrangement des différents motifs est toujours controversé. Les pectines sont capables de former des gels grâce à des interactions avec des ions calcium (Ca^{2+}). De plus, l'étude des liaisons pectines-cellulose a montré une affinité des chaînes latérales constitutives des pectines pour la cellulose, contrairement à leur chaîne principale.

Les pectines sont présentes principalement dans la lamelle moyenne et dans la paroi primaire des dicotylédones [Carpita and Gibeaut, 1993]. Elles ont essentiellement un rôle de régulation, que ce soit en terme de pH, de force ionique mais également de porosité [Baron-Epel et al., 1988] 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.

I.3 La paroi primaire : un matériau composite structuré

I.3.1 Fabrication de la paroi primaire par les cellules végétales

Les MFC sont fabriquées par les complexes de synthèse de la cellulose (CESA : Cellulose Synthase complex). Ces complexes sont intramembranaires. Les autres polysaccharides sont fabriqués dans l'appareil de Golgi de la cellule et sont amenés à la membrane plasmique dans des vacuoles. Ils sont ensuite relâchés dans la paroi primaire où ils diffusent pour prendre leur place. La paroi primaire est fabriquée en continu lors de la croissance de la cellule végétale afin de conserver ses propriétés mécaniques. La figure 1.6 présente un schéma des mécanismes de synthèse de la paroi primaire.

3. Plante à fleurs dont la graine n'a qu'un seul cotylédon (Larousse).
4. Plante à graines dont l'ovule, fécondé par l'intermédiaire d'un tube pollinique, se transforme en un fruit clos (Larousse).
5. Plante à graines, dont les ovules, puis les graines, sont portés sur des écailles plus ou moins ouvertes et non dans un fruit clos (Larousse)

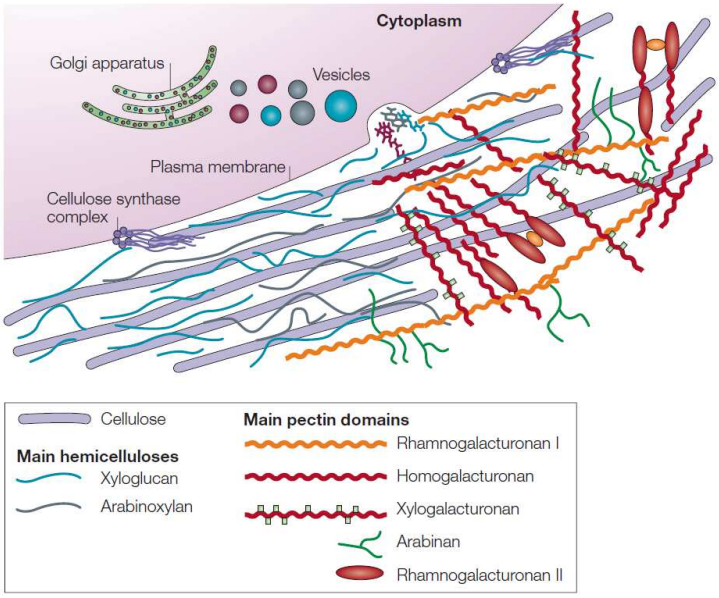


FIGURE 1.6 – Représentation schématique de la structure et de la fabrication de la paroi primaire [Cosgrove, 2005].

I.3.2 Organisation et élongation de la paroi primaire

Le modèle actuel de la paroi primaire est apparu dans les années 90 avec l'utilisation de techniques d'extraction couplées à des observations en microscopie électronique. Les microfibrilles de cellulose et les xyloglucanes, reliés par des liaisons hydrogène et des interactions de Van der Waals, sont maintenus dans une matrice de pectines [McCann et al., 1990]. Ce modèle a été complété par Carpita et Gibeaut en considérant un autre réseau constitué de protéines structurales [Carpita and Gibeaut, 1993].

Il est généralement admis que c'est le réseau de cellulose-hemicellulose qui donne ses propriétés mécaniques à la paroi primaire. Les microfibrilles sont synthétisées sur la face intérieure de la paroi primaire, perpendiculairement à la direction d'élongation de la cellule (Fig. 1.7). Elles sont organisées en couches successives où sur chacune d'elles, les MCF sont parallèles. L'orientation des fibres est modifiée au cours de l'élongation de la cellule. La synthèse et la rotation de microfibrilles de cellulose supplémentaires sous la première couche entraîne la formation d'une paroi primaire contenant des microfibrilles orientées suivant plusieurs angles [Anderson et al., 2010]. La rotation de couches de MFC au cours de la croissance de la cellule est illustrée sur la figure 1.7.

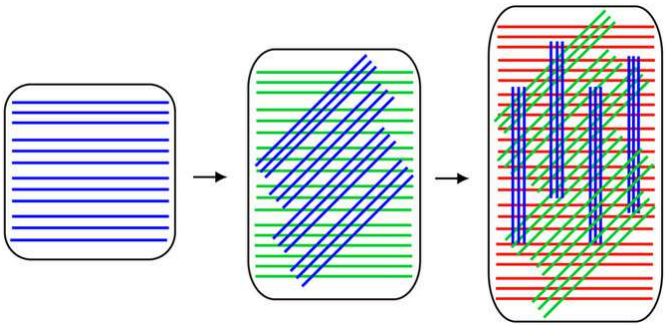


FIGURE 1.7 – Modèle de la dynamique des microfibrilles de cellulose pendant l'extension de la paroi primaire [Anderson et al., 2010].

L'origine de cette organisation reste encore mal connue de nos jours. Deux mécanismes semblent être tout du moins reliés à cela : tout d'abord l'intervention des microtubules [6] pour guider la synthèse des fibres de cellulose. En effet Paredez *et al.* ont mis en évidence le fait que les microtubules et les CESA suivaient le même trajet [Paredez et al., 2006]. Ils ont marqué par des fluorophores les CESA (vert) et les microtubules (rouge) et ont suivi leur trajet en microscopie confocale. Un exemple d'image obtenue est donné sur la figure 1.8. En superposant les deux images de fluorescence, une coïncidence entre les trajets des deux polymères, cellulose et microtubules, apparaît. Paredez et *al.* en ont déduit que les microtubules pouvaient avoir un rôle à jouer dans l'organisation des microfibrilles de cellulose dans la paroi primaire. Cette étude a également confirmée que les CESA se déplacent dans la membrane cellulaire lors de la polymérisation de la cellulose.

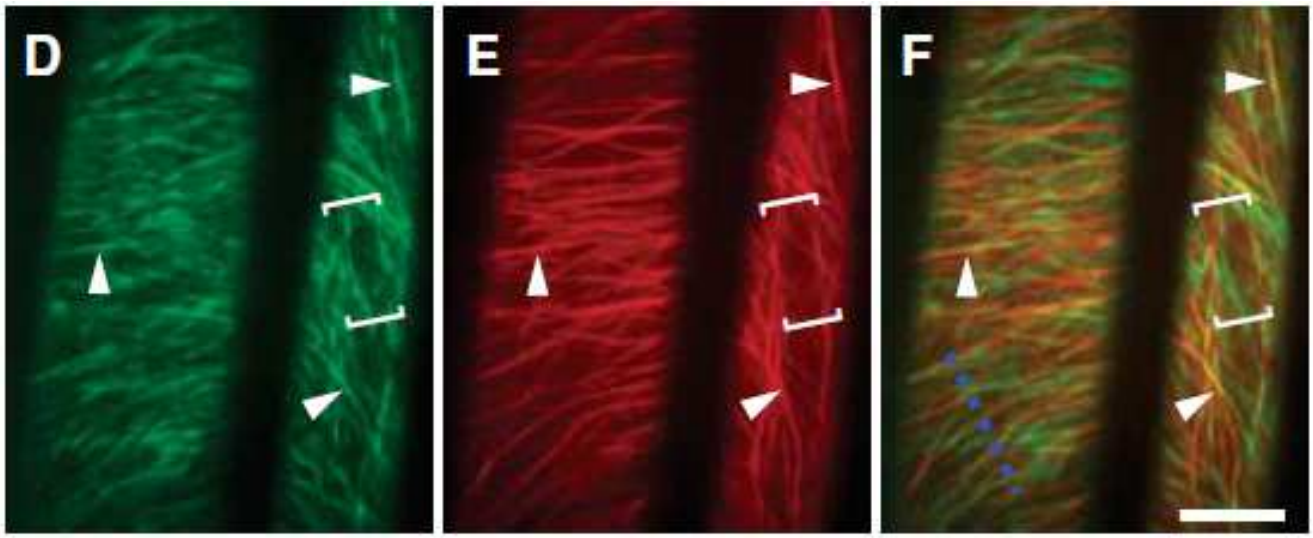


FIGURE 1.8 – Images de microscopie confocale des CESA (vert), des microtubules corticales (rouge) et leur superposition chez une cellule d'*Arabidopsis* [Paredez et al., 2006].

Cependant, il a également été montré que, dans certains cas, en l'absence de polymérisation correcte des microtubules, grâce à l'utilisation d'une drogue (l'oryzaline), les microfibrilles sont tout de même orientées et organisées. En effet, Emons et *al.* ont travaillé sur le même type de cellule que Paredez *et al*, et ont réalisé la même observation avec des CESA marqués. Ils ont mis en évidence que les CESA suivent un trajet bien défini avec des faisceaux parallèles, alors que les microtubules, elles, ne présentent pas d'organisation particulière [Emons et al., 2007]. La figure 1.9 présente un exemple d'image en microscopie confocale obtenu par Emons et *al.* Il apparaît donc que la cellulose peut, dans certains cas, s'auto-organiser spontanément pour former l'arrangement spécifique à la paroi primaire végétale.

6. Fine structure cytoplasmique cylindrique, constituant des centrioles, des fibres du fuseau mitotique, des structures ciliaires (cils et flagelles), d'une partie du squelette cellulaire et qui intervient dans le transport intracellulaire des substances, ainsi que dans la mobilité cellulaire.

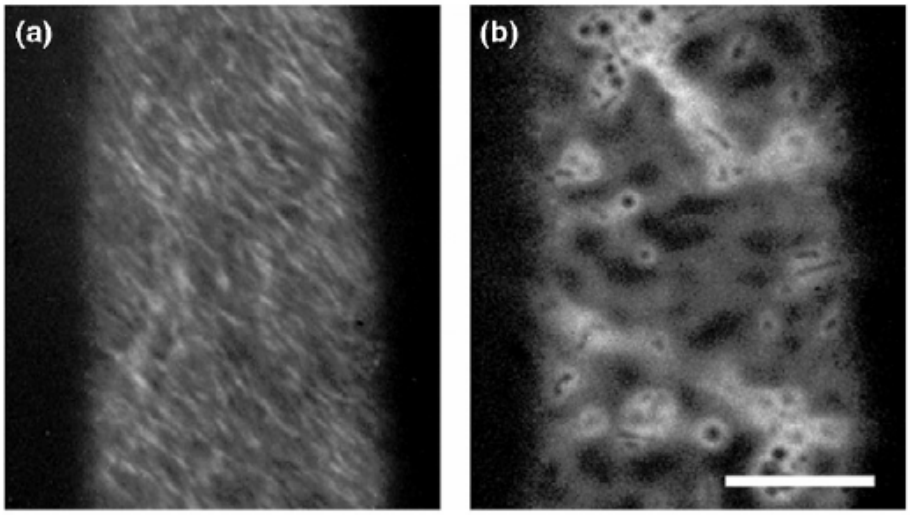


FIGURE 1.9 – Images de microscopie confocale de CESA (a) et des microtubules (b) en présence d'oryzaline qui dépolymérise les microtubules corticales sur une cellule d'*Arabidopsis* [Emons et al., 2007].

I.3.3 La porosité de la paroi primaire

La paroi primaire est une structure poreuse. Le diamètre des pores a été mesuré par la diffusion de dextran et de protéines de différentes tailles aux travers de la PP de cellules de germes de soja [Baron-Epel et al., 1988]. Il est admis que ce sont les pectines qui déterminent la porosité de la PP. En présence de pectines, les pores ont un diamètre compris entre 3,3 et 4,6 nm. En l'absence de pectines, retirées de la paroi primaire par un traitement enzymatique aux pectinases, la porosité augmente avec des pores de 10 nm de diamètre environ.

II La cellulose et les xyloglucanes

II.1 La cellulose

II.1.1 Structure chimique et cristallographique

La cellulose est un homopolysaccharide linéaire constitué d'unités D-anhydroglucopyranose ($C_6H_{10}O_5$) liées entre elles par des liaisons β-1,4. L'unité de répétition de la cellulose native est la cellobiose (Fig.1.10). Cette dernière est formée de deux motifs glucose orientés à 180° l'un par rapport à l'autre autour de la liaison glycosidique C1-O-C4.

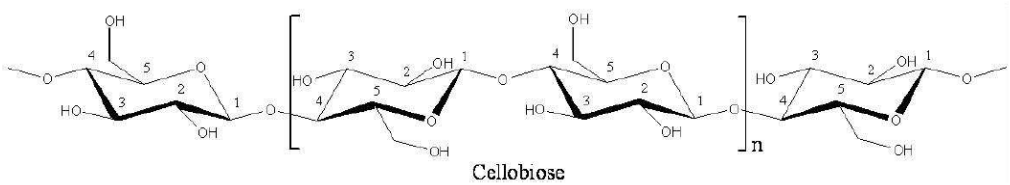


FIGURE 1.10 – Structure de la cellulose avec son unité de répétition la cellobiose.

La cellulose existe sous la forme de six allomorphes appelés I, II, III_I, III_{II}, IV_I et IV_{II}. La cellulose native est présente quasi-exclusivement sous forme de cellulose I, où les chaînes de cellulose sont parallèles les unes aux autres. La taille et le degré de cristallinité des chaînes varient fortement suivant l'origine de la cellulose. Quelques exemples de morphologie de microfibrilles de cellulose sont présentés sur la figure 1.11.

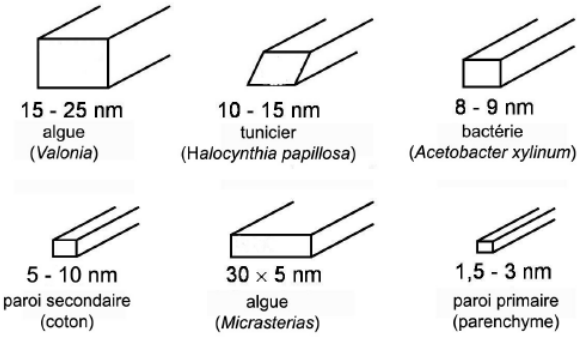


FIGURE 1.11 – Morphologie des microfibrilles selon l'origine de la cellulose et ordre de grandeur des dimensions des nanocristaux. D'après [Chanzy, 1990].

II.1.2 Les nanocristaux de cellulose (CNC)

II.1.2.1 La morphologie des CNC

L'hydrolyse acide de microfibrilles de cellulose permet d'obtenir des monocristaux individuels et allongés, appelés nanocristaux de cellulose (CNC) ou "whiskers". Ils forment après traitement une suspension aqueuse. L'attaque acide se fait préférentiellement au niveau des défauts de structure le long de l'axe principal, c'est-à-dire sur les zones amorphes de la microfibrille. Par conséquent, la taille des cristaux va dépendre du degré de cristallinité et donc de l'origine de la cellulose. Suivant la source, les nanoparticules obtenues ont une longueur qui varie entre 100 nm et 1 µm [Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008, Habibi et al., 2010]. La figure 1.12 présente des images de microscopie à balayage de nanocristaux de cellulose issus du coton et du tunicier, et le tableau 1.1 donne des exemples de la taille des objets obtenus en fonction de leur origine et de la méthode de mesure.

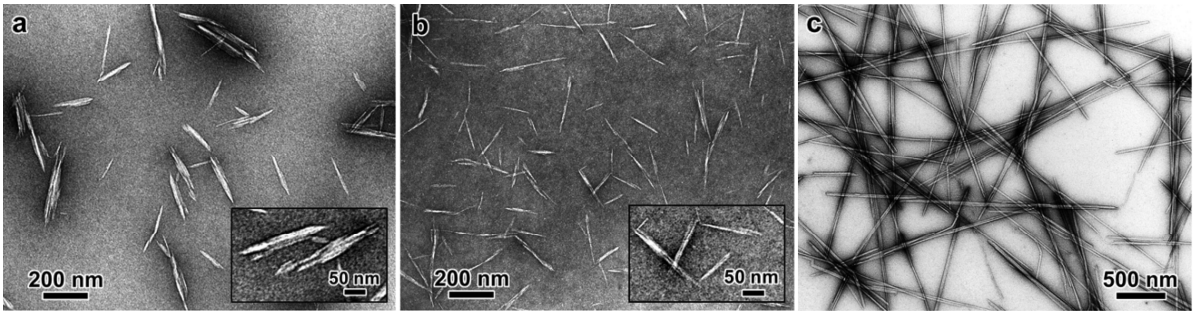


FIGURE 1.12 – Images de microscopie électronique en transmission de nanocristaux de cellulose marqués négativement, obtenus par hydrolyse à l'acide sulfurique de coton (a), avicel (b) et tunicier (c). Inserts : vues agrandies de quelques particules caractéristiques. D'après [Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008].

TABLEAU 1.1 – Exemple de longueur (L) et largeur (l) de nanocristaux en fonction de la source de cellulose et de la technique de mesure [Habibi et al., 2010]. MET : microscopie électronique en transmission, MEB-FEG : microscopie électronique à balayage avec canon à effet de champ, DDL : Diffusion dynamique de lumière dépolarisée, AFM : micoscopie à force atomique.

Source	**L (nm)**	**l (nm)**	**Technique**	**Références**
Batérienne	100-1000	10-50	MET	[Araki and Kuga, 2001]
	100-1000	5-10 x30-50	MET	[Roman and Winter, 2004, Grunert and Winter, 2002]
coton	100-150	5-10	MET	[Araki et al., 2001]
	70-170	~ 7	MET	[Dong et al., 1996]
	200-300	8	MET	[Heux et al., 2000]
	255	15	DDL	[De Souza Lima et al., 2002]
	150-210	5-11	AFM	[Miller and Donald, 2003]
Linters de coton	100-200	10-20	MEB-FEG	[Roohani et al., 2008]
	25-320	6-70	MET	[Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008]
	300-500	15-30	AFM	[Li et al., 2009]
Cellulose microcristalline	35-265	3-48	MET	[Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008]
	250-270	23	MET	[Capadona et al., 2009]
	~ 500	10	AFM	[Pranger and Tannenbaum, 2008]
ramie	150-250	6-8	MET	[Habibi et al., 2008]
	50-150	5-10	MET	[Junior de Menezes et al., 2009]
sisal	100-500	3-5	MET	[Garcia de Rodriguez et al., 2006]
	150-280	3.5-6.5	MET	[Siqueira et al., 2008]
tunicier	1160	16	DDL	[De Souza Lima et al., 2002]
	500-1000	10	MET	[Anglès and Dufresne, 2000]
	1000-3000	15-30	MET	[Kimura et al., 2005]
	100-1000	15	MET	[Heux et al., 2000]
	1073	28	MET	[Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008]
Valonia	>1000	10-20	MET	[Revol, 1982]
Bois	100-200	3-4	MET	[Araki et al., 1998, Araki et al., 1999]
	100-150	4-5	AFM	[Beck-Candanedo et al., 2005]
	140-150	4-5	AFM	[Beck-Candanedo et al., 2005]

L'acide le plus couramment utilisé pour hydrolyser les microfibrilles est l'acide sulfurique, qui permet d'obtenir des suspensions stables [Revol et al., 1992, Revol et al., 1994, Dong et al., 1996]. Il permet de greffer à la surface des whiskers des groupements sulfate (SO_3^-). La répulsion électrostatique entre ces groupements permet la mise en suspension des whiskers dans l'eau. Dans le cas d'hydrolyses réalisées avec de l'acide chlorhydrique, il a été observé que les suspensions obtenues sont généralement peu stables et floculent rapidement. De plus l'hydrolyse a un effet sur la taille des CNC. Plus la température d'hydrolyse est élevée plus la taille est réduite (tab.1.2).

TABLEAU 1.2 – Longueur moyenne en nombre (L_n), ecart-type (σ), longueur moyenne pondérée par la longueur (L_l), indice de polydispersité pour les longueurs (P_L), largueur moyenne en nombre (l_n), écart-type (σ), largeur moyenne pondérée par la largeur (l_l), indice de polydispersité de la largeur (P_l) calculés pour les suspension de whiskers préparées par hydrolyse a différentes température (T_{hyd}), à partir de linter de coton. D'après [Elazzouzi, 2006].

Échantillons	$\mathbf{T_{hyd}}$ **(°C)**	$\mathbf{L_n}$ $[\sigma]$	$\mathbf{L_l}$	$\mathbf{P_L}$	$\mathbf{l_n}[\sigma]$	$\mathbf{l_p}$	$\mathbf{P_l}$
Cot45	45	141 [0,39]	163	1,15	27 [0,52]	34	1,28
Cot54	54	131 [0,39]	151	1,15	21 [0,52]	27	1,27
Cot63	63	128 [0,43]	151	1,18	26 [0,46]	32	1,20
Cot72	72	105 [0,47]	128	1,21	21 [0,52]	26	1,27

II.1.2.2 L'auto-organisation des CNC

Revol *et al.* ont montré qu'au-delà d'une concentration critique, une suspension colloïdale de nanocristaux de cellulose se séparait spontanément en une phase isotrope et une phase anisotrope

biréfringente [Revol et al., 1992, Revol et al., 1994]. En général, pour les CNC de coton ou de bois en suspension dans l'eau, l'apparition de la phase anisotrope a lieu à une concentration d'environ 5 % [Revol et al., 1992, Dong et al., 1996]. Les suspensions de nanocristaux se comportent donc comme des cristaux liquides. Les whiskers s'auto-organisent pour former une phase présentant un ordre hélicoïdal comparable à l'organisation structurale que l'on rencontre dans différents systèmes biologiques [Bouligand, 1972].

Les suspensions de nanocristaux de cellulose obtenues par hydrolyse à l'acide sulfurique peuvent s'organiser en cristaux liquides cholestériques, qui est une phase nématique au sein de laquelle est introduite une chiralité de structure. La représentation schématique de cette phase cholestérique est donnée figure 1.13.

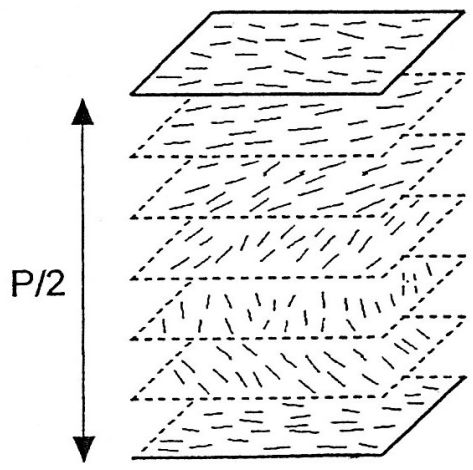


FIGURE 1.13 – Représentation schématique d'une phase cholestérique. Le demi-pas (P/2) mesure la distance qui équivaut à une rotation de 180° des objets .

La phase cholestérique peut être décrite comme un empilement continu de plans fictifs dans chacun desquels règne un ordre nématique. En se déplaçant le long d'un axe perpendiculaire aux plans, l'orientation des molécules tourne régulièrement. La structure hélicoïdale est caractérisée par le pas P qui correspond à la distance obtenue pour une rotation de 360° des objets (Figure 1.13). Cette distance peut varier de quelques dixièmes à quelques dizaines de microns.

La formation de la phase cholestérique anisotrope dépend du facteur de forme du nanocristal. Ainsi Onsager, dans un modèle de suspension de bâtonnets, a défini deux concentrations critiques : $\phi_i = 3{,}34$ d/L et $\phi_a = 4{,}49$ d/L avec d le diamètre du bâtonnet et L sa longueur [Onsager, 1949]. Pour une concentration $C < \phi_i$, la suspension est complètement isotrope, pour $\phi_i < C < \phi_a$, il y a coexistence des phases isotrope et anisotrope et enfin pour $C > \phi_a$, la suspension est entièrement anisotrope. Pour les nanocristaux de cellulose, issus du coton et en suspension dans l'eau, que nous allons utiliser, ces concentrations critiques sont de l'ordre de 5% et 12 %, mais elles peuvent varier légèrement suivant le procédé d'hydrolyse [Elazzouzi, 2006].

II.2 Les xyloglucanes

Les xyloglucanes, composés d'un squelette identique à celui de la cellulose, sont formés de résidus glucose liés en β-1,4. Par contre, jusqu'à 75% des résidus glucose des xyloglucanes sont substitués en position O6 par des chaînes latérales mono-, di- ou tri-saccharidiques. Lorsque le résidu glucose est branché, le premier ose qui lui est lié est l'α-D-xylopyranose via une liaison α-1,6. Une nomenclature internationale a été proposée pour nommer les structures des chaînes latérales des xyloglucanes. Ainsi, la lettre G représente une unité glucose non ramifiée et la lettre X représente une unité glucose substituée par une unité xylose.

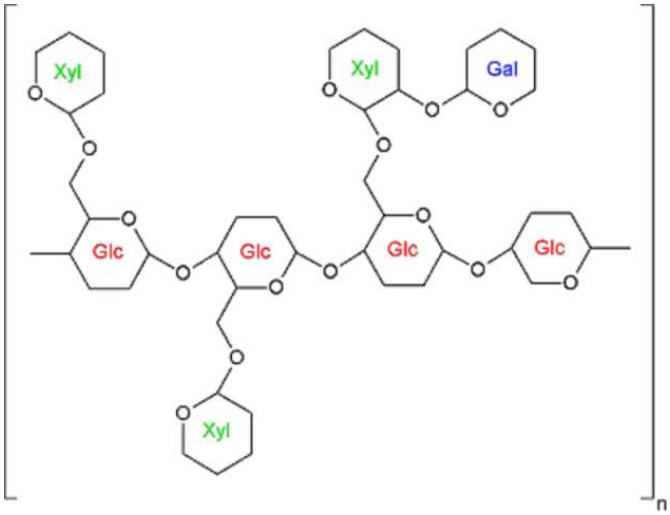


FIGURE 1.14 – Représentation schématique d'une chaine de xyloglucane.

Les xyloglucanes possèdent une structure relativement régulière basée sur la répétition de sous-unités oligosaccharidiques. L'hydrolyse des liaisons glucosidiques par des β-1,4 endoglucanases permet de libérer ces sous-unités. Deux types majeurs de sous-unités oligosaccharidiques existent suivant le nombre et la distribution de chaînes latérales attachées à la chaîne principale : XXXG et XXGG où 75% et 50% des glucoses sont branchés respectivement. En outre, plusieurs études ont montré qu'une acétylation peut avoir lieu sur chacun des monosaccharides, à l'exception du fucose et du xylose.

II.3 Les interactions cellulose et xyloglucanes

Les xyloglucanes interagissent avec la cellulose via des interactions non-covalentes, probablement des liaisons de types Van der Waals ou hydrogène [Hayashi and Maclachlan, 1984]. En effet, elles ne peuvent être de types covalentes car les procédés utilisés pour extraire les xyloglucanes de la paroi primaire ne permettent pas de détruire ce type de liaison. Il existe trois domaines xyloglucosidiques en fonction de leur force d'interaction. Ces trois domaines moléculaires ont été identifiés par extraction séquentielle de parois cellulaires de tiges de pois étiolées [Pauly et al., 1999]. Ils sont représentés sur la figure 1.15.

- Un premier domaine est composé de XG qui ne sont pas directement en interaction avec la cellulose tels 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 directement en interaction avec la surface de la cellulose. Elle peut être extraite avec une solution alcaline concentrée (potasse : KOH 24 %), postérieurement au traitement par la XEG.
- Le troisième domaine des XG présent au sein de la paroi primaire pourrait être situé au coeur 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.

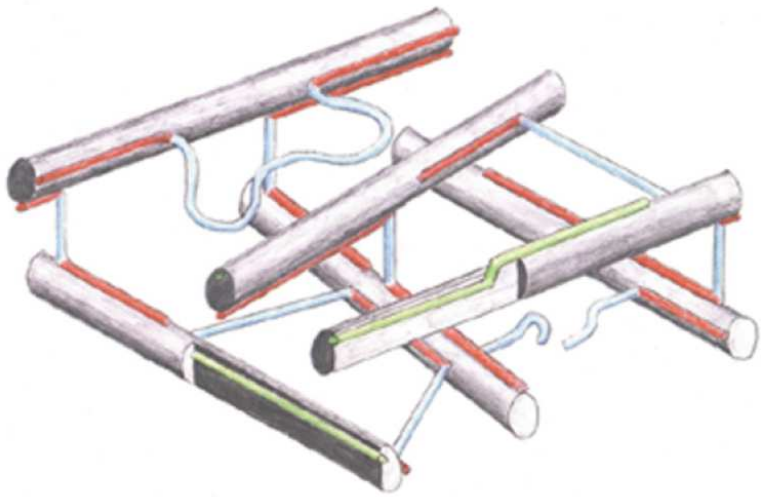


FIGURE 1.15 – Modèle des différents domaines des xyloglucanes dans le réseau cellulose/xyloglucanes : les domaines sans interaction directe avec la cellulose (bleu) qui sont extractibles par l'utilisation d'enzymes, les xyloglucane-endoglucanases ; les domaines en interaction avec la surface de la cellulose (rouge) qui sont extractibles par un traitement alcalin ; les domaines piégés dans la cellulose (vert) [Pauly et al., 1999].

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. En effet, ce procédé, appelé mercerisation, gonfle les fibres de cellulose pouvant entraîner l'encapsulation des XG. Une extraction par la cellulase est donc nécessaire pour ôter les XG qui ont pu pénétrer dans la fibre. 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.

II.4 Les propriétés mécaniques de composites cellulose et xyloglucane

II.4.1 Les nanocristaux de cellulose

La cellulose cristalline est un matériau extrêmement résistant. Elle possède un module d'Young de 138 GPa [Sakurada et al., 1962] ce qui est de l'ordre du module de l'acier et 10 fois supérieur à celui du bois. Les nanocristaux de cellulose étant constitués de cellulose cristalline, ils possèdent

un module similaire de l'ordre de 143 GPa [Šturcová et al., 2005]. Des études ont également été menées sur les propriétés mécaniques de films de nanocristaux de cellulose en fonction de l'origine de ces derniers. Le tableau 1.3 récapitule les mesures qui ont été réalisées.

TABLEAU 1.3 – Caractéristiques géométriques moyennes de nanocristaux de cellulose issus de différentes sources : longueur (L), largueur (l), facteur de forme (L/l) et module d'Young (E) mesuré par test de traction sur des films de CNC obtenus par séchage de suspension de cellulose. D'après [Bras et al., 2011a].

Source	L (nm)	l (nm)	L/l	E (GPa)	Références
capim Dourado	300 ± 93	4,5 ± 0,86	67	10,9 ± 1,6	[Siqueira et al., 2010a]
Coton	170	15	11,3	2,13 ± 0,32	[de Souza Lima and Borsali, 2004]
Bois	200	10	20	0,40 ± 0,06	[Beck-Candanedo et al., 2005]
Luffa cylindrica	242	5,2	46,5	2,41 ± 0,31	[Siqueira et al., 2010b]
Rachis de palmier	260	6,1	42.6	7,70 ± 1,15	[Bendahou et al., 2009]
Ramie	134	10.8	12.4	0,46 ± 0,07	[Habibi and Dufresne, 2008]
Sisal	215	5	43	8,50 ± 1,27	[Siqueira et al., 2009]
Bagasse de canne à sucre	96,7	7,5	12,9	1,50 ± 0,24	[Hassan et al., 2009]
Tunicier	1000	15	66,7	15	[Favier et al., 1995]
Paille de blé	225	5	45	6	[Helbert et al., 1996]

Le module élastique des films de CNC est bien inférieur à celui d'un cristal unique. Cependant, il dépend fortement du facteur de forme des objets le constituant, comme le montre la figure 1.16.

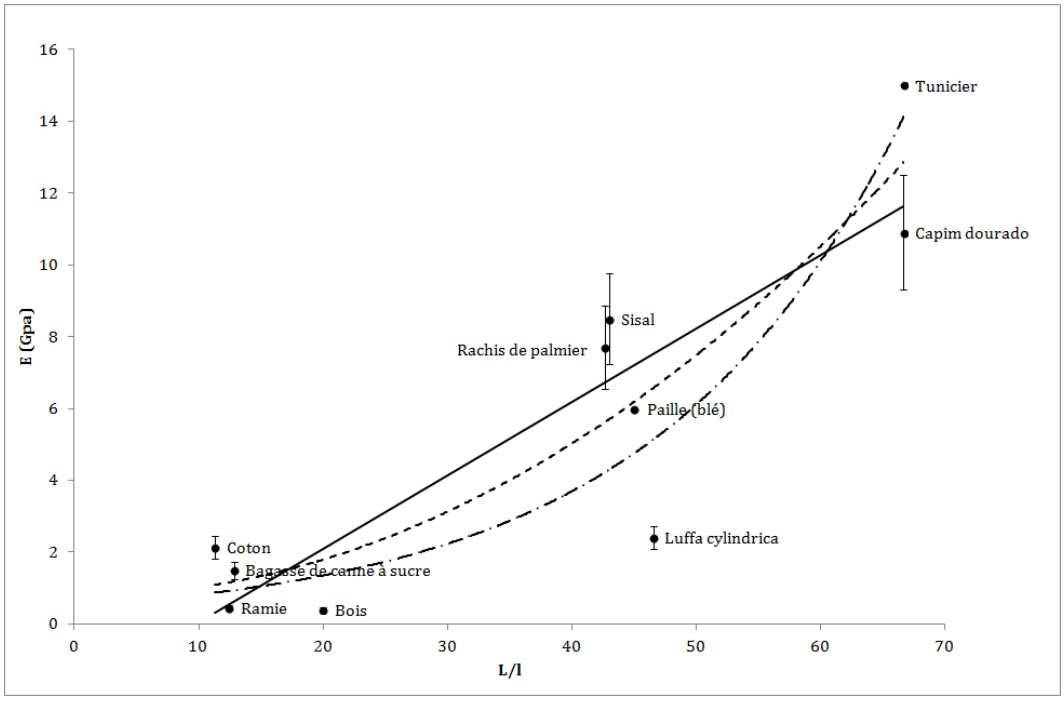


FIGURE 1.16 – Évolution du module d'Young de film de nanocristaux de cellulose, mesuré par traction uniaxial, en fonction du facteur de forme des nanocristaux qui le constitue. Les données ont été ajustées par une régression linéaire (ligne continue), polynomiale (ligne pointillée) et exponentielle (ligne hybride). D'après [Bras et al., 2011a].

II.4.2 Les films de xyloglucanes

Des études ont également été menées sur des films de xyloglucanes. Tout comme la cellulose, les films de xyloglucanes présentent un module relativement élévé (5 GPa). Cette valeur diminue avec la quantité d'eau absorbée. La figure 1.17 présente des mesures de traction sur des films

de xyloglucanes conservés à différents taux d'humidité et le tableau 1.4 récapitule les modules d'Young mesurés [Kochumalayil et al., 2010].

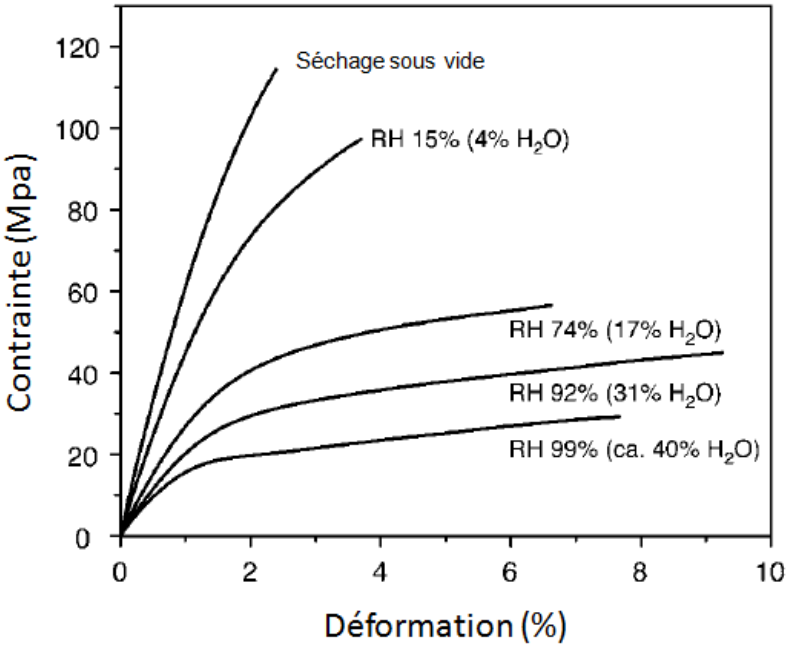


FIGURE 1.17 – Courbe de traction uniaxiale de films de xyloglucanes préparés à température ambiante et sous différentes conditions d'humidité (humidité relative et prise en eau correspondante sont indiquées). D'après [Kochumalayil et al., 2010]

TABLEAU 1.4 – Propriétés mécaniques de XG plastifiés à partir des données de traction (erreur standard entre parenthèse). D'après [Kochumalayil et al., 2010].

Conditions expérimentales	Contrainte à la rupture MPa	Déformation max %	Module élastique GPa
Séchage sous vide	114 (12,0)	2,7 (0,6)	5,95 (0,83)
RH 15% (4% H_2O)	64 (5,6)	6,6 (3,6)	5,07 (0,24)
RH 74% (17% H_2O)	56 (3,1)	6,4 (0,5)	3,67 (0,23)
RH 92% (31% H_2O)	45 (4,7)	9,2 (0,7)	2,36 (0,71)
RH 99% (ca. 40% H_2O)	28 (6,4)	7,5 (1,1)	1,63 (0,31)

Le module d'Young des films est fortement affecté par la présence d'eau. En effet, sa valeur est divisée par 4 entre un film complètement déshydraté et un film placé dans une atmosphère saturée en eau (Tab. 1.4). Si la présence d'eau diminue le module élastique, elle améliore néamoins l'extensibilité des films et a un effet plastifiant sur ceux-ci (Fig. 1.17).

II.4.3 Les films composites

La mesure directe des propriétés mécaniques de la paroi primaire des cellules végétales est difficile car les échantillons extraits de plantes ou de cultures cellulaires sont souvent trop petits pour les tests mécaniques. Des tests de traction uniaxial ont toutefois pu être réalisés sur des PP de cellules géantes, issues de l'algue *Chara corallina* [Toole et al., 2001]. Les modules d'Young mesurés varient en fonction de l'âge de la cellule étudiée : le module des cellules jeunes est de 407

± 44 MPa, et celui des cellules plus âgées est de 662 MPa ± 62. Cette différence pourrait refléter une augmentation des liaisons entre les MFC qui rigidifient la paroi.

Des films modèles ont également été développé pour obtenir une valeur du module élastique de la paroi primaire. Pour les réaliser, la méthode généralement utilisée est celle décrite par Whitney [Whitney et al., 1995, Whitney et al., 1999], qui consiste à utiliser la cellulose produite par des bactéries de type *Acetobacter Xylinus*. Ces micro-organismes produisent des microfibrilles de cellulose qui forment en quelques jours des films de plusieurs centimètres de diamètre et de plus d'un millimètre d'épaisseur dans leur milieu de culture . En ajoutant des pectines ou des xyloglucanes au milieu de culture, il est possible de former des nanocomposites dont la composition est proche de celle de la paroi primaire végétale [Chanliaud et al., 2002]. Contrairement aux films de CNC et XG purs, les films nanocomposites ainsi réalisés sont très hydratés ; ils sont constitués de 5% [Whitney et al., 1999] à 10-12% [Chanliaud et al., 2002] de matière sèche. Leur module d'Young est donc de l'ordre de quelques centaines de MPa contre quelques GPa pour des films plus secs.

Des études ont été réalisées sur les effets des xyloglucanes sur les propriétés mécaniques d'un film de cellulose bactérienne [Whitney et al., 1999, Chanliaud et al., 2002]. La figure 1.18 présente les résultats obtenus sur des films de cellulose bactérienne formée en présence de 0,5% de xyloglucanes. Dans ces conditions le ratio de cellulose/xyloglucane dans le film est de 1 : 0,38 [Whitney et al., 1995].

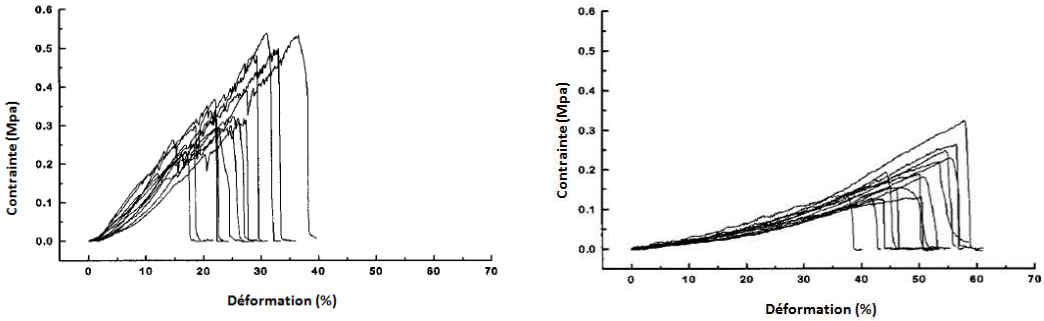


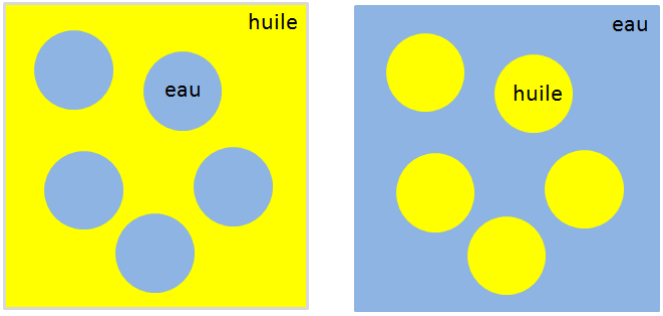
FIGURE 1.18 – Courbes de traction uni-axiale de films composites de cellulose [gauche] et de cellulose/xyloglucane [droite]. Les résultats présentés proviennent de films issus de cultures de A. Xylinus indépendantes, [Whitney et al., 1999].

Les xyloglucanes diminuent la rigidité du film de cellulose mais augmentent son extensibilité. Cela provient des liaisons que le polymère créé entre les fibres de cellulose. Cela va créer des zones où les microfibrilles sont localement alignées, contrairement à un film de cellulose bactérienne pur, où les fibres s'organisent en réseau aléatoire [Whitney et al., 1995]. Il est supposé qu'à cause de l'alignement des fibres de cellulose, la charge n'est pas uniquement transmise dans la fibre mais également à travers les pontages que forment les xyloglucanes. Cette hypothèse, pourrait expliquer la diminution de la rigidité du film de cellulose en présence de l'hémicellulose. Cette diminution à également été observée, pour des films réalisés dans des conditions similaires, par Chanliaud et al [Chanliaud et al., 2002].

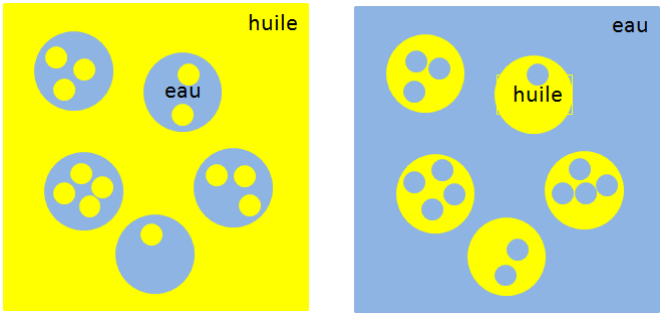
III État de l'art des procédés d'émulsification

III.1 Définition

Une émulsion est un système hétérogène et métastable de deux liquides non miscibles, où l'un est dispersé sous forme de gouttelettes sphériques de taille micrométrique dans l'autre. Il existe plusieurs types d'émulsions. Dans les émulsions simples, le liquide se trouvant sous forme de gouttelettes, appelé phase dispersée, se trouve dispersé dans le second liquide appelé phase continue. Les émulsions simples sont de type huile dans eau (H/E) ou eau dans huile (E/H). Un second type d'émulsion existant est l'émulsion multiple. Dans ce cas, un liquide est dispersé sous forme de gouttes dans un second liquide, lui-même dispersé en gouttelettes dans une troisième phase. Les émulsions multiples sont ainsi de type eau dans huile dans eau, ou huile dans eau dans huile. La figure 1.19 présente des illustrations des différents types d'émulsions citées ci-dessus.



(a) Émulsion simple



(b) Émulsion multiple

FIGURE 1.19 – Schéma représentatifs des différents types d'émulsions les plus courantes.

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables qui nécessitent l'utilisation d'un stabilisant, appelé émulsifiant. Il peut s'agir de tensioactifs, de particules solides ou de macromolécules (protéines, polymères...). Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement aux deux premiers qui ont été utilisés dans les travaux présentés dans ce manuscrit. Le rôle de l'émulsifiant est de diminuer la tension interfaciale entre les deux phases pour rendre l'émulsion plus stable. Deux phases coexistent à l'équilibre seulement si elles sont séparées par une interface stable. Cette dernière est caractérisée par son énergie libre F_S associée à la formation d'une surface de contact A entre les deux phases :

$$F_S = \frac{\partial F}{\partial A} A = \gamma A \tag{1.1}$$

La quantité notée γ, appelée tension de surface, caractérise la variation d'énergie libre dF associée à une variation dA de la surface entre les deux milieux.

III.2 La stabilité d'une émulsion

Une émulsion est considérée comme stable si elle résiste aux changements physiques sur une période déterminée. Plusieurs comportements peuvent démontrer l'instabilité d'une émulsion. Les différents procédés suceptibles de mener à la destruction d'une émulsion sont présentés sur la figure 1.20.

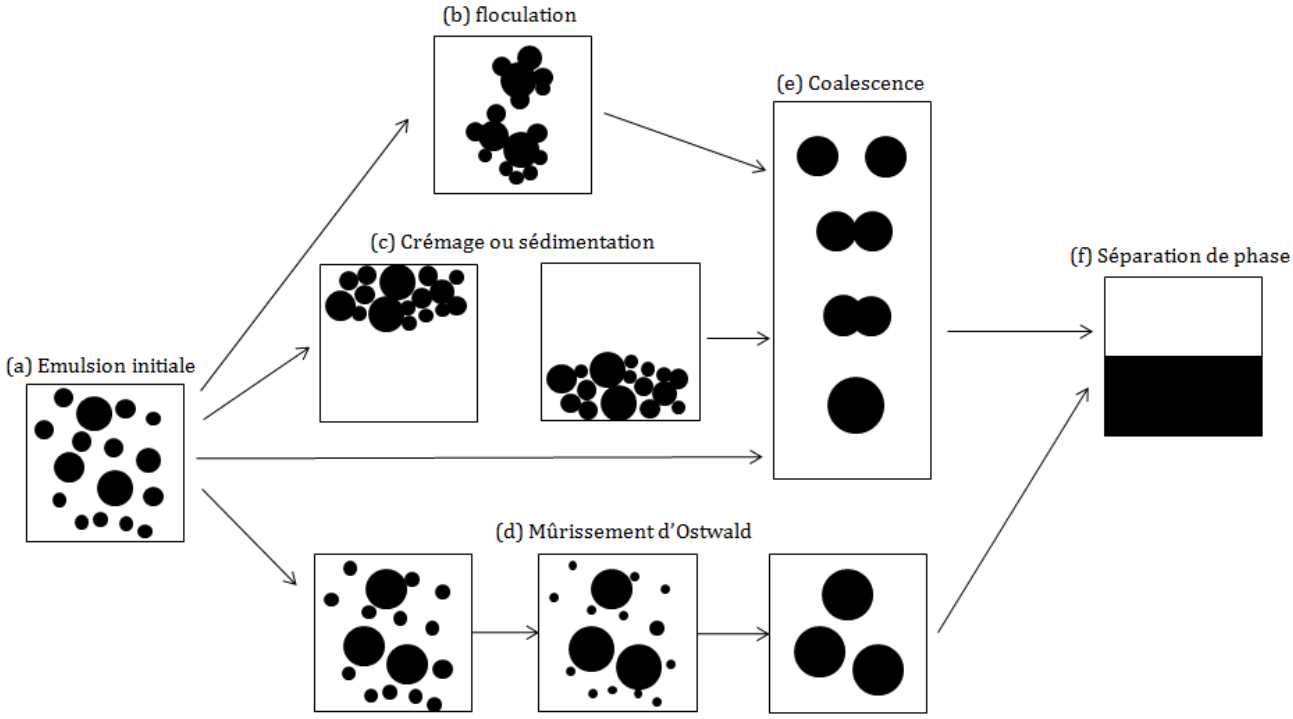


FIGURE 1.20 – Les différents mécanismes responsables de la destruction d'une émulsion instable. D'après [Lopetinsky et al., 2006].

Lors de la floculation les gouttes vont s'agréger sans changer leur taille (Fig. 1.20 (b)). Le crémage et la sédimentation sont causés par la gravité, ils apparaissent lorsqu'il y a une différence de densité entre la phase continue et la phase dispersée (Fig. 1.20 (c)).

Le mûrissement d'Ostwald apparaît lorsque la phase dispersée est légèrement soluble dans la phase continue (Fig. 1.20 (d)). Les petites gouttes vont se vider dans les plus grosses en raison de leur différence de pression de Laplace. Cette dernière décrit la dépendance de la différence de pression ΔP entre deux milieux en fonction de la courbure de leur interface. Elle est exprimée par $\Delta P = \gamma C = \frac{2\gamma}{R}$ avec γ la tension de surface (N/m), C la courbure moyenne de l'interface (m^{-1})

et R le rayon de la goutte (m) qui est supposée sphérique. Les gouttes les plus petites ont donc une pression de Laplace supérieure à celle des plus grosses. Leur taille va donc diminuer jusqu'à leur disparition au profit des gouttes plus grandes.

Enfin, lors de la coalescence, les gouttes vont fusionner pour en former des plus grosses en nombre moins important (Fig. 1.20 (e)), réduisant ainsi l'aire interfaciale totale du système ce qui diminue l'énergie totale du système et le rend plus stable.

Si une émulsion n'est pas stabilisée correctement, tous ces phénomènes vont conduire à sa destruction et à une séparation entre les deux phases , sans qu'aucune ne soit dispersée dans l'autre (Fig. 1.20 (f)).

III.3 Les méthodes d'émulsification

Il existe trois méthodes principales pour fabriquer une émulsion : le cisaillement, le passage au travers d'une membrane et l'utilisation de procédés microfluidiques. Suivant les propriétés souhaitées (taille et monodispersité des gouttes créées, type d'émulsion, rendement), le processus d'émulsification pourra être choisi parmi les trois méthodes citées précédemment. Nous détaillons dans ce chapitre l'émulsification par cisaillement et par membrane, qui sont celles que nous avons envisagées.

III.3.1 L'émulsification mécanique : cisaillement

Nous appelons émulsifications mécaniques les méthodes qui dispersent un liquide dans un autre par une action mécanique directe sur l'ensemble du mélange. Dans ce cas, la dispersion peut se faire par cisaillement, par l'utilisation d'un homogénéiseur-disperseur ou par l'application d'ultrasons au mélange. L'avantage de l'émulsification mécanique est qu'elle permet de fabriquer rapidement et en grande quantité des émulsions. Toutefois, un des désavantages majeurs est qu'elle ne permet généralement pas de contrôler la taille des gouttes, et donne des objets très polydisperses.

Dans des conditions très particulières, où le cisaillement est contrôlé, il est possible de rendre monodisperse une émulsion grossière et polydisperse [Mason and Bibette, 1996, Mason and Bibette, 1997, Mabille et al., 1999, Mabille and et al., 2003]. Cette technique requiert certaines conditions telles que le rapport de viscosité entre la phase dispersée sur la phase continue qui doit être compris entre [0.01-2] [Mabille and et al., 2003] et un appareillage bien spécifique.

III.3.2 L'émulsification par membrane

L'émulsfication par membrane (EM) met en jeu la pénétration de phase dispersée pure à travers une membrane microporeuse dans une phase continue agitée ou à écoulement transversal (EM directe ou conventionnelle [Joscelyne and Trägårdh, 2000]) ou bien le passage d'une émulsion grossière à travers la membrane (EM à pré-mélange ou homogénéisation par membrane [Suzuki

et al., 1996]). Par cette méthode, la taille des gouttes est contrôlée par la taille des pores et le débit à travers la membrane. Les différents procédés d'émulsification par membrane sont représentés sur la figure 1.21.

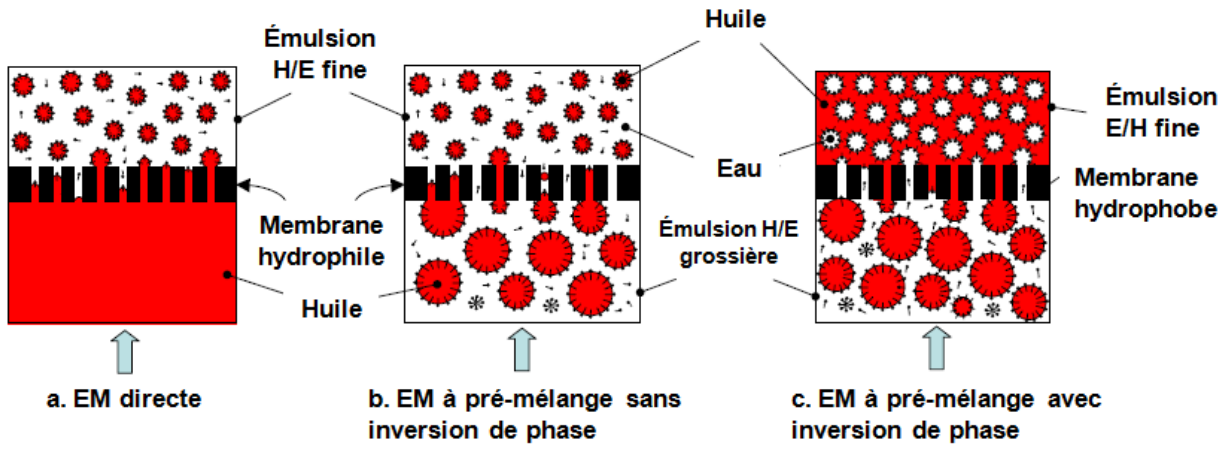


FIGURE 1.21 – Diagramme schématique des différentes méthodes d'émulsification par membrane [Vladisavljević and Williams, 2005].

Le principal désavantage de l'EM directe est le débit de la phase dispersée qui est relativement lent 0.01 - 0.1 $m^3/(m^2h)$ [Vladisavljević and Williams, 2005]. Ceci est nécessaire pour obtenir des gouttes monodisperses et de taille contrôlée. Il est possible d'augmenter le débit, toutefois le contrôle des dimensions des gouttes est alors très approximatif.

L'avantage de l'EM à pré-mélange est le débit utilisable et la simplicité de l'appareillage expérimental. En effet, par cette technique il est possible d'utiliser des flux membranaires allant jusqu'à 37 $m^3/(m^2h)$ [Vladisavljević et al., 2004, Vladisavljević and Williams, 2005]. Cependant l'inconvénient est la polydispersité par rapport à une EM directe. Ceci peut être en partie corrigé par un passage multiple à travers la membrane [Sawalha et al., 2008, Surh et al., 2008]. Dans ce cas, des émulsions peuvent être fabriquées rapidement et dans des quantités importantes. L'avantage par rapport à une émulsification mécanique est l'utilisation d'une membrane qui permet de contrôler la taille des gouttes (1-100 µm) et d'obtenir des émulsions relativement monodisperses.

Dans le cas des EM à pré-mélange, il est nécessaire que la pression transmembranaire soit supérieure à une valeur critique $P_{c,EM}$ pour que les gouttes plus grandes que la taille des pores ne soient pas retenues par la membrane [Vladisavljević et al., 2004]. Au-dessus de cette pression, toutes les gouttes vont passer quel que soit leur diamètre initial d_1. En sortie, le diamètre d_2 des gouttes peut être plus grand ou plus petit que celui des pores, noté d_m, suivant le taux de cisaillement dans la membrane. À faible taux de cisaillement, les grandes gouttes de diamètre d_1 sont déformées à l'entrée dans la membrane, puis subissent un fractionnement causée par les frictions avec la paroi des pores. Les gouttes plus petites ainsi formées restent déformées jusqu'à la sortie de la membrane où elles reprennent leur forme sphérique. À plus haut taux de cisaillement, les gouttes entrant dans la membrane vont être fractionnées plus finement à cause des frictions et des collisions sur la paroi des pores. Il ressort de la membrane des gouttes de taille inférieure à

celle des pores. Les différents cas sont schématisés sur la figure 1.22.

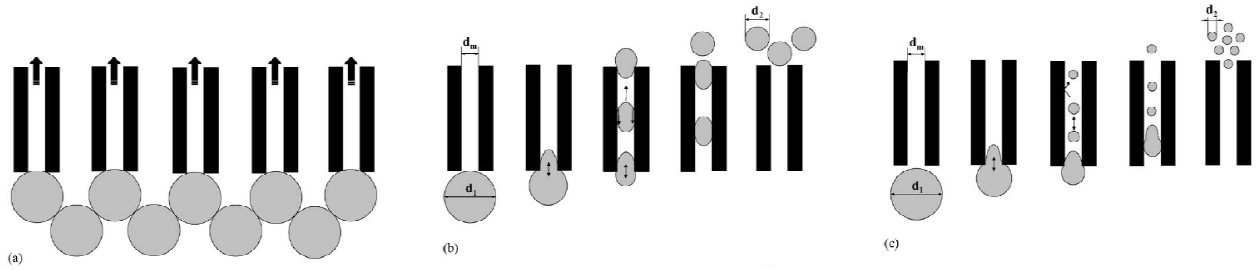


FIGURE 1.22 – Fractionnement des gouttes dans les EM à premixe (a) rétention des gouttes en dessous de la pression critique ; (b) fractionnement modéré à taux de cisaillement modéré ($d_m < d_2 < d_1$) ; (c) fractionnement fort à haut taux de cisaillement ($d_2 < d_m < d_1$) D'après [Vladisavljević et al., 2004].

Si la taille initiale des gouttes d_1 est proche de celle des pores (d_m), la pression critique est donnée par [Park et al., 2001] :

$$P_{c,EM} = \frac{\gamma_{O/W}[2 + 2a^6/\sqrt{2a^6 - 1}.arccos(1/a^3) - 4a^2]}{a + \sqrt{a^2 - 1}} \tag{1.2}$$

avec $a = d_1/d_m$ et $\gamma_{O/W}$ la tension interfaciale à l'interface huile/eau.

Dans le cas où les gouttes initiales sont largement plus grosses que les pores ($d_1/d_m \gg 1$), la pression critique est égale à la pression capillaire définie pour les EM directes :

$$P_{c,EM} = \frac{4\gamma_{O/W} cos\theta}{d_m} \tag{1.3}$$

avec θ l'angle de contact entre les gouttes de la phase dispersée et la membrane dans la phase continue.

III.4 Les émulsions de Pickering

III.4.1 Notions générales sur les émulsions de Pickering

Les émulsions de Pickering sont des émulsions stabilisées par des particules solides. Cet effet stabilisant des particules fines est connu depuis plus d'un siècle. Ces dispersions portent le nom d'un des premiers chercheurs qui décrit ce type de stabilisation (Pickering, 1907). Il a établi que des particules peuvent agir comme des tensioactifs et stabilisent des émulsions huile dans l'eau.

L'adsorption des particules à l'interface de deux phases est responsable de la stabilisation des émulsions de Pickering (Fig. 1.23). Les émulsions de Pickering peuvent être de type huile-dans-eau, eau-dans-huile ou multiples.

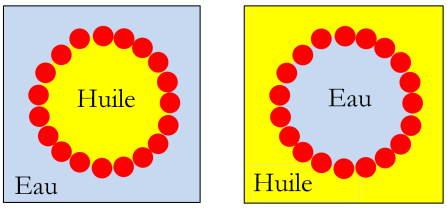


FIGURE 1.23 – Émulsions simples stabilisées par des particules : huile dans eau (gauche) et eau dans huile (droite).

III.4.2 Mécanismes de stabilisation des émulsions de Pickering

Le mouillage partiel de particules par les deux phases d'émulsion est nécessaire pour obtenir une adsorption à l'interface. L'angle de contact $\theta_{H/E}$ entre la phase aqueuse, la phase huileuse et le solide caractérise le mouillage. Pour obtenir une stabilisation optimale des émulsions, sa valeur doit être proche de 90° (mesuré du côté de la phase aqueuse). La valeur de l'angle de contact détermine le positionnement de la particule à l'interface (Fig. 1.24).

Des particules avec un angle de contact inférieur à 90° sont qualifiées d'hydrophiles et celles qui possèdent un angle de contact est supérieur à 90° sont dites hydrophobes.

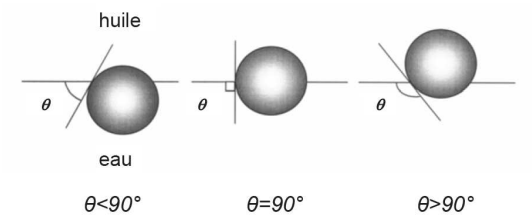


FIGURE 1.24 – Position d'une particule sphérique à l'interface huile/eau pour des angles de contact $\theta_{H/E}$ inférieur, égal ou supérieur à 90°. Adaptée de [Aveyard et al., 2003].

Les propriétés de mouillage des particules déterminent le type des émulsions : H/E ou bien E/H. Pour obtenir une stabilisation optimale des émulsions, des particules solides doivent être plus mouillées par le liquide de la phase externe de l'émulsion que par celui de la phase interne. Si des particules sont trop mouillées par une des phases, la stabilisation n'est pas efficace [Lopetinsky et al., 2006]. Des particules plutôt hydrophiles ($\theta_{H/E} < 90°$) formeront des émulsions H/E et des particules plutôt hydrophobes ($\theta_{H/E} > 90°$) des émulsions E/H (Fig. 1.25). Le sens de l'émulsion est aussi fixé par le milieu où les particules solides sont introduites lors de l'émulsification [Binks and Lumsdon, 2000b].

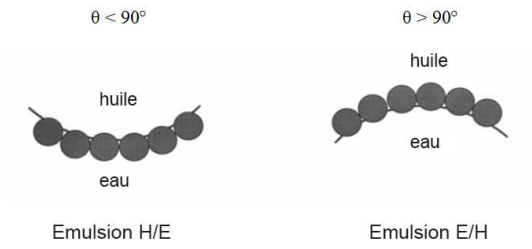


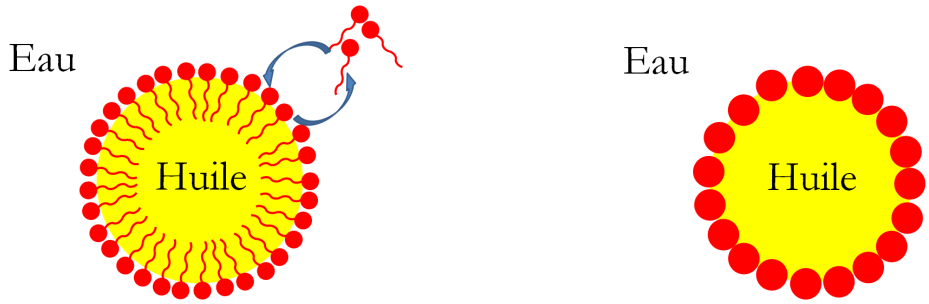
FIGURE 1.25 – Type d'émulsion obtenue en fonction de l'angle de mouillage des particules. Adaptée de [Aveyard et al., 2003].

III.4.3 Les aspects énergétiques

La mouillabilité des particules (exprimée par la valeur de l'angle de contact) influence la quantité d'énergie nécessaire pour enlever une particule de l'interface. En considérant une particule solide, sphérique et de petite taille (submicronique), l'effet de la masse est donc négligeable, l'énergie nécessaire pour retirer une particule de rayon r de l'interface huile/eau vers une des deux phases est donnée par l'équation [Tambe and Sharma, 1994, Binks, 2002, Lopetinsky et al., 2006] :

$$E_{desorp} = \gamma_{H/E}\pi R^2(1 \pm cos\ \theta_{H/E})^2 \tag{1.4}$$

Le signe positif dans l'équation correspond à l'extraction vers la phase huileuse et le signe négatif à l'extraction vers la phase aqueuse. Cette équation montre qu'en fonction de l'angle de contact, l'adsorption d'une particule à la surface peut être élevée ou faible. L'énergie de désorption est faible ($10k_bT$) pour des angles compris entre 0 et 20° ou 160 et 180°. Elle est maximale ($1000k_bT$) pour un angle proche de 90° [Binks, 2002]. Dans ce dernier cas, l'adsorption peut être considérée comme irréversible. L'avantage des émulsions de Pickering par rapport aux émulsions classiques utilisant des tensioactifs est leur stabilité accrue. En effet, contrairement aux tensioactifs qui s'échangent en permanence entre l'interface et la phase continue, une particule solide restera à l'interface une fois adsorbée ($\theta_{H/E} \sim 90°$) (Fig. 1.26).



(a) Émulsion stabilisée par des tensio-actifs : interface "liquide"

(b) Émulsion stabilisée par des nanoparticules : interface "solide"

FIGURE 1.26 – Stabilisation d'une goutte par des tensio-actifs ou des particules solides.

III.4.4 Facteurs influencant la stabilité des émulsions de Pickering

Plusieurs facteurs expérimentaux influencent la position des particules à l'interface et donc la stabilité de l'émulsions. Parmi eux nous retrouvons par exemple les caractéristiques des particules (angle de mouillage, concentration, taille) et la présence d'additifs (électrolytes, tensioactifs, agents floculants).

III.4.4.1 La mouillabilité des particules

Plusieurs types de particules ont déjà été utilisés pour former des émulsions de Pickering : oxyde de fer, hydroxydes métalliques, silice, argile, carbone [Aveyard et al., 2003].

Les propriétés physico-chimiques de la surface déterminent leur mouillabilité par des liquides. Un traitement chimique de la particule peut les changer. Par exemple, dans le cas de la silice, initialement hydrophile, une silanisation permet de la rendre hydrophobe. Il est possible par cette réaction d'obtenir toute une gamme de nanoparticules de silice présentant des angles de mouillage $\theta_{H/E}$ variés [Binks and Lumsdon, 2000b].

La mouillabilité des nanoparticules peut également être affectée par le pH de la phase aqueuse. Par exemple, pour des valeurs de pH inférieures à 9, les nanoparticules de silice stabilisent des émulsions E/H, et à un pH supérieur à 12,5, elles stabilisent des émulsions H/E [Binks and Lumsdon, 2000a].

III.4.4.2 L'état de dispersion des particules

Les particules agrégées s'adsorbent plus facilement à l'interface. La suspension de particules optimale est à la limite de sa stabilité. Des particules qui ne sont pas floculées ont plus de mobilité à l'interface que des particules floculées [Tambe and Sharma, 1994], la coalescence est alors plus facile.

La plupart des colloïdes en suspension sont chargés. L'addition d'électrolytes réduit le potentiel de surface et entraîne la floculation. Par exemple des études récentes d'émulsions stabilisées par des particules de silice chargées négativement (pH = 10) ont montré que la stabilité des émulsions dépend de la concentration en électrolyte de la phase aqueuse [P. Binks and O. Lumsdon, 1999]. Dans ce système, la stabilité au crémage et à la coalescence des émulsions obtenues dépend de la concentration en sel (chlorure de lanthane). Les émulsions les plus stables sont obtenues pour une concentration de 2 à 5 mM. En dehors de cet intervalle, la déstabilisation des émulsions a été observée.

III.4.4.3 La concentration en particules

La taille des gouttes de l'émulsion diminue quand la quantité de particules augmente pour un volume de phase dispersée constant. Cela a lieu jusqu'à une taille limite minimale des gouttelettes, l'excès de particules se retrouve alors dans la phase continue [Tambe and Sharma, 1994]. Si la concentration en particules est faible, la taille des gouttes augmente dans le temps [Arditty et al., 2003].

III.4.4.4 La taille des particules

La taille des particules détermine leur propension à rester en suspension et leur adsorption à l'interface (Eq. 1.4). Expérimentalement il a été prouvé que la diminution de taille des particules augmentait la stabilité des émulsions et diminuait la taille des gouttes jusqu'à une taille critique. Tambe et Sharma ont étudié des particules d'alumine de 4 µm et 37 µm avec le décane et l'eau. Les petits objets stabilisent l'émulsion alors que les grosses particules sont peu efficaces [Tambe and Sharma, 1994].

III.4.5 La coalescence limitée

Dans le cas des émulsions de Pickering, la taille finale des gouttes ne dépend pas uniquement de la méthode d'émulsification ou de l'intensité d'agitation, mais également de la quantité et de la taille des particules stabilisantes. Si l'ensemble des particules est initialement insuffisant pour recouvrir entièrement les interfaces huile-eau (les gouttes sont trop petites), les gouttes de l'émulsion coalescent afin de faire diminuer cette interface. Comme les particules sont irréversiblement adsorbées, le taux de recouvrement va augmenter jusqu'à ce que la coalescence soit stoppée : c'est la coalescence limitée. Ce phénomène permet de créer des émulsions stables et relativement monodisperses [Arditty et al., 2003].

Pour ne pas confondre la coalescence limitée avec les phénomènes d'instabilité d'émulsion cités précédemment (coalescence, floculation...), ce terme est utilisé pour une coalescence qui cesse après quelques secondes ou minutes et qui conduit à des gouttes stables et relativement monodisperses [Wiley, 1954].

III.4.6 Emulsion Pickering stabilisée par des nanocristaux de cellulose

Kalashnikova et al ont montré qu'il était possible d'utiliser les nanocristaux de cellulose comme émulsifiants [Kalashnikova et al., 2012, Kalashnikova et al., 2011]. En effet, ils ont stabilisé des émulsions d'hexadécane et de styrène dans l'eau, par des nanocristaux de cellulose (Fig. 1.27) obtenus à partir de cellulose bactérienne (BCN : bacterial cellulose nanocrystals) et de coton (CNC).

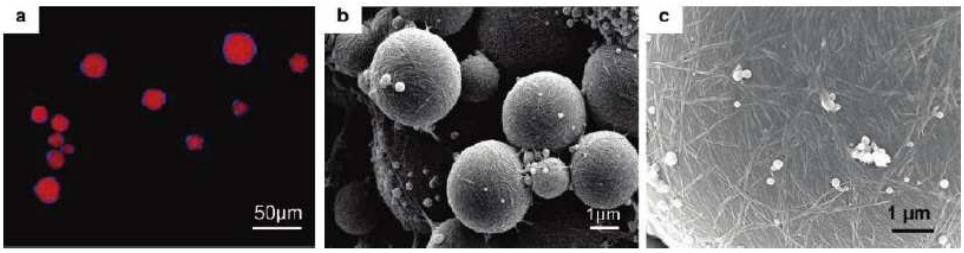


FIGURE 1.27 – (a) Images de microscopie confocale à balayage laser de gouttes stabilisées par des BCN avec un double marquage (hexane marqué avec BODIPY564/570 et la cellulose avec calcofluor) ; (b et c) Images de microscopie électronique à balayage d'une émulsion de Pickering de styrène stabilisée par des BCN et polymérisée avec de l'initiateur V65 [Kalashnikova et al., 2011].

Les suspensions de nanocristaux de cellulose peuvent être obtenues, à partir de diverses sources, par hydrolyse à l'acide sulfurique ou chlorhydrique. Le premier acide créé des groupements sulfates (SO_3^-) à la surface des particules, le second donne des nanocristaux non chargés. Des traitements chimiques permettent de moduler la densité de charge de surface, qui dépend du nombre de SO_3^- greffés, en sulfatant ou désulfatant les nanocristaux. Kalashnikova *et al* ont ainsi montré que la densité de surface de charge était un paramètre déterminant dans la stabilisation d'émulsion par des nanocristaux de cellulose [Kalashnikova et al., 2012]. Au dessus de 0,03 e/nm^2 les émulsions sont instables (tab. 1.5).

TABLEAU 1.5 – Caractérisation des nanocristaux de cellulose issu de coton (CNC) ou de cellulose bactérienne (BCN) par leur taille et densité de surface de charge et le diamètre moyen des gouttes et le volume de l'émulsion après centrifugation. D'après [Kalashnikova et al., 2012].

Source	**longueur (nm)**	**largeur (nm)**	**densité de surface de charge (e/nm^2)**	**diamètre moyen des gouttes de l'émulsion (μm)**	**volume de l'émulsion(μL)**
coton	189	13	0.123	instable	0
	189	13	0.051	instable	0
	189	13	0.033	14.5	61.3
	157	13	0.026	7.6	80.2
	147	13	0.017	4.2	94.3
	141	13	0.018	4.3	84.9
	117	13	0.019	3.8	70.8
	128	13	0.015	3.4	66.0
bactérienne	855	17	0.012	4.8	108.5
	644	16	0.037	18.6	61.3
	624	16	0.009	7.2	99.1

La densité de charge de surface d'un nanocristal augmente avec le nombre de groupements sulfate. Ils sembleraient que ces derniers influence la mouillabilité des nanoparticules de cellulose et nuisent à la stabilité de l'émulsion.

IV La méthode de dépôt couche par couche

La technique de dépôt "couche par couche" ou *layer-by-layer* (LbL) a été développée par Decher [Decher, 1997] dans les années 1990. Cette technique permet de créer des assemblages de différents composés, sans modification chimique, qui donnent lieu à des films multicouches d'épaisseur contrôlée et aux propriétés variées. Si cette méthode était initialement appliquée à des polymères chargés, elle est également valide pour déposer des couches de colloides ou de macromolécules.

Cette technique repose sur les interactions entre les objets en solution et ceux se trouvant à la surface. Les interactions entre couches peuvent être électrostatiques, mais également chimiques ou par liaisons hydrogène. L'épaisseur des couches est parfaitement contrôlée, elle est régie par les objets déposées. La technique couche par couche, d'abord utilisée sur des surfaces planes, a ensuite été transposée sur des supports tridimensionnels pour former des capsules d'épaisseur et aux propriétés contrôlées.

IV.1 Généralités sur la méthode couche par couche

La première méthode utilisée pour le dépôt couche par couche est le trempage (*dip-coating*), qui consiste à tremper le support dans des solutions ou des suspensions contenant les molécules d'intérêt (Fig.1.28). Cette technique demande des temps de dépôt relativement longs (environ 20 minutes par couches) et des quantités de solutions importantes. Elle peut être utilisée pour préparer des films sur une surface plane ou pour former des capsules.

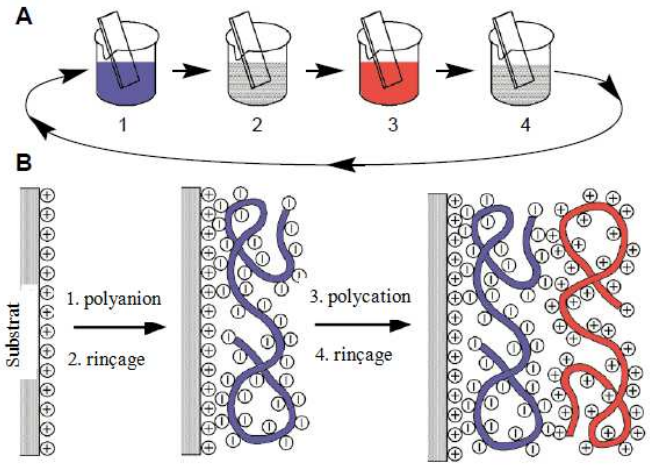


FIGURE 1.28 – (A) Schéma représentatif du dépôt de film sur une lame dans un bécher. Les étapes 1 et 3 représentent respectivement l'adsorption du polyanion et du polycation, les étapes 2 et 4 correspondent aux rinçages. Les quatres étapes sont la séquence de base de la construction de film d'architecture simple $(A/B)_m$. Des architectures plus complexes nécessitent simplement de changer le nombre ou la nature de la solution de dépôt, ou de modifier de la séquence. (B) Image d'un modèle moléculaire simplifié des deux premières couches déposées sur le substrat. D'après [Decher, 1997].

Une autre technique qui a connu un développement important au début des années 2000 avec les travaux de Lee et al [Chiarelli et al., 2001, Lee et al., 2001, Cho et al., 2001] est l'enduction par centrifugation. La solution de polymère est déposée sur un support en rotation à grande vitesse (> 1000 tr/min). L'excédent de solvant est évacué par centrifugation lors du mouvement du substrat, le reste s'évapore laissant la matière à la surface. Les avantages de cette méthode sont sa rapidité (environ 1 min par couche) et des surfaces généralement plus régulières qu'avec le trempage. Toutefois, les couches obtenues sont souvent plus épaisses et cette technique ne peut être utilisée que pour des surfaces planes.

IV.2 La croissance des films multicouches

Il existe deux régimes de croissance pour les films multicouches : une croissance linéaire et une croissance dite exponentielle. Dans le régime linéaire, l'épaisseur du film est proportionnelle au nombre de couches. Dans le régime dit exponentiel, l'épaisseur du film et la quantité de matière adsorbée augmente plus rapidement qu'une loi linéaire en fonction du nombre de couches.

La méthode couche par couche repose sur les interactions entre les couches successives. Par exemple, pour les polyélectrolytes, la croissance du film utilise l'inversion de la charge de surface

après chaque dépôt du polyanion et du polycation. Dans de nombreux cas cela conduit à une croissance de l'épaisseur en régime linéaire. Les films présentant une croissance dite exponentielle ont surtout été observés lorsque des polysaccharides naturels ont été utilisés [Boudou et al., 2010]. Par exemple, des systèmes formés à partir de poly(L-lysine) (PLL)/hyaluronane (HA) entraîne une croissance dite exponentielle [Picart et al., 2002]. L'origine de ce régime est dans ce cas due à une diffusion des polymères de PLL dans le film au cours du dépôt.

IV.3 Multicouches de nanocristaux de cellulose

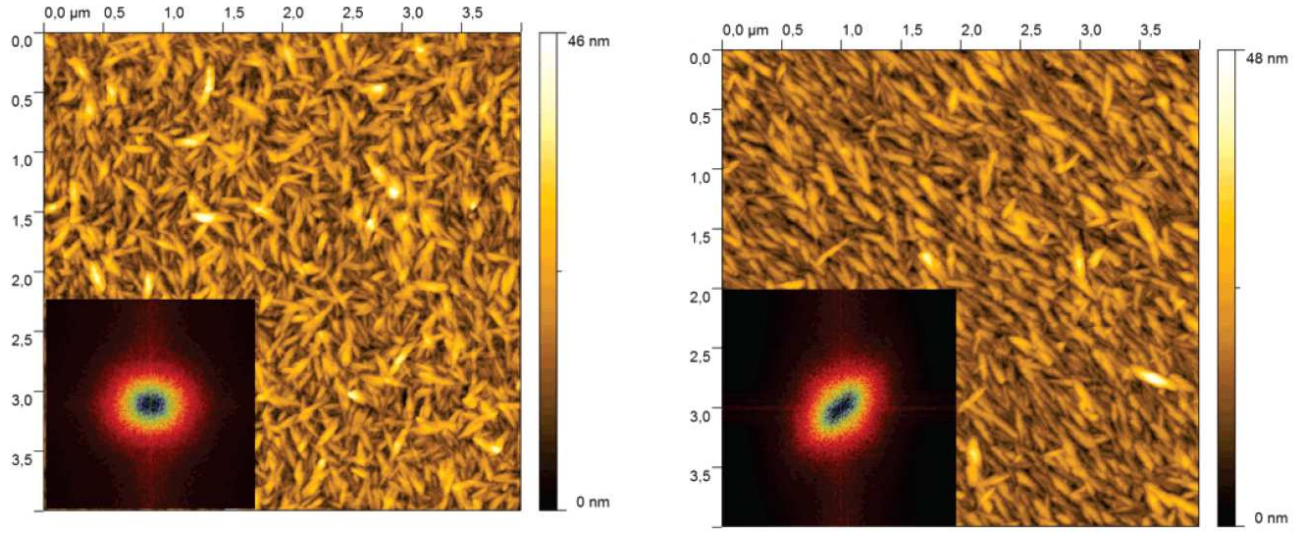
La fabrication de matériaux composites nanostructurés et performants connaît un intérêt croissant depuis quelques années. La méthode LbL permet le contrôle de la composition et de la structure d'un film à l'échelle du nanomètre. D'abord développée pour les polyélectrolytes, cette technique a depuis été appliquée avec des nanoparticules telles que les protéines [Lvov et al., 1995], les nanotubes de carbones [Rouse and Lillehei, 2002] ou des silicates [Kleinfeld and Ferguson, 1994]. Les nanocristaux de cellulose présentent des propriétés mécaniques remarquables avec un module d'Young de l'ordre de 140 GPa [Šturcová et al., 2005] comparable aux fibres d'aramide (kevlar : $\sim$ 150 GPa), et seulement 2 à 8 fois inférieur à celui des nanotubes de carbones ($\sim$ 1000 GPa). Ainsi, à la fin des années 2000, sont apparues des études sur la fabrication de films multicouches à bases de nanocristaux de cellulose, couplés à des polycations ou à des hémicelluloses.

IV.3.1 Cellulose/polyelectrolyte

La préparation des nanocristaux de cellulose par hydrolyse à l'acide sulfurique permet le greffage des groupements sulfates à leur surface, ils sont donc chargés négativement. Grâce à ces charges ils est possible de créer des films multicouches contenant des CNC en les couplant à des polycations tels que le poly(allilamine hydrochlorure) (PAH) [Cranston and Gray, 2006a, Cranston and Gray, 2008, Jean et al., 2008, Cranston et al., 2010, Cranston et al., 2011] ou le poly(chlorure diallyldimethylammonium) [Podsiadlo et al., 2005]. Les techniques de trempage et d'enduction par centrifugation ont toutes deux été utilisées pour former des films.

Comme pour les polymères classiques, l'enduction par centrifugation donne des couches plus épaisses que le trempage. Dans les deux cas, il est possible d'obtenir des surfaces de nanocristaux organisées. Dans le cas du trempage, le dépôt de CNC est réalisé dans la phase organisée de la suspension de cellulose (C = 7 %). En effet, les CNC ont la particularité de former une phase cholestérique lorsque la concentration de la suspension est augmentée [Revol et al., 1992, Revol et al., 1994]. Une étude récente réalisée au laboratoire a montré qu'en trempant une surface recouverte de PAH dans cette phase, il est possible de transposer son organisation sur la surface [Jean et al., 2008]. Après rinçage et séchage, le nanocristaux de cellulose présentent une direction commune, issue de la transposition de l'ordre local nématique du cholestérique (Fig. 1.29(b)). Ce phénomène est très différent du cas de l'enduction par centrifugation, où, en raison de la très

haute vitesse de rotation, les nanocristaux de cellulose vont s'aligner de manière radiale. Dans ces conditions l'avantage du trempage est de pouvoir contrôler la structuration de la couche de nanocristaux de cellulose en faisant un dépôt dans une suspension non-organisée ou organisée (Fig. 1.29). Il est également possible d'orienter une surface désorganisée en plaçant les multicouches dans un champ magnétique intense [Cranston and Gray, 2006a].



(a) Dépôt de CNC dans la phase isotrope de la suspension.

(b) Dépôt de CNC dans la phase anisotrope de la suspension.

FIGURE 1.29 – Topographie AFM (4x4µm^2) d'en échantillon PEI/PSS/(PAH/CNC)$_1$ [Jean et al., 2008].

L'épaisseur de la bicouche, formée par trempage, est de 15 nm environ [Jean et al., 2008]. Elle se compose d'une couche fine de PAH, et d'une double couche de nanocristaux. Les deux couches de cellulose ont la même épaisseur de 7,5 nm, soit l'ordre de grandeur de l'épaisseur d'un nanocristal de cellulose [Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008]. La couche superficielle est deux fois moins dense que la précédente. Le système est hétérogène, et sa rugosité va augmenter en fonction du nombre de couches.

Dans le cas du trempage, l'obtention d'une couche uniforme de CNC n'est pas immédiate si une seule couche de PAH est déposée sur le support, il faut environ 2,5 bicouches pour obtenir une couverture totale de la surface [Cranston and Gray, 2006a]. Il est nécessaire de préparer le support avant de déposer les premiers CNC. Dans les systèmes de Jean et *al.*, la présence de plusieurs couches de polyélectrolytes sur le support avant le dépôt de la première couche de cellulose favorise la mise en place d'une couche uniforme de nanoparticules [Jean et al., 2008]. Ainsi, dès le premier dépôt ils obtiennent une couche uniforme de CNC.

IV.4 Cellulose/xyloglucane

Les interactions entre cellulose et xyloglucane étant fortes, il a été montré qu'il est possible de construire des films multicouches à partir de ces éléments [Jean et al., 2009, Cerclier et al.,

2010]. Jean et al ont formé des assemblages par trempage à partir d'une suspension de cellulose concentrée (jusqu'à 7% en masse) et d'une solution de xyloglucane diluée (0,1%). Les films obtenus sont lisses (rugosité de l'ordre de 4 nm et densité de 40 - 45% [Jean et al., 2009]) et l'épaisseur de la bicouche est de 9 nm, ce qui correspond à une monocouche de CNC sur laquelle se dépose une fine couche de XG.

Cerclier et *al.* ont travaillé avec une suspension de CNC plus diluée (1% en masse) et diverses solutions de XG (0,5 g/l, 1 g/l, 5 g/l, 10 g/l). Les couches ont été déposées par trempage ou par enduction par centrifugation. Une concentration trop importante en XG est une étape limitante de la croissance des films puisqu'au dessus de 1 g/l, seules 3 à 4 bicouches peuvent être déposées [Cerclier et al., 2010]. Après cela, plus aucune couche n'a pu être déposée. Le phénomène est relié aux différents régimes de concentrations des solutions de xyloglucanes qui sont successivement le régime dilué (0 - 0,2 g/l), le régime semi-dilué non enchevêtré (0,5 - 1 g/l) et le régime enchevêtré (> 1 g/l) [Gidley et al., 1991]. Pour les plus fortes concentrations, les chaînes de XG sont en régime enchevêtré et ne se déposent vraisemblablement que sous forme de paquets. La présence de ces derniers ne permet pas d'assurer une cohésion intercouche, lors du dépôt d'une nouvelle couche de nanocristaux de cellulose, entraînant l'élimination de l'ensemble lors du rinçage par désenchevêtrement des chaînes de xyloglucanes.

IV.5 Les capsules couche par couche

IV.5.1 Principe de leur élaboration

Il existe déjà de nombreux procédés permettant de fabriquer des capsules de tailles micrométriques à millimétriques : polymérisation *in situ*, évaporation du solvant dans une émulsion, extrusion (etc...). Ces capsules trouvent des applications dans de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire, les cosmétiques, la pharmaceutique (etc.). La technique dite couche par couche permet de fabriquer des capsules dont la structure de la paroi est contrôlée. Les capsules sont ainsi caractérisées par un bon contrôle de leur taille et forme, et de l'épaisseur et rigidité de leur paroi qui peut être constituée de nombreux matériaux différents. Il est également possible d'y incorporer des molécules fonctionnelles à la surface de la paroi, ce qui permet de contrôler leurs propriétés physicochimiques avec beaucoup de précision.

Les microcapsules préparées par un dépôt couche par couche ont été présentées pour l'une des premières fois par Sukhorukov et *al.* dans les années 90 [Donath et al., 1998, Sukhorukov et al., 1998]. Le principe est le même que le dépôt sur une surface plane, mais les polyélectrolytes de charges opposées sont adsorbés sur des particules colloïdales au lieu d'un support plat. Le substrat est trempé successivement dans les solutions contenant les polymères à déposer. Chaque dépôt est entrecoupé d'une étape de rinçage qui consiste en une centrifugation, un retrait du surnageant et à une resuspension dans de l'eau déionisée ou ultrapure. Comme pour les supports plans, le temps de dépôt est généralement de quelques dizaines minutes. Plusieurs rinçages sont nécessaires

entre chaque couche. Après le dépôt du nombre de couches souhaité, le coeur de la capsule est généralement retiré, donnant ainsi des capsules vides. La figure 1.30 présente le procédé général pour la formation de capsules LbL.

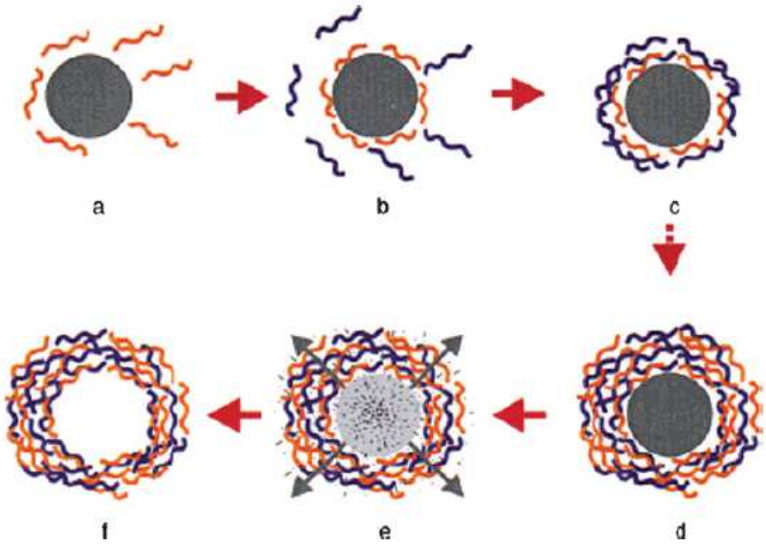


FIGURE 1.30 – Représentation schématique du dépôt couche par couche et de la décomposition du substrat qui en suit. D'après [Donath et al., 1998].

IV.5.2 Les substrats

L'utilisation de particules colloïdales comme substrat est un paramètre clé de la fabrication des capsules par la méthode couche par couche. Tout comme les films, des polyélectrolytes [Peyratout and Dähne, 2004], des polysaccharides [Szarpak et al., 2008, Cui et al., 2011] et des nanoparticules [Caruso et al., 1998, Holt et al., 2007] ont été utilisées pour former des capsules multicouches. Le choix du support du LbL doit être réalisé avec précision, car il doit répondre à certaines contraintes telles que sa stabilité au cours des dépôts successifs, les conditions pour le dissoudre (pour former des capsules vides), sa taille et sa forme. Ainsi de nombreux substrat ont été utilisés pour former des microcapsules tels que : des mélamine formaldéhyde [Donath et al., 1998, Peyratout and Dähne, 2004], des particules de latex de polystyrène (PS) [Caruso et al., 1998, Peyratout and Dähne, 2004], des gouttes liquides [Grigoriev et al., 2007, Li and Stover, 2010], du carbonate de calcium [Peyratout and Dähne, 2004, Holt et al., 2007, Szarpak et al., 2008].

IV.5.3 Les interactions utilisées pour la construction du multicouche

Dans de très nombreux cas, les interactions entre les couches successives sont de nature électrostatique [Caruso et al., 1998, Donath et al., 1998, Donath et al., 1998, Peyratout and Dähne, 2004]. Il existe cependant d'autres types d'interactions qui se sont révélées efficaces comme les liaisons hydrogène [Kharlampieva et al., 2009], les interactions hôte/invité, les reconnaissances biomoléculaires spécifiques ou les liaisons covalentes.

IV.5.4 Capsules multicouches de CNC/PAH

Il n'y a qu'un exemple à notre connaissance de capsules multicouches utilisant des nanocristaux de cellulose. Holt [Holt et al., 2007] a montré que des capsules multicouches de CNC/PAH pouvait être fabriquées. Les couches ont été déposées sur des particules de carbonate de calcium de diverses formes. Après quelques bicouches, le support est dissous et la capsule garde la forme de la particule de carbonate de calcium. La paroi est donc très rigide puisqu'elle conserve la forme du support une fois celui-ci dissous. Cette technique, présentée comme une variante nanométrique du papier maché, permet d'obtenir des assemblages de formes variées. La figure 1.31 présente des images de microscopie électronique à balayage (MEB) et de microscopie optique (MO) obtenues par Holt *et al.* pour des microcapsules construites sur une particule de carbonate de calcium en forme d'aiguille et un dépôt multicouche de PAH et CNC.

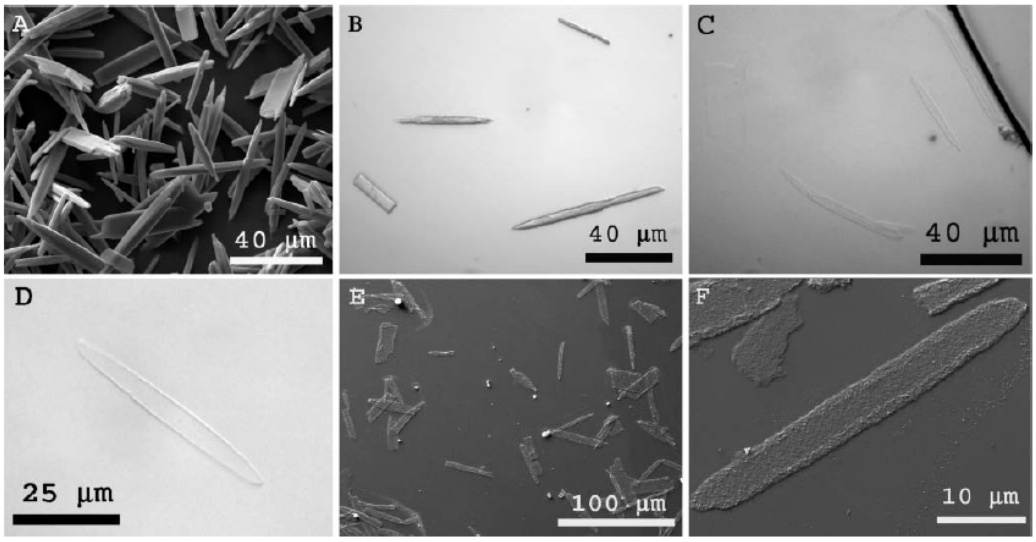


FIGURE 1.31 – (A) Image de MEB de cristaux d'aragonite (carbonate de calcium) en aiguille utilisés comme substrat. (B) Image de microscopie optique des substrats de carbonate de calcium recouverts d'une couche de PAH et de nanocristaux de cellulose (CNC). (C) Image de microscopie optique des microcapsules en "nano-papier maché" produites après dissolution du substrat. Les capsules ont été produites à partir d'une seule couche de PAH et CNC. (D) Image de microscopie optique des microcapsules en "nano-papier maché" avec deux couches de PAH et CNC. (E) et (F) Images de MEB de microcapsules à une couche. Extraite de [Holt et al., 2007] .

V Déformation de capsules : méthodes et formes caractéristiques

V.1 La déformation d'une coque sphérique, élastique et mince

Lorsque le volume interne d'une coque élastique et sphérique diminue, elle se déforme dans un premier temps par compression pour conserver la symétrie sphérique. Puis, elle va subir une rupture de symétrie pour relâcher la très forte énergie de compression en une énergie de flexion moins élevée, en inversant une calotte sphérique (création d'une dépression axissymétrique). L'origine de cette transition, ou flambage, a été étudiée par Landau au siècle dernier [Landau and Lifshitz,

1986]. Il a montré que la dépression devrait apparaître au dessus d'une différence de pression interne/externe critique ΔP_{Landau} définie par :

$$\Delta P_{Landau} = Y_{3D} \left(\frac{h}{R}\right)^2 \tag{1.5}$$

avec Y_{3D} le module d'Young du matériau constituant la coque, h son épaisseur et R son rayon.

Une coque est équivalente à une plaque courbée, à l'état initial non déformé. La particularité de la coque par rapport à la plaque est qu'elle ne peut pas être courbée sans être cisaillée [Landau and Lifshitz, 1986]. Rappelons que pour une plaque les énergies de flexion (E_b : *bending energy*) et de compression (E_s : *stretching energy*) par unité de surface sont [Komura et al., 2005] :

$$E_s \sim Y_{3D} h \varsigma^4 / l^4 \quad (J/m^2) \tag{1.6}$$

$$E_b \sim Y_{3D} h^3 \varsigma^2 / l^4 \quad (J/m^2) \tag{1.7}$$

Avec Y_{3D} le module d'Young du matériau constituant la plaque, h l'épaisseur de la plaque, ς l'amplitude du déplacement et l une longueur caractéristique à la déformation. Comme le rapport $E_s/E_b \sim (\varsigma/h)^2$, l'énergie de cisaillement peut-être négligée quand ς « h. Inversement, elle devient dominante par rapport à l'énergie de courbure dès que le déplacement ς devient plus grand que l'épaisseur h de la plaque. Pour une coque de rayon R et d'épaisseur h, ces mêmes énergies sont respectivement [Landau and Lifshitz, 1986, Komura et al., 2005] :

$$E_s \sim Y_{3D} h \varsigma^2 / R^2 \quad (J/m^2) \tag{1.8}$$

$$E_b \sim Y_{3D} h^3 \varsigma^2 / R^4 \quad (J/m^2) \tag{1.9}$$

Dans ce cas, le même rapport des énergies par unité de surface donne $E_s/E_b \backsim (R/h)^2$, qui est généralement grand dans le cas de coques minces. Ainsi, les déformations en flexion sont toujours accompagnées d'un cisaillement dans la coque. Contrairement aux plaques, ce phénomène est indépendant du rapport ς/h.

Supposons à présent qu'une force locale soit appliquée sur la coque dans la direction normale à sa surface. Cela entraîne la flexion de la coque sur une petite région autour du point de pression. Notons d la dimension de cette déformation. La figure 1.32 présente un schéma d'une coque déformée et des dimensions caractéristiques liées à la déformation.

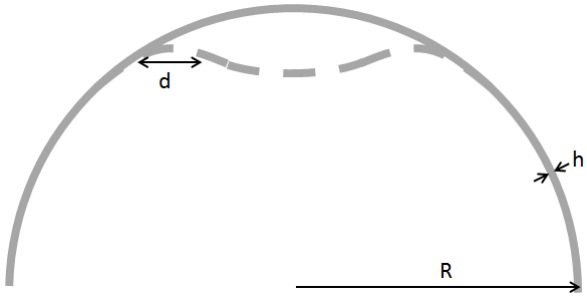


FIGURE 1.32 – Représentation schématique d'une dépression dans une coque sphérique et ces dimensions caractéristiques, inspirée de [Vliegenthart and Gompper, 2011].

Les énergies de flexion et de cisaillement sur l'ensemble de cette région, d'une aire de l'ordre de d^2, sont donc respectivement :

$$E_s \sim Y_{3D} h \varsigma^2 d^2 / R^2 \quad (J) \tag{1.10}$$

$$E_b \sim Y_{3D} h^3 \varsigma^2 / d^2 \quad (J) \tag{1.11}$$

Comme l'énergie de flexion diminue avec d et l'énergie de cisaillement augmente avec d il faut considérer les deux énergies simultanément pour trouver la condition d'équilibre. Elle est obtenue quand l'énergie totale est minimale, soit [Landau and Lifshitz, 1986] :

$$d \sim \sqrt{hR} \tag{1.12}$$

Cette dépendance de la taille de petite déformation par rapport au rayon et à l'épaisseur de la coque a été déterminée par des considérations purement théoriques. Plus récemment une étude théorique de la déformation d'une coque élastique sous une pression homogène ou par diminution de son volume interne est venue confirmer la relation d $\sim \sqrt{hR}$ et l'a étendue aux grandes déformations [Knoche and Kierfeld, 2011]. Pour ces calculs, la coque a été considérée comme une surface sphérique en 2 dimensions. Elle est alors définie par sa constante de courbure κ, son module d'Young 2D Y_{2D} et son coefficient de Poisson ν. Dans ces conditions, la longueur caractéristique d des déformations et la pression critique ΔP_{Landau} peuvent être généralisées à tout type de coque, qu'elle soit constituée d'un matériau isotrope ou non :

$$d = \left(\frac{\kappa R^2}{Y_{2D}}\right)^{1/4} \tag{1.13}$$

$$\Delta P_{Landau} = \frac{\kappa^{1/2} Y_{2D}^{1/2}}{R^2} \tag{1.14}$$

Dans le cas d'une coque fine sphérique et isotrope (TSIM : thin shell of isotropic material) les paramètres 2D sont :

$$Y_{2D} = Y_{3D}h \tag{1.15}$$

$$\kappa = \frac{Y_{3D}}{12(1-\nu^2)}h^3 \tag{1.16}$$

$$\tag{1.17}$$

En utilisant ces paramètres dans l'équation 1.13, nous retrouvons d $\sim \sqrt{hR}$.

V.2 La morphologie de déformation de coques sphériques

Il existe deux morphologies principales observées lors de la déformation d'une coque sphérique, isotrope et élastique. Tout d'abord, il a été observé expérimentalement [Tsapis et al., 2005, Zoldesi et al., 2006, Sacanna et al., 2011, Quemeneur et al., 2012] ou par des modèles numériques [Tsapis et al., 2005, Vliegenthart and Gompper, 2011, Quemeneur et al., 2012] la formation de dépressions multiples sur des coques, également appelée indentation multiple. Un exemple d'observation expérimentale est donné sur la figure 1.33. D'autre part, des coques possédant une dépression unique ont également été observées [Zoldesi and Imhof, 2005, Quilliet et al., 2008]. Les figures 1.33 et 1.34 présentent respectivement des coques de silice dégonflées présentant des dépressions multiples ou une dépression unique.

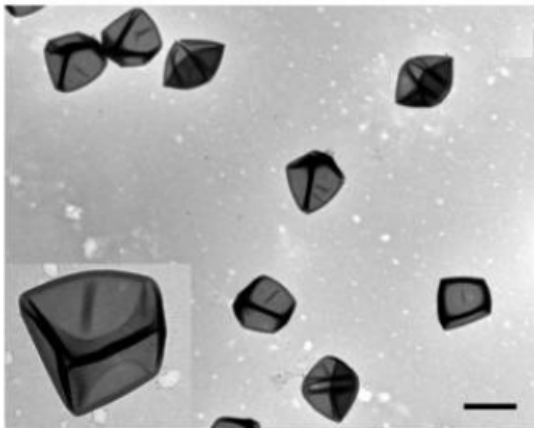


FIGURE 1.33 – Images de microscopie électronique en transmission de coques de silice vides d'un rayon de 795 nm et d'une épaisseur de 150 nm, barre d'échelle : 2 µm [Zoldesi et al., 2006].

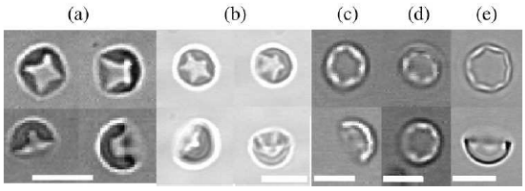


FIGURE 1.34 – Images de microscopie optique de coques de silice déformées en solution par l'ajout d'éthanol (a-e). Chaque sous figure présente différentes vues du même objet. Barre d'échelle : 5 µm sauf pour (c) 2 µm [Quilliet et al., 2008].

Des études numériques ont permis de déterminer les facteurs influençant l'apparition de l'une ou l'autre des deux morphologies. Pour les calculs un modèle en 2 dimensions est employé. La coque ou la capsule est considérée comme une surface sphérique [Quilliet, 2012, Vliegenthart and Gompper, 2011]. Dans ces conditions, une approximation linéaire permet de transposer les paramètres en 3 dimensions de la capsule (module d'Young Y_{3D}, coefficient de Poisson ν_{3D}, épaisseur h, rayon R) dans l'espace en 2 dimensions. Pour une TSIM les paramètres 2D sont alors :

$$\nu_{2D} = \nu_{3D} = \nu \tag{1.18}$$

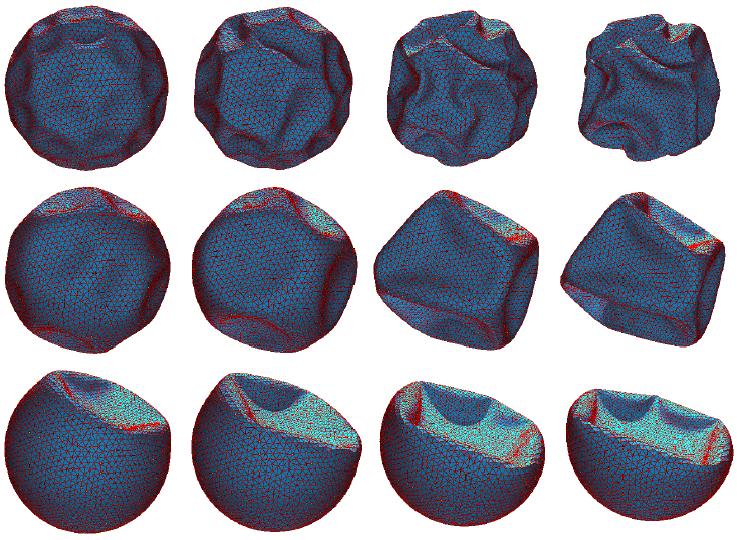
$$Y_{2D} = Y_{3D}h \tag{1.19}$$

$$\kappa = \frac{Y_{3D}}{12(1-\nu^2)}h^3 \tag{1.20}$$

$$\gamma = \frac{Y_{2D}R^2}{\kappa} = 12(1-\nu^2)\left(\frac{R}{h}\right)^2 \tag{1.21}$$

Avec κ la constante de courbure et γ le nombre de Föppl-von Kármán. Ce dernier permet de considérer l'influence de la taille de la capsule sur sa déformation dans les modèles numériques.

Les paramètres influençant la formation d'une dépression unique ou de dépressions multiples sont la vitesse de déformation et le nombre de Föppl-von Kármán [Vliegenthart and Gompper, 2011]. L'indentation multiple apparaît pour des déformations rapides et des valeurs de γ élevées ($>10^5$). Les diminutions lentes du volume interne de la capsule ou des γ plus faibles permettent d'obtenir la formation d'une dépression unique. La figure 1.35 présente les déformations obtenues in silico à γ fixé pour différentes vitesses de déformation.



$V/V_0 = 0.93$, $V/V_0 = 0.85$, $V/V_0 = 0.63$, $V/V_0 = 0.48$

FIGURE 1.35 – Images de déformation d'un modèle numérique de capsules de $\gamma = 8.10^4$ à différentes vitesses de déformation. Ligne du haut : déformation rapide ; ligne centrale : déformation plus lente ; ligne du bas : déformation la plus lente [Vliegenthart and Gompper, 2011].

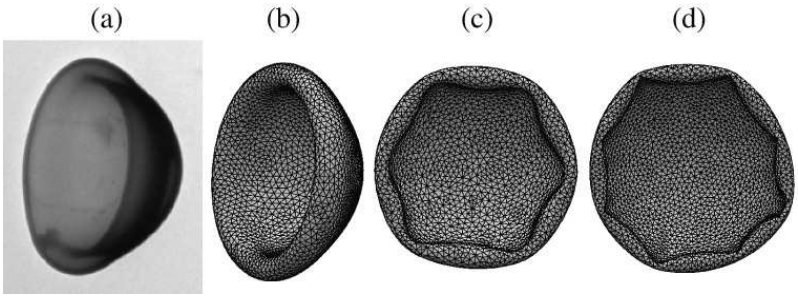


FIGURE 1.36 – (a) Image de microscopie électronique en transmission d"une capsule obtenue par évaporation dans l'air d'une coque sphérique de rayon 870 nm et d'épaisseur 150 nm ; (b) Simulation obtenue pour obtained for $\gamma = 271$ et $\nu = 0{,}333$ (équivalent à h/R = 0,172) ; (c) Simulation : $\gamma = 2333$ and $\nu = 0{,}333$ (d/R = 0,0586) ; (d) Simulation : $\gamma = 20995$ and $\nu = 0{,}333$ (equivalent to d/R = 0,0195) [Quilliet et al., 2008].

Dans le cas où une dépression unique est formée, sa bordure peut soit être circulaire, soit présenter des plis ou rides. Dans le premier cas, la capsule a alors une forme de bol comme représenté sur la figure 1.36a-b. Dans le second, comme représenté sur la figure 1.36.c-d, la déformation a une forme polygonale également appelée indentation multiple. Dans ces conditions, il a montré par une étude numérique que la longueur de ces rides ($l \backsim \frac{2\pi R}{W}$ avec W le nombre de rides formées) varie comme la longueur caractéristique donnée par Landau $d \backsim \sqrt{hR}$ [Quilliet, 2012]. La relation entre le nombre de rides, le rayon de la capsule R et son épaisseur h est alors :

$$W = 0,940 \left(\frac{h}{R}\right)^{-\frac{1}{2}} \tag{1.22}$$

Cette égalité est théoriquement valable pour toutes coques ou capsules constituées d'un matériau isotrope. Nous remarquons que la relation est indépendante des propriétés du matériau (module d'Young et coefficient de Poisson), seules les tailles caractéristiques de la capsule (épaisseur et rayon) influencent le nombre de rides.

V.3 Méthode de déformation de capsule

Il existe différentes techniques pour déformer des capsules. Certaines n'étudient qu'une seule capsule à la fois comme l'AFM [Fery and et al., 2004] ou le *point load* [Vella et al., 2010]. D'autres permettent la déformation de plusieurs objets simultanément comme le séchage [Zoldesi et al., 2006], la pression osmotique [Gao et al., 2001a, Gao et al., 2001b] ou la dissolution du coeur de la capsule [Quilliet et al., 2008].

L'intérêt des capsules est de contenir des élements dans leur coeur et de les relarguer ultérieurement. Ainsi, le liquide contenu dans la capsule peut être le même que la phase continue (ex de l'eau) ou de nature différente (huile dans la capsule en suspension dans l'eau). Dans le cas où une paroi poreuse entoure une goutte d'huile dans l'eau, il est possible d'entraîner la déformation de la capsule en dissolvant le coeur dans la phase continue par l'ajout d'un solvant miscible à l'eau.

Lorsque l'huile devient miscible au mélange eau/solvant, un ménisque va se former aux niveaux des pores. La tension de surface va créer une force $F \approx \gamma a$ au niveau de chaque pore, celui-ci occupant une surface a^2. L'effet à l'échelle de la capsule ($\gg a$) est donc celui d'une pression $P \sim \gamma a/a^2 = \gamma/a$. Ce phénomène est représenté sur la figure 1.37.

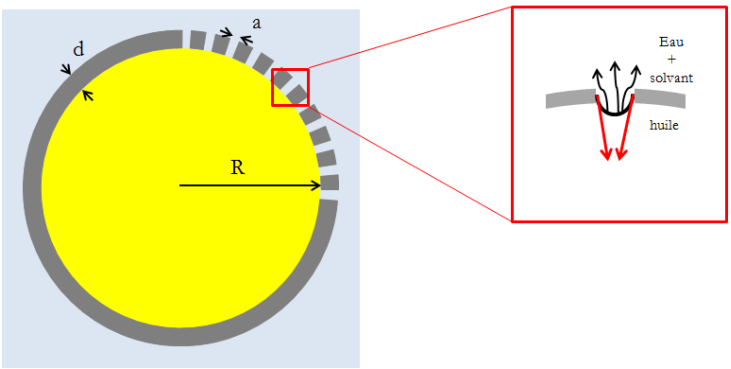


FIGURE 1.37 – représentation schématique d'une capsule poreuse, contenant de l'huile, dans l'eau et des contraintes appliquées sur la paroi lors de l'ajout d'un solvant dans la phase aqueuse pour dissoudre le coeur.

C'est donc cette pression exercée sur la paroi de la capsule qui lors du séchage ou de la dissolution qui va conduire à la déformation de celle-ci, phénomène que nous allons utiliser dans la suite de ce manuscrit.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

I Préparation et caractérisation des briques élémentaires : nanocristaux de cellulose et xyloglucanes

I.1 Préparation de suspension de nanocristaux de cellulose

Les nanocristaux de cellulose (CNC) sont préparés à partir de linters de coton [1] (**Buckeye cellulose Corporation**) en suivant le protocole décrit par Revol et al [Revol et al., 1992]. L'hydrolyse a été réalisée avec de l'acide sulfurique à 64%, à 63°C pendant 30 minutes.

Pour obtenir les CNC, 60 g de linters de coton sont placés dans de l'acide sulfurique d'une concentration de 64% et à une température de 63°C sous agitation mécanique. Après 30 minutes, l'hydrolyse est stoppée par l'ajout de 450 g de glace au milieu réactionnel.

La suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 20 335 g (11 200 tr/min ; *6K15, rotor n° 12256*, **Sigma**). Les culots sont resuspendus dans 1L d'eau déionisée par agitation mécanique pendant 10-15 minutes. Cette opération est répétée 2 fois supplémentaires. Après la dernière centrifugation, Les nanocristaux de cellulose sont redispersés dans un volume final de 2 l.

La suspension est mise en dialyse, dans une membrane de seuil de coupure 14 000 M (g/mol) (*GnbH + Co D 768185 Karsruhe*, **Roth**) à l'eau déionisée. L'eau est changée 2 à 3 fois par jour. La dialyse est considérée comme terminée quand la conductivité du bain est de l'ordre de quelques µS ($\leq$ 5 µS).

A la fin de la dialyse, les nanocristaux de cellulose sont agréger. Pour les séparer, la suspension est soniquée (*Sonde 102C, Digital sonifier 450*, **Branson**) et filtrée successivement à 8 µm, 5 µm, 1 µm dans un filtre sous pression (*SM 162 4*,**Sartorius**) pour retirer les éventuels agrégats de CNC restant.

Après purification, par centrifugation et dialyse, la suspension a une concentration massique finale (également appelée siccité [2]) de 2,5% environ. La suspension est conservée à 4 °C et, pour éviter la contamination bactérienne, y sont ajoutés quelques gouttes de chloroforme ou quelques milligrammes d'azoture de sodium.

I.2 Caractérisation des nanocristaux de cellulose

Plusieurs lots de suspension de CNC ont été réalisés dans ces conditions. Pour l'un d'eux, la distribution en taille des nanoparticules a été mesurée par microscopie électronique en transmission et par diffusion dynamique de la lumière. De plus, la charge de surface des CNC à également été caractérisée par dosage conductimétrique et mesure du potentiel zéta.

1. Ce sont les courtes fibres restées sur les graines de coton après égrenage, qui ne peuvent être filées
2. pourcentage massique de matière sèche, mesuré par évaporation du solvant

I.2.1 Distribution en taille des nanocristaux de cellulose

I.2.1.1 Mesure en MET

La distribution en longueur des nanocristaux de cellulose d'une suspension, préparée dans les conditions présentées §I.1, a été déterminée par microscopie électronique en transmission (*CM200*, **Philips**). Une goutte de suspension diluée à 0,01% est déposée et séchée sur une grille de cuivre de 5 mm de diamètre recouverte de 10 nm de carbone. Les CNC sont ensuite marqués par coloration négative à l'acétate d'uranile. La longueur de plusieurs centaines de CNC a été mesurée avec le programme *Analysis* sur les images obtenues. Un exemple d'image obtenue en MET est présenté sur la figure 2.1. La distribution en taille des CNC en suspension est donnée sur la figure 2.2.

La distribution en longueur permet de calculer la longueur moyenne en nombre L des nanocristaux de cellulose. D'après les données présentées sur la figure 2.2, L = 145 nm avec un coefficient de variation[3] $\sigma_L = 31$ % . Ces valeurs sont bien en accord avec celles présentées par Elazzouzi-Hafraoui et *al.* dans les mêmes conditions expérimentales [Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008]. Par la même méthode, la largeur moyenne des CNC peut être déterminée. Nous n'avons pas réalisé ces mesures ici, cependant nous utiliserons les valeurs données par Elazzouzi et al dans [Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008]. La largeur sera considérée comme l = 26 nm ($\sigma_l = 46$ %) et la hauteur h $\approx$ 6 nm.

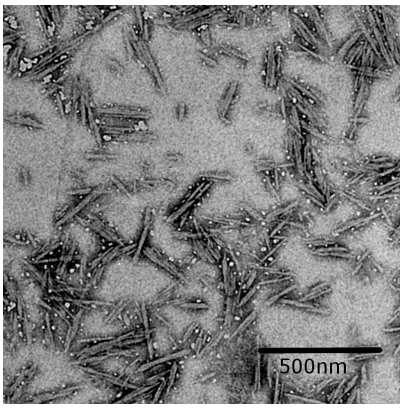


FIGURE 2.1 – Image de microscopie électronique en transmission de nanocristaux de cellulose obtenus par hydrolyse à l'acide sulfurique à 63°C de linters de coton.

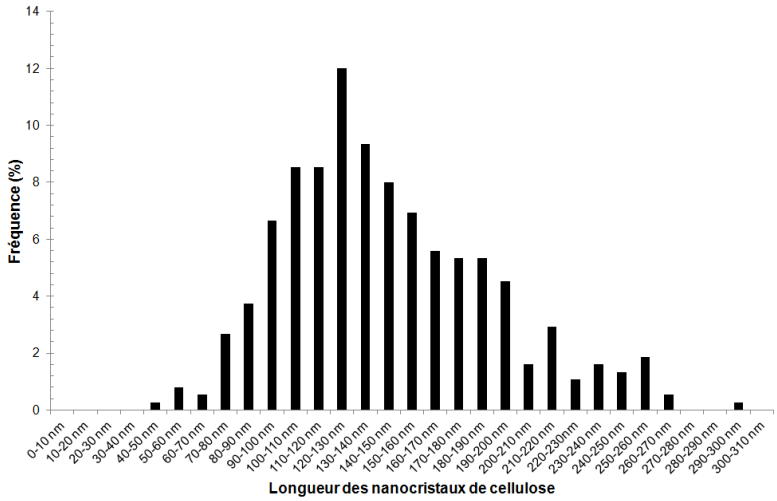


FIGURE 2.2 – Histogramme de la longueur des nanocristaux de cellulose préparés par hydrolyse à l'acide sulfurique à 63°C et mesurés sur image de microscopie électronique en transmission.

I.2.1.2 Mesure en diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Une autre mesure de la taille des CNC est réalisée en diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering). Une suspension de CNC diluée à 0,01% est placée dans une cuve de spectrophotométrie de 1 ml possédant un trajet optique de 1 cm. La mesure est répétée une dizaine de fois sur le même échantillon afin de s'assurer de la reproductibilité de la mesure. Les courbes

3. Rapport de l'écart-type de la distribution sur la longueur moyenne

obtenues sont présentées sur la figure 2.3.

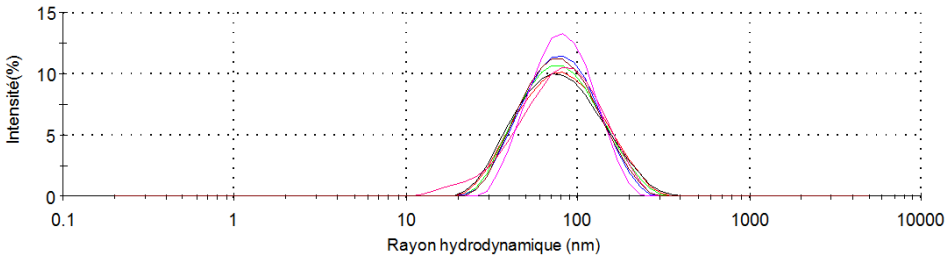


FIGURE 2.3 – Données de mesures du rayon hydrodynamique d'une suspension de cellulose issue de linters de coton hydrolysés pendant 30min à 63°C(*Zetasizer Software*, **Malvern**).

Le rayon hydrodynamique moyen trouvé est de 67,0 ± 0,7 nm. Dans cette mesure l'objet est considéré comme une sphère de diamètre égale à la longueur du batônnet. Nous obtenons bien une longueur $L_{CNC} \approx 132$ nm qui est cohérente avec les mesure en microscopie électronique en transmission.

I.2.2 Mesure de la charge des nanocristaux de cellulose

Les nanocristaux de cellulose obtenus par hydrolyse à l'acide sulfurique présentent à leur surface des groupements sulfate (SO_3^-) qui, par répulsion électrostatique, assurent la stabilité colloïdale de la suspension. Une représentation de ces groupements sulfate à la surface d'un nanocristal de cellulose est présentée sur la figure 2.4.

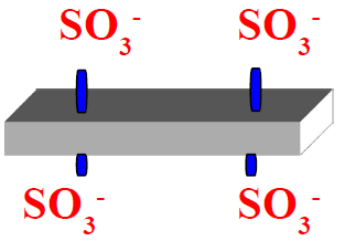


FIGURE 2.4 – Représentation schématique des groupements sulfate à la surface d'un nanocristal de cellulose.

I.2.2.1 Dosage conductimétrique

Un dosage conductimétrique permet de calculer le dégré de substition (d_S) des groupements hydroxyle (OH) en groupements sulfate à la surface du cristal de cellulose. Le taux de soufre (τ_S) est calculé à partir du d_S. Nous avons utilisé un conductimètre de type *CDM 210* et une électrode *CDM 614T*. La titration est réalisée avec du NaOH à 0,01 M (mol/L). La soude est ajoutée graduellement dans une suspension de cellulose de volume et de concentration connus. La conductivité est mesuré tous les 0,1 ml de soude ajoutés. La suspension est agitée durant toute la durée du dosage. Le taux de soufre est déterminé à partir du volume équivalent en soude. Pour le détail du calcul se référer à l'annexe B §I.1. Le volume équivalent est mesuré à partir de la courbe de dosage. Un exemple est donnée sur la figure 2.5.

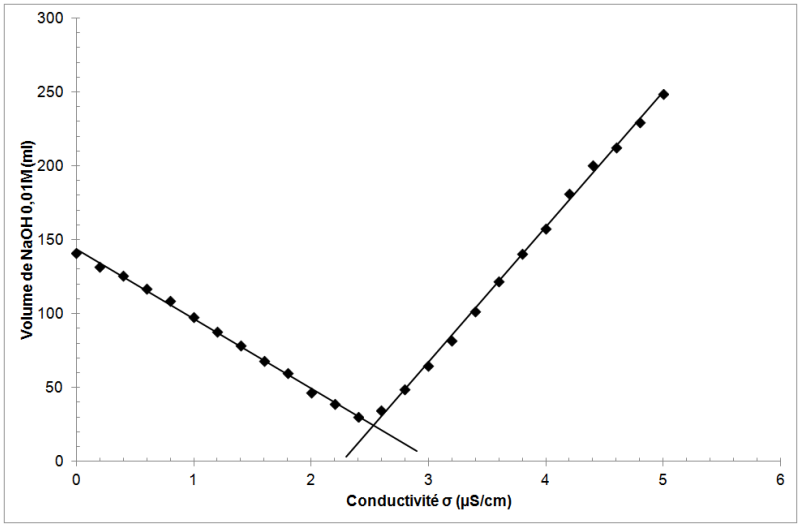


FIGURE 2.5 – Courbe de dosage, par de la soude à 0,01M, d'une suspension de nanocristaux de cellulose ($m_{cellulose}$ = 101mg) préparée par hydrolyse à l'acide sulfurique de linters de coton à 63°C pendant 30 minutes.

D'après la courbe de dosage, le volume équivalent de soude est V_{eq} = 2,5 ml. Ceci correspond à un degré de substitution d_S = 0,04 et à un taux de soufre τ_S = 0,8%. Nous en déduisons un taux surfacique de charge des CNC de 0,57 e/nm^2 (voir l'annexe B §I.2 pour le détail des calculs). Ces valeurs sont similaires à celles trouvées pour des suspensions faites dans les mêmes conditions expérimentales [Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008, Jean et al., 2008].

I.2.2.2 Mesure de potentiel zeta

Un autre moyen de connaître la charge de surface et de juger de la stabilité colloïdale, est de mesurer le potentiel zeta ζ des nanocristaux de cellulose. La mesure du potentiel zeta d'une suspension de CNC à 0,01% est réalisée avec le *Nanosizer Nano-ZS* (**Malvern Instruments**). La mesure est réalisée en présence d'un tampon salin de chlorure de sodium (NaCl 50 mM). Dans ces conditions le potentiel zeta est ζ_{CNC} = -29,0 ± 0,8 mV.

I.2.3 La coalescence limitée par des nanocristaux de cellulose

Dans le cas des émulsions de Pickering, il est possible d'obtenir des émulsions relativement monodisperses et dont le diamètre moyen des gouttes est contrôlé grâce à la coalescence limitée. Pour cela il est donc nécessaire de connaître la surface que peut recouvrir une masse de nanocristaux de cellulose m_{CNC} donnée. Pour le calcul, il est supposé que pour un volume d'huile V_h, une émulsion parfaitement monodisperse est obtenue avec des gouttes de diamètre D_g. La surface S_h à recouvrir est :

$$S_h = \pi D_g^2 \frac{3V_h}{\pi D^3/2} = \frac{6V_g}{D_g} \tag{2.1}$$

Les nanocristaux de cellulose sont considérés comme des parallélépipèdes de longueur L, de largeur l et de hauteur h. La surface S_{CNC} qu'une masse m_{CNC} de nanocristaux de cellulose peut

recouvrir est :

$$S_{CNC} = N_{CNC}Ll = \frac{m_{CNC}}{h\rho_{CNC}} \tag{2.2}$$

Où N_{CNC} est le nombre de CNC et ρ_{CNC} est la masse volumique des CNC (1550 kg/m^3).

En supposant, un recouvrement total de l'interface huile/eau par l'ensemble des nanoparticules i.e $S_h = S_{CNC}$, les équations (2.1) et (2.2) donne :

$$D_g = \frac{6h\rho_{CNC}V_h}{m_{CNC}} \tag{2.3}$$

I.3 Préparation des solutions de xyloglucanes

Les xyloglucanes sont préparés en suivant le protocole décrit par Muller *et al* [Muller et al., 2011]. Une poudre de xyloglucane de graine de tamarin (*Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., grade 3S*) est utilisée.

Les xyloglucanes sont dissous dans de la soude à 10 mM (pH=12), pendant 3h à une température de 110°C. Le rapport volume de solvant sur masse de poudre est de 100 (ex : 10 g de poudre de xyloglucane pour 1 L de soude). Un montage à reflux est utilisé lors de la dissolution pour éviter les pertes en eaux par évaporation.

La solution est ensuite centrifugée pendant 30 minutes à 20 335 g (11 200 tr/min ; *6K15, rotor n° 12256*, **Sigma**). Le surnageant est dialysé dans une membrane de 14,000 à l'eau déionisée, jusqu'à ce que la conductivité soit de quelques µS. La siccité d'une solution ainsi préparée est de l'ordre de 0,5-0,7% et la masse molaire moyenne des chaînes de xyloglucanes est de 470 000 g.mol^{-1} [Muller et al., 2011]. La solution est conservée à 4°C, et pour éviter la contamination bactérienne quelques gouttes de chloroforme ou quelques milligrammes d'azoture de sodium sont ajoutés à la solution.

I.4 Marquage fluorescent des CNC et XG pour l'observation en microscopie confocale

I.4.1 Informations générales

D'après Nielsen et al [Nielsen et al., 2010], un fluorophore contenant une fonction isothiocyanate (-N=C=S) peut être greffé sur les nanocristaux de cellulose via ces groupements hydroxyles (-OH). Les xyloglucanes possédant le même squelette de glucose que la cellulose, il est donc également possible de les marquer avec un fluorophore en utilisant le même protocole. Les fluorophores utilisés sont la Rhodamine B isothiocyanate (RBITC, **Sigma Aldrich**) pour les CNC et la fluoréscéine

isothiocyanate (FITC, **Sigma Aldrich**) pour les XG. Ces fluorophores se trouvent sous forme de poudre.

TABLEAU 2.1 – Formule chimique et propriétés des fluorophores utilisés.

	Formule chimique	MW (g.mol^{-1})	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Molécule
FITC	$C_{21}H_{11}NO_5S$	389,382	495	521	
RBITC	$C_{29}H_{30}ClN_3O_3S$	536,08	540	625	

I.4.2 Protocole de greffage

La réaction de greffage est réalisée, pendant 72 h à température ambiante et à l'abri de la lumière, dans de la soude à 0,1 M. Le groupement isothiocyanate du fluorophore réagit avec le groupement hydroxyle de la cellulose suivant la réaction suivante :

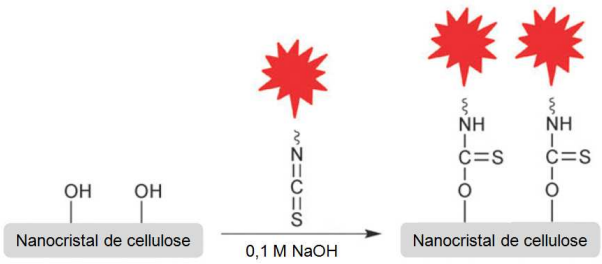


FIGURE 2.6 – Schéma de la réaction de greffage du RBITC sur un nanocristal de Cellulose. D'après [Nielsen et al., 2010]

Les quantités de fluorophore à utiliser sont calculées à partir de [Dong and Roman, 2007]. Pour la cellulose, la masse de RBITC est divisée par 10 de manière à ne pas substituer trop de groupements hydroxyle afin de ne pas gêner les interactions avec les XG. Ainsi, le calcul des masses de FITC et RBITC est :

$$m_{FITC} = m_{XG} * 0.32 * M_{W,FITC} \; en \; mg \tag{2.4}$$

$$m_{RBITC} = m_{CNC} * 0.032 * M_{W,RBITC} \; en \; mg \tag{2.5}$$

où m_{XG} est la masse de xyloglucanes en g, m_{CNC} la masse de cellulose en g, $M_{W,FITC}$ la masse molaire de la fluorescéine isothiocyanate en g.mol^{-1} et $M_{W,RBITC}$ la masse molaire de la rhodamine B isothiocyanate en g.mol^{-1}.

Pour le calcul des masses de XG et de CNC, le volume en millilitre de la solution de XG ou de la suspension de CNC est considéré équivalent à sa masse en gramme, soit :

$$m_{XG} = \frac{C_{XG} * V_{sol,XG}}{100} \; au\ lieu\ de \; \frac{C_{XG} * m_{sol,XG}}{100} \tag{2.6}$$

$$m_{CNC} = \frac{C_{CNC} * V_{susp,CNC}}{100} \; au\ lieu\ de \; \frac{C_{CNC} * m_{susp,CNC}}{100} \tag{2.7}$$

où C_{XG}, $V_{sol,XG}$, $m_{sol,XG}$ sont respectivement la concentration (en %), le volume (ml) et la masse (en g) de la solution de xyloglucanes utilisée et C_{CNC}, $V_{sol,CNC}$, $m_{sol,CNC}$ la concentration (en %), le volume (ml) et la masse (en g) de la suspension de nanocristaux de cellulose utilisée.

Pour le greffage, le fluorophore est dissous dans la solution de xyloglucanes (0,1-0,2%) ou dans la suspension de nanocristaux de cellulose (2-2,5%). De la soude à 1 M (mol/l) est ajoutée pour atteindre la concentration finale de 0,1 M. Les mélanges sont mis à réagir à température ambiante, sous agitation, pendant 72h à l'abri de la lumière.

I.4.3 Purification des CNC marqués

Une fois le marquage terminé, la suspension est centrifugée à 20 335 g pendant 30 minutes (11 200 tr/min ; *6K15*, **Sigma**). Le surnageant est retiré et le culot resuspendu dans une solution de NaOH à 0,1 M. Ce processus est répété 2 fois supplémentaires. Puis la suspension est placée dans une membrane à dialyse et dialysée à l'eau déionisée jusqu'à ce que le bain de dialyse devienne incolore (la majorité du fluorophore non greffé à la cellulose a été évacué). Enfin, pour terminer la purification, la suspension est lavée dans une cellule d'ultrafiltration. Ce même dispositif permet de concentrer la suspension de cellulose jusqu'à 3-5%. Les suspensions marquées sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Quelques gouttes de chloroforme ou quelques grammes d'azoture de sodium y sont ajoutés pour éviter la prolifération bactérienne. Les suspensions de nanocristaux de cellulose marquées à la rhodamine isothiocyanate sont référencées comme CNC-RBITC.

I.4.4 Purification des XG marqués

Une fois le marquage terminé, la solution de xyloglucanes est placée dans une membrane de dialyse et dialysée à l'eau déionisée jusqu'à ce que le bain de dialyse deviennent incolore. Dans ce cas, l'étape de centrifugation n'est pas réalisée car les XG étant en solution, ils ne peuvent être séparés du solvant par ce procédé. Puis, pour terminer la purification, la solution est lavée dans une cellule d'ultrafiltration. Ce même dispositif permet de concentrer la solution de XG jusqu'à 0,1-0,2%. Les solutions marquées sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Quelques gouttes de chloroforme ou quelques grammes d'azoture de sodium y sont ajoutés pour éviter la prolifération bactérienne. Les solutions de xyloglucanes marqués à la fluorescéine isothiocyanate sont référencées comme XG-FITC.

I.4.5 Caractérisation du greffage de fluorophore sur des CNC et XG par absorbance

Pour déterminer la quantité de fluorophore greffée, les spectres d'absorbances d'une suspension de CNC-RBITC (3%) et d'une solution de XG-FITC (0,06%) ont été étudiés. Des courbes d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en fluorophore ont été réalisées sur des gammes de dilution de solution de RBITC (0,4-200 mg/l) et FITC (5-50 mg/l). Les concentrations maximales des gammes de dilution en RBITC et FITC correspondent aux concentrations en fluorophores lors des marquages.

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-Visible (*Cary-50 Bio*, **Varian**). Pour la mesure, l'échantillon étudié est placé dans une cuve de 1 ml, possédant un trajet optique de 1 cm. Sur le spectre obtenu, seules l'absorbance maximale (A_{max}) et la longueur d'onde correspondante (λ_{max}) sont relevées. Avant chaque mesure, le spectre d'absorbance du solvant de chaque échantillon est mesuré et enregistré comme ligne de base : c'est le blanc. Il est soustrait automatiquement par l'appareil au spectre de l'échantillon correspondant. Dans le cas des gammes de dilution, le blanc est de l'eau déionisée. Pour la suspension CNC-RBITC, une suspension de CNC non marqués de même concentration est utilisée comme blanc. Enfin, pour la solution de XG-FITC, une solution de XG non marqués de même concentration est utilisée comme blanc. Pour connaître le veillissement de la fluorescence des CNC-RBITC et XG-FITC des échantillons préparés quelques jours avant la mesure d'absorbance (référencés comme (1)) et des échantillons préparés 5 mois avant la mesure d'absorbance (référencés comme (2)) sont comparés. Les valeurs d'absorbances et de longueurs d'ondes sont répertoriées sur le tableau 2.2.

Les objets greffés possèdent une absorbance maximale à la même longueur d'onde que les solutions de leur fluorophores respectifs. De plus, cette valeur maximale coïncide avec la longueur d'onde d'excitation du FITC et du RBITC (tab.2.1 & 2.2). Cette absorbance provient des molécules greffées et non de l'objet en lui-même qui ne présente pas d'absorbance particulière à cette longueur d'onde et dont le spectre a été soustrait des mesures.

TABLEAU 2.2 – Mesure de l'absorbance maximale de solutions de FITC, de solutions de RBITC, de suspensions de CNC marqués et de solutions de xyloglucanes marqués .

Échantillons	**Blanc**	λ_{max} **(nm)**	**absorbance**
RBITC 200 mg/l	eau déionisée	saturé	saturé
RBITC 40 mg/l	eau déionisée	555	2,928
RBITC 21 mg/l	eau déionisée	555	1,542
RBITC 4 mg/l	eau déionisée	555	0,291
RBITC 2 mg/l	eau déionisée	555	0,176
RBITC 0,4 mg/l	eau déionisée	555	0,035
RBITC 0,2 mg/l	eau déionisée	555	0,024
CNC-RBITC (1) 3%	CNC 3%	560	0,838
CNC-RBITC (2) 3%	CNC 3%	560	0,404
FITC 50 mg/l	eau déionisée	480	0.98
FITC 10 mg/l	eau déionisée	480	0.235
FITC 5 mg/l	eau déionisée	455	0.125
XG-FITC (1) 0,6%	XG 0,6%	480	0,190
XG-FITC (2) 0,6%	XG 0,6%	455	0,112

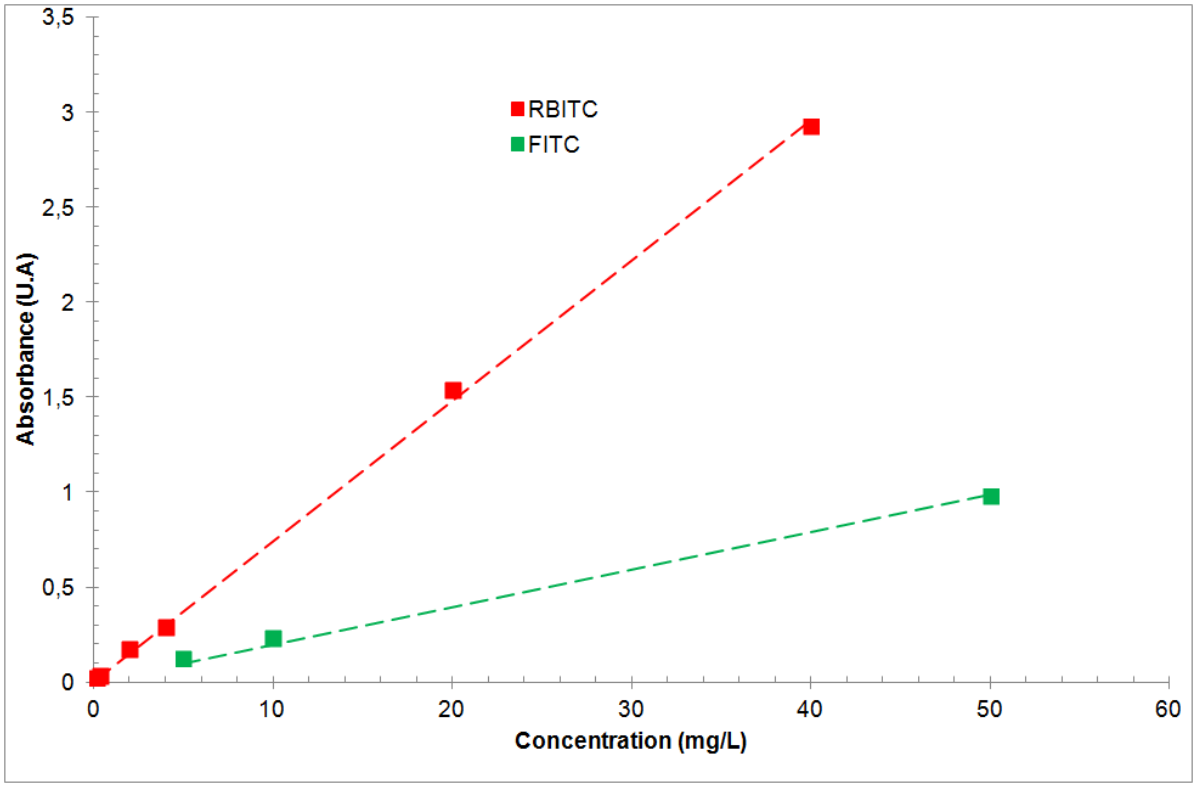


FIGURE 2.7 – Absorbance maximale d'une solution de RBITC et d'une solution de FITC en fonction de la concentration en fluorophore.

Les lois de l'absorbance maximale (longueur d'onde fixe) du FITC et du RBITC en fonction de la concentration sont linéaires. Ceci est en accord avec la loi de Beer Lambert :

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda . l . C \tag{2.8}$$

Où ϵ_λ est l'absorptivité molaire (L.mol^{-1}.cm^{-1}), l la longueur du trajet optique (1 cm dans notre cas) et C la concentration en molécules fluorescentes.

Grâce aux courbes présentées figure 2.7, il est possible de déterminer la concentration de fluorophore dans les suspensions de CNC-RBITC et les solutions de XG-FITC. Il y a respectivement une concentration de 11,7 mg/l et 5,3 mg/l de RBITC dans les suspensions de CNC-RBITC à 30 g/l (1) et (2). Nous supposons que tous les fluorophores détectés sont greffés. Le taux de greffage de RBITC sur la cellulose est donc de 0,69 µmol.g^{-1} pour la suspension (1) et de 0,33 µmol.g^{-1} pour la suspension (2).

Plus de la moitié de la fluorescence à disparu en 5 mois. Il est donc préférable de travailler pour la microscopie confocale avec des CNC-RBITC préparés peu de temps avant l'observation pour obtenir un maximum de signal. Cependant, les capsules préparées avec ces suspensions devraient pouvoir se conserver plusieurs mois avant de perdre totalement leur fluorescence.

D'après la figure 2.7, il y a respectivement une concentration de 8,0 mg/l et 4,6 mg/l de FITC dans les solutions de XG-FITC à 0,6 g/l (1) et (2). Le taux de greffage de FITC sur les xyloglucanes est donc de 3,34 µmol.g^{-1} pour la solution (1) et de 1,97 µmol.g^{-1} pour la solution

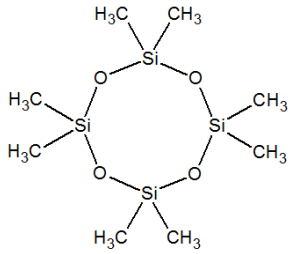
(2). Comme dans le cas des CNC-RBITC, près de la moitié de la fluorescence disparaît 5 mois après la préparation.

II Les méthodes d'émulsification

Deux méthodes d'émulsification ont été employées. Tout d'abord, un homogénéiseur-disperseur a été utilisé pour fabriquer des émulsions rapidement afin de tester les propriétés stabilisantes des CNC. Les gouttes ainsi formées ont un diamètre allant du micromètre à la dizaine de micromètres. Une fois les conditions stabilisantes trouvées, l'émulsification a été réalisée par la filtration d'un pré-mélange huile/eau au travers d'une grille calibrée. Dans l'optique des dépôts de couches, le ratio huile/eau est toujours inférieur à 1/10. En effet, les gouttes ne doivent pas être trop nombreuses dans la phase continue pour éviter les problèmes de pontages lors des dépôts et limiter la coalescence.

L'huile utilisée pour les émulsions est l'octaméthylcyclotetrasiloxane (D4). Nous avons choisi d'utiliser une huile silicone car ces huiles sont régulièrement utilisées pour former des émulsions de Pickering du moins dans la littérature que nous avons étudiée. Quelques unes des propriétés physiques du D4 sont présentées dans le tableau 2.3. Elle est quasiment insoluble dans l'eau (6 µg/L), les gouttes seront insensibles au mûrissement d'Ostwald qui nécessite une certaine solubilité de la phase dispersée dans la phase continue. De plus, sa densité étant de 0,95, les gouttes vont donc crémer. Les phénomènes pouvant mener à la coalescence, et donc à la destruction de l'émulsion, sont la floculation et le crémage. Enfin, sa température de fusion est 17,5°C (Tab. 2.3), elle est donc très proche de la température ambiante. Les échantillons sont conservés à température ambiante (25°C) pour éviter une solidification du coeur des capsules.

TABLEAU 2.3 – Principales caractéristiques physiques du D4 .

Propriétés	**Valeur**
Masse molaire	296.62 g/mol
Point de fusion	17.5°C
Point d'ébullition	175-175.8°C
Densité (D_4^{20})	0.95-0.96
Densité de vapeur (air=1)	10.2
Pression de vapeur saturante	90-100 Pa à 20 °C
Indice de refraction	1,395-1,397
Viscosité	$\approx\ 2,5.10^{-2} Pa.s$
Molécule	

II.1 Homogénéiseur-disperseur

Pour déterminer les propriétés stabilisantes des nanocristaux de cellulose, des émulsions ont été réalisées à l'aide d'un homogénéiseur-disperseur (*Ultraturrax T25, tête de dispersion S-25N-18G,* **Janke & Kunkel, Ika Laborteknik**). Cette technique permet d'obtenir en quelques minutes des émulsions polydisperses dont les gouttes ont des tailles allant du micromètre à la dizaine de micromètres. Par la haute vitesse du rotor, le fluide à travailler est aspiré automatiquement dans le sens axial dans la tête de dispersion, et est comprimé ensuite dans le sens radial à travers les fentes du système rotor/stator. Le matériel est ainsi soumis à de très hautes forces de cisaillement et de poussée. Dans l'interstice entre le rotor et le stator, il se forme en plus une haute turbulence donnant lieu à un mélange optimal de la suspension Fig.2.8.

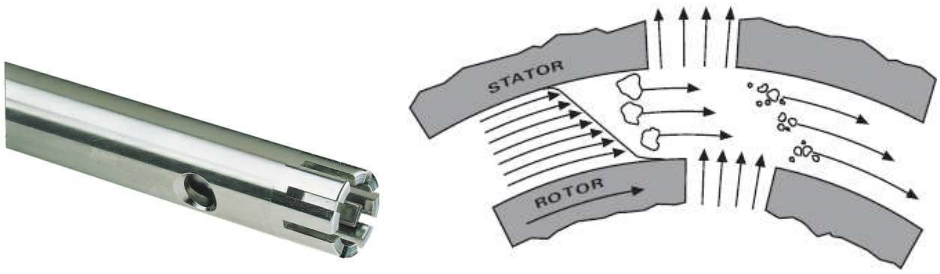
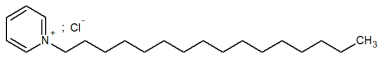


FIGURE 2.8 – Schéma du principe de la dispersion-homogénéisation rotor-stator par les Ultra-Turrax IKA, www.imlab.com.

Les émulsions sont réalisées avec un rapport huile/eau de 1/10. Le volume standard utilisé est de 10 ml d'eau pour 1 ml de D4. Dans ces conditions, pour obtenir un rayon moyen final de 25 µm, il faut dans l'eau 2,23 mg de CNC (2.3) soit 90 µl d'une suspension à 2,5%. Avant l'émulsification, les CNC sont ajoutés à l'eau, le tout est soniqué pendant 1 minute. Le mélange huile/eau est émulsifié à 8000 tr/min pendant quelques minutes à l'ultraturrax.

En complément des CNC, du chlorure de sodium (NaCl) ou un tensioactif cationique est ajouté à la phase aqueuse avant émulsification afin de voir leur effet sur la stabilité de l'émulsion. Le tensio-actif utilisé est le chlorure de cétylpyridinium (CPC) (Tab. 2.4). C'est un ammonium quaternaire cationique qui se présente sous la forme d'un solide à température ambiante. Le CPC est composé d'une tête " pyridinium " hydrophile chargée positivement, et une queue hydrophobe. Ces charges positives améliorent les interactions attractives entre l'huile et les CNC.

TABLEAU 2.4 – Formule chimique et propriétés principales du CPC.

Propriétés	**Valeur**
Formule chimique	$C_{21}H_{38}ClN - H_2O$
Masse molaire	358 g.mol^{-1}
Molécule	

D'après Varade et al [Varade et al., 2005], la tête polaire des molécules de CPC mesure S_{CPC} = 42Å^2. La concentration C_{CPC} de la solution est donnée en g/L. Ainsi pour un volume V_{CPC}

d'une solution CPC à C_{CPC}, en supposant que toutes les molécules de CPC sont utilisées pour stabiliser l'interface eau/huile, il est possible de recouvrir une surface S :

$$S = S_{CPC} * N_{CPC} = S_{CPC} \frac{m_{CPC} N_a}{M_{w,CPC}} \tag{2.9}$$

avec N_a le nombre d'Avagadro (6,02 10^{23} mol^{-1}) et $M_{w,CPC}$ (385 g/mol) la masse molaire du chlorure de cétylpyridinium. Comme pour les CNC, le diamètre maximum des gouttes d'une émulsion monodisperse stabilisée par un volume V_{CPC} d'une solution de CPC de concentration C_{CPC} (g/l) est donné par l'égalité $S_h = S$, soit d'après les équations (2.1) et (2.9) :

$$D_g = \frac{6 M_{w,CPC} V_h}{S_{CPC} m_{CPC} N_a} \tag{2.10}$$

avec V_h le volume d'huile.

II.2 Filtration sur une grille calibrée

Dans ce cas, le mélange huile/(eau + émulsifiant) est poussé dans une enceinte sous pression à travers une grille calibrée. Grâce au cisaillement exercé, l'huile est fractionnée en gouttes de taille contrôlée par les pores de la grille. Un schéma représentatif du fractionnement des gouttes lors du passage à travers la grille est présenté sur la figure 2.9. Les paramètres déterminant la taille des gouttes sont la maille de la grille calibrée et le taux de cisaillement lié à la pression dans l'enceinte.

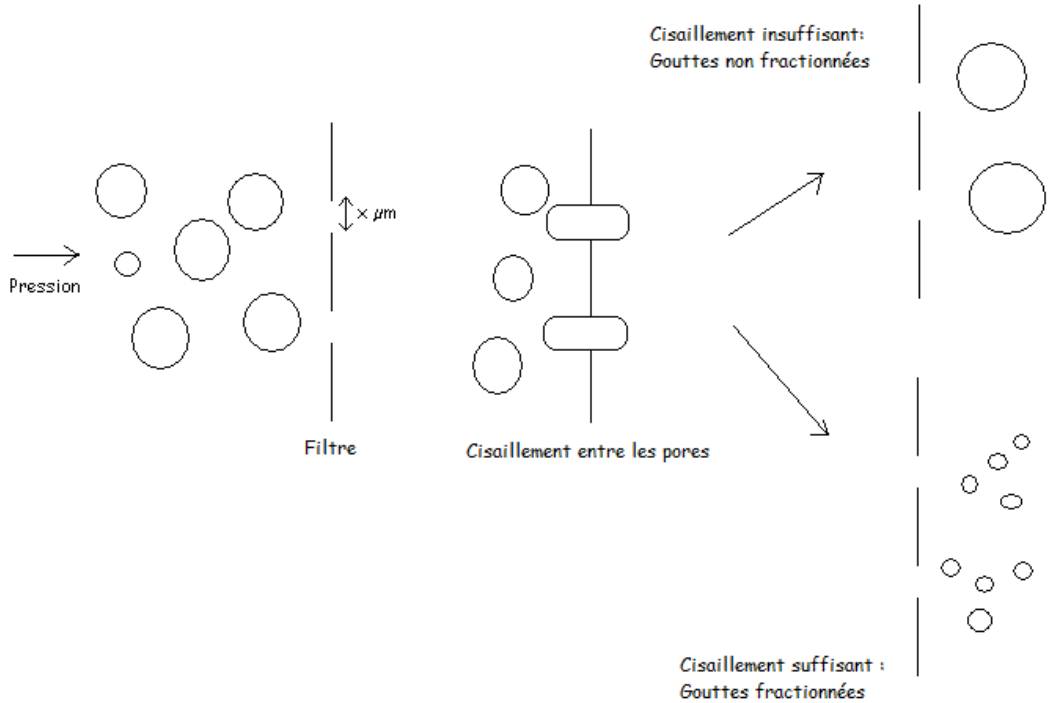


FIGURE 2.9 – Effet du cisaillement au niveau de la toile à bluter sur le diamètre des gouttes.

Pour le montage expérimental, l'enceinte utilisée est un filtre sous pression (*SM 162 4*, **Sartorius**) ; les grilles utilisées sont des toiles à bluter [4] de 7 µm, 21 µm, 40 µm et 100 µm. Le schéma représentatif du montage expérimental et une photographie en microscopie optique d'une toile à bluter sont présentés sur la figure 2.10.

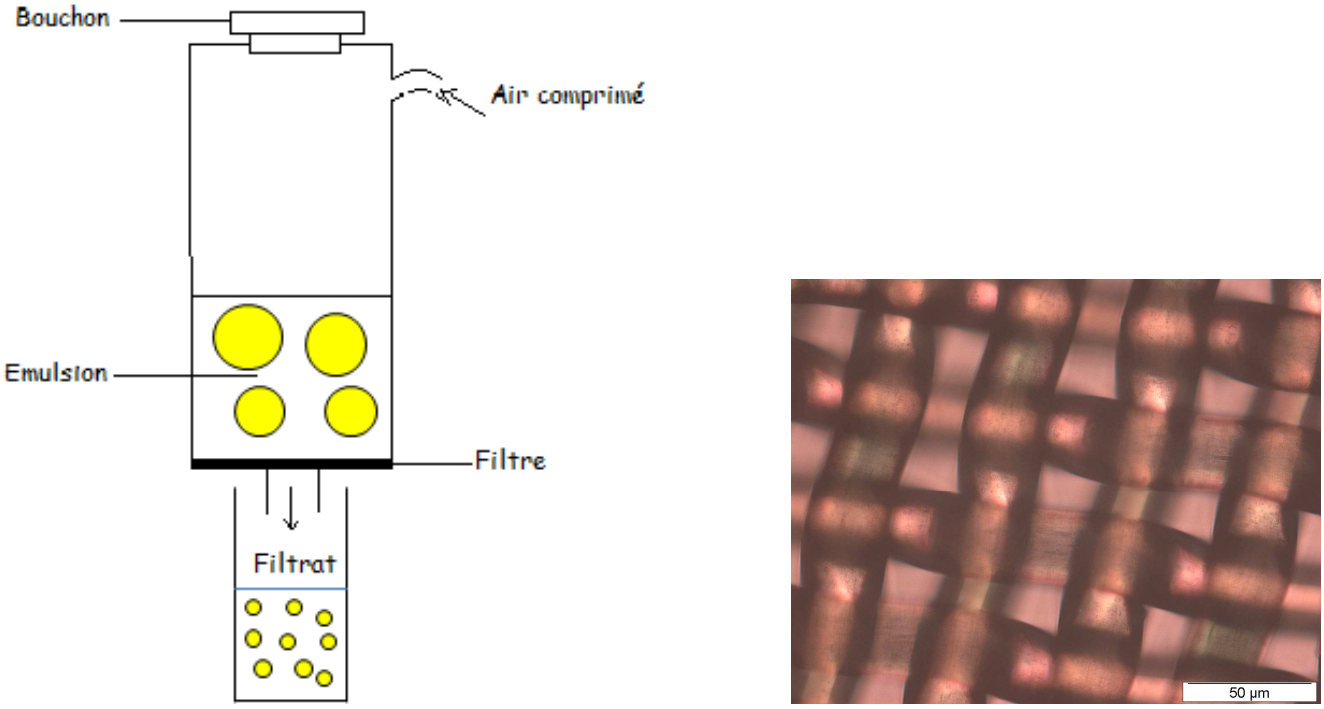


FIGURE 2.10 – Représentation schématique du montage expérimental pour l'émulsification d'un pré-mélange par une grille calibrée ; Image de microscopie optique d'une toile à bluter de 21 µm.

Nous avons identifié après analyse des données que la pression pourrait être un paramètre important, alors qu'elle n'est pas contrôlée à l'intérieur de l'enceinte. Une grande attention est donc portée sur ce point et nous essayons d'avoir un débit relativement constant d'une émulsification à l'autre, sachant qu'il est difficile d'obtenir un cisaillement parfaitement constant d'un passage à l'autre du mélange huile/(eau + émulsifiant) à travers la grille. Afin d'améliorer le cisaillement et diminuer la taille des gouttes en sortie un viscosifiant, la carboxyméthylcellulose (CMC), est ajouté à la phase aqueuse.

Pour l'émulsification, 5 ml d'huile sont dispersés manuellement dans 50 ml d'eau contenant 30 g/l de CMC (ν = 400 -500 mPa [Ghannam and Esmail, 1997], se référer à l'annexe pour le détail du calcul) , 50 mg de CPC et 50 mg de CNC. Le pré-mélange est ensuite passé plusieurs fois à travers une grille calibrée (une toile à bluter de 7 µm, 21 µm ou 40 µm), dans un filtre Sartorius sous pression. L'émulsion est rincée 3 fois avant de débuter le dépôt de la première couche de xyloglucanes. Pour le rinçage, l'émulsion est placée dans des tubes à essais de 10 ml en pyrex ou dans des tubes en plastique de 15 ml (**Falcon**). Ces derniers sont centrifugés à 1000 tr/min pendant 10 minutes (*1-6P*, **Sigma Fisher Bioblock Scientific**), le sous-nageant est ensuite aspiré avec une seringue et la crème est redispersée dans de l'eau déionisée. La figure 2.11 présente

4. Tissu de filtration en nylon dont le diamètre des pores, appelé maillage, est compris entre 1 et 1000 µm

un schéma explicatif de procédé de rinçage.

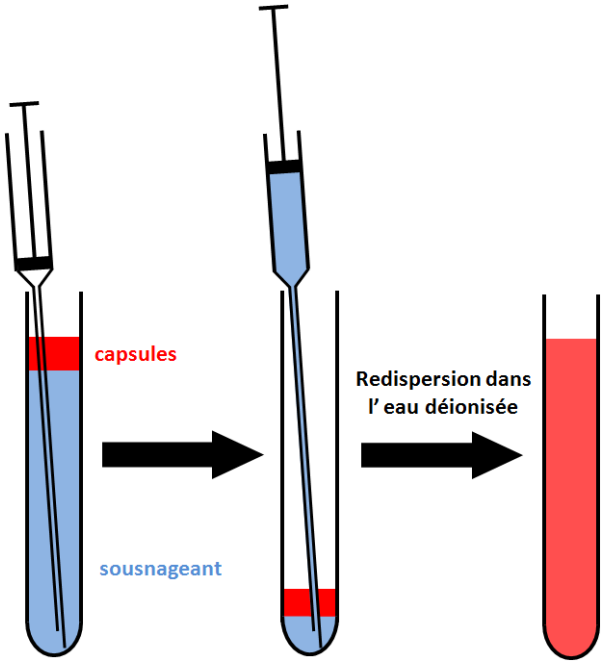


FIGURE 2.11 – Schéma du procédé de rinçage entre chaque dépôt de couche.

III Élaboration des capsules multicouches CNC/XG

III.1 Émulsification

Les émulsions sont réalisées par émulsification d'un pré-mélange sur une toile à bluter comme décrit précédemment. Deux types de capsules sont fabriqués. Des capsules au coeur "liquide" pour l'étude de la déformation et des capsules au coeur "solide" pour l'étude de la paroi à l'échelle nanométrique (épaisseur et organisation).

III.1.1 Coeur "liquide"

Les capsules au coeur "liquide" sont fabriquées à partir d'une émulsion H/E d'octaméthylcyclotétrasiloxane, sur une toile à bluter de 21 µm. Elle seront référencées 21 µm D4 CPC/CNC. L'huile utilisée pouvant être dissoute ou évaporée, une étude des formes caractéristiques des déformations des capsules ainsi préparées est présentée dans le chapitre 5.

III.1.2 Coeur "solide"

Pour observer la paroi des capsules à l'échelle nanométrique, il est nécessaire d'utiliser la microscopie électronique. Cette technique impose des observations dans un vide poussé menant à la disparition du coeur d'huile et à un écrasement des capsules. Pour les étudier avec cette

technique, l'octaméthylcyclotétrasiloxane a été remplacé par une résine liquide non-miscible à l'eau (*LR white*, **London Resin Company**). Cette dernière peut être polymérisée par l'ajout d'un accélérateur ou thermiquement en la plaçant 4 jours à 60°C. Ces méthodes sont valides pour la résine pure, mais il est supposé qu'elles fonctionnent également pour une émulsion de résine dans l'eau. Ainsi deux méthodes ont été utilisées pour solidifier la résine :

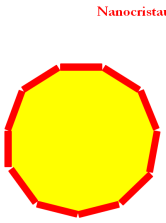
- Polymérisation thermique : une émulsion de LR white dans l'eau stabilisée par des CNC est réalisée sur une toile à bluter de 21 µm. Les couches sont déposées et une fois les capsules prêtes, l'échantillon est placé à 60°C pour polymérisation. A l'état liquide, la résine est moins dense que l'eau et forme une crème. Une fois polymérisée, elle devient plus dense et forme un culot lors de la centrifugation. Ce changement de densité permet de juger de l'avancée de la polymérisation du coeur et en déduire à quel moment celui-ci est solide. De telles capsules sont référencées avec le préfixe : 21 µm LRW CPC/CNC.
- Polymérisation par un accélérateur : Un accélérateur est ajouté à la résine. Elle est ensuite émulsifiée sur une toile à bluter de 100 µm. Les gouttes deviennent solides quelques minutes après l'émulsification. De telles capsules sont référencées avec le préfixe : 100 µm LRW + acc CPC/CNC.

III.2 Dépôt de couches

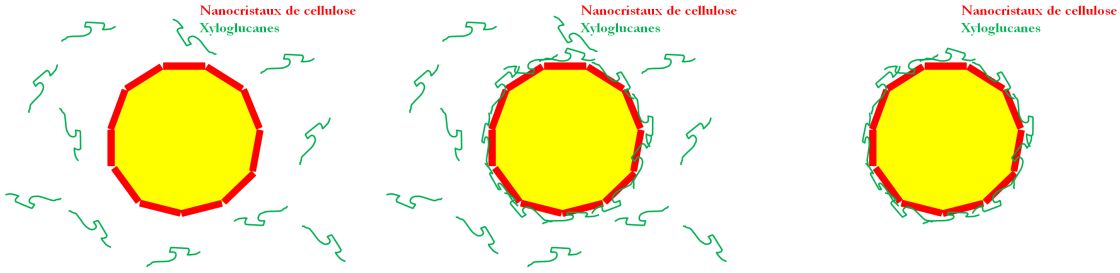
D'après [Jean et al., 2009], l'épaisseur d'une bicouche est d'environ 9 nm. Rappelons que la paroi primaire des cellules végétales a une épaisseur de 100 nm. Il faut déposer une dizaine de couches pour atteindre cette taille. Nous avons choisi de déposer un maximum de 15 bicouches pour former les capsules, dont la paroi devrait avoir dans ce cas une épaisseur de 135 nm environ. Les capsules étudiées dans ce document possèdent 5, 10 ou 15 bicouches.

Pour les dépôts, les gouttes sont trempées dans une solution de XG (C_{XG} = 0,05-0,2% w/w) ou une suspension de CNC (C_{CNC} = 2-7% w/w) (Fig. 2.12). La même suspension de nanocristaux de cellulose et la même solution de xyloglucanes sont utilisées pour 4-5 dépôts consécutifs. Les dépôts de couches sont réalisés dans des tubes à essais en pyrex de 10 ml ou des tubes *Falcon* de 15 ml. Les capsules sont laissées 20 à 30 minutes dans la suspension de CNC ou la solution de XG, sous agitation. Jusqu'à 5 bicouches les émulsions sont agitées manuellement (le tube est retourné et remis à l'endroit) toutes les 5 minutes car les gouttes coalescent si le tube est placé sur une roue motorisée (*rotator SB2*, **Stuart**). Une fois ces bicouches déposées, les capsules sont assez solides pour être placées sur la roue sans coalescer. Une fois le dépôt terminé, l'émulsion est rincée avant de passer à la couche suivante. Le protocole de rinçage utilisé est le même que pour la préparation des émulsions au dépôt de couche. Les tubes contenant les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 1000 tr/min (95 g, *1-6P*, **Sigma Fisher Bioblock Scientific**), le liquide est aspiré à la seringue et la crème ou le culot sont redispersés dans de l'eau déionisée. Les capsules sont rincées 3 fois après un dépôt de CNC et 2 fois après un dépôt de XG. De la même manière que pour le dépôt d'une couche, le tube est centrifugé, le sousnageant ou le surnageant est aspiré à la seringue et la

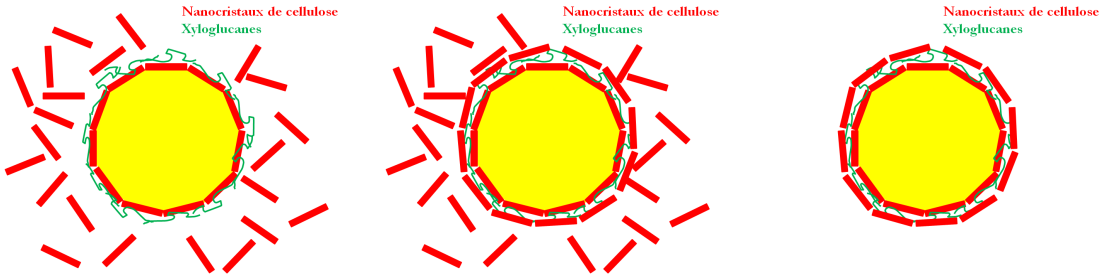
crème ou le culot est resuspendu dans la suspension de CNC ou la solution de XG. Le processus de dépôt couche par couche de CNC et de XG sur une goutte d'huile dans l'eau stabilisée par des CNC est illustré sur la figure 2.12.



(a) Emulsion initiale stabilisée par des CNC.



(b) Dépôt d'une couche de XG et rinçage.



(c) Dépôt d'une couche de CNC et rinçage.

FIGURE 2.12 – Schéma du dépôt couche par couche de CNC/XG sur une goutte de D4 ou de LR White.

Dans la suite de ce document, toutes les capsules (sauf si mentionné) sont terminées par une couche de nanocristaux de cellulose. La charge de ces particules assure une répulsion entre les capsules et évite la formation d'agrégats. Une capsule dite de 5 bicouches correspond en réalité à 4,5 bicouches, 5 couches de CNC et 4 couches de XG, notée CPC/CNC/$(XG/CNC)_4$. Cette approximation est faite car les propriétés mécaniques des capsules proviennent essentiellement des couches de nanocristaux de cellulose, les xyloglucanes étant un liant entre chaque couche. Les capsules étudiées par la suite seront 21 µm D4 CPC/CNC, CPC/CNC/$(XG/CNC)_4$, CPC/CNC/$(XG/CNC)_9$, CPC/CNC/$(XG/CNC)_{14}$, soit l'émulsion initiale de D4 dans l'eau préparée sur une maille de 21 µm, et les capsules de 5, 10 et 15 bicouches qui en sont issues. La même notation est utilisée pour les échantillons à coeur solide soit 21 (100) µm LRW (+ acc) CPC/CNC et 21 (100) µm LRW (+ acc) CPC/CNC/$(XG/CNC)_{4/9/14}$.

III.3 Caractérisation de la paroi des capsules

III.3.1 Dépôt de couches fluorescentes et mesure d'intensité

Les capsules fluorescentes sont préparées en suivant le protocole de dépôt décrit au paragraphe III.2. Lors du dépôt de la couche d'intérêt, les CNC-RBITC ou les XG-FITC sont utilisés en remplacement des CNC et XG, non fluorescents. Les capsules sont rincées avant observation pour limiter le bruit de fond dû aux particules fluorescentes non déposées sur les capsules. Pour l'observation, 3 µl de capsules sont déposés sur une lame (*Superfrost plus slide White 4951+*, **Electron Microscopy Sciences**) et recouverts d'une lamelle circulaire d'un diamètre de 15 mm (**Electron Microscopy Sciences**). L'ensemble est scellé avec du vernis à ongles pour empêcher l'évaporation de l'eau et le mouvement des capsules.

III.3.2 Préparation de capsules pour l'observation en MET

Afin de ne pas avoir un dégonflement ou un éclatement de nos capsules dus à la dissolution du coeur, des capsules à coeur solide ont été utilisées. Les capsules sont incluses en suivant le protocole donnée dans l'annexe A §III.3.

Une fois la résine polymérisée, elle est coupée à l'ultramicrotome afin de pouvoir les observer en microscopie électronique. Dans un premier temps, des coupes semi-fines de 1 µm sont réalisées avec un couteau en diamant (Histo). Elles sont déposées sur des lames de verre, séchées et colorées au bleu de toludine. Le colorant va marquer la cellulose, permettant de repérer les capsules en microscopie optique. Un exemple d'image en microscopie optique de ces coupes est donné sur la figure 2.13. Dans le cas présent nous observons la présence dans la coupe de la paroi des capsules colorée par le bleu de toludine. Cette étape permet donc de savoir si des capsules sont présentes dans la partie coupée.

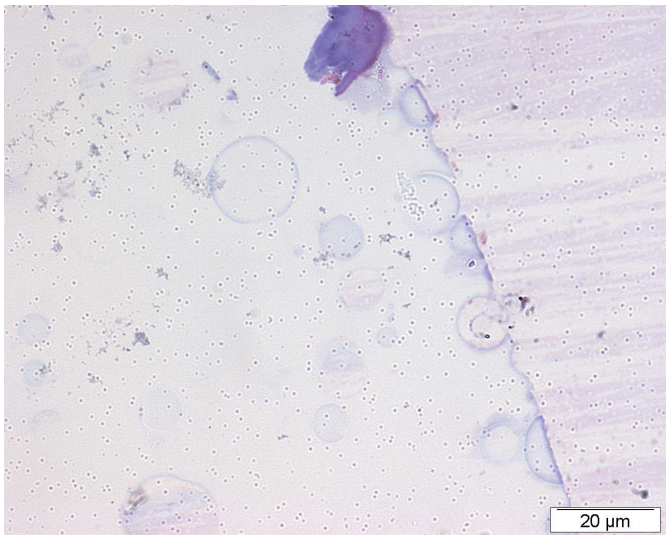


FIGURE 2.13 – Image en microscopie optique d'une coupe de 1mm d'épaisseur, de capsules 21 µm LRW CPC/CNC/(XG/CNC)$_4$ incluses dans la résine LRW, colorées au bleu de toludine.

Si des capsules sont observées dans les coupes semi-fines, des coupes ultrafines (50 nm et 140 nm) sont préparées à l'ultramicrotome avec le couteau (35°). Elles sont déposées sur une grille de cuivre de 5 mm de diamètre. Les grilles sont conservées dans une armoire sèche jusqu'à observation en microscopie électronique en transmission.

III.3.3 Topologie de la paroi : MEB-FEG

Pour observer l'organisation des CNC à la surface de la capsule, la technique employée est la microscopie électronique à balayage à canon à émission de champ (MEB-FEG) qui donne une résolution équivalente à la microscopie en transmission (de l'ordre du nanomètre contre le micromètre pour la microcopie électronique à balayage classique). Les échantillons sont préparés en suivant le protocole décrit dans l'annexe A §IV.2.

Cette technique est préférée au MET pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le MEB-FEG permet d'obtenir une image de la surface des objets et permet de retrouver les volumes. De plus dans le cas du MET, l'image obtenue est la projection de l'ensemble de l'objet observé et l'épaisseur ne peut excéder 200 nm. Le MEB-FEG donne une image de la surface de la capsule et non une projection de l'ensemble comme le MET. Ainsi pour observer l'organisation d'une couche, la microscopie électronique à balayage est la technique la plus adaptée.

IV Déformation des capsules

IV.1 Déformation de capsules hydratées en milieu aqueux

De l'éthanol, de l'acétone ou du terbutyl alcool est ajouté à la suspension de capsules. L'échantillon est homogénéisé au vortex et les capsules sont observées en microscopie optique dans des capillaires plats en verre (0,2*2*100 mm, **Vitrocom**) scellés à la flamme.

IV.2 Déformation de capsules sèches dans des gels

IV.2.1 Inclusion de capsules dans un gel d'acrylamide

Le séchage sur une lame de verre à l'air ambiante ou en étuve ne permet pas d'étudier des capsules sphériques mais des demi-sphères. Pour pouvoir sécher les capsules tout en les gardant sphériques elles sont incluses dans des gels de polyacrylamide (*Acrylamide-Bisacrylamide 30% 29 :1*, **Euromedex**) à 10%, 20% et 30%. Les capsules sont mélangée à la solution d'acrylamide-bisacrylamide. L'acrylamide est polymérisé par l'ajout à la solution de persulfate d'ammonium (APS, **Euromedex**) et de TEMED (**Euromedex**). Le tableau 2.5 présente les quantités en chaque élément utilisé pour former le gel.

TABLEAU 2.5 – Quantité des réactifs utilisés pour la formation de gel d'acrylamide à 10, 20 ou 30%.

	10%	20%	30%
Eau+capsules (µl)	990	490	90
Acrylamide 30% (µl)	500	1000	1400
APS (µl)	10	10	10
TEMED (µl)	2	2	2

Afin de ne pas écraser les capsules, la lame et la lamelle sont séparées grâce à des espaceurs constitués de 4 lamelles de verre de 150 μm d'épaisseur chacune. La lame, les espaceurs et la lamelle couvre objets sont collés entre eux et 500 µl de gel sont ensuite coulés entre la lame et la lamelle. Un schéma du montage est présenté sur la figure 2.14.

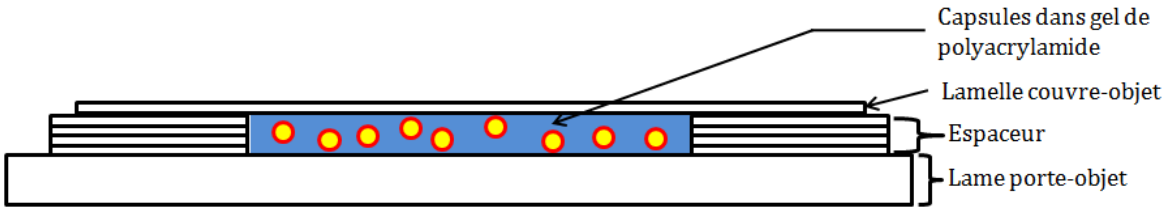


FIGURE 2.14 – Représentation schématique des gels, contenant les capsules, mis en forme entre lame et lamelle.

IV.2.2 Séchage du gel et déformation des capsules

Pour déshydrater la paroi, le gel est séché dans un dessiccateur contenant du pentoxyde de phosphore (P_2O_5). Les échantillons sont laissés une semaine dans cette enceinte. L'huile contenue dans les capsules est ensuite évaporée dans une cloche à vide à une pression de 0,5 Pa et une température de 40 °C, pendant 4 à 48 h. Le temps d'évaporation dépend du nombre d'échantillon présente dans l'enceinte. La figure 2.15 présente un schéma de l'échantillon après séchage.

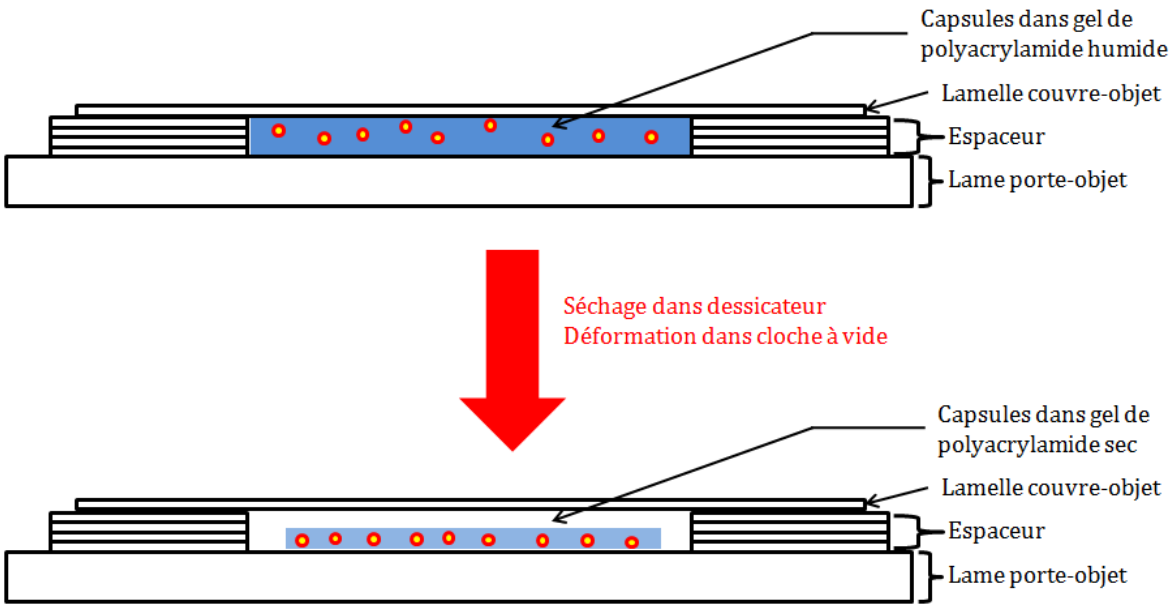


FIGURE 2.15 – Représentation schématique du séchage des gels et de la déformation des capsules sous vide.

Après séchage les gels ont diminué en volume Fig.2.15. Leur épaisseur est passée de 600 µm à 150 µm. La déformation est caractérisée en microscopie optique et confocale.

IV.2.3 Observation de la déformation en microscopie confocale

Les capsules étudiées possèdent 5, 10 et 15 bicouches. Dans chaque cas, uniquement les 5 dernières couches sont fluorescentes. Des schémas de capsules à 5, 10 et 15 bicouches utilisées pour l'observation de la déformation sont présentés sur la figure 2.16.

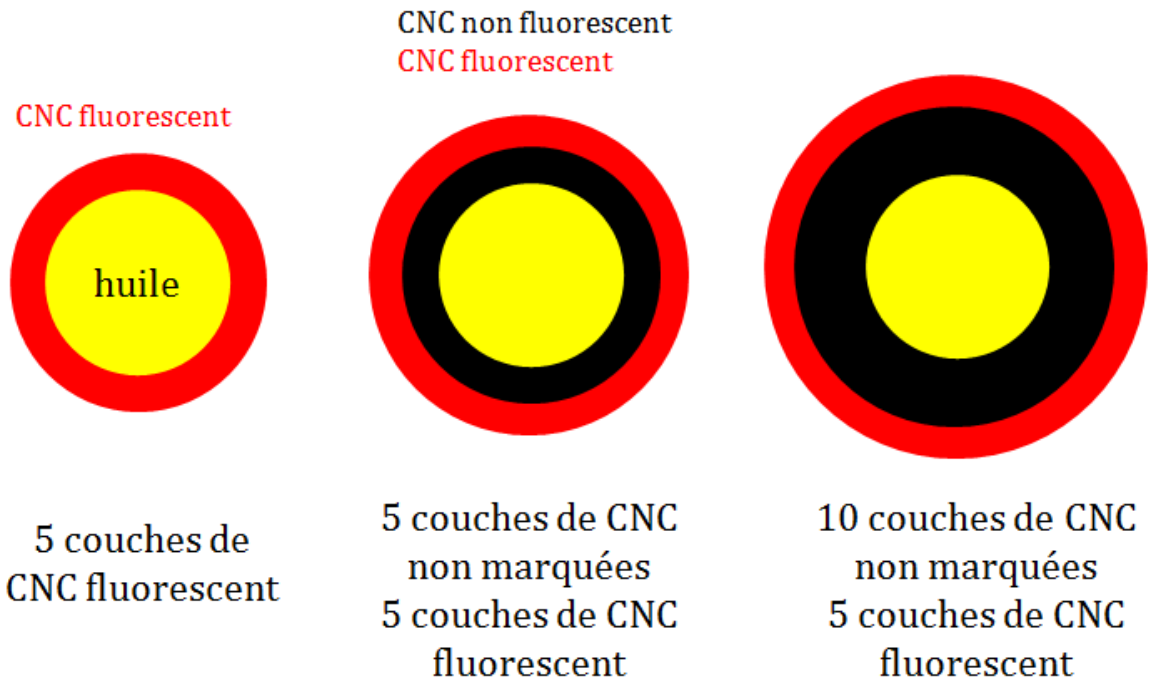


FIGURE 2.16 – Schéma et position des couches fluorescentes de capsules à 5, 10 et 15 bicouches réalisées pour la microscopie confocale.

Pour l'observation en microscopie confocale les capsules sont incluses dans un gel d'acrylamide à 20%, séchées et déformées en suivant le protocole décrit dans le §IV.2.1 et IV.2.2.

En microscopie confocale, la profondeur de champ de l'objectif utilisé est de 200 µm. La lamelle couvre-objet a une épaisseur de 150 µm, ce qui ne laisse qu'une cinquantaine de micromètres de profondeur d'observation pour voir les capsules. Or, le gel perd du volume en séchant et ne reste pas totalement plan. Il n'est plus collé à la surface de la lamelle qui le recouvre et est séparé de la lamelle par une couche d'air qui l'éloigne encore de l'objectif (Fig.2.15). Dans ces conditions, les capsules sont trop éloignées de l'objectif pour faire la mise au point.

Pour limiter la distance entre les capsules et l'objectif, il est nécessaire de retirer la lamelle couvre objet tout en protégeant le gel pour ne pas le mettre en contact direct avec l'huile d'immersion de l'objectif. Pour cela, les gels sont recouverts d'une résine d'inclusion (LR white) utilisée en microscopie électronique. Cette résine a un indice de réfraction de 1,46 (25°C) proche de celui du polyacrylamide sec (1,47 [Franklin and Wang, 2002]). Pour conserver une surface plane, l'inclusion

est faite entre lame et lamelle avec un spacer de 300 µm. Le gel est posé, sans le retourner, sur la lame entre les espaceurs puis 500 µl de résine, à laquelle a été ajouté de l'accélérateur, sont versés sur le gel. Une lamelle est immédiatement posée dessus pour aplanir la surface de la résine et la répartir. La lamelle est ensuite retirée une fois que la résine est polymérisée. la figure 2.17 présente un schéma de l'inclusion du gel dans la résine LR White.

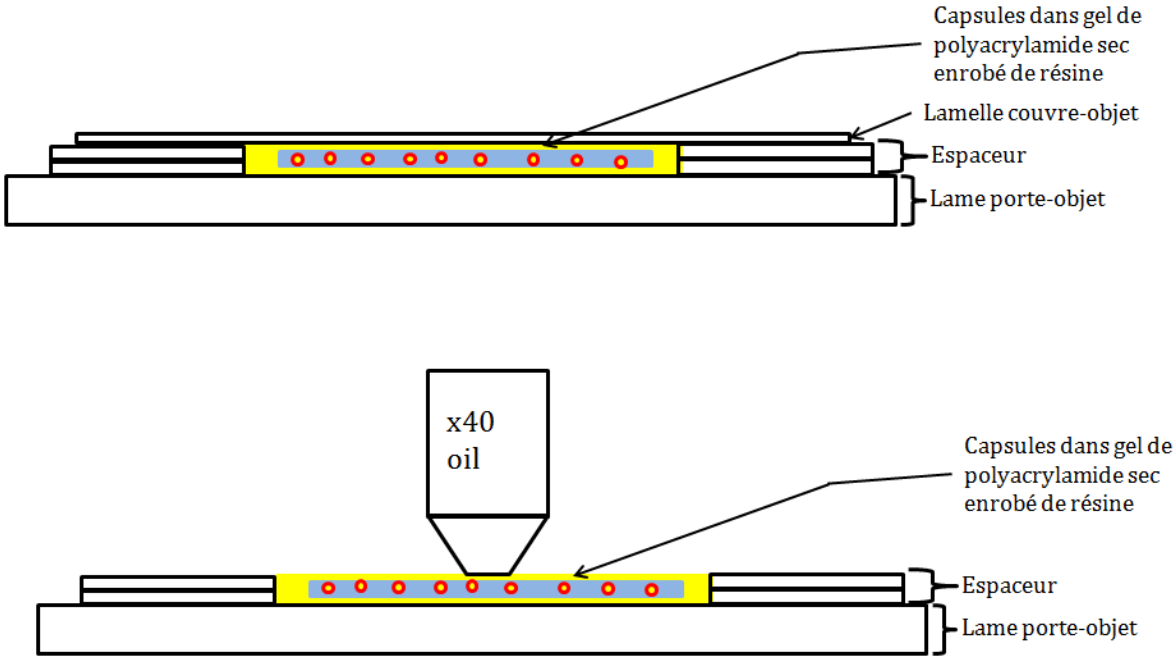


FIGURE 2.17 – Schémas de l'inclusion des gels secs dans la résine LRW pour l'observation en microscopie confocale.

IV.2.4 Reconstruction en trois dimensions de capsules en MCBL

Pour mettre en évidence la forme des capsules déformées, la microscopie confocale a été utilisée. Nous posons XY le plan correspondant à la coupe observée, et l'axe Z la profondeur de l'image. Les échantillons sont préparés comme décrit dans le paragraphe §IV.2.3. Les capsules observées possèdent 5, 10, 15 bicouches. Lors de la prise d'images les photons changent de milieu ; l'indice change créant une déviation de la lumière. Après l'objectif, ils traversent l'huile d'immersion (n = 1,5), puis la résine LR white (n = 1,46), et enfin le gel d'acrylamide sec (n = 1,47) avant d'atteindre la capsule. Il est donc possible que les images de la séquence soient déformées dans le plan XY et selon l'axe Z. La taille des voxels sera donc différente de celle donnée par le programme d'acquisition. Pour vérifier, si l'image est affectée par ces changements d'indice, des billes de polystyrène fluorescentes et indéformables sont ajoutées dans le gel avec les capsules. Leur observation permet de mettre en évidence les éventuelles distorsions des images dues au montage expérimental. Les figures 2.18 et 2.19 présentent respectivement les vues orthogonales de ces billes dans l'eau et dans le gel d'acrylamide sec.

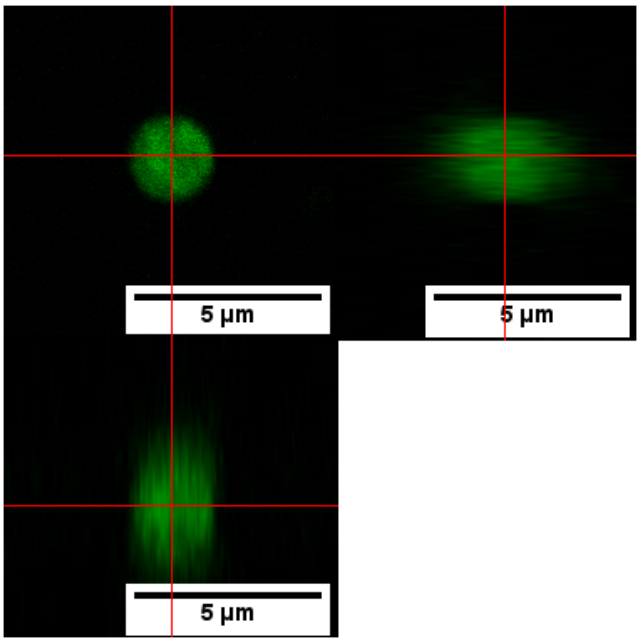


FIGURE 2.18 – Images en vue orthogonale de microscopie confocale d'une bille de polystryrène fluorescente dans eau.

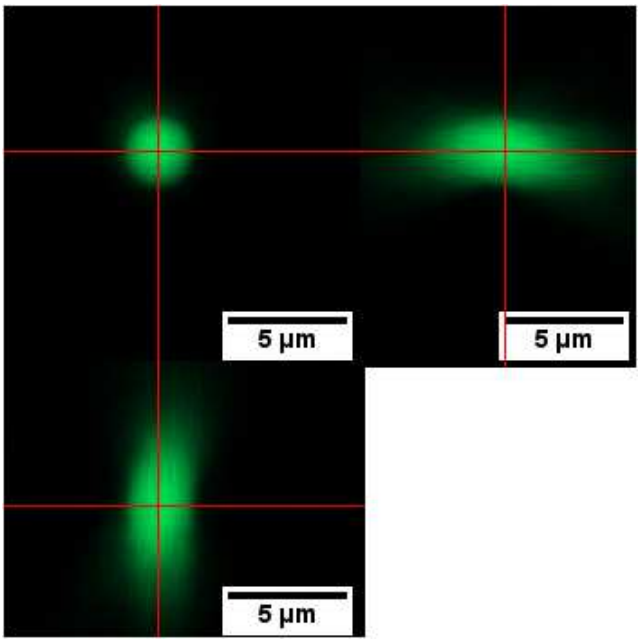


FIGURE 2.19 – Images en vue orthogonale de microscopie confocale d'une bille de polystyrène fluorescente dans gel sec.

Dans le gel, la bille semble plus allongée que dans l'eau. En effet, d'après la figure 2.18 le grand axe de la bille (selon l'axe Z) a une longueur a_{eau} = 2,7 μm et le petit axe (selon l'axe X ou Y) a une longueur b_{eau} = 2,3 μm. Dans le gel, le grand axe et le petit axe sont a_{gel} = 4,5 μm et b_{gel} = 3 μm sur la figure 2.19. Dans les deux cas la bille apparaît comme un ellipsoïde de révolution. La section elliptique de l'image dans le plan YZ possède une excentricité (e = $\sqrt{a^2 - b^2}/a$) de 0,5 dans le cas d'eau et de 0,75 dans le cas du gel. La bille apparaît plus allongée lorsqu'elle est observée dans le gel enrobé de résine. Il faut donc tenir compte de cette déformation en modifiant l'épaisseur des voxels dans les séquences d'images (distance, entre chaque image, donnée pour la reconstruction en 3D et les coupes orthogonales) en multipliant par un facteur 0,67 (3/4,5) la valeur utilisée comme pas de l'objectif en Z lors de l'acquisition.

V Films nanocomposites

Afin de faire une approximation du module d'Young, des parois des capsules multicouches CNX/XG, des films minces contenant nanocristaux de cellulose et xyloglucanes dans diverses proportions ont été étudiés en traction. De plus les capsules étant en suspension dans l'eau, il est important de connaître l'effet que peut avoir l'hydratation de la paroi sur ces propriétés. Nous nous attendons à une baisse de module [Kochumalayil et al., 2010, Cybulska et al., 2010]. Cependant, pour vérifier à quel point le module des capsules pourrait être affecté, l'effet de l'hydratation des films sur leurs propriétés mécaniques à également été étudié.

Une suspension de nanocristaux de cellulose à 2-2,5% et une solution de xyloglucanes à 0,5-1% sont utilisées. La suspension et la solution sont mélangées dans les proportions suivantes :

– 100% CNC

- 75% CNC et 25% XG
- 50% CNC et 50% XG
- 25% CNC et 75% XG
- 100% XG

Ces valeurs correspondent au pourcentage de masse sèche. Le mélange est homogénéisé à l'ultraturrax à 8000 tr/min pendant quelques minutes. Puis, il est placé dans une coupelle en aluminium (ϕ = 70 mm, **Fisherbrand**) ou un moule en téflon (ϕ = 75 mm), et dégazé dans un cloche à vide pendant 30 minutes. Les mélanges sont ensuite placés dans une étuve entre 30°C et 60°C pour séchage. Une fois secs, les films sont réhydratés dans des dessiccateurs contenant des solutions saturées en sel fixant le taux d'humidité (RH : rate of humidity). Les solutions salines utilisées sont P_2O_5 (RH=0%), K_2CO_3 (RH=43%) ; NaCl (RH=75%) ; K_2SO_4 (RH=98%) [Greenspan, 1977]. Les tests de traction uniaxiale sont réalisés sur un *Minimat 2000* (**Rheometric Scientific**) avec un capteur de 200 N sur des éprouvettes de 5 mm x 2 cm découpées à la lame de rasoir ou au ciseau dans chacun des films. Plusieurs éprouvettes sont obtenues à partir d'un film.

Chapitre 3

Émulsions stabilisées par des nanocristaux de cellulose et films composites cellulose/xyloglucanes

Dans ce chapitre, vont être présentées la démarche suivie pour créer des émulsions d'huile dans l'eau (H/E) stabilisées par des nanocristaux de cellulose (CNC), ainsi que la mesure de modules de films composites de cellulose et xyloglucanes (XG). L'émulsion servira de substrat pour l'élaboration par la méthode couche par couche de capsules de CNC et de XG. Les mesures de module réalisées sur les films composites permettront d'évaluer les propriétés élastiques de la paroi des capsules formées.

Le choix d'utiliser des émulsions d'huile dans l'eau (H/E) comme support pour construire des capsules multicouches, mimant la paroi primaire des cellules végétales, a été fait pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la forme sphérique des gouttes constitue un modèle idéal pour représenter des cellules. De plus, leur déformabilité va leur permettre de prendre des formes potentiellement imposées par les couches déposées à leur surface. Rappelons que des capsules multicouches de nanocristaux de cellulose et de poly(hydrochlorure diallylamine) (PAH), construites sur des particules de carbonate de calcium ($CaCO_3$), gardent la forme de leur support une fois celui-ci dissous et ce, dès la première bicouche [Holt et al., 2007]. Ce type de support rigide pour la fabrication de capsules multicouches n'est pas adapté pour le modèle étudié ici, car les couches déposées doivent avoir la possibilité d'imposer une forme au coeur. Enfin, en éliminant le coeur d'huile dans le milieu aqueux, par l'ajout d'un solvant tel que de l'éthanol par exemple, ou bien par séchage, les capsules peuvent être soumises à une force extérieure, et être déformées [Quilliet et al., 2008].

Afin de modéliser au mieux les cellules végétales, il est important de contrôler la taille des gouttes qui devra être comprise entre 10 et 100 µm. Il faut également prêter attention à la concentration de l'émulsion, qui ne doit pas être trop importante pour permettre un dépôt des couches sans risque de pontage puis agrégation des capsules. Cela permet aussi de diminuer les interactions entre gouttes, et donc la coalescence. Une étape primordiale pour pouvoir construire des capsules multicouches est le dépôt de la première couche sur le support. Pour y parvenir, des émulsions stabilisées par des nanocristaux de cellulose vont être fabriquées.

L'étude de la déformation des capsules impose de connaître les propriétés mécaniques de composites de nanocristaux de cellulose et xyloglucanes ainsi que leur comportement face à l'humidité du milieu. Ainsi, des films de CNC/XG ont été soumis à des tests de traction (mesure de module d'Young) à différents taux d'humidité pour évaluer l'influence de l'humidité résiduelle sur les propriétés mécaniques des capsules.

I Stabilisation d'une émulsion huile/eau par des nanocristaux de cellulose (CNC)

I.1 Choix de l'utilisation de CNC pour stabiliser l'émulsion

Pour stabiliser les émulsions H/E, nous avions le choix entre les microfibrilles de cellulose (qui font plusieurs microns de longueur) et les nanocristaux de cellulose qui ne font qu'une centaines de nanomètres environ, pour la même largeur. Les nanocristaux de cellulose ont été choisis, plutôt que les microfibrilles, pour mimer la cellulose de la paroi primaire des cellules végétales pour les raisons suivantes :

- Les microfibrilles forment des gels même à très faible concentration ($> 1\%$ en masse), rendant leur utilisation pour un dépôt de couche difficile, notamment pour obtenir une monocouche de cellulose.
- Les microfibrilles sont longues de plusieurs microns (5-10 µm). Leur longueur, de l'ordre du diamètre des gouttes que nous souhaitons obtenir, entraîne la floculation plutôt que des objets individuels [Andresen and Stenius, 2007, Kalashnikova et al., 2011]. Or nous souhaitons étudier des capsules isolées.
- Les nanocristaux de cellulose ont des dimensions adaptées (< 1 µm) pour stabiliser une émulsion de type Pickering dans la gamme de taille de gouttes que nous nous sommes fixée (10 - 100 µm). De plus, les suspensions restent stables et ne forment pas de gel dans la gamme de concentration utilisée (2 - 7%). Enfin, pour des concentrations supérieures à 5% dans l'eau, il y a apparition d'une phase organisée dans la suspension de CNC [Revol et al., 1992]. Cette organisation peut être transposée sur une surface. En effet, lors de l'élaboration d'un film sur une surface plane, par dépôt couche par couche du système CNC/PAH, il est possible d'obtenir des couches de nanocristaux de cellulose organisés, en réalisant le dépôt dans la phase cholestérique de la suspension [Jean et al., 2008]. Dans ce cas, l'ordre nématique local est conservé et les CNC sont alignés selon une même direction. Cette structure est potentiellement similaire dans son anisotropie aux faisceaux de microfibrilles parallèles qui constituent la paroi primaire des cellules végétales [Paredez et al., 2006]. Il est donc envisageable d'obtenir un dépôt organisé à la surface des capsules multicouches si le dépôt de cellulose est réalisé dans la phase organisée de la suspension de CNC.

I.2 Les conditions de stabilité pour l'émulsion

Le dépôt de couches implique de plonger les gouttes successivement dans une suspension de nanocristaux de cellulose et une solution de xyloglucanes. Elles vont donc être soumises à des forces de déplétion. Si l'émulsion n'est pas stable, les gouttes vont coalescer, détruisant le substrat des multicouches. De plus, la technique de couche par couche nécessite de rincer le substrat entre

chaque dépôt, ceci étant réalisé par centrifugation (voir le chapitre 2 §II.2). Ces opérations créent des contraintes fortes sur les gouttes, susceptibles d'entraîner leur coalescence et donc la destruction de l'émulsion. Il est donc impératif d'avoir des émulsions qui résistent à toutes ces forces extérieures. La stabilité implique également que les échantillons n'évoluent pas dans le temps (au moins sur quelques mois) c'est-a-dire que les gouttes ne coalescent ou ne s'agrègent pas.

Ainsi, une émulsion sera considérée comme un substrat convenable pour l'élaboration de capsules par la méthode couche par couche, si la taille de ses gouttes reste quasi-invariante après centrifugation, lors des dépôts et également au cours du temps.

I.3 Stabilisation d'une émulsion huile dans l'eau par des CNC

Les suspensions de nanocristaux de cellulose utilisées pour la stabilisation des émulsions sont préparées suivant le protocole décrit au chapitre II §II.1. Les nanoparticules ainsi préparées ont une longueur moyenne L = 145 nm, une largeur moyenne l = 26 nm et une épaisseur de 6 nm. Les nanocristaux de cellulose sont chargés et présentent un taux de sulfatation de 0,8%, ce qui correspond à une charge surfacique de 0,57 e/nm^2.

I.4 Émulsion de Pickering de CNC seul

Des solutions pour réaliser des émulsions de Pickering huile dans l'eau avec des CNC ont très récemment été proposées dans la littérature [Kalashnikova et al., 2012, Kalashnikova et al., 2011, Zoppe et al., 2012]. Dans tous les cas, il s'agit d'utiliser des CNC dont la charge de surface est minimale, afin de diminuer leur hydrophilie et les répulsions interparticules, et ainsi augmenter leur affinité avec l'huile. De telles nanoparticules peuvent être obtenues par désulfatation [Kalashnikova et al., 2012], par l'utilisation d'acide chlorhydrique en remplacement de l'acide sulfurique lors de la préparation des suspensions [Kalashnikova et al., 2011], ou alors par le greffage de polymères à la surface des CNC [Zoppe et al., 2012].

Pour tester les propriétés stabilisantes des nanocristaux de cellulose chargés que nous utilisons, des émulsions d'octaméthylcyclotétrasiloxane (D4) dans l'eau ont été réalisées avec un homogénéiseur/disperseur, dans les conditions décrites au chapitre II §III.1, dans des suspensions de CNC de concentration comprise entre 0,1% à 2,5% en masse. Le rapport huile/eau utilisé est de 1/10. Pour la concentration la plus faible, en considérant que tous les CNC en suspension vont s'adsorber à l'interface huile/eau, il est envisageable de stabiliser une émulsion monodisperse de gouttes d'un diamètre de 6 µm. En effet, dans les émulsions de Pickering H/E, pour un volume d'huile fixé, la concentration en nanoparticules est inversement proportionnelle au diamètre des gouttes à stabiliser ($D_g = \frac{6h\rho_{CNC}V_h}{m_{CNC}}$). Dans tous les cas, pour le rapport huile/eau choisi, nous sommes donc en large excès de CNC pour stabiliser des gouttes de diamètre de 10 à 100 µm. Néanmoins, quelle que soit la concentration de la suspension utilisée, l'émulsion est instable. Les gouttes coalescent après quelques minutes au repos ou alors durant la première centrifugation (x 95 g).

Les émulsions de Pickering ne sont réalisables qu'avec des particules qui présentent de l'affinité avec la phase continue et la phase dispersée [Binks and Lumsdon, 2000b, Aveyard et al., 2003]. La préparation de CNC par de l'acide sulfurique entraîne la formation de groupements sulfates (SO_3^-) à leur surface. Ils permettent une bonne stabilité colloïdale de la suspension en chargeant les CNC ce qui les rend répulsifs entre eux [Dong et al., 1998, Azizi Samir et al., 2005, Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008]. Ceci est défavorable à l'adsorption des nanoparticules à une interface huile/eau. Il a été montré récemment que si les CNC présentent une densité de charge de suface supérieure à 0,03 e/nm^2, ils ne peuvent être utilisés comme émulsifiants [Kalashnikova et al., 2012]. Le nombre de groupements sulfate à la surface des CNC est donc un élément clé de leur propriétés émulsifiantes.

Dans nos conditions de préparation (hydrolyse de linters de coton à l'H_2SO_4 à 64% pendant 30 minutes à 63°C), nous trouvons un taux de charge de surface de 0,57 e/nm^2 ($\gg$ 0,03 e/nm^2). Les CNC utilisés sont trop chargés pour permettre seuls la stabilisation de l'émulsion. Néanmoins, des CNC non chargés ne peuvent pas être utilisés en tant que tel car ils conduisent très rapidement à la floculation des suspensions, il n'y pas de force électrostatique répulsive entre les nanoparticules, et ne peuvent être employés que pour l'émulsification.

Dans notre cas, un autre phénomène est défavorable à la stabilisation. En effet, en mesurant le potentiel zeta d'une suspension de nanocristaux de cellulose et d'une émulsion de D4 dans l'eau nous avons obtenu les valeurs respectives de ζ_{CNC} = -29,0 ± 0,8 mV et de ζ_{D4} = -42,9 ± 1,7 mV. Les nanoparticules et les gouttes de D4 étant chargées négativement dans l'eau, les répulsions électrostatiques entre l'huile et les CNC défavorisent également la stabilisation de l'émulsion.

Plutôt que de modifier les CNC, nous avons choisi de trouver un moyen d'inverser la polarité des gouttes de D4 dans l'eau afin d'adsorber les nanoparticules à leur surface par des attractions électrostatiques. Pour cela, nous allons employer un tensioactif cationique. De plus, il a déjà été observé que l'utilisation d'un tensioactif en plus de nanoparticules dans des cas où ces dernières ne présentent pas de propriétés émulsifiantes, améliore fortement la stabilité des émulsions formées [Binks et al., 2007].

I.4.1 Stabilisation d'une émulsion par CNC et tensioactif

Le tensioactif doit être cationique, notre choix s'est porté sur le chlorure de cétylpyridinium (CPC) qui présente un charge positive sur sa tête hydrophile. Deux méthodes de stabilisation ont été étudiées

1. Une stabilisation séquentielle : l'émulsification est réalisée en présence de CPC uniquement. Les nanocristaux de cellulose sont ensuite ajoutés à l'émulsion.

2. Une stabilisation par un complexe CPC/CNC : l'émulsification est réalisée en présence d'un mélange CPC/CNC.

I.4.1.1 La stabilisation séquentielle

Dans ce cas, l'émulsion est dans un premier temps stabilisée avec un tensioactif. Le recouvrement des gouttes par le CPC devrait ainsi rendre leur surface chargée positivement. Nous pouvons supposer qu'en ajoutant les nanocristaux de cellulose (chargés négativement) dans un second temps, ceux-ci pourraient s'adsorber à l'interface grâce aux interactions électrostatiques. L'adsorption des tensioactifs est un équilibre dynamique et le taux de recouvrement de la phase dispersée dépend de la concentration en tensioactifs dans la phase continue [P. Velikov et al., 1997]. Il est donc nécessaire de conserver des tensioactifs en solution pour avoir une émulsion stable. Il faut cependant éviter les interactions en volume pouvant conduire à l'agrégation des CNC, ce qui entrerait en compétition avec l'adsorption à l'interface. Or, Nous avons pu constater expérimentalement que les émulsions de D4 H/E, stabilisées avec un excès de tensioactifs, ne peuvent être recouvertes de CNC par cette technique. De manière particulièrement frappante, nous avons obtenu des émulsions à la fois instables et pontées par des agrégats de particules.

I.4.1.2 La stabilisation par un complexe CPC/CNC

La seconde option est d'utiliser un mélange de CPC/CNC pour stabiliser les gouttes. Dans ce cas, il est attendu que les nanocristaux de cellulose soient décorés de CPC, rendant la charge totale neutre. La charge du tensioactif étant présente sur sa tête hydrophile, c'est elle qui va interagir avec les CNC, laissant sa queue hydrophobe libre. Le complexe est alors au moins partiellement hydrophobe facilitant l'adsorption des CNC décorés à l'interface huile eau.

Les tests d'émulsification ont été réalisés avec un ratio 1/1 en masse de CPC/CNC (0,1% en masse). Le mélange est soniqué avant de faire l'émulsion, afin de casser les plus gros agrégats. Dans ces conditions, les molécules de CPC sont en excès par rapport à la surface de cellulose à recouvrir, il va rester du tensioactif en solution. L'utilisation combinée de CNC et de CPC permet de stabiliser des gouttes de D4 dans l'eau. Toutefois, l'émulsification à l'ultraturrax ne permet pas de contrôler la taille finale des gouttes, et nous obtenons dans ces conditions une émulsion très polydisperse.

I.5 Stabilisation après passage sur grille calibrée

Dans la mesure où l'émulsification directe en présence de CNC s'est avérée très délicate, nous avons envisagé de procéder d'abord à la formation de gouttes par passage à travers une grille calibrée puis recouvrement et stabilisation par le complexe tensioactifs/CNC. Ainsi qu'il a été présenté dans la partie bibliographique, ce procédé dérivé de l'émulsification sur membrane permet d'obtenir des émulsions de taille relativement bien contrôlée [Vladisavljević and Williams, 2005] ; il est également plus facile à mettre en oeuvre que les procédés d'émulsification sous cisaillement

dans un rhéomètre [Mason and Bibette, 1997, Mabille et al., 1999, Mabille and et al., 2003], que nous avons testés mais qui se sont révélés difficiles à reproduire.

I.5.1 Les conditions d'émulsification

Avec cette méthode d'émulsification nous souhaitons obtenir des gouttes de taille contrôlée dont le diamètre est compris entre 10 et 100 µm, le diamètre moyen visé est de 25 µm. Les grilles calibrées utilisées sont fabriquées à partir de toiles à bluter, qui sont constituées d'un tissu de fils de polyamide orthogonaux de maille calibrée. Ce procédé consiste en un passage sous pression d'une pré-émulsion grossière et non-contrôlée à travers les ouvertures d'une grille calibrée (voir chapitre II. Fig.2.9).

Nous allons distinguer un régime à faible taux de cisaillement où les gouttes ne seront pas fractionnées, d'un autre à plus fort taux de cisaillement où nous allons pouvoir contrôler la taille des gouttes. Celle-ci va dépendre de la taille de l'ouverture, mais aussi du taux de cisaillement qui va conduire au fractionnement de la goutte. Plusieurs mailles sont utilisées (7, 21 et 40 µm), afin de déterminer la grille la plus adaptée pour obtenir les tailles visées. L'émulsification est réalisée dans un filtre sous pression (Sartorius). L'émulsification est réalisée après passage d'une pré-émulsion grossière à travers la grille, sous une pression de l'ordre de 4 bars qui n'a pas été contrôlée précisément. Cette pression est suffisante pour faire passer le pré-mélange au travers de la membrane et former l'émulsion. En effet, la pression minimale pour pousser les gouttes d'huile au travers des pores est $p_{min} = \frac{4\gamma_{H/E} cos\theta_{H/E}}{d_m}$ ($\theta_{H/E}$ l'angle de contact entre les gouttes de la phase dispersée et la grille dans la phase continue, et d_m la taille des pores et $\gamma_{H/E}$ la tension de surface). En prenant $\theta_{H/E} = 90°$, $d_m = 7$ µm et $\gamma_{H/E} = 17{,}93$ mN.m^{-1} [Palczewska-Tulinska and Oracz, 2005], nous obtenons $p_{min} = 0{,}1$ bar. Nous sommes donc bien au-dessus de la valeur limite de pression requise pour faire passer le pré-mélange au travers de la grille.

L'émulsification a été réalisée en présence de carboxyméthylcellulose (CMC). Cela permet de rendre la phase continue plus visqueuse et de diminuer la taille moyenne des gouttes formées [Vladisavljevic et al., 2006]. En l'absence de CMC, les gouttes ont un diamètre trop important par rapport à la taille visée, en raison de la faible valeur du cisaillement imposé au passage de la grille calibrée. Nous avons déterminé empiriquement, par essais/erreurs, une concentration en CMC de 30 g/l pour l'émulsification. Cette valeur sera celle utilisée dans la suite du document. La mesure du diamètre des gouttes est effectuée sur des clichés de microscopie optique pris sur des échantillons d'émulsions contenus dans des capillaires scellés à la flamme. Les tailles caractéristiques calculées sont le diamètre moyen des gouttes D_{moy} et le coefficient de variation[1] (C.V). La mesure par granulométrie laser a été envisagée, toutefois la distribution en taille dépend des conditions de la mesure (temps dans l'appareil et vitesse du flux entraînant les gouttes devant le faisceau laser). Pour cette raison cette technique n'a pas été retenue pour la mesure de la taille des gouttes.

Nous étudierons dans un premier temps la reproductibilité de l'émulsification pour une taille

1. Rapport de l'écart-type sur la valeur moyenne d'une distribution

de pore fixée. Puis nous nous intéresserons à l'influence du ratio CPC/CNC sur la stabilité des gouttes. L'effet du nombre de passages sur la taille moyenne et la polydispersité de l'émulsion créée sera également étudié. Enfin, le contrôle de la distribution en taille de l'émulsion par la maille de la toile à bluter sera également envisagé.

I.5.2 Reproductibilité de l'émulsification

Comme il a été présenté précédemment, la pression à l'intérieur de l'enceinte n'est pas contrôlée, nous n'avons qu'une mesure qualitative du débit dans le filtre et non quantitative. Ainsi, d'une émulsification à l'autre pour des pores identiques, le diamètre moyen et la polydispersité de l'émulsion sont susceptibles de varier. Afin de vérifier la reproductibilité du processus d'émulsification, celui-ci est effectué pour divers pré-mélanges de même composition. Les émulsions sont réalisées en suivant le protocole donné dans le chapitre II §III.2 avec une concentration en CMC de 30 g/L et une concentration massique de CPC et CNC de 0,1% (CPC/CNC : 1/1). Le pré-mélange est passé 5 fois successives au travers d'une toile à bluter de 21 µm, ce qui est une valeur classiquement utilisée dans le domaine et jugée suffisante pour tendre vers les valeurs limites du diamètre moyen et du coefficient de variation [Vladisavljevic et al., 2006]. Il est important de connaître la variabilité des tailles obtenues si nous souhaitons pouvoir comparer l'effet de la maille sur les distributions. La figure 3.1 présente le diamètre moyen d'émulsion dans des conditions identiques (même toile à bluter et pré-mélange), où le paramètre qui peut varier est la pression et donc le taux de cisaillement. Le tableau 3.1 présente les valeurs de diamètre moyen et le coefficient de variation des distributions en taille, pour les émulsions présentées sur la figure 3.1 qui ont été obtenues dans des conditions de pré-mélanges identiques.

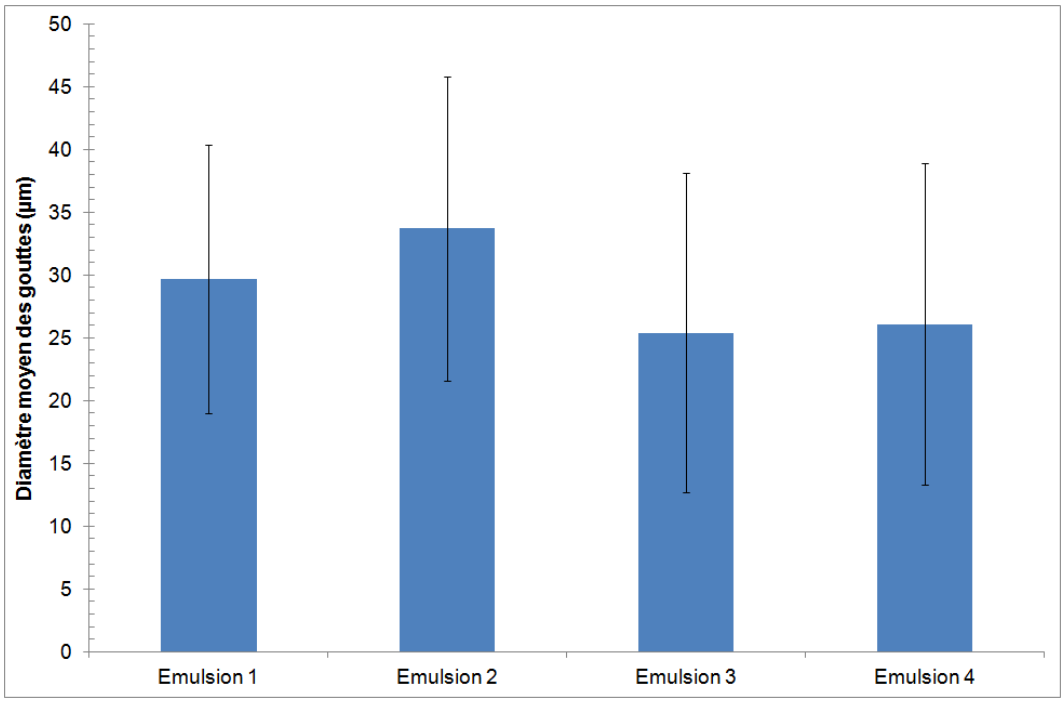


FIGURE 3.1 – Histogramme du diamètre moyen d'émulsions de D4 dans l'eau réalisées par émulsification sur une toile à bluter de 21 µm, la barre d'erreur correspond à l'écart-type des distributions en taille obtenues.

TABLEAU 3.1 – Récapitulatif des valeurs caractéristiques de la distribution en taille d'émulsions de D4 dans l'eau réalisées par filtration d'un pré-mélange sur une toile à bluter de 21 µm avec 5 passages.

	D_{moy} (µm)	C.V
Émulsion 1	29,7	0,36
Émulsion 2	33,7	0,36
Émulsion 3	25,4	0,50
Émulsion 4	26,1	0,49

Le processus d'émulsification n'est pas parfaitement reproductible puisque nous observons des variations pour le diamètre moyen de l'ordre de ± 15% au sein de cette série (à l'erreur expérimentale près) (Fig. 3.1 & Tab. 3.1). Cependant nous restons dans le même ordre de grandeur de taille pour une maille donnée. De plus, la méthode de mesure utilisée introduit une certaine erreur sur le diamètre moyen. En effet, seule une petite partie de l'émulsion est considérée lorsqu'elle est observée dans un capillaire (quelques µl). Pour une même émulsion, dans des capillaires différents, il est possible de voir apparaître une différence de quelques microns sur le diamètre moyen, et ceci en raison du phénomène de crémage qui peut conduire à une ségrégation selon les tailles de gouttes au sein de l'émulsion.

Cependant nous observons que malgré cette variabilité, l'ensemble des gouttes a un diamètre compris dans l'intervalle visé de 10 à 100 µm, et ce quel que soit l'échantillon. Donc dans tous les cas, nous obtenons une émulsion correspondant à nos besoins pour la fabrication des capsules multicouches et l'étude de leur déformation. L'étude de la reproductibilité de l'émulsification nous permet également de déduire une variation sur le diamètre moyen calculé pour une émulsion donnée : elle est fixé à 15% de la valeur D_{moy} obtenue. Ainsi, nous obtenons pour la maille de 21 µm un diamètre moyen $<D_{moy}> = 29 \pm 4$ µm.

I.5.3 Effet de la concentration en CPC

Dans les expériences précédentes le rapport entre les concentrations des nanocristaux de cellulose et de chlorure de cétylpyridinium a été fixé et pris à 1/1. Cependant, il est intéressant de connaître l'influence de la quantité de CPC sur la stabilité des gouttes. Ceci permet de limiter la quantité de CPC présente dans la phase continue, et donc de réduire la quantité de molécules de tensioactif libres en solution qui entrent en compétition avec les nanoparticules pour stabiliser les émulsions. Rappelons que les gouttes stabilisées par du CPC auront au mieux un diamètre $D_g = \frac{6M_{w,CPC}V_h}{S_{CPC}m_{CPC}N_a}$ (Chap II §III.1). L'émulsification est réalisée, à une concentration de CNC fixée (0,1%), à quantités variables de CPC : 0,02% (0,2/1), 0,1% (1/1), 0,2% (2/1) et 0,4% (4/1). La figure 3.2 présente l'histogramme du diamètre moyen des gouttes dans les différentes conditions ; le tableau 3.2 regroupe les valeurs numériques des distributions en taille obtenues.

TABLEAU 3.2 – Récapitulatif de l'effet du ratio des concentrations massiques de la solution de CPC et de la suspension de CNC sur une émulsion préparée sur une toile à bluter de 21 µm. La concentration en CNC est fixé à 0,1%.

Ratio CPC/CNC	D_{moy} (µm)	C.V
0,2/1	39,6 (± 5,9)	0,58
1/1	33,7 (± 5,1)	0,37
2/1	37,8 (± 5,7)	0,52
4/1	31,3 (± 4,7)	0,60

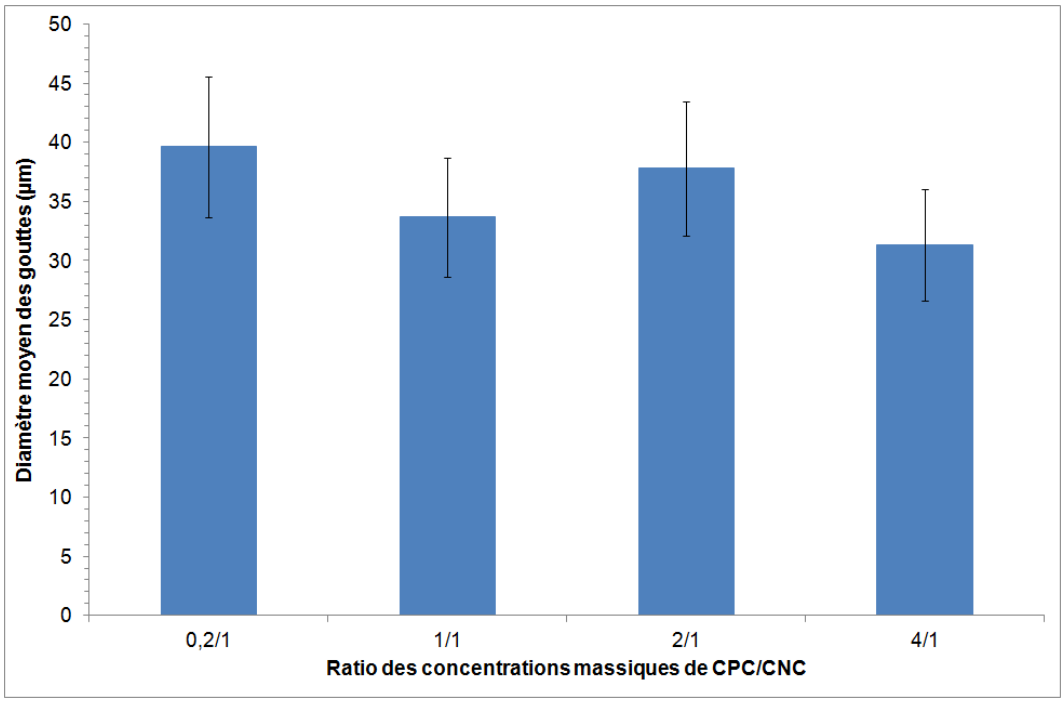


FIGURE 3.2 – Histogramme des diamètres moyens d'émulsions préparées sur une toile à bluter de 21 µm en fonction du rapport de concentration CPC/CNC. La concentration en CNC est fixe (0,1% en masse). Les barres erreurs positive et négative sont prises égales à 15% du diamètre moyen mesuré.

Il est clair que la quantité de CPC n'a que très peu d'influence sur la taille moyenne et la polydispersité de l'émulsion (Fig.3.2, tab.3.2). Les variations observées sont du même ordre de grandeur que celles obtenues lors de l'étude de la reproductibilité. On peut montrer cependant que les valeurs du diamètre moyen sont plus élevées que pour les essais de reproductibilité. Ceci illustre la variabilité du procédé d'une série d'expériences à l'autre, probablement en raison du faible contrôle de la pression. Cependant, l'indépendance de la taille avec la concentration en tensioactif semble montrer que l'on est bien dans un régime de fractionnement, et non pas de coalescence limitée.

I.6 Nombre de passages

Il est souvent nécessaire, dans l'émulsification d'un pré-mélange par membrane, de réaliser plusieurs passages au travers des pores avant d'obtenir la distribution limite la plus fine possible [Sawalha et al., 2008, Surh et al., 2008]. Nous nous sommes donc interrogés sur le nombre de

passages optimum pour former une émulsion relativement monodisperse, avec des gouttes de tailles comprises entre 10 et 100 µm, afin de limiter le nombre de gouttes trop petites ou trop grandes. Comme l'a montré Vladisavljevic et *al.*, plus les pores de la membrane sont grands, plus il faut un nombre important de passages pour arriver au diamètre moyen limite [Vladisavljevic et al., 2006]. Ainsi, nous avons choisi d'illustrer ce phénomène pour la taille de grilles calibrées la plus élevée dont nous disposons, soit 40 µm. La figure 3.3 présente l'évolution de l'histogramme de la distribution en taille de l'émulsion en fonction du nombre de passages. Le tableau 3.3 et la figure 3.4 récapitulent les diamètres moyens et les coefficients de variation associés pour différents nombres de passages successifs d'une même émulsion.

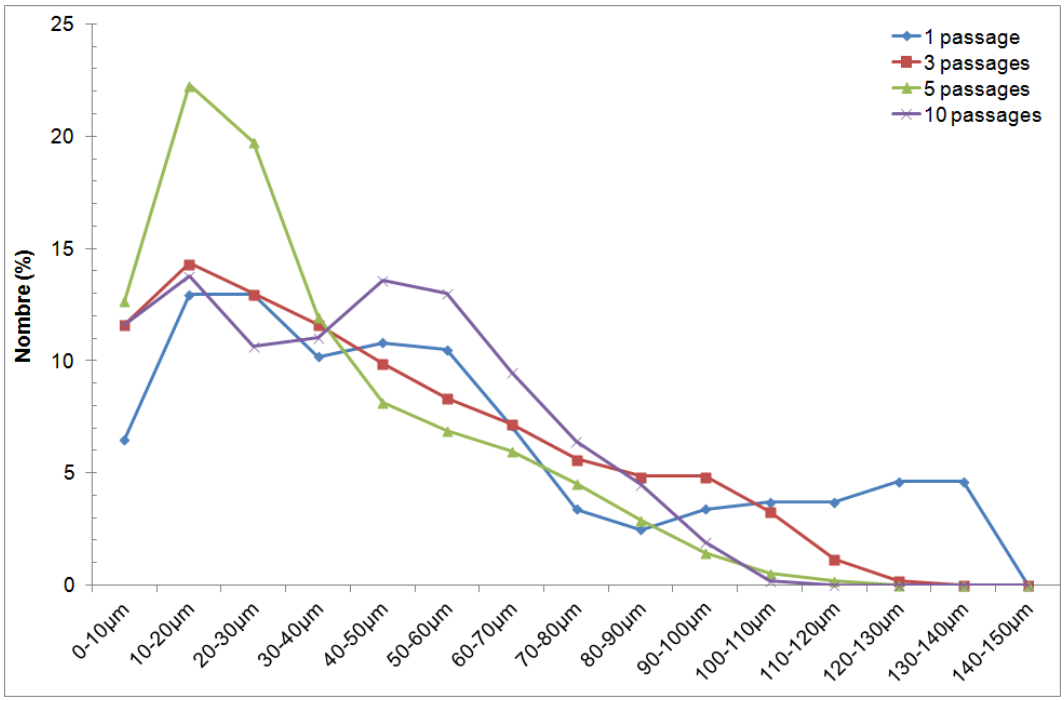


FIGURE 3.3 – Distribution en diamètre des gouttes en fonction du nombre de passages au travers de la membrane pour des pores de 40 µm. 1 passage [bleu], 3 passages [rouge], 5 passages [vert] et 10 passages [violet].

Sur la figure 3.3, nous remarquons que, à l'exception du tout premier passage pour lequel de très grosses gouttes sont encore présentes, la majorité des gouttes formées ont un diamètre compris entre 10 et 100 µm. Les passages supplémentaires permettent d'affiner la distribution en taille, mais ne changent pas de manière sensible le diamètre moyen.

TABLEAU 3.3 – Diamètre moyen D_{moy} (µm) et coefficient de variation C.V (rapport de l'écart-type sur la valeur moyenne de la distribution), des gouttes en fonction du nombre de passages au travers d'une toile à bluter de 40 µm.

Nombre de passage	D_{moy} (µm)	C.V
1 passage	60,3 (± 9,0)	0,87
3 passages	41,6 (± 6,2)	0,72
5 passages	32,4 (± 4,9)	0,68
10 passages	38,9 (± 5,8)	0,62

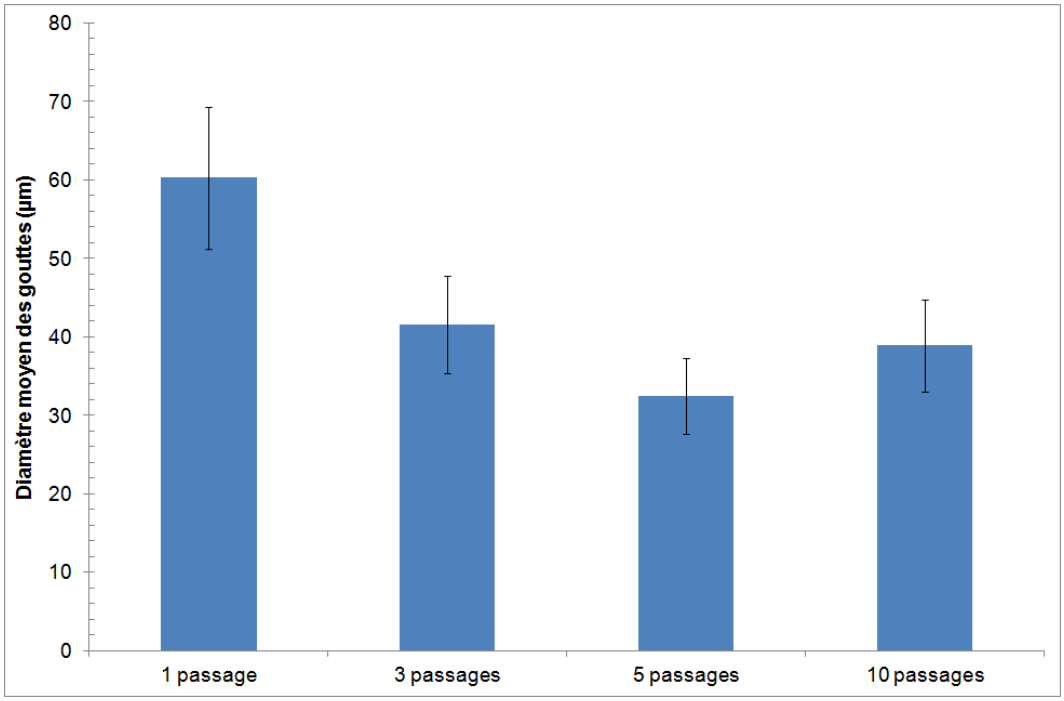


FIGURE 3.4 – Histogramme du diamètre moyen des gouttes pour une toile à bluter de 40 µm en fonction du nombre de passages.

A partir de cinq passages, la taille moyenne semble avoir atteint sa limite : des passages supplémentaires au travers de la membrane ne permettent pas de la diminuer (Fig. 3.4 & Tab. 3.3). Nous remarquons qu'après une dizaine de passages, le coefficient de variation reste relativement élevé. Nous conserverons un nombre de cinq passages, suffisant pour obtenir une émulsion de taille raisonnablement calibrée. La polydispersité relativement importante va nous permettre d'explorer au cours d'une seule expérience une gamme de taille variée.

I.7 Effet de la maille

Pour évaluer l'effet de la taille de la maille, nous avons réalisé des émulsions sur des toiles à bluter de 7, 21 et 40 µm, dans des conditions de pression semblables. Les pré-mélanges utilisés ont été réalisés dans les mêmes conditions et la dispersion est obtenue par 5 passages successifs aux travers de la membrane. La figure 3.5 présente les histogrammes de distribution en taille des émulsions obtenues pour chaque toile à bluter. Les diamètres moyens et le coefficient de variation de chaque distribution sont donnés dans le tableau 3.4.

TABLEAU 3.4 – Diamètre moyen D_{moy} (µm) et coefficient de variation C.V, des gouttes en fonction de la taille de la maille de toile à bluter utilisée.

Diamètre des pores	**D_{moy} (µm)**	**C.V**
7 µm	14,1 (± 2,1)	0,48
21 µm	33,7 (± 5,0)	0,38
40 µm	48,8 (± 7,3)	0,56

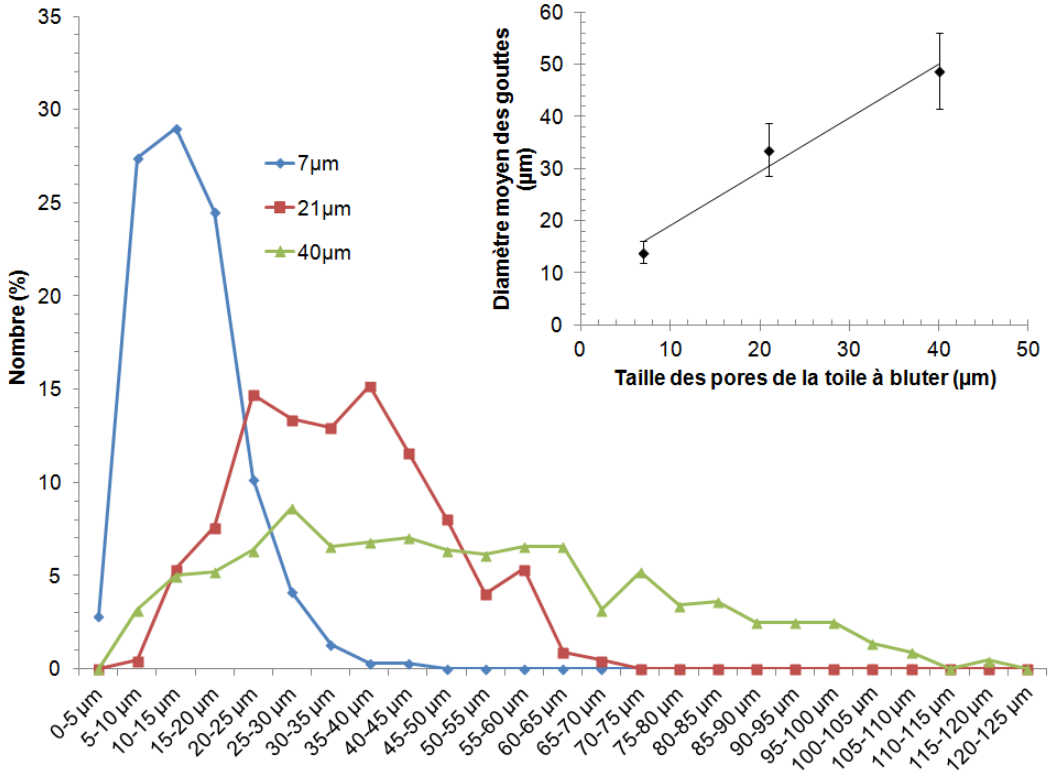


FIGURE 3.5 – Distribution en diamètre d'émulsions faites à partir de 3 toiles à bluter différentes : 7 µmm [bleu], 21 µmm [rouge] ou 40 µmm [vert]. Sur le graphique représentant le diamètre moyen des gouttes en fonction de la taille des pores la barre d'erreur correspond à la variation de cette valeur moyenne (± 15%).

Le diamètre moyen de l'émulsion obtenue dépend de la maille de la grille calibrée utilisée lors de l'émulsification (Tab. 3.4). Nous observons une augmentation linéaire du D_{moy} en fonction de la maille de la toile à bluter (Fig. 3.5). Nous avons donc un moyen simple de contrôler la taille des gouttes, pour des conditions expérimentales identiques. Dans tous les cas, nous obtenons une émulsion assez polydisperse centrée autour d'une valeur moyenne. La toile à bluter qui donne des valeurs dans le domaine de taille visé est la toile de 21 µm. C'est donc celle-ci qui sera utilisée pour former les émulsions qui serviront de base à la construction des capsules.

Pour la préparation des multicouches, nous avons observé l'effet de la centrifugation sur les émulsions. Quelle que soit la taille des gouttes de l'émulsion initiale, cette dernière est détruite au dessus d'une accélération de 200 g. Par des tests essais/erreurs nous avons déterminé qu'une accélération de 95 g pendant 10 minutes offrait le meilleur compromis entre le crémage de l'émulsion et la non-destruction de celle-ci.

I.8 Conclusion et Discussion

Nous avons été confrontés à des difficultés pour l'obtention d'émulsions de Pickering de D4 recouvertes de nanocristaux de cellulose, en raison de deux phénomènes imposant des caractéristiques physico-chimiques contradictoires que nous n'avions pas identifiées immédiatement. Ainsi que l'ont montré très récemment Kalashnikova et *al.*, il est difficile voire impossible d'obtenir des

émulsions stabilisées par des CNC lorsque leur taux de charge est supérieur à 0,03 e/nm^2 [Kalashnikova et al., 2012], ce qui est bien inférieur au 0,57 e/nm^2 des nanocristaux que nous utilisons. L'ionisation partielle des émulsions n'est bien entendu pas un facteur favorable également. Or ces charges de surface sont indispensables pour envisager un dépôt couche par couche de nanocristaux qui nécessite une dispersion colloïdale stable des objets [Jean et al., 2008, Jean et al., 2009]. Dans le cas de nanocristaux de cellulose peu chargés, le dépôt nécessite des techniques de type d'enduction par centrifugation [Cerclier et al., 2010] incompatibles avec la fabrication de capsules multicouches.

Il aurait été envisageable d'utiliser des nanocristaux non-chargés pour effectuer un premier dépôt servant de plateforme à la construction des autres couches. Cependant, les émulsions de Pickering formées à partir de CNC non-chargés par Kalashnikova *et al.* ont des tailles moyennes inférieures à 15 µm, ce qui est bien en-dessous des tailles que nous nous étions fixées [Kalashnikova et al., 2012].

Le couplage des nanoparticules avec un tensioactif cationique, le CPC, permet de résoudre ce problème. L'utilisation d'un complexe CPC/CNC (1/1 en concentration massique) permet de stabiliser l'émulsion H/E sans obtenir de floculation de gouttes. Dans ces conditions, nous pensons que le tensioactif vient s'adsorber sur les nanoparticules, les rendant plus hydrophobes. Ceci entraîne une augmentation de l'angle de contact $\theta_{H/E}$ des nanocristaux de cellulose. L'angle de contact $\theta_{H/E}$ est définit comme représenté sur la figure 3.6.

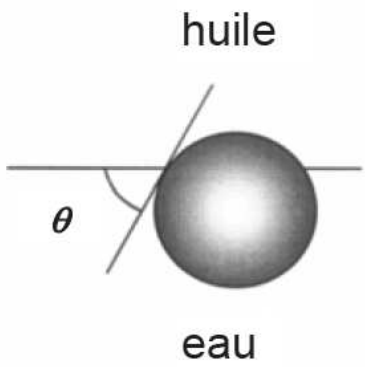


FIGURE 3.6 – Représentation schématique de l'angle de mouillage d'une particule à l'interface eau/huile.

Comme il est également en excès par rapport aux CNC, il va également venir recouvrir en partie les gouttes avant les particules, ce qui entraîne une diminution de la tension de surface des gouttes $\gamma_{H/E}$. Rappelons que l'énergie de désorption d'une nanoparticule sphérique de rayon R d'une interface huile/eau vers la phase aqueuse est :

$$E_{desorp} = \gamma_{H/E}\pi R^2(1 - cos\theta_{H/E})^2 \ [Lopetinskyet\ al., 2006] \tag{3.1}$$

Une particule est donc mieux maintenue à l'interface quand l'angle de contact est proche de 90°. Il a été montré qu'une surface plane de nanocristaux de cellulose présente un angle de

contact inférieur à 5° [Aulin, 2009] pour différentes huiles. Ainsi, en prenant la valeur $\theta_{H/E}$ = 5°, $\gamma_{H/E}$ = 17,9 mN.m^{-1} [Palczewska-Tulinska and Oracz, 2005] et R = 67 nm (mesure de la taille des nanocristaux par DLS) nous obtenons $E_{desorp} \approx k_b T$. Si un CNC s'adsorbe à la surface, l'énergie d'agitation thermique suffit à le détacher et à le ramener dans la phase aqueuse. Le tensioactif augmente l'angle de mouillage des nanoparticules mais diminue la tension de surface. Cependant, les faibles variations de $\theta_{H/E}$ ont plus d'impact que celles de $\gamma_{H/E}$. Ainsi, nous pensons qu'en présence de CPC l'énergie de désorption est augmentée d'où une meilleure stabilisation des émulsions.

Des émulsions de taille contrôlée stabilisées par un mélange de CNC et de CPC ont pu être créées par la technique de l'émulsification sur grille calibrée. Par cette méthode, en utilisant différents tailles de pores nous avons pu contrôler la taille moyenne des gouttes obtenues. En effet, il existe une relation linéaire entre la maille de la toile à bluter (la membrane) et D_{moy}. Dans notre cas, une maîtrise qualitative du débit suffit à contrôler de manière satisfaisante la taille des gouttes avec des coefficients de variation de l'ordre de 0,5 classiques pour ce type de procédé. Nous avons également pris conscience que pour obtenir une reproductibilité optimale, il faut utiliser un système dont la pression est contrôlée.

Les variations de diamètre moyen d'une émulsification à l'autre ne posent cependant pas de réel problème. En effet, l'obtention d'une distribution qui s'étend de 10 à 100 µm permet d'étudier plusieurs tailles de capsules simultanément, ce qui représentera un avantage pour la détermination de la loi de déformation. En effet, les morphologies observées dépendent théoriquement de l'épaisseur et du rayon de la coque étudiée [Landau and Lifshitz, 1986, Knoche and Kierfeld, 2011, Quilliet, 2012]. Les lois de comportement s'établissent donc en fonction de ces deux paramètres que nous allons pouvoir faire varier individuellement, soit en changeant la taille des gouttes, soit en changeant l'épaisseur (voir Chapitre 4 et 5).

L'émulsification sur une grille calibrée à nécessité l'utilisation d'un viscosifiant afin de contrôler au mieux la taille des objets crées. Dans notre cas nous avons utilisé la carboxyméthylcellulose qui est chargé négativement en solution. Si ce viscosifiant ne devrait pas avoir d'interaction directe avec la cellulose dans nos conditions, il est envisageable que des interactions de type électrostatique est lieu avec le CPC. Ainsi, nous ne n'omettons pas la possibilité que de la CMC vienne également se déposer à la surface des gouttes et favorise leur stabilité. Actuellement, nous ne sommes pas certains de qui, entre les CNC et les CMC, interagit avec le CPC pour stabiliser les gouttes de D4 dans l'eau. Il s'agit sûrement d'un mélange des deux et une étude plus approfondie de cette couche initiale est envisagé afin d'optimiser le protocole d'émulsification et de stabilisation. De plus, la fragilité relative de l'émulsion nous laisse penser que la surface des gouttes n'est pas entièrement recouverte par de la cellulose. Il serait intéressant d'observer cette couche, par microscopie électronique à balayage par exemple.

II Films composites cellulose/xyloglucanes

En première approximation, les parois des capsules multicouches que nous allons élaborer puis déformer sont supposées équivalentes à des nanocomposites composés d'un renfort (les CNC) et d'une matrice (les xyloglucanes, ou XG). Afin de comprendre les mécanismes de déformation de ces capsules, il est intéressant d'avoir une idée des caractéristiques mécaniques de ces assemblages.

L'objet de cette partie est donc d'évaluer la valeur du module élastique tridimensionnel de nanocomposites CNC/XG dans des situations expérimentales proches de celle des systèmes étudiés. Comme nous allons le voir par la suite, les systèmes multicouches sont au départ hydratés, puis séchés *in-situ* sur la capsule par évaporation. Ce mécanisme conduit très probablement à la formation d'un réseau percolant de nanocristaux de cellulose liés par liaisons hydrogène et imprégné d'une matrice xyloglucane. Cependant, la détermination des propriétés mécaniques de ces films minces est de manière générale très délicate en raison de leur très faible épaisseur. Dans le domaine plus particulier et encore peu développé des assemblages multicouches incluant de la cellulose, une estimation du module d'Young d'assemblages Polyethyleneimide/nanofibrilles de cellulose par flambage de films a donné des valeurs de 1,5 ± 0,2 GPa à un taux d'humidité de 50% et de 17,2 ± 1,2 GPa à une taux d'humidité de 0% [Cranston et al., 2011]. Ces modules sont indépendants de l'épaisseur du film.

La structure d'un tel matériau est en revanche tout à fait comparable à celle des systèmes les plus fréquemment décrits dans la littérature en ce qui concerne les matériaux nanocomposites renforcés par des nanocristaux de cellulose [Eichhorn et al., 2010]. Dans la très grande majorité des cas, ces matériaux sont obtenus par évaporation d'un mélange d'une suspension de nanocristaux et d'un polymère soit hydrosoluble soit dispersé sous forme de latex [Favier et al., 1995, Dubief et al., 1999], et ce pour assurer une bonne dispersion au sein de la matrice. En raison de ce procédé de séchage qui conduit à une très grande réduction de volume, on s'attend à ce que ces matériaux nanocomposites aient la structure d'un réseau percolant pseudo-2D en interaction avec une matrice continue, analogue à une feuille de papier à l'échelle nanométrique [Moon et al., 2011].

Cette problématique a été abondamment étudiée dans la littérature, dans des situations très diverses en terme de matériaux de départ. Les propriétés mécaniques de ces assemblages y sont dans la grande majorité des cas décrites en suivant un modèle de percolation mis au point pour rendre compte des propriétés de renfort de l'un des tous premiers systèmes élaborés selon ce procédé [Favier et al., 1995]. Pour des raisons essentiellement pratiques (les fortes fractions volumiques en nanocristaux d'une part, qui rendent le système très cassant, et d'autre part les importants volumes d'eau à manipuler), la plupart de ces matériaux nanocomposites ont été étudiés pour des fractions volumiques en cellulose inférieures à 15% [Azizi Samir et al., 2005].

Pour évaluer quel système pourrait être représentatif de ces matériaux, il est nécessaire de connaître la composition précise des systèmes multicouches, ce qui n'est pas toujours facile à évaluer en raison de leur faible épaisseur. Dans le cas qui nous préoccupe, la très grande proximité

chimique des deux espèces en présence, qui partagent un même squelette de glucose liés en β-1,4, rend l'analyse par spectroscopie particulièrement délicate. L'évaluation des épaisseurs relatives de chacun des constituants par réflectivité des neutrons conduit à une évaluation de l'épaisseur totale des couches de l'ordre de 9 nm [Jean et al., 2009]. L'épaisseur des nanocristaux étant de 6 à 7 nm, cela conduit à un modèle de nanocristaux recouvert d'une fine couche de xyloglucane, soit une proportion d'environ 75% de cellulose et 25% de XG.

Ces proportions sont compatibles avec les situations rencontrées au sein des parois primaires, avec cependant une proportion probablement plus élevée de cellulose au sein de nos assemblages. Afin d'évaluer également l'impact d'un changement de composition sur les propriétés mécaniques de ces films, et de séparer les contributions de chacun des composants, nous avons fait varier la composition des films obtenus par évaporation de 0 à 100% de chacun des constituants par pas de 25%. Dans cette situation expérimentale, nous pouvons nous attendre à ce que le séchage et la très forte réduction de volume conduisent effectivement à la formation d'un réseau percolant de nanocristaux enrobés de polymères, qui serait assez semblable à ce qui peut se passer au sein des systèmes multicouches plans. Nous espérons de cette série de mesure qu'elle va nous donner des informations sur le rôle du réseau de nanocristaux de cellulose au sein des assemblages et sur l'influence de la composition sur les propriétés mécaniques.

Tout comme le papier, les propriétés élastiques de ces réseaux percolants de nanocristaux de cellulose sont très sensibles au degré d'humidité. Si l'adsorption d'eau par la cellulose est un sujet bien documenté, l'impact de sa présence sur les propriétés des réseaux percolants a été en revanche beaucoup moins étudié. Un petit nombre seulement de travaux récents se réfère à cette situation [Capadona et al., 2008, Peresin et al., 2010, Rusli et al., 2010]. Afin d'avoir un éclairage sur l'impact de l'humidité sur les propriétés de ces systèmes, nous avons donc également étudié leurs propriétés élastiques pour différents taux d'humidité.

II.1 Etude expérimentale des propriétés de traction

L'une des difficultés de l'étude des propriétés élastiques des films minces concerne la mesure de l'épaisseur. Une étude préliminaire a montré que l'incertitude liée à la mesure était d'environ 15% sur des séries d'échantillon homologues. Par ailleurs, la fragilité des échantillons rend délicate leur manipulation, et particulièrement leur installation pour des essais dans la machine de traction. Lorsque le degré d'humidité est trop bas, les films sont relativement cassants, surtout ceux à haute teneur en cellulose. Les fissures créées sur les bords d'échantillons lors de la découpe peuvent entraîner des défauts de type indentation dans les profils de courbe de contrainte en fonction de la déformation, et fausser la mesure. Pour cette raison, nous n'avons pas pu obtenir de données fiables pour les plus hauts taux de cellulose aux degrés d'humidité les plus faibles. Les résultats de valeur de module en fonction du taux d'humidité et de la teneur en cellulose sont présentés sur la figure 3.7, et les valeurs numériques dans le tableau 3.5.

TABLEAU 3.5 – Valeur de module d'Young en GPa de films nanocomposites à différentes teneurs en nanocristaux de cellulose en poids, en fonction du taux d'humidité relative.

	RH = 0 %	**RH = 43 %**	**RH = 75 %**	**RH = 98 %**
0 % CNC	2	1,2	0,8	0,2
25% CNC	2,9	2	1,9	0,5
50% CNC		3,2	2	0,9
75% CNC		4,2	3,1	1,2
100% CNC				1,3

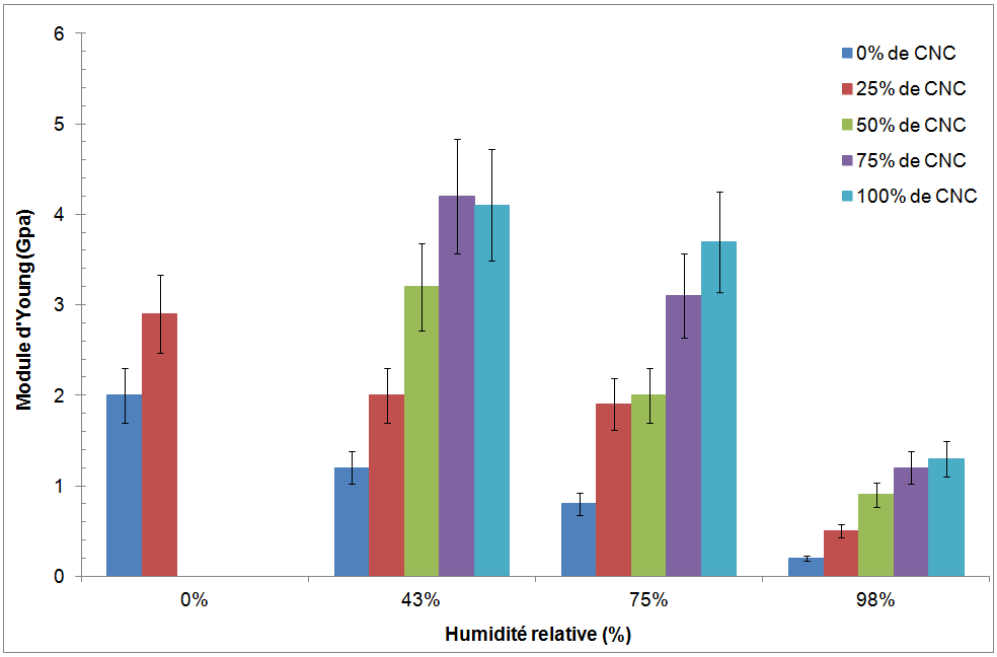


FIGURE 3.7 – Module d'Young de films nanocomposites à différentes teneurs en nanocristaux de cellulose en poids, en fonction du taux d'humidité relative.

Les valeurs de module d'Young suivent une évolution continue significative en fonction à la fois du taux de nanocristaux et du taux d'humidité relative. Elles augmentent avec le taux de CNC et diminuent avec le taux d'humidité. Nous allons traiter ces deux effets séparément. En dépit de l'absence de données, en particulier pour les taux d'humidité les plus faibles, nous pouvons cependant chercher à séparer l'influence de chacun des paramètres.

II.1.1 Influence de l'humidité relative

La présence d'eau va jouer deux rôles au sein du nanocomposite. Le premier est celui de plastification de la matrice. Ainsi qu'il a déjà été décrit pour de nombreux polysaccharides, les films de xyloglucane sont particulièrement hydrophiles. Les isothermes d'adsorption d'eau en fonction du taux d'humidité révèlent une teneur en eau qui peut varier de 4% d'eau en poids, à 15% d'humidité relative, à 40% d'eau pour une humidité relative de 99% [Kochumalayil et al., 2010]. Cette présence d'eau joue un rôle plastifiant au sein de la matrice, conduisant à une diminution de module et une augmentation de l'extensibilité. Il est cependant à noter que les valeurs absolues

de modules que nous mesurons sont inférieures à celles données par Kochumalayil et al., et ce probablement en raison de la différence de nature et de mise en forme des échantillons.

Le second effet de la présence d'eau est l'affaiblissement du réseau percolant de charges, qui conduit à une diminution de module par rupture des liaisons hydrogène entre nanocristaux et ainsi à la destruction du réseau de charges [Capadona et al., 2008, Rusli et al., 2010]. L'origine exacte de cet effet est très débattu depuis récemment dans la littérature [Moon et al., 2011], l'affaiblissement des interactions entre la matrice et le réseau de nanocristaux pouvant être invoqué pour justifier de ces pertes de propriétés. Quoi qu'il en soit, cet effet est visible pour tous les taux de charge et entre en compétition avec l'influence de la plastification de la matrice.

II.1.2 Influence de la quantité de nanocristaux

De manière assez attendue, la présence de nanocristaux au sein de la matrice xyloglucane renforce celle-ci quelque soit le taux d'humidité relative. Lorsque nous représentons la variation du module en fonction de la quantité de nanocristaux, nous constatons une évolution linéaire sur toute la gamme considérée de 0 à 100% de renforts (Fig. 3.8).

Les deux bornes auxquelles on s'attend pour ce type de matériau biphasé sont les suivantes :

- limite supérieure : une association en parallèle des deux systèmes, polymère et nanocharge, pour laquelle les modules s'additionnent à proportion de leur fraction volumique (addition des contraintes).
- limite inférieure : une association en série, pour laquelle ce sont les inverses des modules qui s'additionnent (addition des déformations).

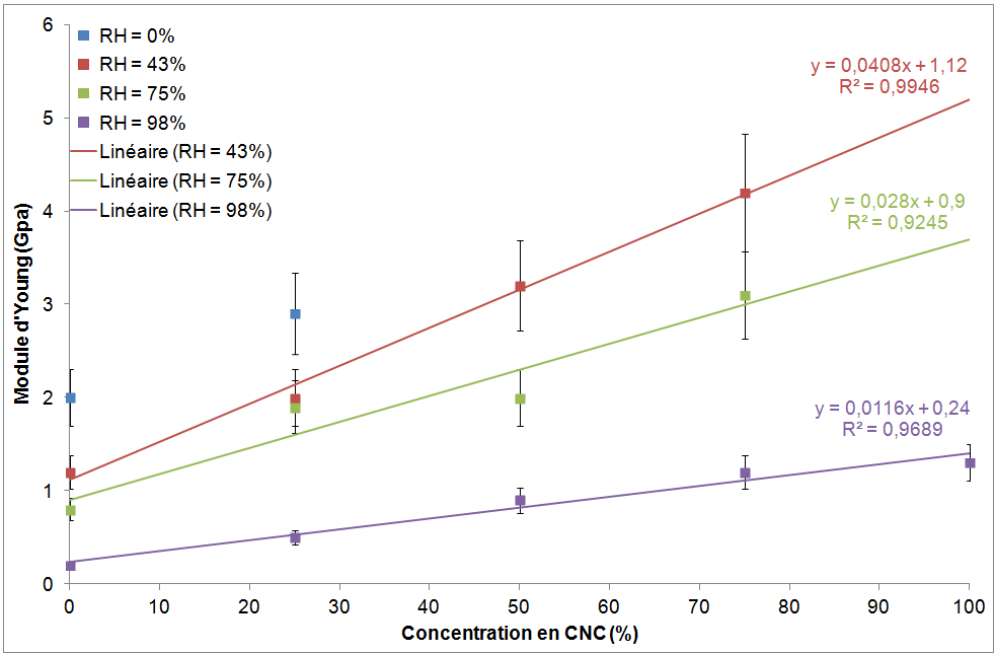


FIGURE 3.8 – Module d'Young de films nanocomposites à différente taux d'humidité relative en fonction de la teneur en nanocristaux de cellulose.

Le comportement clairement linéaire qui se dégage des données expérimentales suggère une association en parallèle des contributions des deux systèmes, matrice polymère et réseau de nanocharges. Cette situation correspond à deux phases indépendantes, l'une constituée du réseau de nanocharges et l'autre du polymère, ce qui correspond bien à l'idée que l'on se fait du système expérimental obtenu après évaporation d'un mélange d'une suspension de nanocristaux et d'une solution de xyloglucane.

De ces relations linéaires, nous pouvons également extrapoler le module d'un réseau constitué de 100% de nanocristaux pour les deux humidités relatives pour lesquelles nous n'avions pas de données expérimentales. L'ordonnée à l'origine nous donnera le module de la phase polymère. On trouve ainsi les valeurs suivantes pour les deux phases :

TABLEAU 3.6 – Valeurs de modules respective des deux phases du composites CNC/XG extrapolée des valeurs de modules obtenues pour les mélanges à différents taux d'humidité

	RH = 0 %	**RH = 43%**	**RH = 75 %**	**RH = 98 %**
E 100% CNC (GPa)	NC	4,10	3,70	1,40
E 100% XG (GPa)	1,10	0,90	0,20	

Les valeurs obtenues pour les films de CNC sont tout à fait compatibles avec ceux données dans la littérature, annonçant un module de 2,1 GPa pour un films de nanocristaux de coton [Bras et al., 2011b]. Il faut cependant garder en mémoire que ce module dépend beaucoup des caractéristiques des nanocristaux, en particulier du facteur de forme [Bras et al., 2011b]. L'influence de l'humidité relative est cohérente avec l'affaiblissement des liaisons hydrogène du réseau percolant de nanocristaux. En ce qui concerne la matrice xyloglucane, l'extrapolation décrit également très correctement la plastification par l'eau de ce polymère hydrophile.

II.2 Discussion

Ce modèle très simple d'association de deux phases en parallèles permet de rendre compte des données expérimentales, et nous a permis d'évaluer à la fois les ordres de grandeur et la variabilité des modules de films de nanocristaux et de xyloglucanes en fonction de la quantité de renfort et de l'humidité. La description classique des nanocomposites à renforts de nanocristaux de cellulose, obtenus par évaporation de suspension de nanocristaux et de polymère (généralement sous forme de dispersion) fait entrer en jeu la percolation des charges au sein de l'échantillon, formant un réseau en série avec le reste de la matrice et des charges non percolantes [Favier et al., 1995]. Le seuil de percolation dépend alors du facteur de forme de la particule suivant une relation du type $\phi_c = 0.7/f$ [Nan, 1993], avec ϕ_c la fraction volumique au seuil de percolation et f le facteur de forme de la particule. Même s'il n'est pas facile de déterminer un facteur de forme univoque en raison du caractère biaxial des nanocristaux, en prenant un diamètre moyen de 15 nm et une longueur de 150 nm nous pouvons l'estimer à une fraction volumique d'environ 7%, ce qui est bien en-dessous des fractions volumiques que nous avons testées.

Dans ces conditions, nous pouvons donc estimer que la quasi-totalité du réseau de nanocristaux est engagé dans le réseau percolant, ce qui justifie l'adéquation de la borne supérieure des modèles mécaniques (les deux phases en parallèle).

Cependant, si cette description permet de rendre compte de la valeur du module tel qu'il est mesuré dans les expériences de traction, elle ne permet en revanche pas de décrire l'anisotropie des propriétés mécaniques et le caractère bidimensionnels de ce type de films. Il est bien connu des cristallographes de la cellulose que le dépôt d'un film de nanocristaux de cellulose conduit à une orientation bidimensionnelle des cristaux parfaitement identifiable par diffraction en suivant l'intensité des réflexions liés au plan perpendiculaire à l'axe des nanocristaux [Yoshiharu et al., 1997]. Ce phénomène, aussi appelé uniplanarité a été également identifié dans des systèmes mixtes nanocristaux de cellulose/XG lors du séchage de ces mélanges [de Souza et al., 2012]. Il renforce l'analogie entre les systèmes nanocomposites obtenus par évaporation et les systèmes multicouches.

Quoiqu'il en soit, ces expériences sur des films tridimensionnels nous donnent une évaluation de l'ordre de grandeur du module des assemblages CNC/XG. La variation des paramètres de concentration en CNC et d'humidité relative nous permettent également d'évaluer la sensibilité de la valeur de ce module à ces paramètres expérimentaux. En tout état de cause, dans les conditions expérimentales dans lesquelles nous allons travailler pour la déformation des capsules (concentration estimée en cellulose de 75%, degré d'humidité faible), nous pouvons estimer que la valeur du module sera de l'ordre de 4 GPa. Cette valeur est parfaitement compatible avec celles mesurées par flambage sur les films PEI/nanofibrilles de cellulose estimées à 1.5 GPa pour une humidité relative de 50%. La sensibilité modérée de cette valeur aux différents paramètres laisse supposer que la valeur réelle du module ne devrait pas être trop différente de celle que nous avons estimée. Il faut bien entendu garder à l'esprit que cette valeur doit être considérée comme une estimation susceptible d'être réévaluée.

Chapitre 4

Élaboration et caractérisation des capsules

Dans ce chapitre, l'élaboration et la caractérisation de capsules multicouches de nanocristaux de cellulose (CNC) et de xyloglucanes (XG) sont présentées. Deux types de capsules sont étudiées : des capsules au coeur "liquide" et des capsules au coeur "solide". Les premières sont construites par dépôts successifs de CNC et XG, sur une émulsion d'une huile silicone, l'octaméthylcyclotétrasiloxane (D4), dans l'eau stabilisée par des complexes de chlorure de cétylpyridinium et de nanocristaux de cellulose (CPC/CNC). Elles servent à l'étude des propriétés mécaniques de la paroi des capsules multicouches (Chapitre 5). Le second type de capsules a été élaboré par dépôts successifs, sur des gouttes d'une résine liquide non miscible à l'eau et polymérisable (*LR white*), stabilisée par des complexes CPC/CNC. Ces capsules ont été utilisées pour vérifier la transposabilité du dépôt couche par couche, sur une émulsion d'un autre type d'huile stabilisée par des CNC, et également pour caractériser la morphologie des couches formées et mesurer leur épaisseur en microscopie électronique.

Dans un premier temps, l'adsorption de couches successives de CNC et de XG est mise en évidence par des observations en microscopie confocale à balayage laser (MCBL), pour des capsules à coeur liquide et solide. Puis, l'effet du dépôt couche par couche sur la taille des gouttes de l'émulsion initiale est présenté pour des capsules au coeur liquide. Enfin l'épaisseur de la paroi et l'organisation des nanocristaux de cellulose à sa surface ont été caractérisées en microscopie électronique sur des capsules à coeur solide.

I Présentation de la fabrication des capsules par la méthode couche par couche

L'épaisseur d'une bicouche sèche de xyloglucanes et de nanocristaux de cellulose est d'environ 9 nm [Jean et al., 2009]. La paroi primaire des cellules végétales a une épaisseur de 100 nm, il faut donc déposer une dizaine de bicouches pour atteindre cette taille. Nous avons choisi de déposer un maximum de 15 bicouches pour former les capsules. Si le dépôt se déroule comme sur une surface plane, nous devrions obtenir une paroi d'une épaisseur de 135 nm environ autour des gouttes de l'émulsion, quand la paroi est sèche.

Le processus de dépôt couche par couche de CNC et de XG sur une goutte d'huile dans l'eau stabilisée par des CNC est illustré sur la figure 4.1. Le greffage des fluorophores sur les CNC et les XG, utilisés pour les observations en microscopie confocale à balayage laser (MBCL), a été réalisé comme décrit dans le chapitre 2 §I.4.

Dans la suite de ce document, toutes les capsules (sauf si mentionné) sont terminées par une couche de nanocristaux de cellulose. Cela permet de limiter l'aggrégation des objets par répulsion électrostatique. En effet, les CNC étant chargées négativement, la surface l'est également. Une capsule dite de 5 bicouches correspond donc en réalité à 4,5 bicouches : 5 couches de CNC et 4 couches de XG, notée CPC/CNC/$(XG/CNC)_4$. Cette approximation est faite, car nous supposons

que les propriétés mécaniques des capsules proviennent essentiellement des couches de nanocristaux de cellulose, les xyloglucanes étant un liant entre chaque couche.

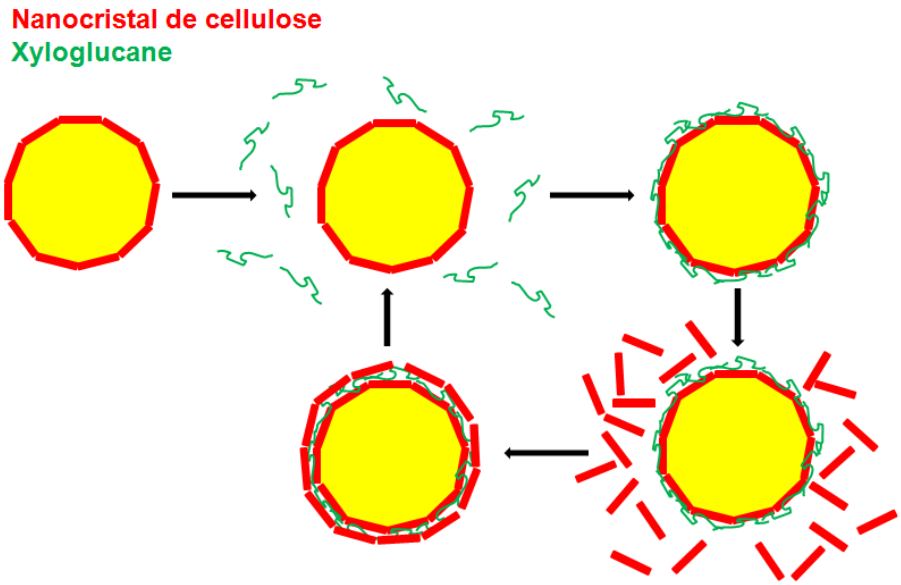


FIGURE 4.1 – Illustration du dépôt couche par couche de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes sur une goutte d'huile dans l'eau stabilisée par des CNC.

Les capsules étudiées par la suite seront :

1. L'émulsion initiale : D4 ou LRW CPC/CNC
2. Des capsules de 5 bicouches : D4 ou LRW CPC/CNC/$(XG/CNC)_4$
3. Des capsules de 10 bicouches : D4 ou LRW CPC/CNC/$(XG/CNC)_9$
4. Des capsules de 15 bicouches : D4 ou LRW CPC/CNC/$(XG/CNC)_{14}$

II Contrôle du dépôt de couche par microscopie confocale à balayage laser

Pour mettre en évidence l'adsorption de matière sur la capsule lors des dépôts successifs, ceux-ci ont été réalisés avec des nanocristaux de cellulose et des xyloglucanes marqués par un fluorophore. La présence des CNC et des XG à la surface des gouttes est mise en évidence par des observations de microscopie confocale à balayage laser (MCBL).

Les nanocristaux de cellulose et les xyloglucanes ont été marqués avec des fluorophores différents. La rhodamine B isothiocyanate (RBITC) à été couplée aux CNC et la fluoréscéine isothiocyanate (FITC) aux xyloglucanes. Nous utilisons la terminologie CNC-RBITC et XG-FITC pour identifier les CNC et les XG marqués. Ils sont utilisés séparément afin d'éviter toute fluorescence parasite due au recoupement des spectres d'émissions des fluorophores.

II.1 Étude des artefacts liés à la microscopie confocale à balayage laser

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que les objets étudiés ne produisent pas un signal de fluorescence qui leur est propre (auto-fluorescence) dans les conditions d'observation. Pour mettre en évidence l'existence potentielle de cet artefact un échantillon de capsules, à coeur liquide, à 1 bicouche (21 µm D4 CPC/CNC/XG) est étudié en microscopie confocale à balayage laser (MCBL). Les figures 4.2 et 4.3 présentent un exemple d'observation de l'échantillon sur le canal de la FITC et de la RBITC.

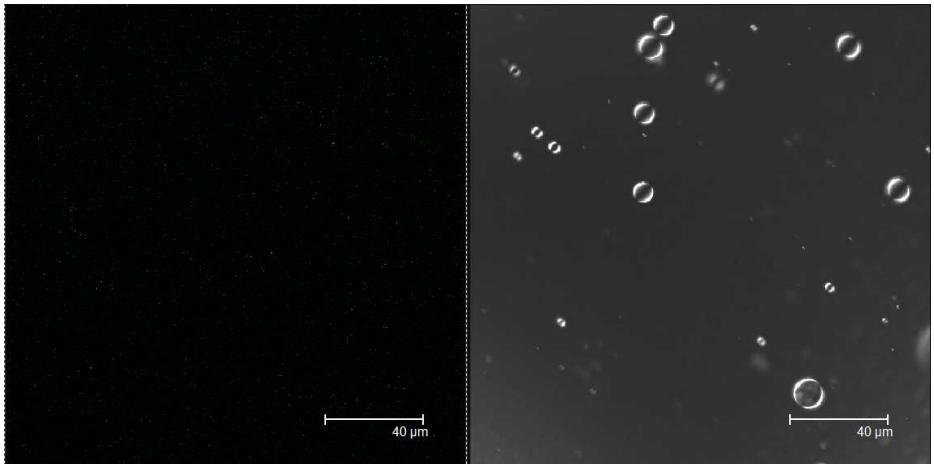


FIGURE 4.2 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une émulsion de D4 dans l'eau stabilisée par des nanocristaux de cellulose, et plongée dans un solution de xyloglucanes non fluorescents pendant 20 minutes, puis rincée. Observation sur le canal du FITC du microscopie. Objectif à immersion huile x40, gain 830.

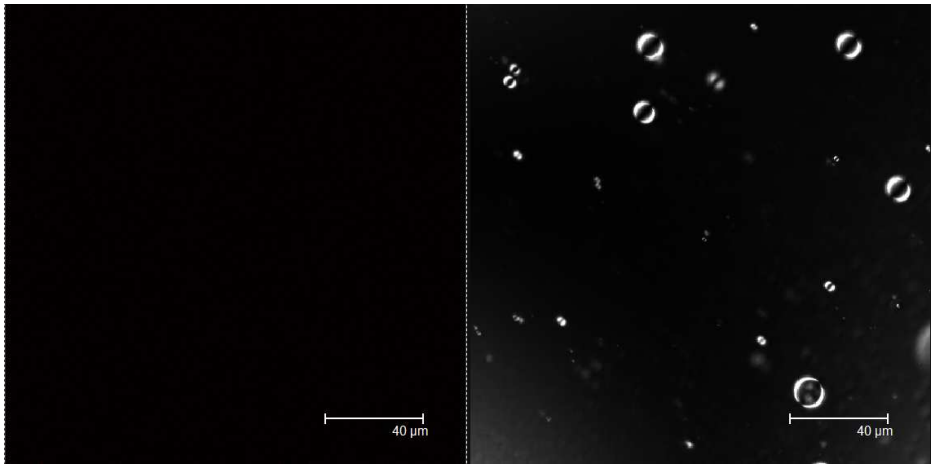


FIGURE 4.3 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une émulsion de D4 dans l'eau stabilisée par des nanocristaux de cellulose, et plongée dans un solution de xyloglucanes non fluorescents pendant 20 minutes puis rincée. Observation sur le canal du RBITC du microscopie. Objectif à immersion huile x40, gain 775.

Aucune fluorescence spécifique n'est détectée, que ce soit sur l'interface eau/huile (au niveau de la paroi) ou dans la goutte. Les nanocristaux de cellulose, les xyloglucanes et l'huile silicone ne produisent pas de signal d'auto-fluorescence dans les conditions d'observation utilisées pour contrôler le dépôt des couches.

Le même type d'expérience a été réalisé pour des capsules à coeur solide. Une émulsion de LR white polymérisée, stabilisée par des nanocristaux de cellulose a été observée en MCBL. La figure 4.4 présente une image de cet échantillon sur le canal d'observation du RBITC. Comme le D4, la résine utilisée comme support à la construction des capsules ne produit pas de signal lumineux dans les conditions utilisées pour étudier la croissance de la paroi avec le dépôt de couche.

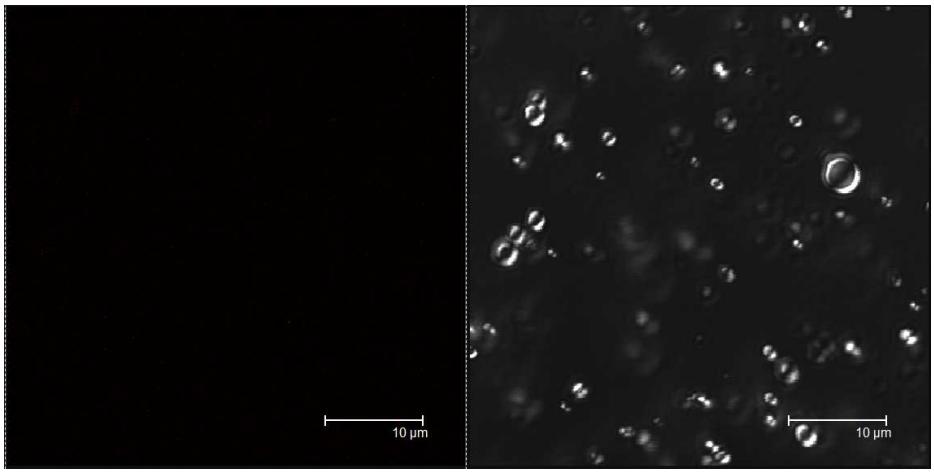


FIGURE 4.4 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une émulsion de LR white polymérisée dans l'eau stabilisées par des nanocristaux de cellulose non modifiés sur le canal du RBITC. Objectif à immersion huile x40, gain 770.

Dans un deuxième temps, nous avons testé la spécificité du signal. En effet, même si la suspension de CNC-RBITC et la solution de XG-FITC sont dialysées avant d'être utilisées, il peut rester des molécules fluorescentes non greffées aux polymères dans le milieu. Celles-ci peuvent venir s'adsorber à la surface de la capsule et produire un signal de fluorescence autour de la goutte sans qu'aucun CNC-RBITC ou XG-FITC ne soit présent à la surface. Pour juger de l'importance de ce phénomène d'adsorption non spécifique des molécules fluorescentes, une émulsion de D4 stabilisée par des CNC non marqués est plongée dans une solution de RBITC ou de FITC à 0,5 g/L pendant 20 minutes, puis rincée. Ces émulsions sont ensuite observées en MCBL. Des exemples d'observations sont présentés sur les figures 4.5 et 4.7.

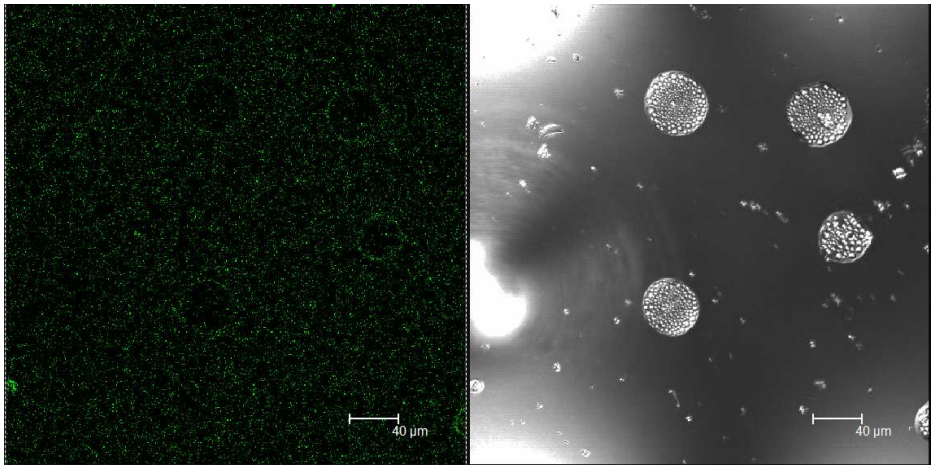


FIGURE 4.5 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une émulsion de D4 dans l'eau stablisée par des nanocristaux de cellulose plongée dans une solution de FITC à 0,5 g/L pendant 20 minutes, puis rincée. Observation sur le canal du FITC du microscope. Objectif à immersion huile x40, gain 999.

Dans le cas de la FITC, aucune fluorescence particulière n'est détectée autour des gouttes après rinçage de l'émulsion (Fig. 4.5). S'il y a adsorption lorsque la goutte est dans la solution du fluorophore, les molécules sont retirées avec les rinçages. Si un signal est détecté autour des gouttes après le passage des capsules dans la solution de XG-FITC, il proviendra uniquement des XG-FITC déposés à la surface. L'aspect granuleux des gouttes sur l'image en lumière transmise nous laisse penser que nous observons des gouttes d'huile aplaties sur la surface de la lame (gouttes sessiles), qui auraient emprisonné des gouttelettes d'eau, entre elles et la surface (Fig. 4.6).

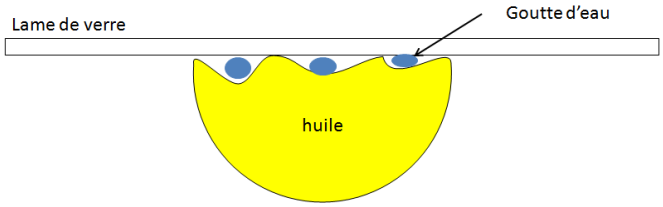


FIGURE 4.6 – Schéma représentatif de l'emprisonnement de gouttelettes d'eau par une goutte d'huile en contact avec une surface plane.

Dans le cas de la RBITC, le contour des gouttes apparaît très légèrement fluorescent (Fig. 4.7). Il est donc possible qu'il y ait adsorption de molécules de RBITC à la surface des gouttes de D4 stabilisées par des CNC. En effet, les CNC étant chargés négativement et la RBITC positivement les interactions électrostatiques favorisent le maintien des molécules adsorbées à la surface des gouttes même après rinçage. Toutefois le signal reste très faible, puisque le gain du détecteur est très élevé (924 avec une maximum de 1000), il est donc considéré par la suite comme du bruit de fond.

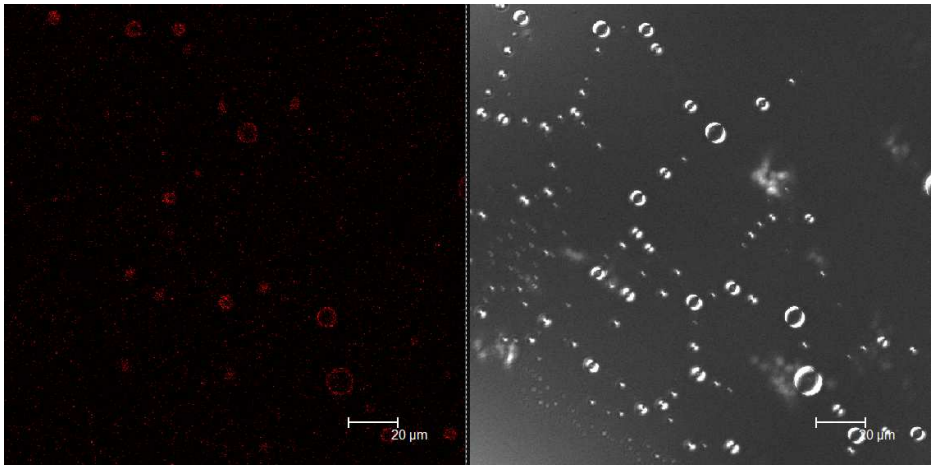


FIGURE 4.7 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une émulsion de D4 dans l'eau stablisée par des nanocristaux de cellulose plongée dans une solution de RBITC à 0,5 g/L pendant 20 minutes, puis rincée. Observation sur le canal du RBITC du microscope. Objectif à immersion huile x40, gain 924.

II.2 Capsules à coeur liquide

II.2.1 Émulsion initiale et dépôt de la première couche de xyloglucanes

Une émulsion de D4 est réalisée sur une membrane de 21 µm en suivant le protocole décrit chapitre II. §II.2. Afin de mettre en évidence la stabilisation des gouttes par les nanocristaux de cellulose, l'émulsification est réalisée avec des CNC-RBITC. Pour s'assurer de l'adsorption de xyloglucanes sur l'émulsion initiale, un dépôt de XG-FITC est réalisé sur une émulsion stabilisée par des CNC non marquées.

Lors de nos observations en MCBL, nous n'avons pas réussi à détecter la première couche de nanocristaux de cellulose formée lors de l'émulsification. Nous n'avons donc pas pu confirmer la présence de la couche stabilisante de CNC en microscopie confocale. Nous pensons que cela peut provenir de mauvaises conditions d'observation ou alors de la faible concentration de CNC à la surface de la goutte due à l'adsorption préférentielle de CMC par rapport aux CNC. Toutefois, en observant après rinçage une émulsion plongée dans une solution de XG-FITC pendant 20 minutes, de la fluorescence est détectée autour de la goutte (Fig. 4.8).

Le signal de fluorescence observé autour de la goutte confirme l'adsorption de XG-FITC à la surface de la goutte, car l'intensité autour des gouttes se démarque du bruit de fond (Fig. 4.8). Comme dans le cas présenté sur la figure 4.5, nous observons des gouttes écrasées sur la lame de verre.

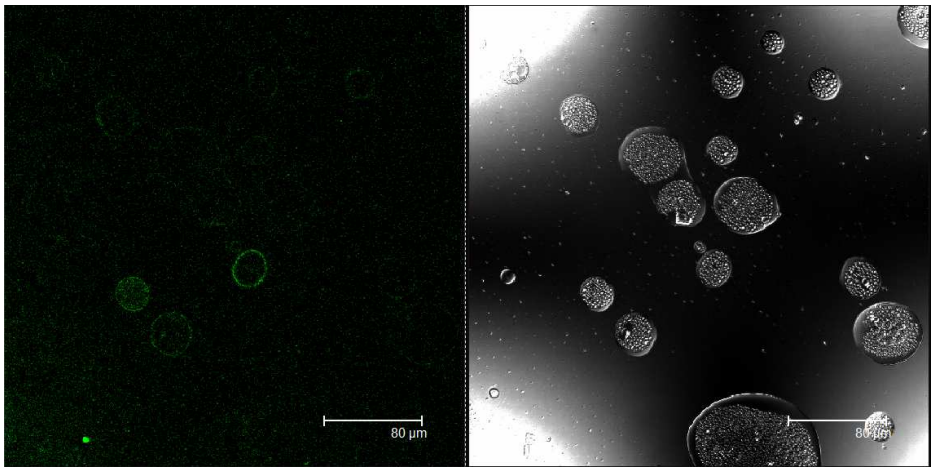


FIGURE 4.8 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une suspension de capsules à une bicouche 21 µm D4 CPC/CNC/XG-FITC. Objectif à immersion huile x40, gain : 1000.

Afin de mesurer quantitativement la fluorescence de la couche de xyloglucanes, un profil d'intensité est acquis sur l'image. Il est calculé sur une bande de 5 pixels d'épaisseur qui traverse la capsule. Le fait d'intégrer sur une bande, par rapport à une ligne, permet d'augmenter le rapport signal sur bruit (RSB). Le graphique 4.9 présente des profils d'intensité obtenus sur l'image 4.8.

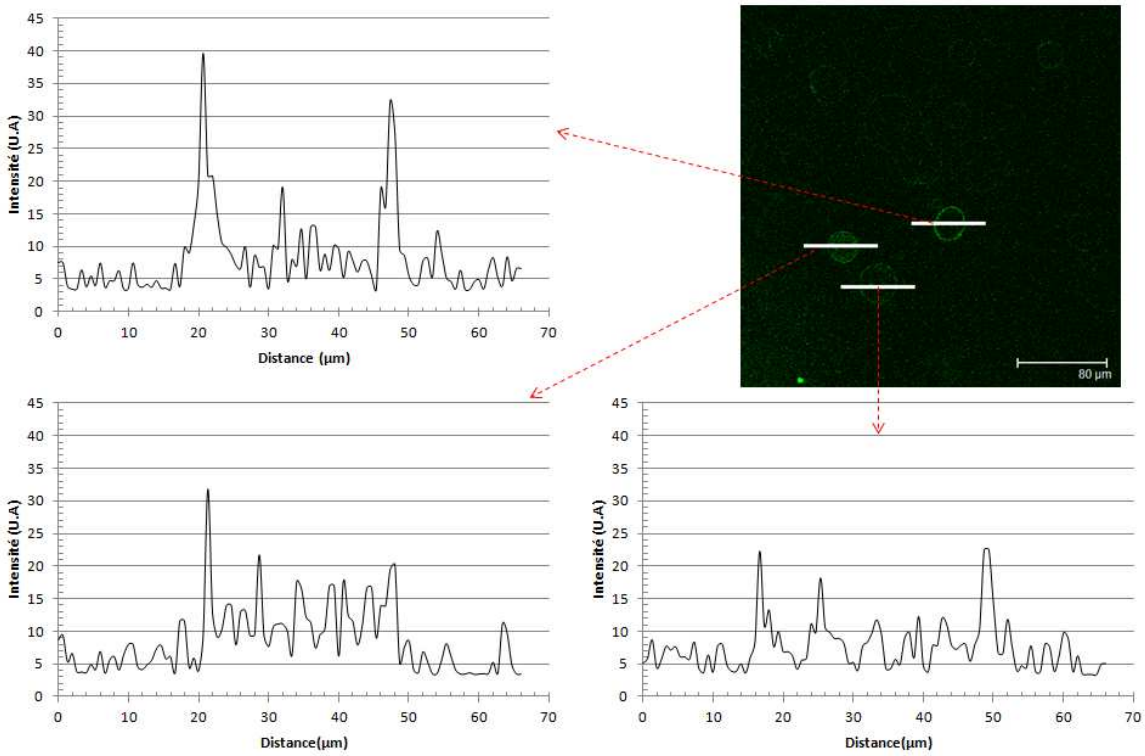


FIGURE 4.9 – Intensité de fluorescence de capsules à une bicouche (21 µm D4 CPC/CNC/XG-FITC) selon les profils représentés par les bandes blanches tracées sur le cliché de MCBL.

La fluorescence de la paroi est supérieure à celle de l'intérieur et de l'extérieur de la capsule (RSB $\sim$ 2-3, Fig. 4.9). Il y a donc bien un dépôt de xyloglucanes sur la goutte. Il est homogène, mais le signal est relativement faible. Il y a donc peu de matière adsorbée. Si aucun CNC-RBITC n'est détecté sur l'émulsion initiale, la présence de xyglucanes après dépôt confirme la présence de cellulose sur la goutte. Même si la couche stabilisante de CNC n'est pas dense il y a suffisamment de nanoparticules pour permettre un dépôt homogène de xyloglucanes à la surface des gouttes.

La première couche de XG se met en place sur les gouttes de D4 stabilisée par des CNC. Nous allons pouvoir envisager la construction d'un multicouche sur une émulsion de D4 dans l'eau préparée dans nos conditions.

II.2.2 Croissance de la paroi

Pour contrôler la croissance de la paroi, nous avons déposé successivement 2 couches de CNC-RBITC ou 3 couches de XG-FITC sur une émulsion de D4 dans l'eau stabilisée par des nanocristaux de cellulose. Dans le premier cas, l'émulsification est réalisée avec des CNC-RBITC et dans le second avec CNC non marqués. Les échantillons sont ensuite observés en MCBL. Les figures 4.10 et 4.11 présentent respectivement une image de MCBL de la capsule 21 µm D4 CPC/CNC-RBITC/(XG/CNC-RBITC)$_2$ et des profils d'intensité obtenus sur la figure 4.10.

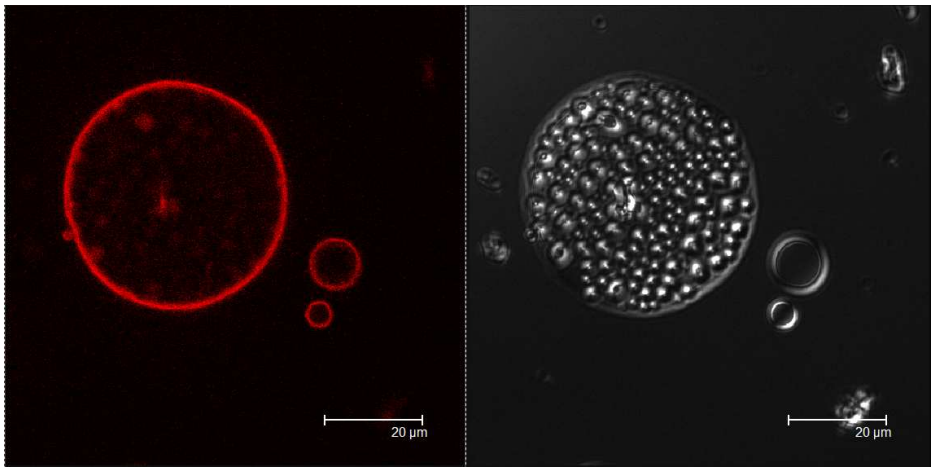


FIGURE 4.10 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une suspension de capsules à 3 bicouches (21 µm D4 CPC/CNC-RBITC/(XG/CNC-RBITC)$_2$). Objectif à immersion huile x40, gain : 921.

En présence de 3 couches de CNC-RBITC (la couche stabilisant l'émulsion et 2 couches déposées), la paroi de la capsule produit un signal de fluorescence qui se démarque du bruit de fond (RSB $\sim$ 8, Fig. 4.11). Il y a donc adsorption de CNC pendant l'étape de dépôt. Nous observons qu'après 3 bicouches le dépôt de nanocristaux de cellulose est uniforme à la surface des gouttes, elle sont donc entièrement recouvertes de CNC.

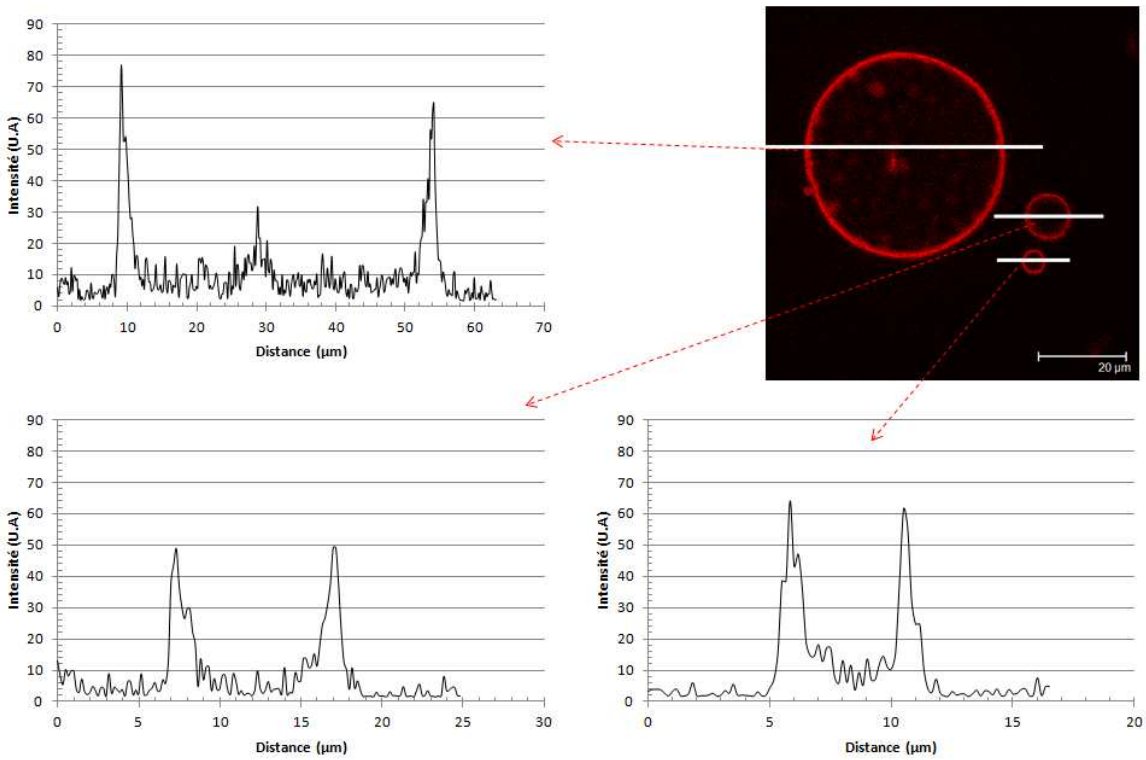


FIGURE 4.11 – Intensité de fluorescence de capsules contenant 3 couches de CNC-RBITC (21 µm D4 CPC/CNC-RBITC/(XG/CNC-RBITC)$_2$) selon les profils représentés par les bandes blanches tracées sur le cliché de MCBL.

Le même type d'expérience est réalisé pour mettre en évidence le dépôt de couche XG. La figure 4.12 présente une image en MCBL d'une capsule ayant reçu 3 dépôts successifs de XG-

FITC, espacés par le dépôt de CNC non fluorescents. Des profils d'intensité des capsules présentes sur l'image 4.12, sont représentés sur la figure 4.13.

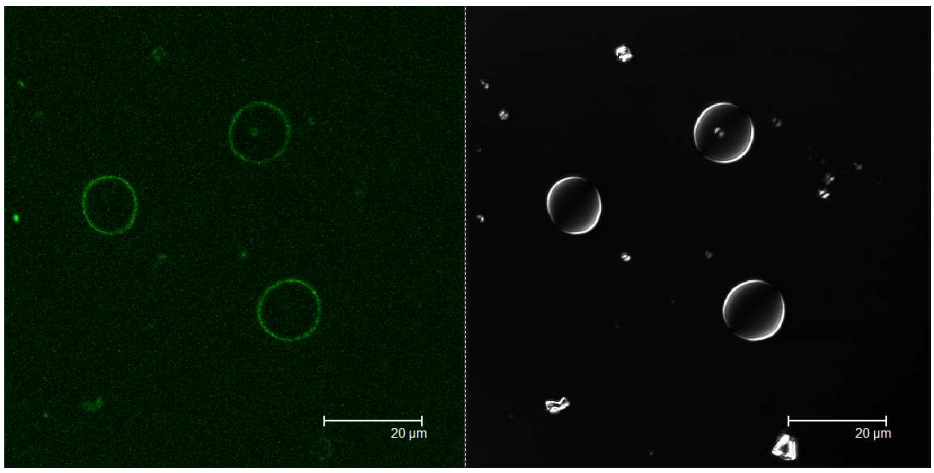


FIGURE 4.12 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une suspension capsules à 3 bicouches (21 µm D4 CPC/CNC/(XG-FITC/CNC)$_2$/XG-FITC). Objectif à immersion huile x40, gain : 880.

D'un point de vue semi-quantitatif, il semblerait que l'intensité du signal, par rapport au bruit de fond, soit plus forte après le dépôt de 3 couches successives (RSB $\sim$ 4-5, Fig. 4.13) comparativement au dépôt d'une seule (RSB $\sim$ 2-3, Fig. 4.9). Toutefois les conditions d'observation ne nous permettent pas d'être plus précis dans l'évolution de la quantité déposée.

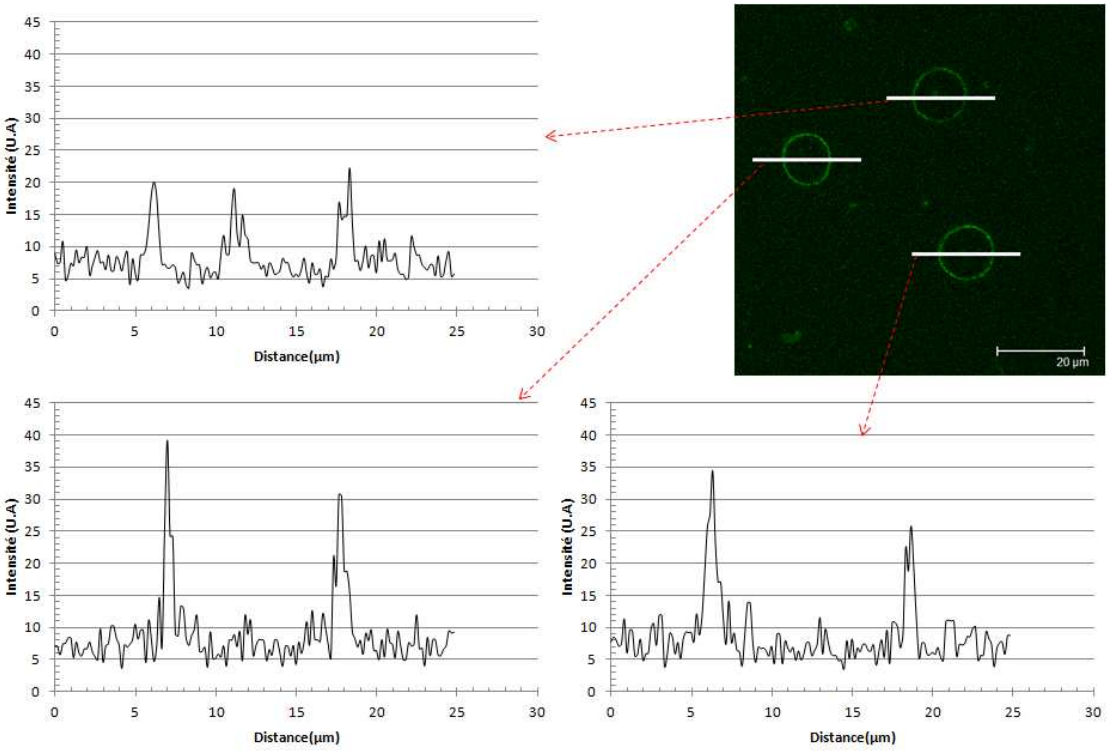


FIGURE 4.13 – Intensité de fluorescence de capsules contenant 3 couches de XG-FITC (21 µm D4 CPC/CNC/(XG-FITC/CNC)$_2$/XG-FITC) selon les profils représentés par les bandes blanches tracées sur le cliché de MCBL.

De la même manière que pour les nanocristaux, ces expériences mettent en évidence le dépôt homogène de xyloglucanes à la surface de la goutte, validant ainsi l'approche de construction couche par couche.

II.2.3 Pérennité de la croissance du film

L'objectif étant de déposer 15 bicouches à la surface des gouttes, il est essentiel de s'assurer que le dépôt de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes n'est pas limité, et que les dépôts successifs se déroulent correctement même après l'adsorption d'un grand nombre de couches.

La croissance du film multicouche a été vérifiée par l'élaboration de capsules dont les 5 dernières couches de CNC sont fluorescentes (voir chapitre II. Fig.2.16). Cela devrait permettre d'avoir une évaluation quantitative du type de croissance du multicouche, en observant si l'épaisseur des bicouches varie au cours des dépôts successifs, dans la limite de résolution du microscope. Ces capsules serviront par la suite à l'étude des déformations en MCBL (Chapitre 5).

Le dépôt de plusieurs couches d'éléments marqués permet, par ailleurs, d'avoir un signal plus intense facilitant la détection des objets. Les figures 4.14 à 4.16 présentent ainsi respectivement des images de MCBL de capsules à 5, 10 et 15 bicouches, élaborées comme représenté sur la figure 2.16.

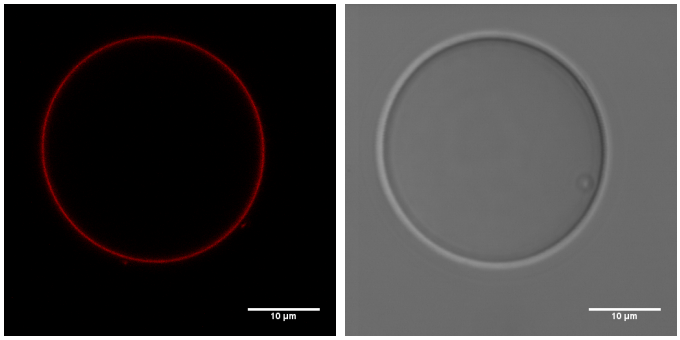


FIGURE 4.14 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une capsule à 5 bicouches (21 µm D4 CPC/CNC-RBITC/(XG/CNC-RBITC)$_4$) immobilisée dans un gel de polyacrylamide à 20%. Objectif à immersion huile x40.

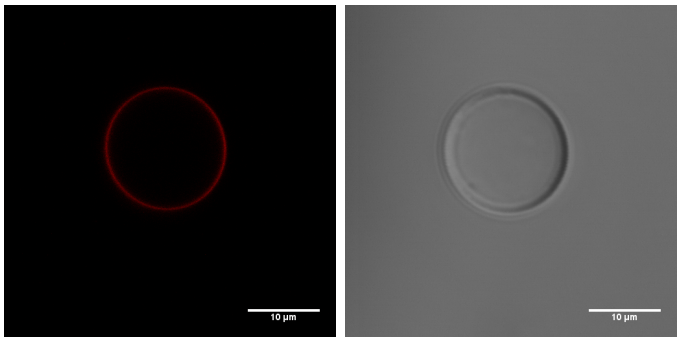


FIGURE 4.15 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une capsule à 10 bicouches (21 µm D4 CPC/CNC/(XG/CNC)$_4$/(XG/CNC-RBITC)$_5$) immobilisée dans un gel de polyacrylamide à 20%. Objectif à immersion huile x40.

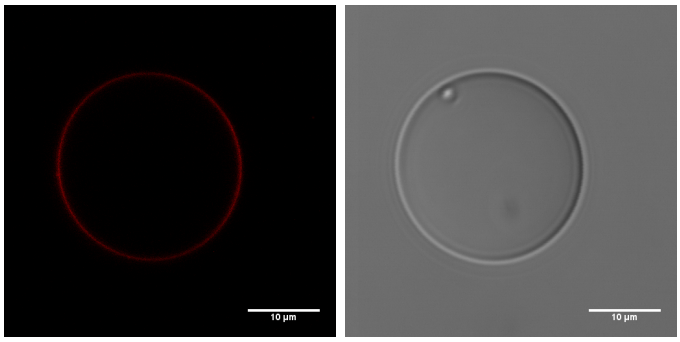


FIGURE 4.16 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une capsule à 15 bicouches (21 µm D4 CPC/CNC/$(XG/CNC)_9$/$(XG/CNC\text{-}RBITC)_5$) immobilisée dans un gel de polyacrylamide à 20% (voir chapitre II). Objectif à immersion huile x40.

Dans tous les cas, nous constatons un dépôt de CNC-RBITC, que ce soit sur l'émulsion initiale (Fig. 4.14), sur une capsule possédant 5 bicouches (Fig. 4.15) ou 10 bicouches (Fig. 4.16). Le processus de croissance couche par couche fonctionne donc pour la fabrication de capsules XG/CNC sur une émulsion de D4 dans l'eau stabilisée par des nanocristaux de cellulose, et ce pour des valeurs atteignant 15 bicouches. De plus, aucune variation d'épaisseur significative, n'est visible sur les images.

Les profils d'intensité sur ces images nous permettent de déterminer l'ordre de grandeur de l'épaisseur d'une bicouche dans l'eau. Ils sont représentés sur la figure 4.17.

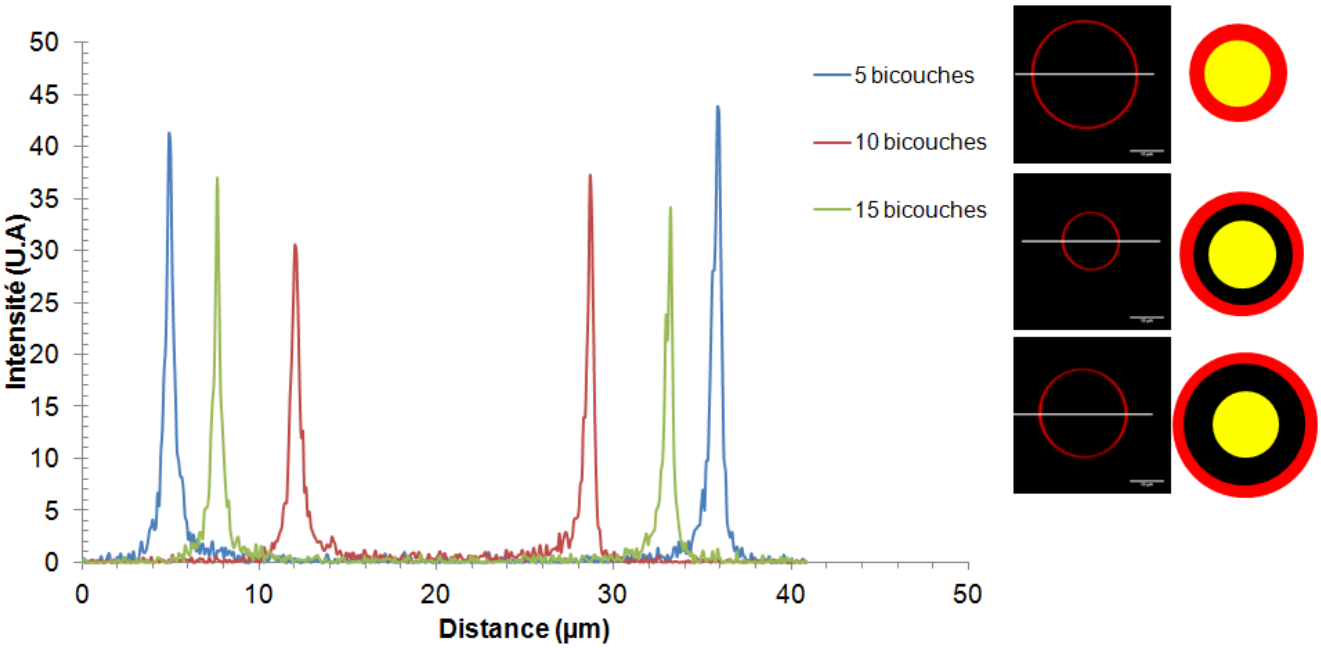


FIGURE 4.17 – Intensité de fluorescence de capsules à 5 [image du haut, courbe bleue], 10 [image du milieu, courbe rouge] et 15 [image du bas, courbe verte] bicouches, selon les profils représentés par les bandes blanches tracées sur les clichés de MCBL. Pour chaque échantillon, seules les 5 dernières couches sont marquées.

Nous notons une très forte amélioration du rapport signal sur bruit lorsque 5 couches fluorescentes sont déposées. En effet, nous obtenons un RSB de l'ordre de 20, ce qui est près de 4 fois supérieur aux mesures précédentes. Si dans les expériences précédentes le signal était relativement

bruité, ici il semble raisonnable de mesurer l'épaisseur de la paroi à partir des images de MCBL. Dans ces conditions, nous utilisons la largeur à mi-hauteur pour juger de l'épaisseur des bicouches. Elle est mesuré sur les graphiques représentés sur la figure 4.18. Nous trouvons pour 5 bicouches une épaisseur de 500 ± 200 nm, indépendamment de sa position dans la paroi (Fig. 4.17 & 4.18). Cette valeur est très proche de la limite de résolution du microscope (taille du pixel 200nm). Toutefois, la croissance ne semble pas conduire à une divergence visible de l'épaisseur des couches. La seule information que nous pouvons tirer de ces mesures est qu'une bicouche hydratée à une épaisseur inférieure à 100 nm.

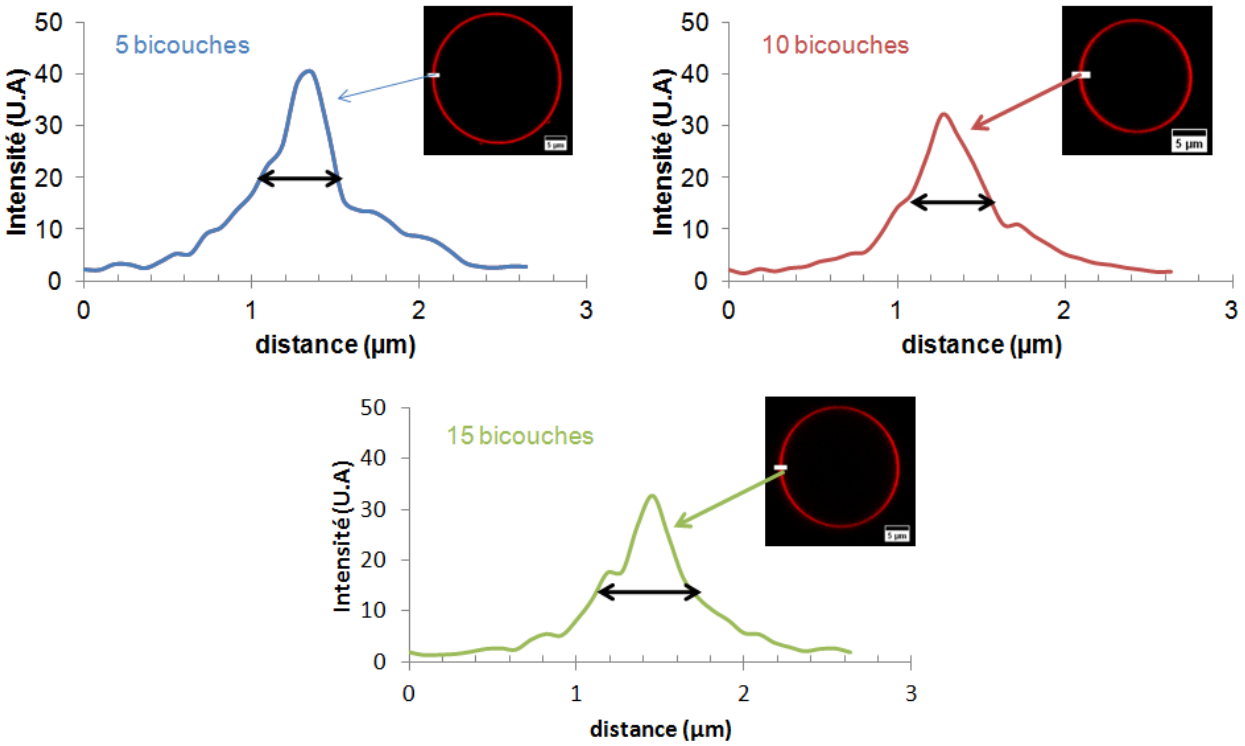


FIGURE 4.18 – Mesure de la largeur à mi-hauteur de l'intensité de fluorescence de capsules à 5, 10 et 15 bicouches, sur le premier pic des profils représentés par les bandes blanches tracées sur les clichés de MCBL.

Il est donc possible de déposer jusqu'à 15 bicouches pour former la capsule. Toutefois, comme plusieurs couches ont été déposées nous n'avons pas la preuve du dépôt de la quinzième couche avec les expériences précédentes. Pour vérifier le dépôt de la couche finale, des capsules comportant 14 bicouches sont élaborées avec des CNC et des XG non fluorescents. Le dépôt de la quinzième couche est effectué avec une suspension de CNC-RBITC. La figure 4.19 présente un exemple d'image en MCBL obtenue pour cet assemblage. Le même type d'échantillon est réalisé pour la couche de xyloglucanes. Nous observons dans ces conditions des capsules 21 µm D4 CPC/CNC/$(XG/CNC)_{13}$/XG-FITC, une des images de MCBL obtenues est présentée sur la figure 4.20.

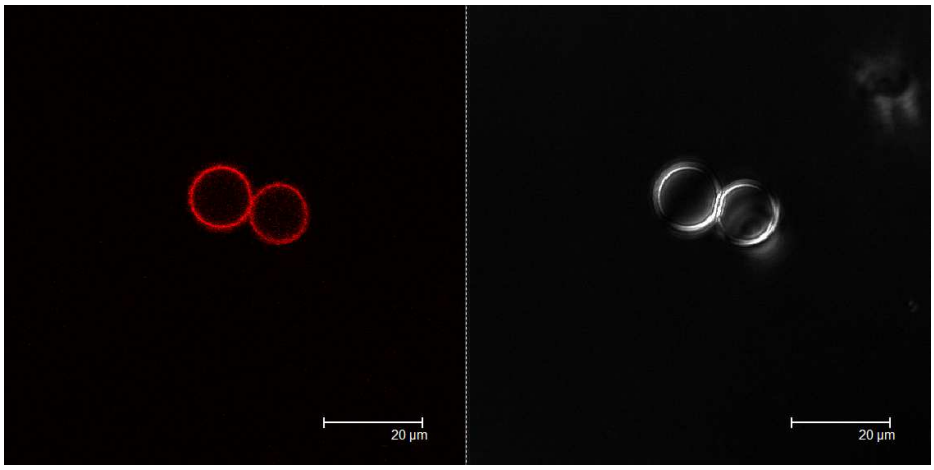


FIGURE 4.19 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une suspension de capsules à 15 bicouches dont la dernière couche de CNC est marquée (21 µm D4 CPC/CNC/(XG/CNC)/$_{13}$/XG/CNC-RBITC), Objectif à immersion huile x40, gain : 751.

Que ce soit pour les nanocristaux de cellulose (Fig. 4.19) ou les xyloglucanes (Fig. 4.20), une couche fluorescente est déposée uniformément sur la surface des capsules. Il semble donc qu'il y a bien alternance de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes sur la paroi de la capsule, y compris pour la dernière bicouche. Nous n'avons pas observé de limitation dans le dépôt des bicouches, et ce jusqu'à 15 bicouches.

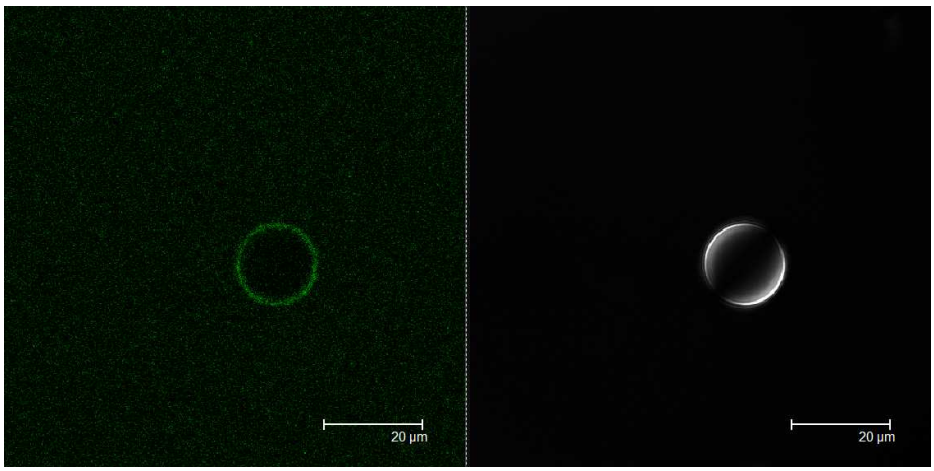


FIGURE 4.20 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une suspension de capsules à 15 bicouches dont la dernière couche de XG est marquée (21 µm D4 CPC/CNC/(XG/CNC)/$_{13}$/XG-FITC), Objectif à immersion huile x40, gain : 982.

II.3 Capsules à coeur solide

Des capsules à coeur solide ont également été élaborées. Cela permet de vérifier la transposabilité de la méthode de fabrication de capsule, par l'utilisation d'un substrat autre qu'une huile silicone. Elles seront également utilisées pour l'observation en microscopie électronique.

Nous avons donc voulu vérifier que le dépôt de matière pouvait être transposé à ces capsules à coeur solide. La paroi est construite couche par couche sur une émulsion de LRW stabilisée par des CNC. Pour cette étude le coeur, est polymérisé dès l'émulsification par l'ajout d'un accélérateur (ChapII §III.1.2). Les mêmes expériences que pour les capsules à coeur liquide sont réalisées.

La figure 4.21 présente un exemple d'observation en MCBL de gouttes de LRW polymérisées dans l'eau stabilisées par des CNC-RBITC.

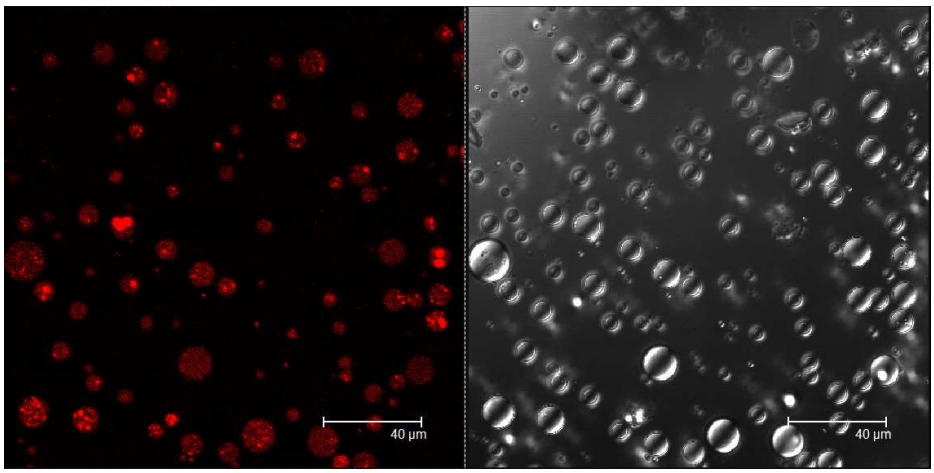


FIGURE 4.21 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une émulsion de 100 µm LRW + acc CPC/CNC-RBITC, Objectif à immersion huile x40, gain :770.

Contrairement aux capsules à coeur liquide, un signal de fluorescence est détecté au niveau de l'émulsion. Toutefois celui-ci est visible sur l'ensemble de l'objet, sans démarcation particulière de sa bordure. Nous observons également la présence de régions lumineuses plus intenses à l'intérieur des gouttes de résine. Nous supposons qu'elles correspondent à des gouttes d'eau piégées dans la résine lors de l'émulsification. Ces gouttes d'eau contiennent donc des CNC-RBITC. Il est donc probable que nous formions quelques gouttes d'émulsions multiples dans notre processus d'émulsification. L'uniformité de la fluorescence sur l'objet, ne nous permet pas de savoir, à partir de ces observations, s'il y a des CNC à la surface de la goutte (Fig. 4.21) ou dans le volume.

Cependant, comme pour les capsules à coeur liquide, la présence de cellulose à la surface est mise en évidence par le dépôt de la première couche de XG. La figure 4.22 présente une image de MCBL obtenue pour une émulsion de LR white dans l'eau stabilisée par des CNC non marqués plongée dans une solution de XG-FITC pendant 20 minutes puis rincée.

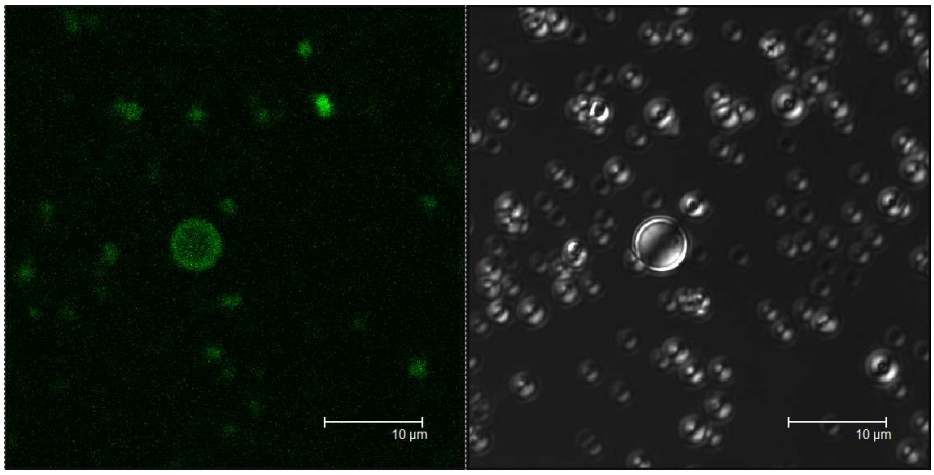


FIGURE 4.22 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une émulsion de 100 µm LRW + acc CPC/CNC/ XG-FITC. Objectif à immersion huile x40, gain : 898.

Comme dans le cas du D4, il y a bien dépôt d'une couche de XG à la surface de gouttes stabilisées par des CNC (Fig. 4.22). Le dépôt semble plus uniforme que celui de la première couche de CNC. La bordure des gouttes produit un signal de fluorescence plus intense que l'intérieur de la goutte.

Comme pour les capsules à coeur liquide, nous observons également l'évolution du signal de fluorescence de la paroi en fonction du nombre de couches déposées, pour des coeurs solides. Pour mettre en évidence le dépôt de CNC, nous comparons l'émulsion initiale stablisée par des CNC-RBITC avec une capsule possédant 3 couches de CNC-RBITC. Un exemple d'observation de ce dernier échantillon est présenté sur la figure 4.23 et les profils d'intensité des objets à une et trois couches fluorescentes sont tracés sur le graphique 4.24.

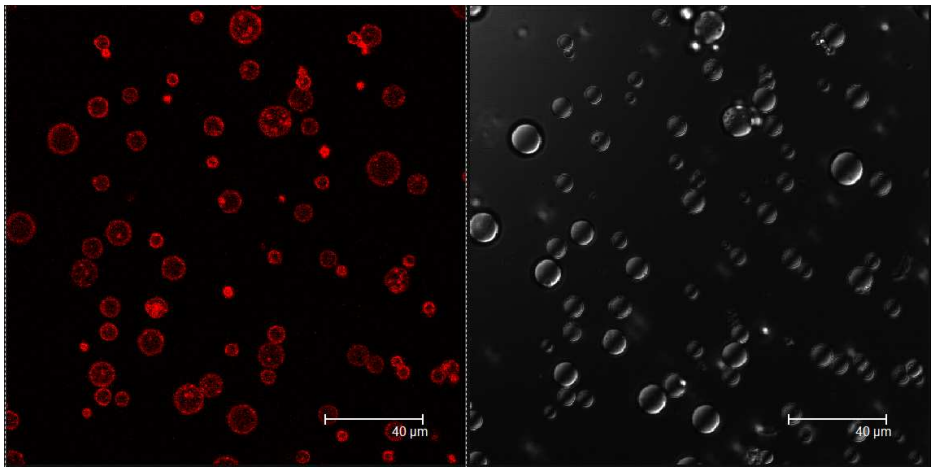


FIGURE 4.23 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une suspension de capsules à 3 bicouches contenant du LRW polymérisé (100 µm LRW + acc CPC/CNC-RBITC/(XG/CNC-RBITC)$_2$), Objectif à immersion huile x40, gain : 770.

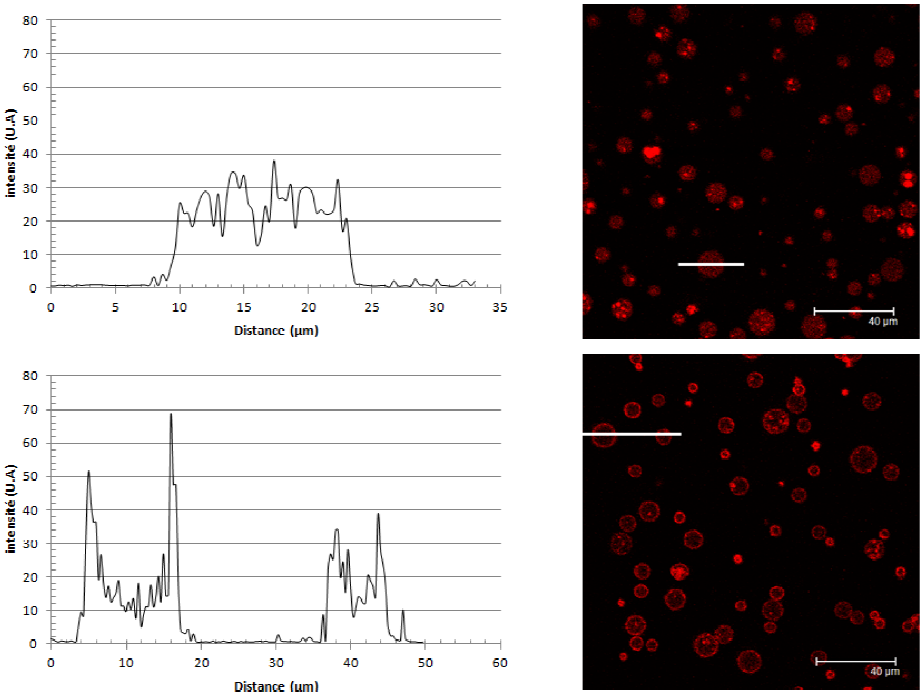


FIGURE 4.24 – Intensité de fluorescence de gouttes de LR white stabilisée par des CNC-RBITC [haut] et de capsules 100 µm LRW + acc CPC/CNC-RBITC/(XG/CNC-RBITC)$_2$ [bas], selon les profils représentés par les bandes blanches tracées sur les clichés de MCBL.

Nous notons une augmentation de la fluorescence au niveau de la paroi de la capsule, entre l'émulsion initiale et après le dépôt de 2 couches fluorescentes supplémentaires (Fig. 4.24). Ici la comparaison des intensités est possible car les échantillons ont été observés au même gain, pour le détecteur du MBCL. De plus en rajoutant des couches de CNC-RBITC, la paroi ressort nettement par rapport au centre de la capsule : le dépôt fonctionne.

Pour observer la croissance des couches de XG des capsules à 3 bicouches (CNC/XG-FITC) sont réalisées est observées en MCBL. Un exemple d'image obtenue est présenté sur la figure 4.25. Comme pour les couches de CNC nous comparons les objets à une et trois couches au travers des profils d'intensité représentés sur la figure 4.26. Cette comparaison peut être réalisée car les images utilisées ont été prises au même gain de détecteur du microscope.

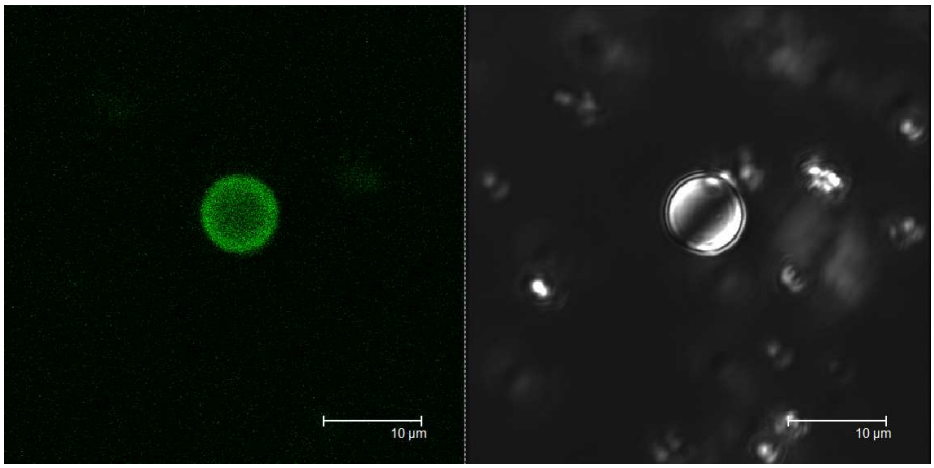


FIGURE 4.25 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une suspension de capsules à 3 bicouches contenant du LRW polymérisé (100 µm LRW +acc CPC/(CNC/XG-FITC$_3$)), Objectif à immersion huile x40, gain : 898.

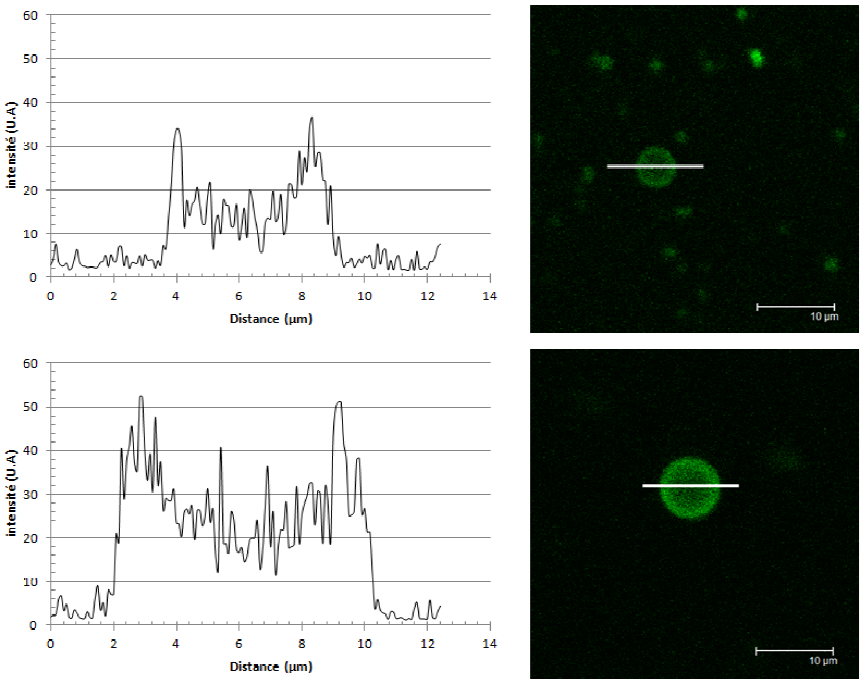


FIGURE 4.26 – Intensité de fluorescence de capsules 100 µm LRW CPC/(CNC/XG-FITC) [haut] et 100 µm LRW +acc CPC/(CNC/XG-FITC)$_3$ [bas],selon les profils représentés par les bandes blanches tracées sur les clichés de MCBL.

Dans ce cas, nous notons une augmentation de la fluorescence au niveau de la paroi quand des couches supplémentaires de XG-FITC sont ajoutées. Il y a donc dépôt de matière lorsque les capsules recouvertes de CNC sont plongées dans une solution de xyloglucanes.

Enfin, nous vérifions qu'il n'y ait pas de de limite dans le nombre de couches qu'il est possible de déposer. Le protocole utilisé est le même que pour les capsules à coeur liquide : 14 bicouches non fluorescentes sont déposées sur les gouttes, et la quinzième couche de CNC est effectuée avec des objets marqués. Un exemple d'observation de MCBL d'un tel échantillon est présenté sur la figure 4.27. Un dépôt homogène apparaît autour de chaque goutte de résine (Fig. 4.27), la quinzième couche de CNC s'adsorbe. Il n'y a donc pas de limite dans le nombre de dépôt réalisable, du moins jusqu'à 15 bicouches.

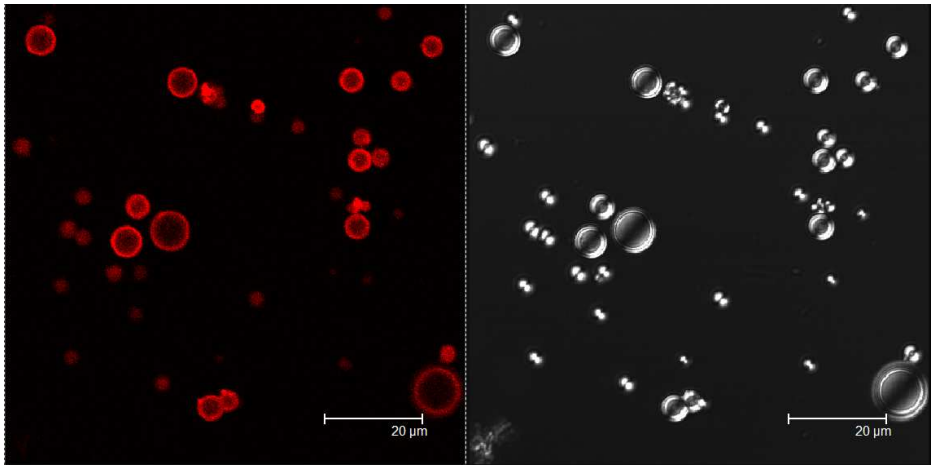


FIGURE 4.27 – Images de MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] d'une suspension de capsules à 15 bicouches (100 µm LRW +acc CPC/CNC/$(XG/CNC)_{13}$/XG/CNC-RBITC), Objectif à immersion huile x40, gain : 693.

III Évolution des capsules au cours des dépôts

III.1 Effet des dépôts sur l'émulsion initiale

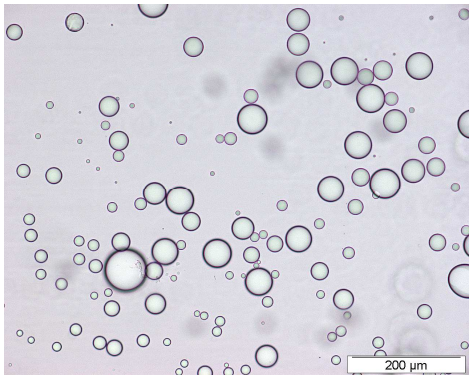
La microscopie confocale à balayage laser a mis en évidence l'efficacité de la méthode couche par couche pour former une paroi, de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes, autour de gouttes d'huile dans l'eau. Or, cette technique entraîne l'application de contraintes sur l'émulsion susceptibles de la déstabiliser. Par exemple, les dépôts successifs de CNC et XG à la surface de la goutte peuvent induire des forces de déplétion ou la formation d'agrégats, pouvant entraîner la coalescence ou le pontage des gouttes. De plus, les centrifugations successives lors des rinçages sont également des facteurs potentiels de destruction de l'émulsion. Nous nous sommes donc intéressés à l'évolution de la taille des objets au fur et à mesure de la croissance de la paroi, et nous avons recherché si des agrégats se formaient au cours de l'élaboration des capsules.

Les objets étudiés ici ont été élaborés par dépôts successifs de 5, 10 et 15 bicouches de CNC/XG, sur une émulsion de D4 dans l'eau formée sur une toile à bluter de 21 µm. Dans le chapitre

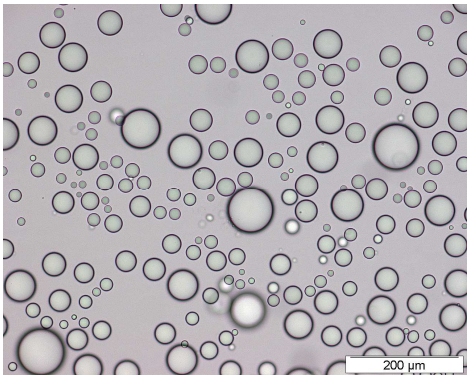
précédent, nous avons observé que le diamètre moyen des gouttes était modulé par la taille des pores de la membrane. La production d'une émulsion calibrée, dont les gouttes servent de substrat à la construction de la paroi multicouches, doit permettre d'obtenir des capsules de dimensions contrôlées, identiques à celle des gouttes.

Des capsules comportant jusqu'à 15 bicouches sont construites par la méthode couche par couche, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les observations en MBCL, avec des matériaux non-fluorescents. Un prélèvement de quelques millilitres est réalisé sur l'émulsion initiale, et après le dépôt successif de 5, 10 et 15 bicouches. Toutes ces capsules sont terminées par une couche de CNC. Lors de l'élaboration d'une série de capsules, nous obtenons donc 4 échantillons : l'émulsion initiale (21 µm D4 CPC/CNC), des capsules à 5 bicouches (21 µm D4 CPC/CNC/$(XG/CNC)_4$), 10 bicouches (21 µm D4 CPC/CNC/$(XG/CNC)_9$) et 15 bicouches (21 µm D4 CPC/CNC/$(XG/CNC)_{14}$)

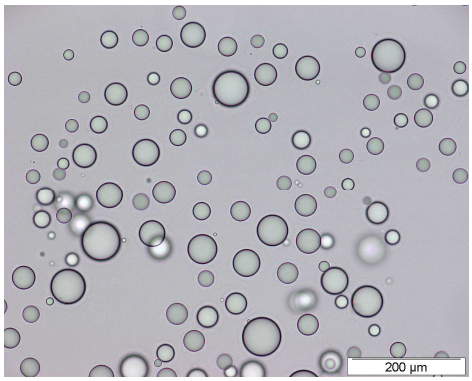
Les objets sont caractérisés en microscopie optique (MO), dans des capillaires (0,2x2x50 mm, Vitrocom) scellés à la flamme. La figure 4.28 présente des images obtenues pour chaque échantillon.



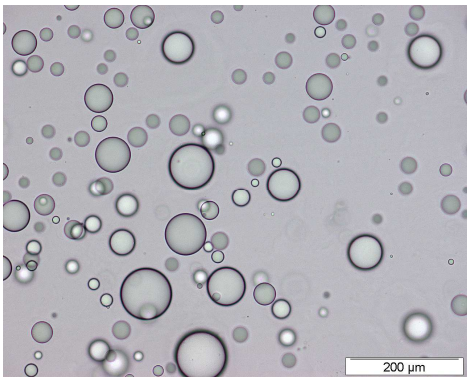
(a) 21 µm D4 CPC/CNC



(b) 21 µm D4 CPC/CNC/$(XG/CNC)_4$



(c) 21 µm D4 CPC/CNC/$(XG/CNC)_9$



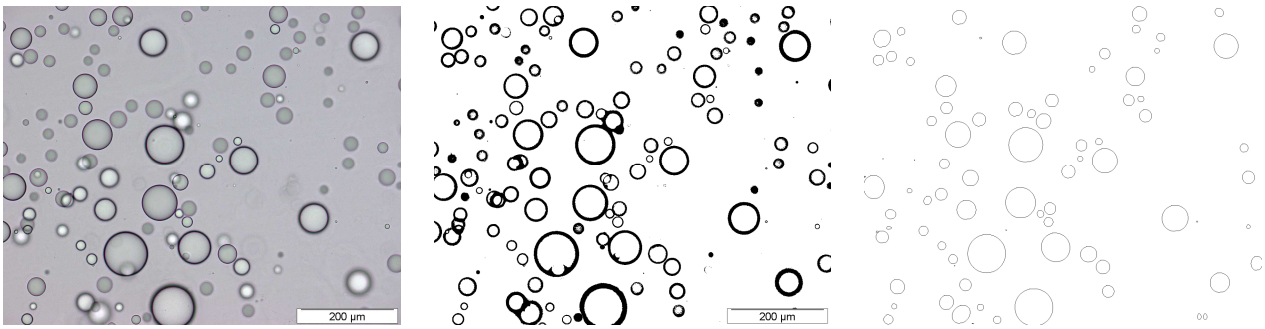
(d) 21 µm D4 CPC/CNC/$(XG/CNC)_{14}$

FIGURE 4.28 – Images de microscopie optique de l'émulsion au cours du processus de dépôt de couches.

Dans nos conditions, l'utilisation de la technique couche par couche pour élaborer les capsules ne semble pas conduire à la formation d'aggrégats (Fig. 4.28). L'étude de la défomation pourra donc être réalisée sur des capsules isolées (Chapitre 5).

Nous avons également évalué la distribution en taille de l'émulsion initiale, et des capsules à 5,

10 et 15 bicouches, à partir d'images de microscopie optique comme celles présentées sur la figure 4.28. Le diamètre de chaque goutte présente sur un cliché de MO est mesuré à l'aide du programme *ImageJ*. Un exemple du processus utilisé est présenté sur la figure 4.29. La binarisation de l'image intiale (Fig. 4.29 (a)) ne laisse apparaître que le contour des gouttes (Fig. 4.29 (b)). La mesure du diamètre est alors obtenue automatiquement pour chaque objet (Fig. 4.29 (c)).



(a) Image initiale (b) Image binarisée (c) Objets détectés et mesurés

FIGURE 4.29 – Traitements d'image effectués pour la mesure automatique du diamètre des gouttes présentent sur une image de microscopie optique.

Cette technique permet d'obtenir rapidement la taille de gouttes présentes sur une image. Quelques-unes ne sont pas comptabilisées mais leur nombre est négligeable par rapport à l'ensemble des mesures effectuées. En effet, pour chaque échantillon, le diamètre de 1000 à 2000 gouttes est mesuré. La figure 4.30 présente les histogrammes de tailles obtenus pour une série de capsules. Le diamètre moyen et le coefficient de variation de chaque distribution sont calculés et présentés dans le tableau 4.1.

TABLEAU 4.1 – Tailles caractéristiques des capsules en fonction du nombre de bicouches : D_{moy} le diamètre moyen et C.V le coefficient de variation.

Échantillon	**D_{moy} (µm)**	**C.V**
21µm D4 CPC/CNC	25,4	0,49
21µm D4 CPC/CNC/(XG/CNC)$_4$	29,4	0,52
21µm D4 CPC/CNC/(XG/CNC)$_9$	33,9	0,47
21µm D4 CPC/CNC/(XG/CNC)$_{14}$	31,6	0,53

Le dépôt des premières bicouches entraîne un début de coalescence des gouttes car nous observons une légère augmentation du diamètre moyen après le dépôt successif de 5 bicouches (tab.4.1). L'accroissement de D_{moy} n'excède cependant pas les 20%. Comme il a été observé dans le chapitre précédent, l'émulsion initiale est stable mais reste tout de même sensible aux contraintes physiques trop importantes. Les centrifugations répétées (x95 g) lors des rinçages, et les forces de déplétion appliquées sur les gouttes lors des dépôts, induisent une légère coalescence d'où une augmentation du diamètre de l'émulsion. Ce phénomène est stoppé après le dépôt de 5 bicouches. Les variations du diamètre moyen à partir de 5 bicouches sont minimes, et la taille des gouttes se stabilise autour de 30 µm.

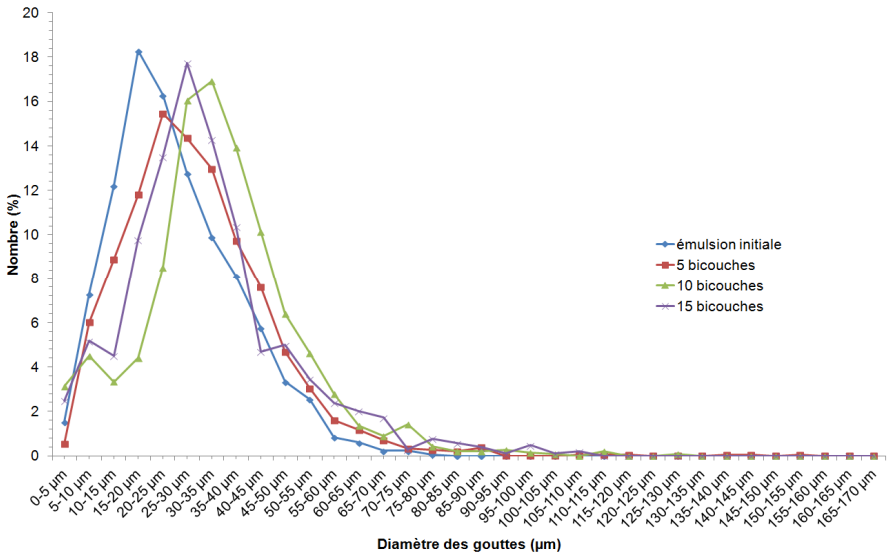


FIGURE 4.30 – Distribution en taille d'une émulsion 21µm D4 CPC/CNC et des capsules qui en sont issues à 5, 10 et 15 bicouches.

Expérimentalement, nous observons qu'à partir de 3 bicouches déposées l'émulsion devient beaucoup plus stable car elle n'est plus détruite par une centrifugation à haute vitesse. Cette observation est cohérente avec celles faites en MCBL (Fig. 4.10), qui montrent que les gouttes sont entièrement recouvertes de nanocristaux de cellulose une fois les 3 premières bicouches déposées (Fig. 4.10). Ceci lui confère un grande stabilité. À partir de ce point, la vitesse de centrifugation est augmentée (x1520 g) afin d'améliorer le crémage des capsules. Cela permet également de s'assurer de la stabilité augmentée de l'émulsion. Quel que soit le nombre de couches déposées, plus de 90% des capsules formées possèdent un diamètre compris entre 10-100 µm. Nous en concluons que le dépôt de couche ne modifie que très peu la taille des gouttes formées lors de l'émulsification. Ce procédé nous permet donc de fabriquer des capsules multicouches CNC/XG, de tailles contrôlées.

IV La paroi à l'échelle nanométrique

IV.1 Pourquoi le LRW ?

La microscopie électronique nécessite de placer l'échantillon dans un vide poussé. Or, le D4 s'évapore sous vide, les capsules observées en MEB apparaissent dégonflées. Ceci entraîne des contraintes de cisaillement et de flexion dans le matériau composite CNC/XG et peut modifier sa structure. Nous avons donc utilisé des capsules à coeur solide pour cette étude. La capsule va garder la forme sphérique qu'elle possédait en suspension lors de l'observation en MO et MCBL.

Dans le cas de la microscopie électronique, la paroi sera déshydratée. Le composite de CNC/XG est donc dans un état similaire aux films multicouches étudiés par Jean en diffraction de neutrons et AFM [Jean et al., 2009]. Cela nous donne un point de comparaison pour l'épaisseur mesurée et la morphologie de surface.

IV.2 Mesure de l'épaisseur de la paroi en fonction du nombre de couche

Pour connaître l'épaisseur et la morphologie d'une bicouche, des capsules à coeur solide de différentes épaisseurs ont été préparées et observées en microscopie électronique en transmission en suivant le protocole décrit dans le chapitre 2 §III.3. Un exemple d'une observation de capsules de 5 bicouches est présenté sur la figure 4.31.

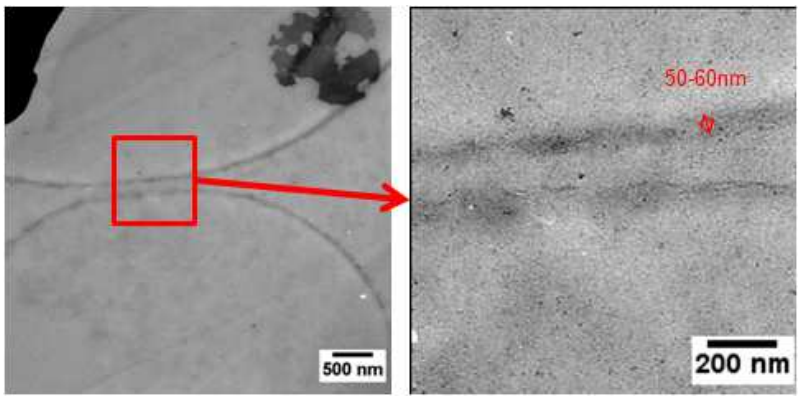


FIGURE 4.31 – Image de microscopie électronique en transmission d'une coupe de 50 nm de capsules 100 µm LRW CPC/CNC/$(XG/CNC)_4$ incluses dans la résine LRW. Tension d'accélération : 80kV.

Nous observons une paroi homogène autour des gouttes de LR white polymérisé. Elle a une épaisseur totale d'environ 50 à 60 nm (Fig. 4.31) soit de l'ordre de 10 nm pour un bicouche (XG/CNC). Nous retrouvons ainsi la valeur d'environ 9 nm par bicouche, mesurée par reflectivité de neutrons, sur des multicouches plans [Jean et al., 2009].

Nous n'avons pas réussi à mesurer une épaisseur pour des capsules formées de plus de 5 bicouches. Des exemples d'observations en MET de capsules de 9 et 12 bicouches, préparées dans les mêmes conditions, sont présentées sur les figures 4.32 à 4.33.

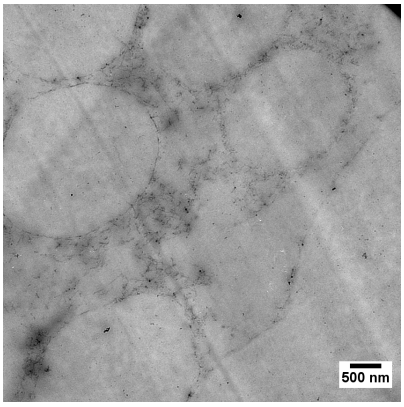


FIGURE 4.32 – Image de microscopie électronique en transmission d'une coupe de 50 nm de capsules 100 µm LRW CPC/CNC/$(XG/CNC)_8$ incluses dans la résine LRW. Tension d'accélération : 80kV.

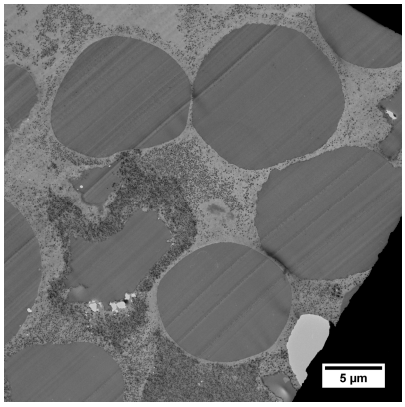


FIGURE 4.33 – Image de microscopie électronique en transmission d'une coupe de 50 nm de capsules 21 µm LRW CPC/CNC/$(XG/CNC)_{11}$ incluses dans la résine LRW. Tension d'accélération : 80kV.

Sur ces échantillons (Fig. 4.32 & 4.33), aucune mesure d'épaisseur n'est possible. En effet, si le coeur des capsules se distingue de la résine d'inclusion, la paroi apparaît morcelée autour de son coeur. En effet, nous observons des lambeaux de paroi (en noir sur Fig. 4.32 & 4.33) autour des gouttes de LR white. Rappelons que pour les observer en MET, les capsules sont incluses dans une résine hydrophobe pour être ensuite coupées à l'ultramicrotome. L'inclusion implique un changement de solvant pour passer de l'eau à la résine. La transition se fait grâce à des mélange eau/éthanol et résine/éthanol. Il semble donc que les capsules ne supportent pas ce traitement. Nous observons plus en détail l'effet que l'éthanol a sur les objets dans le chapitre 5.

IV.3 Organisation de surface

Nous avons également réalisé des observations avec un microscope électronique à balayage à canon à effet de champ (MEB-FEG) pour visualiser la morphologie de surface de capsule à coeur solide. L'information supplémentaire que nous avons cherché à avoir au cours de ces expériences est de savoir s'il était possible de transférer un ordre orientationnel à la surface des capsules à partir de suspensions organisées. En effet, un tel transfert a déjà été observé sur des films multicouches dans le cas d'assemblage de nanocristaux de cellulose et de poly(hydrochlorure d'allilamine) (PAH) [Jean et al., 2008].

Ainsi, deux échantillons de capsules à 10 bicouches ont été étudiés. Pour le premier, le dépôt des couches de CNC à été réalisé dans une suspension isotrope à 3%. Le second a été réalisé comme l'autre échantillon, à la différence que le dépôt de la dernière couche de CNC à été effectué dans une phase organisée d'une suspension de CNC ($C_{CNC} = 7\%$). Les échantillons observés sont donc :

(1)100 µm LRW + acc CPC/CNC/$(XG/CNC)_9$

(2) 100 µm LRW + acc CPC/CNC/$(XG/CNC)_8$/XG/CNC organisés

La figure 4.34 présente des images de MEB-FEG de l'échantillon (1) à différents grossissements.

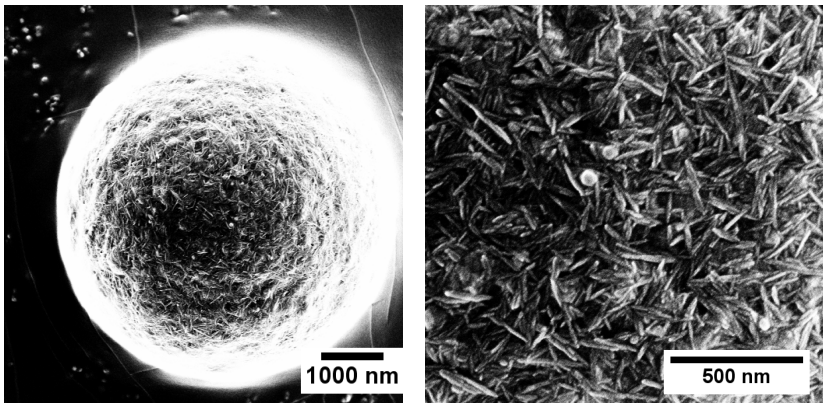


FIGURE 4.34 – Images de microscopie électronique à balayage de capsules à coeur solide formées de 10 bicouches déposées dans une suspension de nanocristaux de cellulose non-organisée

Aucune organisation de surface n'est observée (Fig.4.34). Les CNC sont déposés en un réseau dense et aléatoire, qui recouvre uniformément la surface de la goutte. Ceci est cohérent avec les

conditions de dépôts puisque la suspension de CNC utilisée n'est pas organisée.

La figure 4.35 présente des images de MEB-FEG de l'échantillon (2) à différents grossissements.

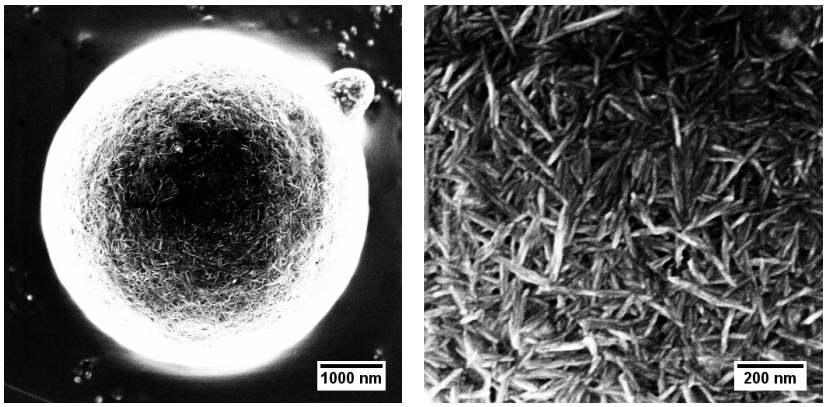


FIGURE 4.35 – Images de microscopie électronique à balayage de capsules 100 µm LRW+acc CPC/(CNC/XG)$_9$/CNC organisée.

Les nanocristaux de cellulose à la surface de la capsule ne présentent pas d'organisation particulière (Fig.4.35). La surface de la capsule est similaire à celle observée précédemment (Fig.4.34). Dans nos conditions de mise en forme des capsules l'organisation de la suspension de CNC ne se transpose pas sur la couche déposée.

Nous ne pouvons pas à partir de ces images déterminer une porosité, ni un taux de recouvrement. Cependant, les surfaces de CNC sont similaires à celle de Jean [Jean et al., 2009]. En première approximation nous utiliserons ses valeurs, soit une porosité de quelques nanomètres (rugosité du film de quelques nanomètres) et une densité de surface d'adsorption des CNC de 40-45%.

V Discussion et conclusion

L'élaboration de capsules multicouches de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes, par la méthode couche par couche, sur une émulsion d'huile dans l'eau constitue une manière relativement simple pour obtenir des objets de taille et de nature analogues à la paroi primaire des cellules végétales. Afin de contrôler la croissance et la morphologie issues de ces dépôts, nous avons caractérisé les capsules ainsi formées à plusieurs échelles.

La microscopie confocale s'est révélée un outil de choix en raison de la taille des capsules adaptée à la résolution de la technique, et, grâce au marquage sélectif de chacun des deux protagonistes. Le bon déroulement du dépôt de couches successives, a pu être mis en évidence sur une émulsion stabilisée par des nanocristaux de cellulose couplés à un tensioactif cationique le CPC. En revanche, les mesures du potentiel zeta, classiques dans le domaine n'ont pas été envisagées car il n'y a pas d'inversion de la polarité de la surface de la capsule à mesurer.

Cependant, il semblerait que le taux de recouvrement évolue au cours des premiers dépôts avant de se stabiliser. En effet, la couche stabilisante de CNC n'a pu être observée par microscopie

confocale dans nos conditions expérimentales, bien qu'une couche uniforme de xyloglucanes a pu être déposée sur les gouttes (Fig. 4.8). Les CNC deviennent aisément détectables à partir de la 3ème bicouche (Fig. 4.10). Ces observations sont corrélés à l'observation empirique de la stabilité des émulsions, qui restent fragile jusqu'à la 3ème bicouche, pouvant être détruite par des vitesses de centrifugation trop importante (> x100 g). Cependant, à partir de CPC/CNC/$(XG/CNC)_2$ les gouttes deviennent très stables et résistent à de très forte contraintes (x 1520 g). Pour la couche initiale l'absence de fluorescence augmente nos doutes sur un recouvrement total de la surface des gouttes par des CNC lors de l'émulsification. Dans nos conditions expérimentales de la carboxyméthylcellulose est utilisée comme viscosifiant pour favoriser le fractionnement des gouttes dans la grille. Ce dérivé de cellulose étant chargé négativement, comme les CNC, il peut intéragir avec le CPC et stabiliser les gouttes d'huile. La CMC étant en bien plus forte concentration que les nanocristaux il est donc très probable qu'il y en est à la surface des gouttes. Comme elle possède une structure très similaire à la cellulose cela n'empêche pas l'adsorption de xyloglucanes et ne nuit donc pas à la construction de la paroi multicouche. Pour confirmer cette hypothèse il serait utile d'observer la topologie de surface de l'émulsion initiale en MEB-FEG par exemple.

Il semble donc qu'il faille adsorber plusieurs couches de CNC avant d'obtenir un recouvrement total. Ce phénomène a déjà été observé sur des systèmes similaires lors de la préparation de film multicouches par trempage sur une surface plane. Ainsi, Cranston et *al.* ont mis en évidence, dans le cas de dépôts par trempage, qu'il est nécessaire de déposer plusieurs couches avant d'avoir un dépôt dense de nanocristaux de cellulose sur le substrat pour des multicouches CNC/PAH [Cranston and Gray, 2006b]. Dans leur système, 5 couches ($(CNC/PAH)_{2,5}$) sont nécessaires pour obtenir un recouvrement total de la surface par les CNC. La nécessité de déposer plusieurs couches avant d'obtenir une surface entièrement recouverte s'observe également dans d'autres systèmes multicouches formés de polysaccharides [Richert et al., 2004]. En étudiant un système multicouche chitosane/hyaluronane, réalisé par trempage, ils ont observés que la première bicouche formait des îlots de 60 nm sur leur substrat. Au fur et à mesure des dépôts successifs ces îlots s'élargissent et coalescent jusqu'à former une couche uniforme qui est obtenue après le dépôt de 10 bicouches.

Dans notre cas, il semblerait que le recouvrement de la surface soit efficace dès la troisième bicouche. Dans la mesure où cet effet n'a pas été mis en évidence sur les substrats plans [Jean et al., 2009], il est probable que l'origine du phénomène soit à chercher dans l'hétérogénéité de la surface des émulsions. Il est à noter que dans ces expériences, le substrat silice était auparavant recouvert de trois couches de PSS/PAH formant un tapis initial.

En ce qui concerne le mode de croissance, une dépendance linéaire de l'épaisseur en fonction du nombre de couches a été mis en évidence pour la formation de film multicouches plans de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes à l'état sec. Ainsi, Jean *et al* ont obtenu une épaisseur de 9 nm par bicouches dans ses conditions [Jean et al., 2009] par des mesures de réflectivité des neutrons. Les mesures sur ultracoupes en MET nous ont permis de mesurer sur des systèmes à 5 bicouches une épaisseur d'environ 10 nm par bicouche, là aussi à l'état sec, en accord avec les mesures réalisées sur les films plans.

L'extrapolation par mesure directe de la taille a un nombre de bicouches plus élevé a été rendu impossible en raison des difficultés expérimentales liées à la sensibilité des capsules au solvant nécessaire à la préparation des échantillons pour la microscopie. Il est connu que les xyloglucanes sont insolubles dans l'alcool, et qu'ils forment des gels pour des concentrations supérieures à 15% [Yamanaka et al., 2000, Yuguchi et al., 2004]. Nous n'avons pu faire de relation directe entre l'insolubilité des XG et l'éclatement des capsules à grand nombre de couches, mais nous allons retrouver ce phénomène dans le chapitre suivant. Il peut éventuellement trouver son origine dans l'hydratation importante des couches supérieures, sans qu'il soit possible à l'heure actuelle de proposer une explication.

Néanmoins, l'observation en microscopie confocale de système à 5, 10 et 15 bicouches marquées sur les 5 dernières bicouches n'a pas montré de différences notables de croissance des parois, tout du moins à la résolution de la microscopie confocale. La mesure de l'épaisseur de ces 5 bicouches a donné des tailles de l'ordre de 500 nm, soit plus ou moins la résolution du microscope, ce qui ne nous permet pas de trancher sur la linéarité du système ou son caractère exponentiel [Boudou et al., 2010]. Un système comportant un plus grand nombre de bicouches marquées serait probablement intéressant pour préciser ce paramètre. Il est à noter que des essais de mesure par microbalance à quartz sur ces systèmes se sont révélés infructueux [Jean, communication personnelle], indiquant une hydratation très importante de ces assemblages.

Dans le cas d'un multicouche cellulose/xyloglucane, le dépôt d'une couche de CNC organisés n'est pas assuré, même lorsque le dépôt de cellulose a lieu dans la phase organisée de la suspension. En effet, aucune différence n'a été observée en MEB entre les capsules issues d'un dépôt de CNC dans la phase isotrope ou dans la phase cholestérique de la suspension. La transposition de l'ordre nématique cholestérique d'une suspension de CNC n'a été observée que dans le cas de multicouches CNC/PAH [Jean et al., 2008], possiblement en raison de l'hydratation des systèmes CNC/XG perturbant l'organisation lors du séchage de la capsule.

Par l'utilisation d'une émulsion de taille contrôlée comme substrat d'un film multicouches de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes, nous avons pu élaborer des capsules de dimensions similaires au support initial et d'épaisseur contrôlée, dont le module est probablement de l'ordre de 4 GPa environ (chapitre 3). Nous obtenons ainsi des coques rigides de composition, d'épaisseur et de diamètre similaires à celles des cellules végétales présentant un réseau pseudo-2D de bâtonnets rigides, répartis dans le plan de manière isotrope. L'étude du flambage des capsules par retrait de son coeur d'huile nous permettra d'avoir des informations sur l'importance de la structure fibreuse de la paroi sur la loi comportementale en déformation des capsules.

Chapitre 5

Étude des propriétés mécaniques des capsules par flambage

I Introduction

Le comportement élastique de coques sphériques minces, constituées d'un matériau isotrope (TSIM : thin shell of isotropic material) a été décrit expérimentalement et théoriquement. Le dégonflement de ces objets entraîne la formation de dépressions. Elles peuvent être multiples [Zoldesi and Imhof, 2005, Tsapis et al., 2005, Vliegenthart and Gompper, 2011, Quemeneur et al., 2012] ou unique [Zoldesi and Imhof, 2005, Quilliet et al., 2008, Quilliet, 2012, Vliegenthart and Gompper, 2011]. Rappelons que pour une TSIM d'une épaisseur h et de rayon R, les énergies de flexion ($E_{b,3D}$) et de compression ($E_{s,3D}$) dues à la formation d'une dépression sont [Landau and Lifshitz, 1986] :

$$E_{s,3D} \sim Y_{3D} h \varsigma^2 d^2 / R^2 \tag{5.1}$$

$$E_{b,3D} \sim Y_{3D} h^3 \varsigma^2 / d^2 \tag{5.2}$$

avec Y_{3D} le module d'Young en 3 dimensions de la coque, h son épaisseur, R son rayon, ς l'amplitude du déplacement et d la taille caractéristique de la déformation créée sur la coque par la dépression.

En minimisant l'énergie totale du système ($E_{s,3D} + E_{b,3D}$) par rapport à ς, Landau a obtenu une taille caractéristique de la déformation d $\sim \sqrt{hR}$ [Landau and Lifshitz, 1986]. Si la description énergétique du comportement en déformation d'une TSIM est exprimée à partir des paramètres en 3 dimensions de l'objet, les calculs sont en fait des calculs de flexion de surface (plaques courbes minces). Dans ce modèle, les paramètres utilisés sont la constante de courbure κ et le module d'Young en 2 dimensions Y_{2D}. Landau, qui ne tient pas compte des préfacteurs, assimile κ à $Y_{3D}h^3$, et Y_{2D} à Y_{3D}h. Les énergies de flexion et de compression peuvent alors être exprimées de la manière suivante :

$$E_{s,2D} \sim Y_{2D} \varsigma^2 d^2 / R^2 \tag{5.3}$$

$$E_{b,2D} \sim \kappa \varsigma^2 / d^2 \tag{5.4}$$

L'équilibre est obtenu quand l'énergie totale est minimale soit pour :

$$d \sim \left(\frac{\kappa R^2}{Y_{2D}} \right)^{1/4} \tag{5.5}$$

Nous avons ainsi une expression plus générale de l'ordre de grandeur de la longueur caractéristique d'une déformation de coque. Celle-ci reste valable pour décrire un matériau qui présenterait des propriétés mécaniques différentes perpendiculairement au plan local de la coque.

En tenant compte des préfacteurs, les relations entre paramètres 2D et paramètres 3D s'expriment comme suit :

$$\nu_{2D} = \nu_{3D} = \nu \tag{5.6}$$

$$Y_{2D} = Y_{3D} h \tag{5.7}$$

$$\kappa = \frac{Y_{3D}}{12(1-\nu^2)} h^3 \tag{5.8}$$

$$\tag{5.9}$$

Avec ν le coefficient de Poisson.

Comme il a été présenté dans le chapitre 4, la paroi des capsules étudiées est constituée de couches d'un enchevêtrement dense et aléatoire de bâtonnets rigides (les nanocristaux de cellulose), maintenues entre elles par une matrice de polymères (les xyloglucanes). Cette structure est observée lorsque le composite est sec. Par analogie avec les TSIM, nous utilisons le dégonflement pour déformer les capsules et ainsi obtenir des informations sur les grandeurs caractéristiques qui régissent leur réponse élastique.

Dans un premier temps, des essais de déformation ont été réalisés par l'ajout de solvant à la suspension de capsules, destiné à dissoudre l'huile contenue dans les capsules. La force capillaire locale qui est exercée, vers l'intérieur, sur chaque pore de la coque donne à l'échelle globale une pression homogène qui devrait permettre sa déformation. Ce processus a déjà été employé pour déformer des coques de silice, en suspension dans l'eau, contenant une huile silicone [Zoldesi et al., 2006, Zoldesi et al., 2007, Zoldesi et al., 2008, Quilliet et al., 2008]. Cette méthode peut être envisagée pour étudier l'élasticité de capsules dont la paroi est hydratée.

Dans un second temps, les capsules ont été incluses dans un hydrogel de polyacrylamide (PAA). L'ensemble gel-capsules est déshydraté dans une atmosphère sèche, puis les capsules sont dégonflées par évaporation du coeur d'huile sous vide. Ce dispositif nous permet d'étudier l'élasticité de la paroi sèche.

Dans l'ensemble de ce chapitre, les capsules sont réalisées par la méthode couche par couche comme décrit dans le chapitre 2 §III.2, en utilisant une suspension de nanocristaux de cellulose (CNC) à 2,5% et une solution de xyloglucanes (XG) à 0,15%. Le substrat utilisé pour la fabrication de la capsule multicouche est une émulsion d'octaméthylcyclotétrasiloxane (D4) dans l'eau, stabilisée par des nanocristaux de cellulose, et réalisée sur une toile à bluter de 21 µm en suivant le protocole donné au chapitre II §II.2. Les capsules fluorescentes utilisées pour les observations en MCBL sont préparées en suivant le protocole décrit au chapitre II §IV.2.3.

II Déformation en solution

Des capsules en suspension dans l'eau sont dégonflées par l'ajout d'éthanol pur, qui dissout leur coeur, à la phase aqueuse. Les objets sont ensuite observés, quelques minutes après l'ajout du solvant, en microscopie optique dans des capillaires scellés à la flamme (0,2*2*100 mm, **Vitrocom**). Un exemple d'observation en microscopie optique d'une capsule en présence d'éthanol est présenté sur la figure 5.1.

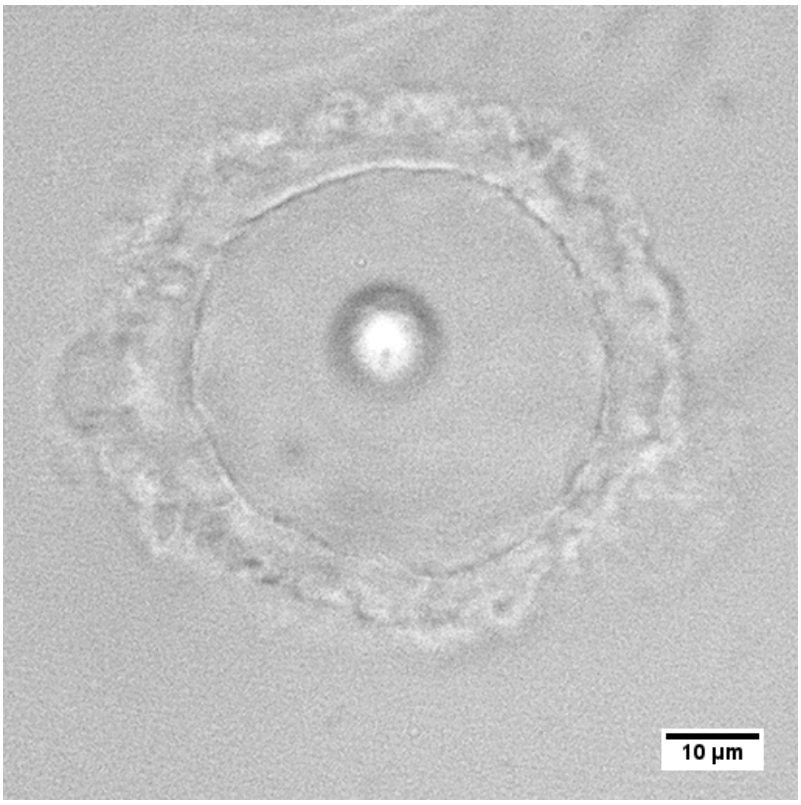


FIGURE 5.1 – Image de microscopie optique d'une capsule à 10 bicouches après l'ajout de 70% en volume d'éthanol à la suspension.

En dessous d'une concentration de 70% en éthanol, nous n'observons pas de dissolution de l'huile (D4) contenue dans les capsules. Au-dessus de cette concentration, le D4 disparaît (Fig. 5.1). Une grande majorité des capsules est détruite lors de ce processus. Les capsules restantes sont déformées, mais elles ne présentent pas de morphologie permettant d'établir un modèle de leur élasticité. Nous observons la plupart du temps une "couronne" autour de la capsule vidée (Fig. 5.1). Nous pensons qu'il s'agit de capsules écrasées sur une surface (dans le capillaire) et dont des morceaux de paroi se sont partiellement détachés. La paroi des capsules semble très sensible à l'éthanol, car elle est altérée, voir détruite en sa présence.

Nous avons pu observer occasionnellement des capsules présentant des dépressions multiples (Fig. 5.2). Le diamètre de ces dépressions varie entre 1,8 et 5,9 µm. Cependant, l'apparition de ce type de déformation est très rare, et n'est ni prévisible, ni reproductible. Elles ne peuvent donc être utilisées pour étudier l'élasticité des capsules multicouches CNC/XG élaborées.

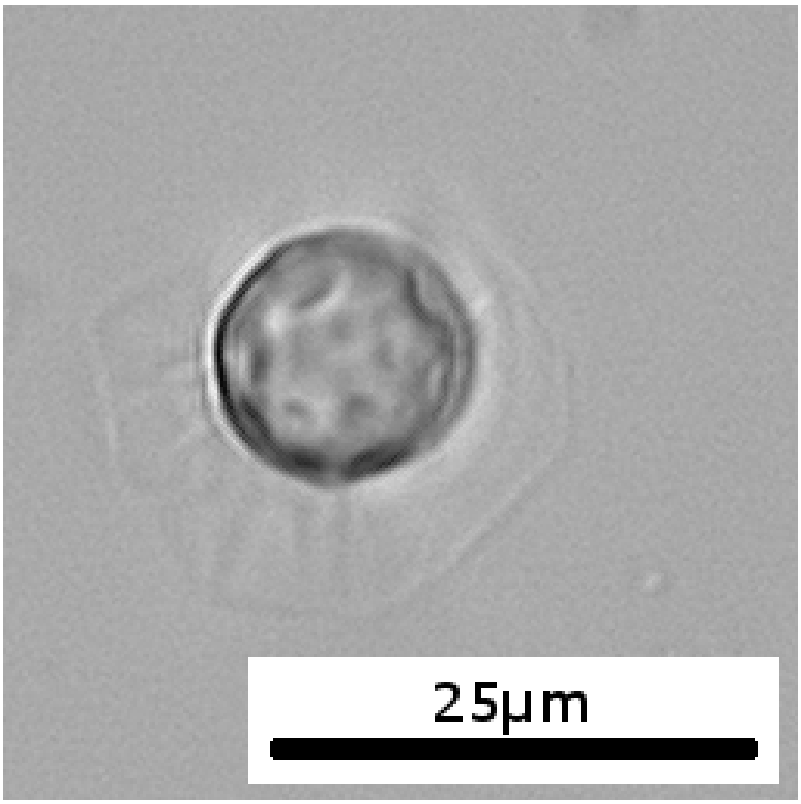


FIGURE 5.2 – Image de microscopie optique d'une capsule à 10 bicouches dégonflée dans une solution d'éthanol à 70%, présentant des dépressions multiples.

D'autres solvants tels que l'acétone ou le terbutyl alcool ont également été utilisés pour dégonfler les capsules. Ils donnent les mêmes résultats qu'avec l'éthanol : une grande partie des capsules disparait, et celles qui restent visibles en microscopie optique présentent la même morphologie que sur la figure 5.1. Elles sont très vraisemblablement endommagées.

La déformation en solution n'est donc pas adaptée à notre système. Les méthodes utilisées pour dissoudre le coeur détruisent les capsules ou endommagent leur paroi, qui ne présente alors pas de comportement élastique interprétable. Il est donc nécessaire de renforcer le composite CNC/XG qui constitue les capsules pour étudier leurs propriétés élastiques.

Pour améliorer les propriétés mécaniques des capsules, il nous est apparu nécessaire de déshydrater leur paroi, ce qui peut renforcer la capsule. Comme nous l'avons observé dans le chapitre III, le module d'Young de films composés d'un mélange de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes dépend fortement de la teneur en eau du film. Ces mêmes films perdent toute cohésion lorsqu'ils sont trempés dans l'eau. En déshydratant le composite CNC/XG, les liaisons Van der Waals et hydrogène entre ses constituants augmentent, il devient plus cohésif et donc plus résistant.

Nous avons donc cherché un moyen de sécher les capsules, pour rigidifier leur paroi avant de les dégonfler. En déposant une goutte de suspension de capsules dans l'eau sur une surface plane, nous observons, après évaporation de l'eau à l'air libre, que le coeur d'huile s'est également évaporé et que les capsules sont complètement aplaties sur la surface. L'écrasement des gouttes semble principalement dû aux forces capillaires mises en jeu pendant l'évaporation de l'eau ou

de l'huile contenue à l'intérieur des capsules. Des images de microscopie optique d'un échantillon de capsules à 10 bicouches, séché sur une lame de verre et laissé à l'air libre pendant 48h, sont présentées sur la figure 5.3.

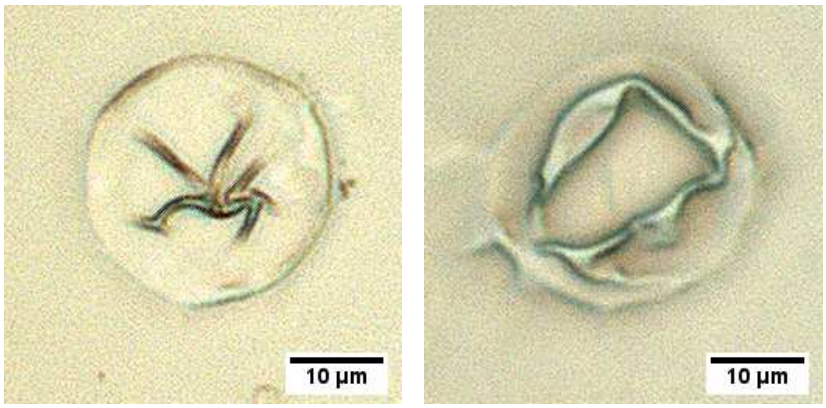


FIGURE 5.3 – Images de microscopie optique d'une suspension de capsules à 10 bicouches séché à l'air libre sur une lame de verre pendant 48h.

Nous notons une meilleure tenue mécanique de la paroi lorsqu'elle est déshydratée. En effet, nous observons la formation de plis qui confirme la présence d'une paroi solide (Fig. 5.3). La paroi est sèche, mais les capsules s'affaissent et ne présentent aucune morphologie de déformation spécifique.

Pour éviter un tel écrasement, nous avons cherché un moyen de déshydrater la paroi des capsules, puis de dégonfler ces dernières, séquentiellement. Ceci devrait empêcher l'écrasement des capsules lors de la déshydratation, afin que le dégonflement se produise à partir d'un état comparable au modèle de TSIM. La solution que nous avons développée est d'inclure les capsules dans un hydrogel. Ainsi, les objets devraient garder leur forme lors de la déshydratation, car le gel offre un maintien qui empêche les capsules de s'écraser sur la surface du verre à cause des forces de capillarité créées par l'évaporation de l'eau.

III Déformation dans un hydrogel

III.1 Le principe

III.1.1 Inclusion et déformation de capsules dans un gel d'acrylamide

Les capsules sont incluses dans un hydrogel de polyacrylamide (PAA) entre lame et lamelle comme décrit dans le chapitre II §III.1 . Rappelons que la lame et la lamelle sont séparées grâce à des espaceurs constituées de 4 lamelles de verre de 150 µm d'épaisseur chacune. La lame, les espaceurs et la lamelle couvre-objet sont collés entre eux, et le gel est ensuite coulé dans ce moule. Le gel à l'état hydraté a donc une épaisseur de 600 µm (dimension bien supérieure à celle des capsules dont le diamètre moyen est inférieur à 35 µm), et mesure de l'ordre de 3 cm de long sur

2 cm de large. Dans ces conditions les capsules ne devraient pas être écrasées entre la lame et la lamelle couvre-objet.

La déshydratation de l'ensemble gel-capsules et l'évaporation de l'huile sont réalisées en laissant le gel dans son moule. Le protocole utilisé est décrit au chapitre II §IV.2.2. Après séchage, le gel a perdu en volume. Ainsi, nous avons mesuré que l'épaisseur d'un gel de PAA à 20% passe de 600 µm (à l'état hydraté) à 150 µm (à l'état sec).

Dans la suite de ce document les concentrations en PAA des gels font références à la concentration en acrylamide utilisée pour former le gel.

III.1.2 Mise en forme des gels pour l'observation en microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

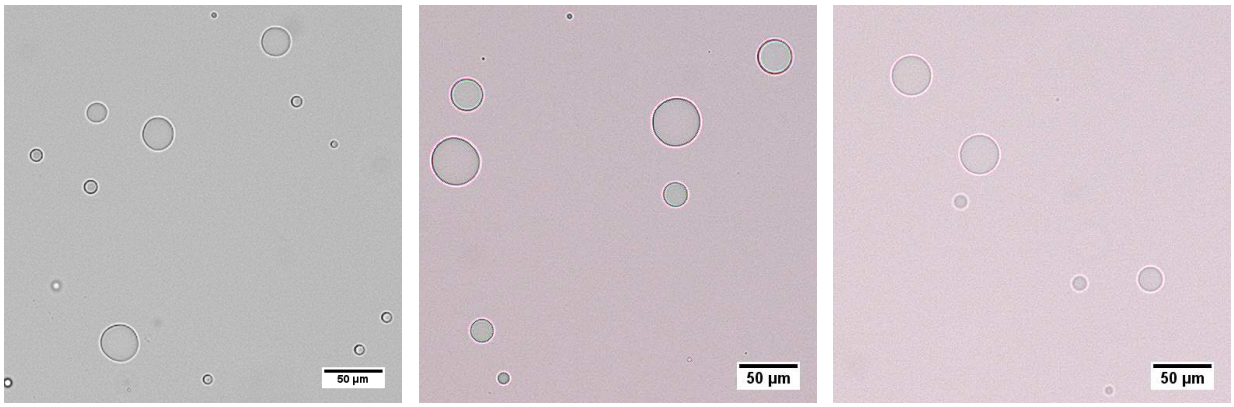
En microscopie confocale, la profondeur de champ de l'objectif utilisé est de 200 µm. La lamelle couvre-objet ayant une épaisseur de 150 µm, il ne reste qu'une cinquantaine de micromètres de profondeur d'observation pour voir les capsules. Or le gel, lorsqu'il est sec, a une épaisseur de 150 µm, et se trouve dans un interstice de 600 µm entre la lame et la lamelle. Il n'est donc plus collé à la lamelle et en est séparé par une couche d'air qui l'éloigne encore de l'objectif. Dans ces conditions, les capsules sont trop éloignées de l'objectif pour faire la mise au point sur les objets.

Pour limiter la distance entre les capsules et l'objectif, il est nécessaire de retirer la lamelle couvre objet, tout en protégeant le gel pour ne pas le mettre en contact direct avec l'huile d'immersion de l'objectif. Pour cela, les gels sont inclus dans une résine en suivant le protocole donné dans le chapitre II §IV.2.3.

III.2 Déformation du gel sans capsules

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la déshydratation du gel sur la déformation de cavités sphériques contenant de l'huile, analogues à celles causées par la présence des capsules. Ceci permet, lorsque l'ensemble gel-capsules sera étudié, de discriminer les déformations dues au gel et celles propres au dégonflement des objets.

Pour produire des cavités de mêmes tailles que les capsules, une émulsion de D4 dans l'eau stabilisée par des nanocristaux de cellulose est incluse dans un gel de polyacrylamide dans les mêmes conditions que nos objets. L'encapsulation de D4 dans le gel permet également d'observer les effets de l'évaporation de l'huile sur le gel. Plusieurs concentrations d'acrylamide sont étudiées : 10%, 20% et 30%. La figure 5.4 présente des images de microscopie optique de l'émulsion incluse dans des gels de PAA de différentes concentrations.

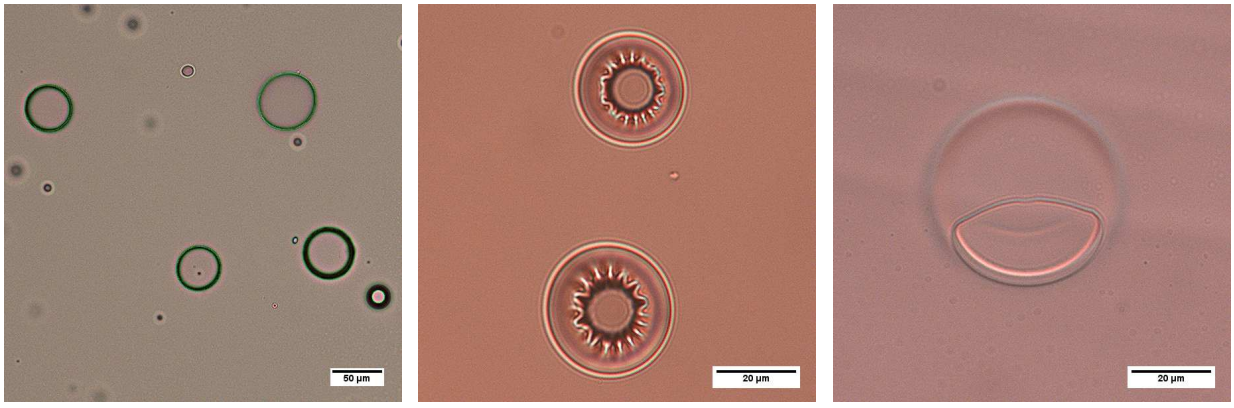


(a) PAA 10% (b) PAA 20% (c) PAA 30%

FIGURE 5.4 – Images de microscopie optique d'une émulsion de D4 dans l'eau stabilisée par des nanocristaux de cellulose, incluse dans un gel de PAA.

L'inclusion dans le gel et sa mise en oeuvre n'induisent pas de déformation des gouttes. Ces dernières ont le même aspect que lorsqu'elles sont observées en suspension dans l'eau. Toutefois, nous notons que le contraste entre l'huile et le gel diminue quand la concentration en acrylamide augmente (Fig. 5.4). L'indice de réfraction de l'huile, de l'eau et du polyacrylamide sec sont respectivement n_{D4} = 1,395, n_{eau} = 1,33 et n_{PAA} = 1,47. L'indice de réfraction du gel hydraté devrait dépendre de la fraction volumique en polyacrylamide ϕ. En prenant une relation linéaire nous posons $n_{PAA,\phi} = \phi\ n_{PAA} + (1 - \phi)\ n_{eau}$, nous obtenons pour les différentes concentration en PAA étudiée : $n_{PAA,10\%}$ = 1,34, $n_{PAA,20\%}$ = 1,36, $n_{PAA,30\%}$ = 1,37. Plus la concentration en PAA augmente et plus l'indice optique du gel se rapproche de celui de l'huile, d'où une diminution du contraste. Nous conservons les 3 concentrations présentées sur la figure 5.4 pour étudier les comportements des cavités, en fonction de la concentration initiale, lors de la déshydratation.

Pour observer les déformations, l'eau et l'huile sont évaporées directement sous vide. La figure 5.5 présente des images de microscopie optique des gels contenant l'émulsion après séchage et évaporation des gouttes d'huile sous vide.



(a) Cavités non déformées (b) Cavités ouvertes (c) Cavité où il reste de l'huile

FIGURE 5.5 – Images de microscopie optique des situations typiques observées pour une émulsion de D4 dans l'eau stabilisée par des nanocristaux de cellulose, incluse dans des gels de PAA après déshydratation du gel et évaporation de l'huile. Concentration initiale en acrylamide (a) et (b) 30% , (c) 10%. Déshydratation et évaporation : 4h. Ces images types sont discutées dans le texte.

Quelle que soit la concentration initiale en acrylamide du gel, nous observons que la majorité des cavités ne présente aucun changement de forme particulier, par rapport à l'état hydraté (Fig. 5.5(a)). Pour les gels initialement plus concentrés en PAA (20% et 30%), nous observons la formation de rides radiales à l'endroit de certaines gouttes (Fig. 5.5(b)). Pour les gels formés à partir d'une solution d'acrylamide à 10%, nous n'observons pas l'apparition d'une telle morphologie. Toutefois, nous observons quelques cavités ayant un aspect similaire à celui présenté sur la figure 5.5(c). Nous pensons qu'il s'agit d'une cavité où il resterait de l'huile. Nous observons donc une goutte de D4 qui mouille une cavité sphérique.

Les rides observées sur les gels (Fig. 5.5(b)) sont similaires à celle observées sur des films minces [Huang et al., 2007, Roman and Bico, 2010, Davidovitch et al., 2011, Davidovitch et al., 2012, King et al., 2012], sur lesquels sont appliquées des contraintes centripètes locales. La figure 5.6 présente les morphologies obtenues par Huang et al [Huang et al., 2007] pour un film fin de polystyrène flottant sur l'eau, sur lequel est déposée une goutte d'eau. La longueur des rides et leur nombre dépendent du film (épaisseur et module d'Young) et de la goutte (taille et tension de surface). Des morphologies similaires ont également été observées sur des coques fines soumises à une pression localisée [Vella et al., 2010].

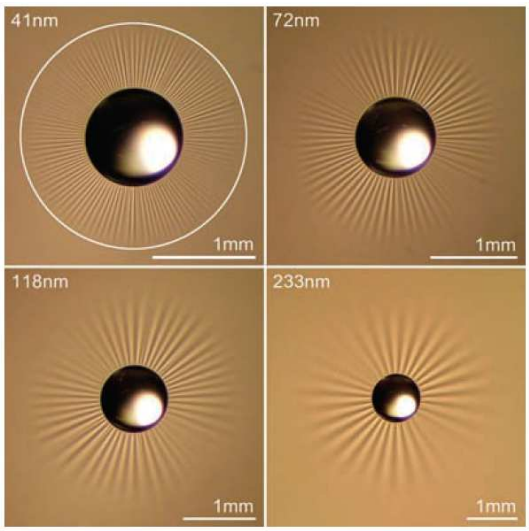
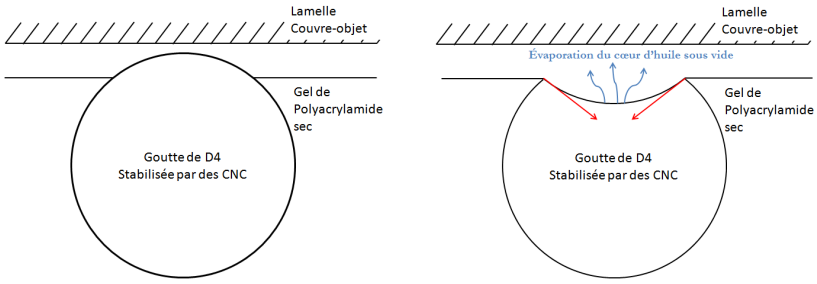


FIGURE 5.6 – Quatre films de polystyrène de diamètre D = 22,8 mm de différentes épaisseurs flottants sur l'eau, chacun est ridé par une goutte d'eau de rayon 0,5 mm et d'une masse de 0,2 mg. Quand le film est plus épais, le nombre N de rides diminue et la longueur L des rides augmente. L est défini comme sur l'image en haut à gauche, en mesurant du bord de la goutte d'eau jusqu'au cercle blanc. L'échelle varie d'une image à une autre alors que les gouttes d'eau ont toutes approximativement la même taille. D'après Huang et al [Huang et al., 2007].

Sur les images de microscopie (Fig. 5.5(b)) nous remarquons que l'origine des rides présente un fort contraste optique. Il y a donc, à cet endroit, un changement de milieu, d'indices de réfraction différents. Nous pensons qu'il s'agit d'un trou laissé à la surface du gel par les gouttes. La mise en forme des objets se fait entre lame et lamelle. La polymérisation de l'acrylamide n'étant pas instantanée, les gouttes ont le temps de crémer avant d'être piégées dans le PAA. Certaines vont pouvoir sortir en partie du gel comme cela est illustré sur la figure 5.7(a). Lors de l'évaporation du coeur, un ménisque va se former. Il crée des contraintes sur le gel et entraîne sa déformation comme

représenté sur la figure 5.7(b). Les indices optiques du PAA sec et du D4 étant relativement proches par rapport à celui de l'air, nous observons en microscopie optique les accidents de l'interface air-matière



(a) Goutte avant évaporation (b) Goutte pendant évaporation

FIGURE 5.7 – Schéma explicatif de l'origine de la déformation de cavité, dans un gel de PAA sec, contenant une goutte d'huile qui s'évapore. Les forces dues à la tension de surface sont représentées par des flèches rouges.

Nous avons également remarqué la présence de cavités allongées dans le gel déshydraté (Fig. 5.8). Elles sont principalement observées sur le bord du gel.

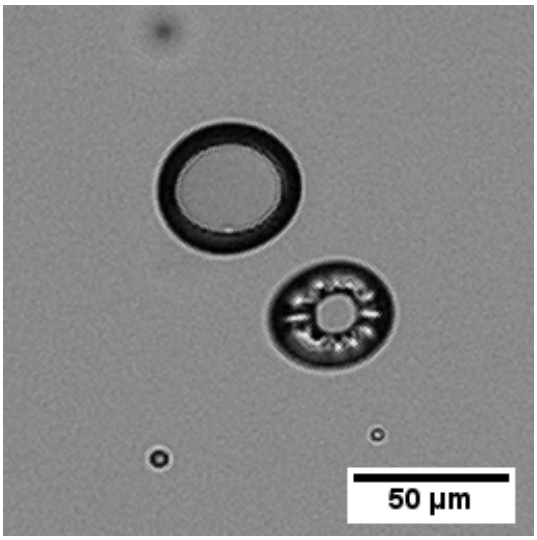


FIGURE 5.8 – Image de microscopie optique de cavités allongées (une fermée, un ouverte) dans un gel déshydraté de PAA à 20%.

En effet, le gel est constitué à l'état hydraté de 10 à 30% de polymère. En se déshydratant complètement il va perdre de 70 à 90% de son volume. Il se rétracte donc fortement lors du séchage, ce qui va créer des contraintes qui peuvent déformer les cavités. Au centre du gel, la force totale appliquée sur la cavité est considérée isotrope dans le plan horizontal. Plus la cavité est proche d'un bord, plus la contrainte imposée par ce dernier devient anisotrope (pas ou peu de contrainte provenant du bord libre). La cavité va être déformée et présente une forme allongée parallèle au bord. Dans la suite de ce document, nous appellerons ce phénomène "déformation anisotrope de bord d'échantillon". La figure 5.9 illustre les forces dans le gel lors de son séchage et les déformations anisotropes, des cavités, qui en résultent.

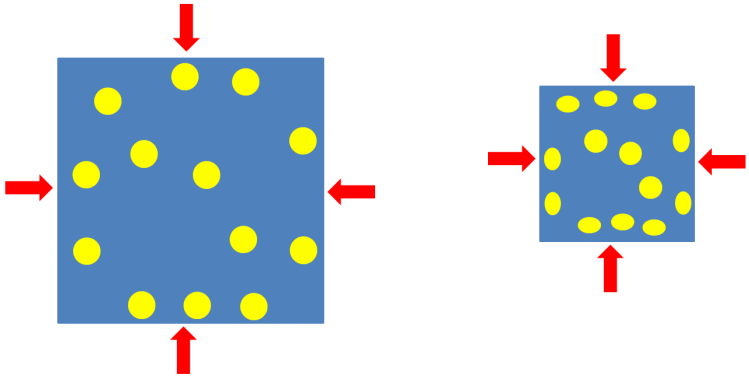


FIGURE 5.9 – Représentation schématique des contraintes appliquées sur le gel lors de sa déshydratation et des formes générées pour les cavités qu'il contient.

Pour les expériences qui suivent, nécessaires à la validation de la méthode de dégonflement de capsules dans un gel de PAA, nous fixons la concentration initiale en acrylamide à 20%. En effet, nous souhaitons que son volume ne diminue pas trop fortement lors du séchage, afin de limiter la déformation anisotrope de bord d'échantillon des capsules avant dégonflement. Nous avons choisi de ne pas utiliser une concentration de 30% car le gel hydraté présente un très faible contraste avec les gouttes d'huile, comme observé sur la figure 5.4.

III.3 Dégonflement de capsules dans un gel de polyacrylamide.

III.3.1 Les capsules dans le gel avant déshydratation et dégonflement

Le gel est utilisé pour sécher la paroi des capsules, tout en maintenant la forme qu'elles possédaient en suspension Il est alors possible d'étudier le dégonflement de capsules à l'état déshydraté. Il est donc nécessaire de s'assurer de la forme des objets non dégonflés, après leur inclusion dans l'hydrogel et après la déshydratation de ce dernier.

Des capsules contenant des couches de CNC marquées sont piégées dans un hydrogel de PAA à 20%, puis observées en MBCL, sans déshydratation. Afin d'éviter le dessèchement du gel, les échantillons sont préparés 1 à 2 h avant l'observation en microscopie confocale à balayage laser (MCBL), qui est réalisée à l'air libre. Une séquence d'images de coupes successives, dans le plan d'observations (XY) suivant l'axe Z, est acquise pour des capsules obtenues par dépôts successifs de 5, 10 et 15 bicouches. Dans chaque échantillon, ce sont les 5 dernières couches qui sont marquées.

Un modèle en 3 dimensions est reconstitué, à partir des séquences d'images, avec le programme *ImageJ*. Nous appelons XY le plan d'observations, et Z la direction de la séquence d'images. Chaque image constitue une coupe (d'une épaisseur de 200 nm environ) de la capsule dans le plan XY, et l'intervalle entre chacune d'elles est appelé pas. Afin de faire une mesure précise du diamètre de la capsule suivant les 3 axes (X, Y et Z) du référentiel, des vues orthogonales sont utilisées. Dans ce cas, ce sont des coupes de la capsule suivant les plans XY, XZ et YZ qui sont visualisées. Elles sont déterminées à partir de la séquence d'images grâce au programme *ImageJ*.

Il est possible de choisir le niveau de la coupe pour chacun des trois plans. Les figures 5.10 et 5.11 présentent respectivement une reconstruction en 3D et une représentation en vues orthogonales d'une même capsule. Dans ce cas il n'y a pas de correction à réaliser sur la séquence d'image car le gel est hydraté (voir chapitre II §IV.2.4).

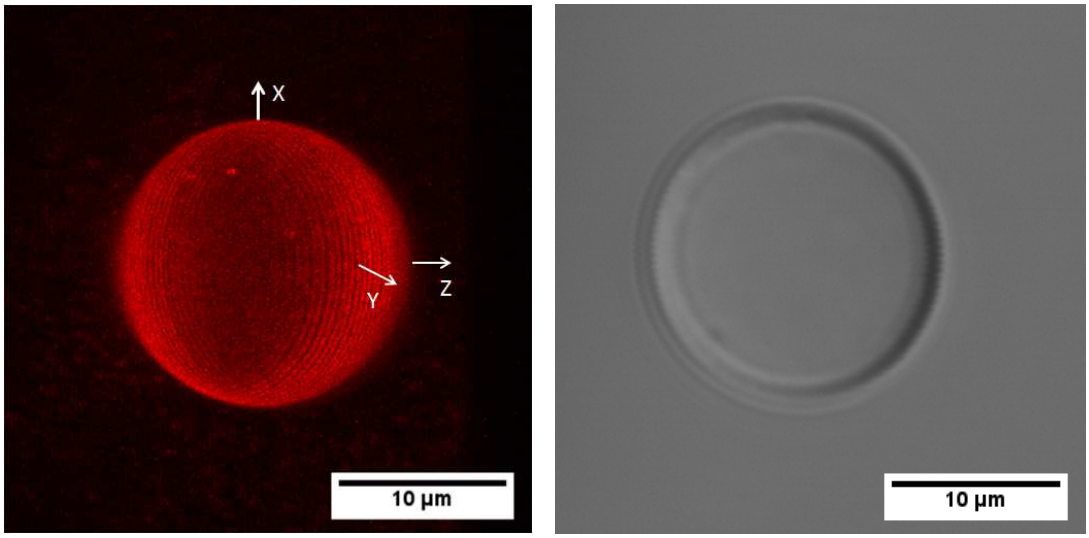


FIGURE 5.10 – Reconstruction en 3 dimensions d'une capsule de 10 bicouches, dans un gel de PAA à 20% hydraté, à partir d'une séquence d'images obtenue par microscopie confocale (objectif X40, pas : 500 nm), et l'image en lumière transmise correspondante. Sur les 10 bicouches, seules les 5 dernières couches de nanocristaux de cellulose sont marquées à la RBITC

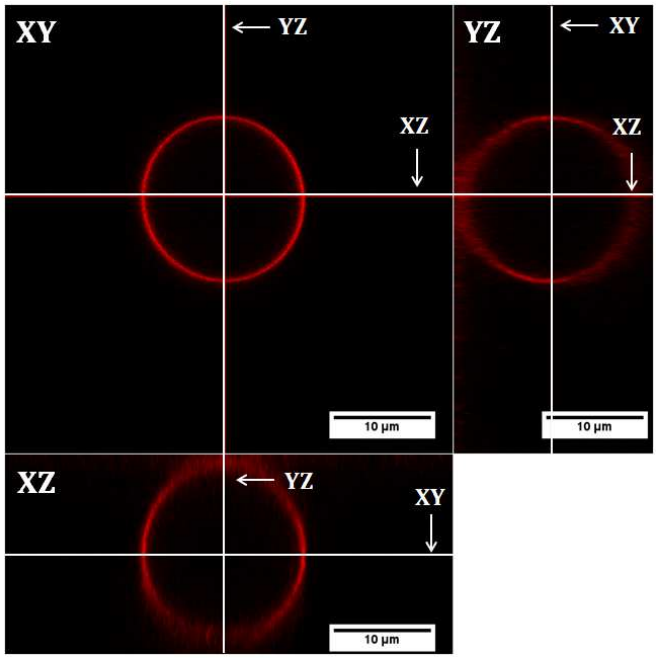


FIGURE 5.11 – Vues orthogonales d'une capsule à 10 bicouches, dans un gel de PAA à 20% hydratée, reconstruite à partir d'une séquence d'images de MBCL (objectif X40, pas : 500 nm). Les lignes continues blanches correspondent aux plans de coupes de la capsule.

Les reconstructions en 3 dimensions font apparaître des sphères (Fig. 5.10) sur l'ensemble des capsules observées dans le gel à l'état hydraté. Dans le cas présenté sur les figures 5.10 et 5.11, le diamètre de la capsule à 10 bicouches, moyenné selon les 3 axes (X, Y et Z), est de 17,3 ± 0,3 µm. De façon plus générale, nous observons une variation du diamètre inférieure ou égale à 4%

selon les 3 directions (X,Y,Z), quelle que soit l'épaisseur de la paroi ou la capsule observée. Nous considérons donc qu'à l'état initial, avant la déshydratation et l'évaporation de l'huile, les capsules piégées dans le gel sont sphériques.

III.3.2 Observation des capsules après déshydratation et dégonflement

III.3.2.1 Validation de la méthode

Comme les cavités dans le gel, certaines capsules présentent une déformation anisotrope après déshydratation. Cet allongement dans le plan horizontal (XY) est dû à la diminution de volume du gel lors du séchage, et non à des propriétés mécaniques anisotropes de la paroi. En effet, comme pour les cavités, ces capsules qui subissent une déformation anisotrope, sont principalement observées sur les bords du gel, celles qui se trouvent au centre du gel ne subissent pas de déformation dans le plan XY et gardent une forme isotrope (Fig. 5.12), comme dans les expériences sur les cavités.

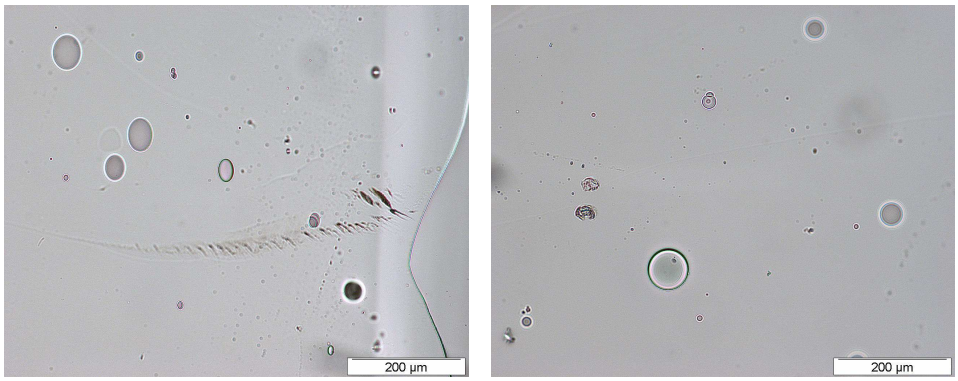


FIGURE 5.12 – Images de microscopie optique d'un gel de PAA déshydraté contenant des capsules à 15 bicouches. gauche : image prise sur le bord du gel ; droite : image prise au centre du gel.

Après déshydratation du gel et évaporation de l'huile, nous observons des capsules dégonflées. Leur dégonflement est caractérisé par la formation d'une dépression unique à indentations multiples (Fig. 5.13). Les morphologies observées sont similaires à celles obtenues expérimentalement et numériquement pour des TSIM [Zoldesi and Imhof, 2005, Quilliet et al., 2008, Quilliet, 2012].

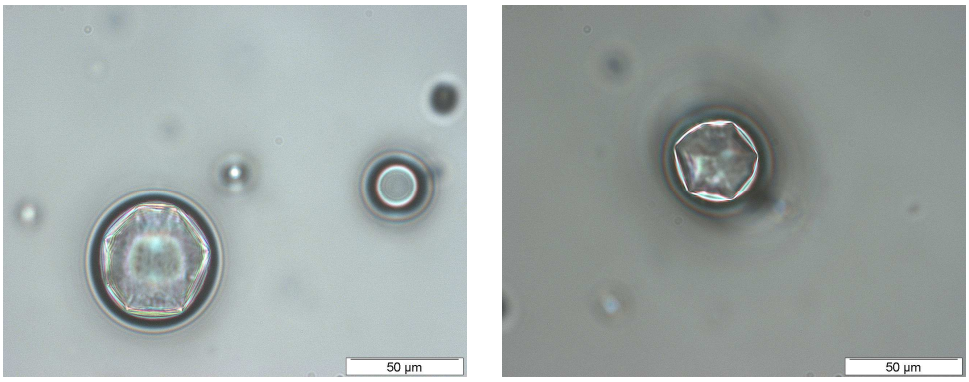


FIGURE 5.13 – Images de microscopie optique de capsules à 10 bicouches dégonflées, dans un gel de PAA à 20%. Déshydratation : 7 jours, Dégonflement : 4 h sous vide.

Nous notons également la présence de ridules semblables à celles observées pour des cavités dans le gel (Fig. 5.14), et qui ne ressemblent pas à des déformations de coques. Nous avons vu que ces morphologies sont générées par la déshydratation du gel sur des cavités ouvertes. Elles ne seront donc pas considérées pour étudier le comportement élastique des capsules.

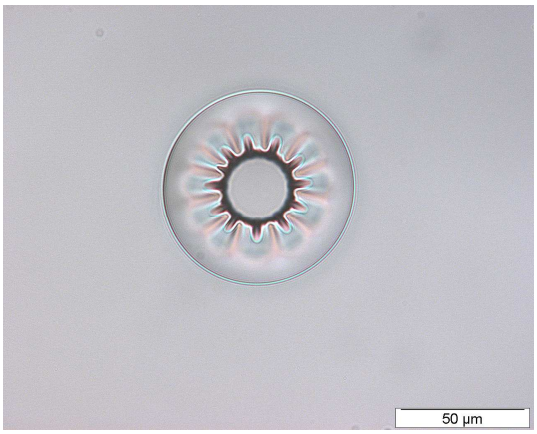


FIGURE 5.14 – Image de microscopie optique d'une déformation caractéristique du gel, observée dans un gel contenant des capsules de 10 bicouches.

En incluant les capsules dans un hydrogel de PAA, nous avons donc mis au point une méthode qui permet de déshydrater et de dégonfler des capsules sans les déchirer. Elle permet également d'observer les objets facilement car ils sont alors immobilisés.

III.3.2.2 Orientation de la calotte sphérique retournée

La microscopie optique ne permet qu'une observation en 2D du système gel-capsules. Nous n'avons pas d'information sur les déformations des capsules dans la profondeur de l'échantillon. La microscopie confocale à balayage laser est donc utilisée pour obtenir des informations en 3D sur la morphologie des capsules dégonflées dans le gel.

Des capsules à parois fluorescentes sont observées en MCBL après déshydratation, puis évaporation de leur coeur d'huile sous vide. Les capsules utilisées pour cette étude proviennent des mêmes lots que dans la partie précédente. Des séquences d'images sont acquises et les capsules dégonflées sont reconstruites en 3 dimensions. Pour obtenir les images en 3 dimensions, le pas de la séquence d'image est corrigé par un facteur 0,67 pour tenir compte des effets de la mise en forme de l'échantillon (voir chapitre II §IV.2.4).

La figure 5.15 présente une reconstruction en 3D de capsule dégonflée, accompagnée de l'image en lumière transmise correspondante.

Pour chaque échantillon, en mettant en parallèle la reconstruction en 3D et l'image en lumière transmise correspondante, nous observons que la fluorescence coïncide avec la cavité du gel (Fig. 5.15). Le gel est donc en contact avec la paroi de la capsule. Ceci n'est pas étonnant, car à l'état hydraté, la cavité a exactement la taille de la capsule qu'elle contient. Lors de la déshydratation, le coeur d'huile, qui définit la taille de la capsule (D » h, avec D le diamètre de la capsule et h

l'épaisseur de sa paroi), ne diminue pas de volume alors que le gel perd près de 80% du sien. Il va donc se rétracter sur les objets et va rester en contact avec la paroi.

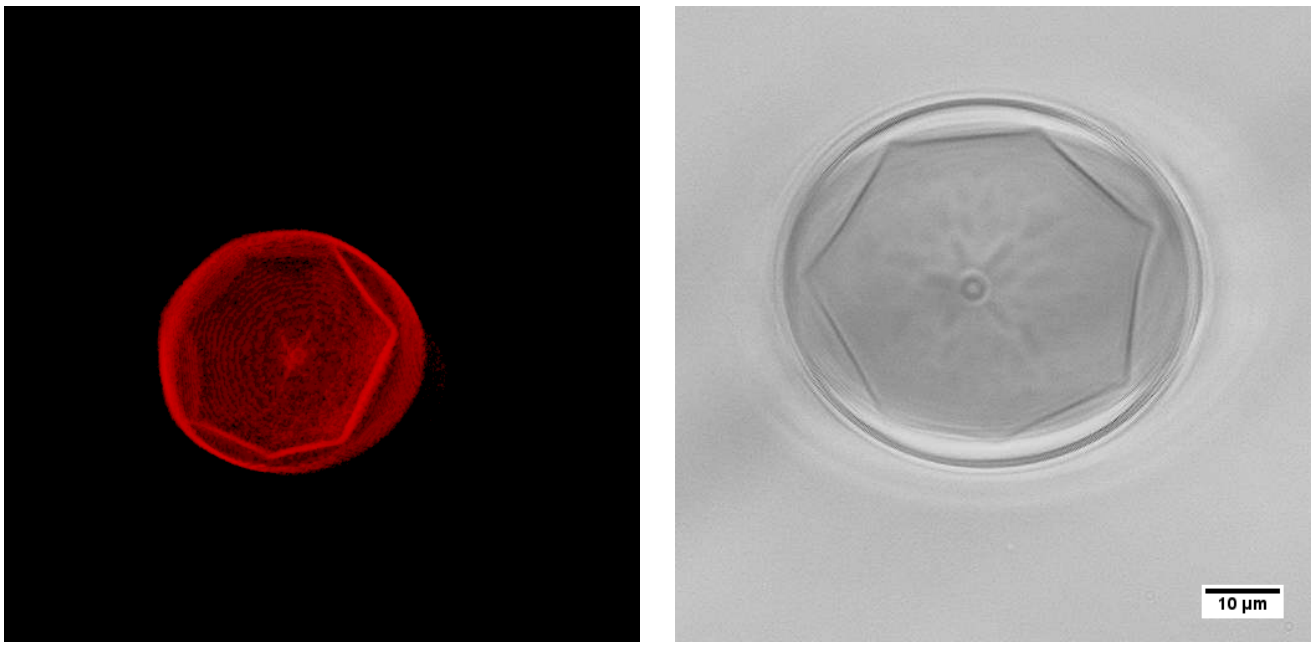


FIGURE 5.15 – Reconstruction en 3 dimensions d'une capsule de 5 bicouches dégonflée. Le gel et la paroi sont déshydratés pendant une semaine dans un atmosphère sèche et le coeur des capsules est évaporé pendant 24h sous vide. Pas : 0,4 µm. Pour la reconstruction en 3D l'épaisseur des voxels est multiplié par un facteur 0,67 afin de corriger la dilatation en Z qu'induit la préparation des échantillons à l'observation (voir chapitre 2).

Nous observons que les dépressions se forment toujours sur la moitié supérieure de la capsule (l'hémisphère le plus proche de l'objectif), mais jamais sur sa moitié inférieure. Nous supposons que ceci est dû à la mise en forme du gel. En effet, les capsules crèment dans le gel avant qu'il ne polymérise. La préparation de ces derniers est réalisée la lame à plat, avec la lamelle couvre-objet vers le haut (voir chapitre II Fig. 2.15). Le gel est donc plus fin au dessus des capsules que dessous (les gouttes sont plus proches de la lamelle couvre-objet que de la lame). Ainsi l'évaporation du coeur se fait plus facilement par le haut de la capsule que par le bas car il y a moins de gel à traverser. Des gels d'une épaisseur de 1 mm à l'état sec (5 mm hydraté, 20% de PAA) ont été réalisés, et même après plusieurs jours sous vide les capsules se trouvant dans ces gels ne présentaient aucun dégonflement. Il est donc important d'utiliser des gels suffisamment fins pour permettre l'évaporation du coeur et entraîner le flambage des capsules.

Nous observons également que la moitié inférieure des capsules (la plus éloignée de l'objectif) donne un signal de fluorescence beaucoup moins intense que la moitié supérieure. Nous pensons que cela est dû à une réabsorption, par la partie supérieure de la capsule, des photons émis par la partie inférieure. En effet, un fluorophore est capable de réabsorber une partie des photons qu'il émet, car sa bande d'excitation, et donc d'absorbance, possède généralement des longueurs d'onde communes avec sa bande d'émission. Ainsi les photons émis par la moitié inférieure de la capsule vont devoir traverser l'autre moitié de la paroi avant d'être récoltés dans l'objectif. Lors de ce passage, il est probable qu'une partie soit réabsorbée. Cette différence peut être partiellement corrigée en modifiant la luminosité et le contraste des images.

Les modèles de dégonflement de coques décrits dans la littérature considèrent des objets sphériques. Les reconstructions en 3D nous permettent de confirmer si nous observons le dégonflement de capsules initialement sphériques. Sur les objets dégonflés, observés en MBCL, les trois quarts présentaient une variation de moins de 5% entre le rayon de la capsule, et le rayon de courbure de l'hémisphère présentant la dépression. Nous observons, de manière générale dans les reconstructions en 3D, que la moitié inférieure est pseudo-sphérique car elle apparait aplatie. Nous n'avons pas pu déterminer s'il s'agissait d'une réalité ou d'un artefact dû au très faible signal de fluorescence récolté pour cette moitié. Toutefois, cela n'a pas de conséquence sur la morphologie de la dépression créée dans la partie supérieure de la capsule. En effet, la longueur caractéristique d'une déformation sur une coque dépend de la courbure initiale de l'objet, à l'endroit où la dépression est formée [Landau and Lifshitz, 1986]. Dans notre, cas le rayon de courbure de l'hémisphère qui présente la dépression est égal au rayon de la capsule. Ainsi, les morphologies obtenues sont équivalentes à celle d'un objet sphérique de même rayon que la capsule.

La figure 5.16 présente la taille caractéristique d'une dépression formée par le dégonflement d'une TSIM sphérique et "pseudo-sphérique". Dans les deux cas la longueur caractéristique est d $\sim \sqrt{hR}$ avec R rayon de courbure de l'hémisphère présentant la dépression, et h l'épaisseur de la coque.

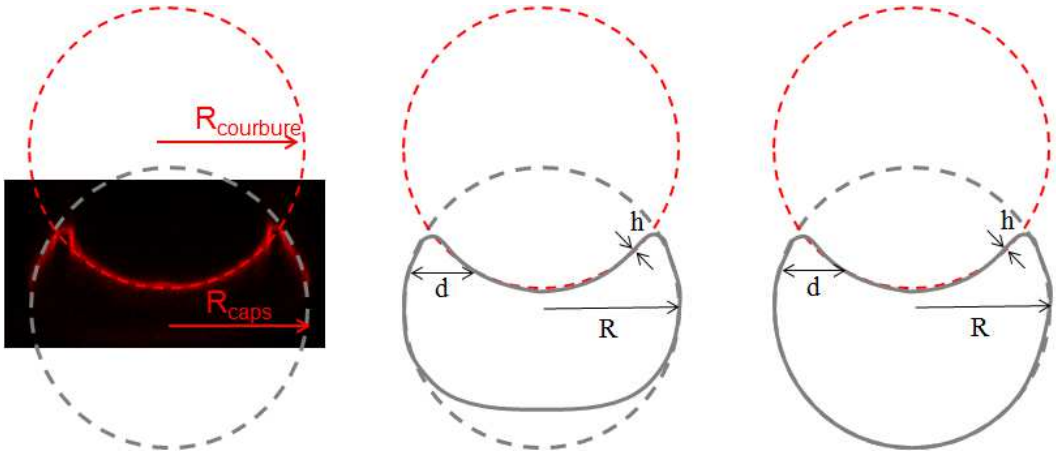


FIGURE 5.16 – Coupe transversale d'une capsule de 5 bicouches pseudo-sphériques obtenue en MCBL [gauche]. Représentation schématique d'une déformation dans une coque pseudo-sphérique [centre] et sphérique [droite]. La longueur caractéristique est égale dans les deux cas.

III.3.3 Acquisition des données quantitatives.

Dans les études des TSIM, les caractéristiques de la capsule qui régissent sa déformation sont principalement : son épaisseur h et son rayon R [Landau and Lifshitz, 1986, Quilliet et al., 2008, Quilliet, 2012, Knoche and Kierfeld, 2011]. Lors de la formation d'une dépression unique à indentations multiples, le nombre de rides, et donc la distance caractéristique de la déformation, peuvent être reliés au dimension de la TSIM. En effet, des simulations ont montré que W = $0,940\ (h/R)^{-1/2}$ [Quilliet, 2012].

En s'inspirant de ce modèle numérique nous allons nous intéresser aux variations du nombre de

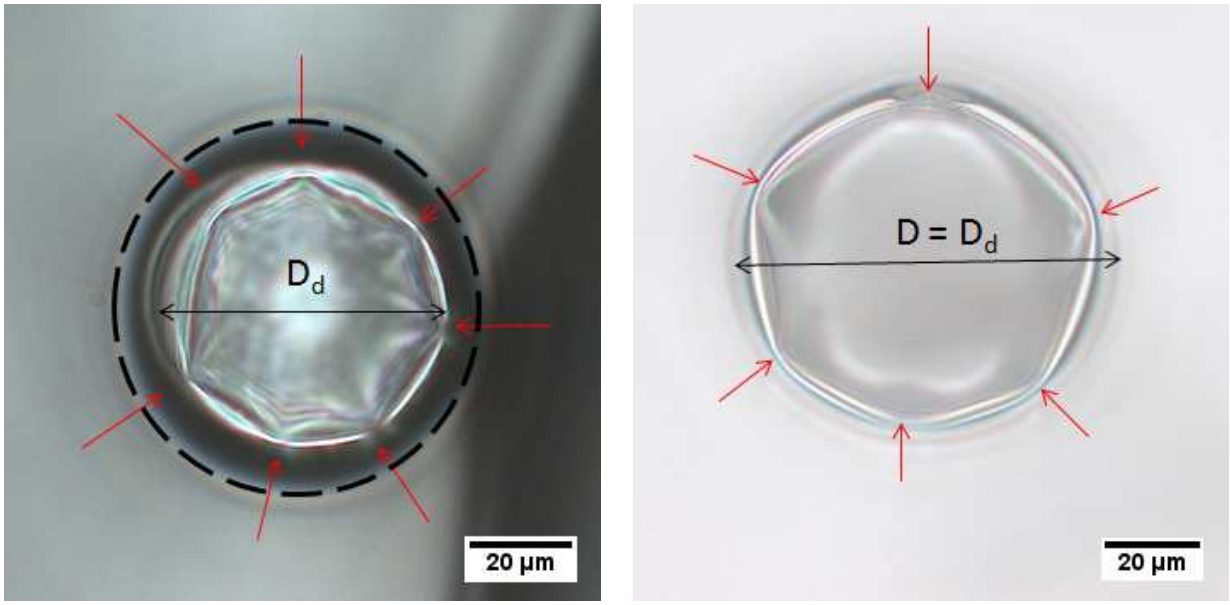
rides W de la dépression en fonction de l'épaisseur h et du rayon R des capsules de notre système. En s'appuyant sur les observations de microscopie confocale à balayage laser (chapitre 4 §II.2.3) et sur les mesures effectuées sur les multicouches plans de CNC et de XG [Jean et al., 2009], nous supposons que la croissance de la paroi de la capsule est linéaire. L'épaisseur h des capsules est donc proportionnelle au nombre de bicouches. Nous avons mesuré en MET, une épaisseur de 10 nm par bicouche, d'où une épaisseur totale pour la paroi h = n*10 nm avec n le nombre de bicouche. L'observation des échantillons en microscopie optique nous permet de mesurer le diamètre des capsules (égal à celui de la cavité), les dimensions de la dépression et le nombre de rides formées.

Les observations des capsules dégonflées sont à présent réalisées en microscopie optique. Nous n'avons donc qu'un aperçu en 2D des objets. Pour étudier les morphologies générées par le dégonflement sur les images de MO, nous distinguons deux formes de capsules avant l'évaporation du coeur d'huile (Fig. 5.12) :

- Les capsules en coeur d'échantillon : ce sont les objets qui n'ont pas subi de déformation anisotrope dans le plan, due aux contraintes de séchage dans le gel.
- Les capsules en périphérie d'échantillon : ce sont les objets qui ont subi une déformation anisotrope lors de la déshydratation du gel.

III.3.3.1 Les capsules en coeur d'échantillon

Leur équateur, dans le plan d'observation, reste globalement circulaire au cours de la déshydratation. Elles présentent toutes une dépression unique de forme polygonale. Des exemples d'observation en microscopie optique de tels objets sont présentés sur la figure 5.17.



(a) Capsules partiellement dégonflées : D = 74,5 µm, D_d = 57,2 µm et W = 7.

(b) capsules quasiment entièrement dégonflées : D = D_d = 72,5 µm et W = 6.

FIGURE 5.17 – Images de microscopie optique de capsules de 10 bicouches en coeur d'échantillon, dégonflées dans un gel d'acrylamide à 20%. Déshydratation : 24h, Dégonflement : 4h sous vide. Les dimensions mesurées pour déterminer la loi de déformation des capsules sont : D le diamètre du cercle noir en pointillé correspondant au de la capsules, D_d le diamètre de la dépression, le nombre de rides W (indiquées par des flèches rouges) est compté.

Dans de nombreux cas les capsules ne sont que partiellement dégonflées (Fig. 5.17(a)). Les données prélevées sur les images sont le diamètre D de la capsule, le diamètre de la dépression D_d ($<$ D) et le nombre de rides W.

Nous avons également observé des capsules en coeur d'échantillon où D_d = D (Fig. 5.17(b)). Nous parlerons alors de capsules quasiment entièrement dégonflées. Les données mesurées sur l'image de MO sont alors le nombre de rides et le diamètre de la capsule. Dans ces conditions, nous supposons que la paroi retournée, qui forme la dépression, touche la paroi non retournée de la capsule. Ce niveau de dégonflement est celui utilisé pour caractériser l'élasticité de TSIM et qui a permis d'établir la loi comportementale du nombre de rides en fonction de l'épaisseur et du rayon des TSIM, à dépression unique à indentations multiples. Il a déjà été observé expérimentalement sur des coques de silice dégonflées (Fig. 5.18).

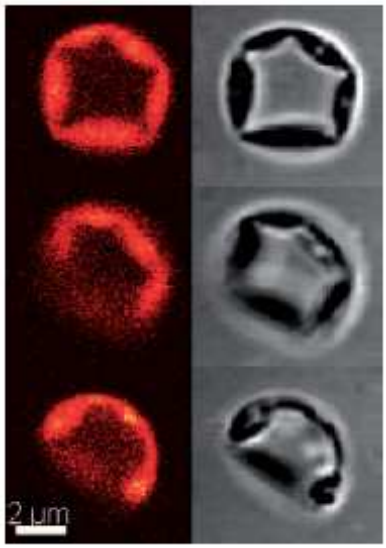


FIGURE 5.18 – Trois vues différentes d'une coque de silice, marquée à la rhodamine isothyiocyanate, déformée en MCBL [gauche] et en lumière transmise [droite] [Quilliet et al., 2008].

Dans nos expériences, une capsule sera considérée comme quasiment complètement dégonflée si $D_d > 0{,}9$ D.

III.3.3.2 Les capsules en périphérie d'échantillon

Un exemple est présenté sur la figure 5.19. Comme pour les capsules en coeur d'échantillon, elles présentent toutes une dépression unique de forme polygonale. Cette dernière est dans la très grande majorité des cas inscriptible dans un cercle. Cependant, cette morphologie ne peut être comparée au modèle classique de déformations de TSIM. En effet, les modèles expérimentaux et numériques ne concernent que des coques sphériques, et non des objets ellipsoïdaux comme les capsules à déformation anisotrope. De plus le rayon de courbure n'étant pas constant sur ces capsules, les lois établies pour les coques sphériques ne sont pas utilisables en l'état.

Cependant nous souhaitons intégrer ces capsules présentant une déformation anisotrope à notre modèle, car elles représentent, suivant l'échantillon, entre 20 et 50% des objets dégonflés.

Pour les exploiter nous prélevons sur les images le grand axe a et le petit axe b de la capsule, le diamètre de la déformation (D_d) et le nombre de rides W. Nous supposons que ces capsules ont le même comportement élastique que lorsqu'elles sont dans leur état initialement sphérique dans le gel hydraté. Nous considérons alors que le volume est resté constant lors de la déformation anisotrope due au gel. En supposant que nous ayons un ellipsoïde de révolution (b = c avec c l'axe de l'ellipsoïde suivant la direction orthogonale au plan d'observation), nous obtenons $D = \sqrt[3]{ab^2}$ comme diamètre initiale de la capsule avant sa déshydratation et son dégonflement.

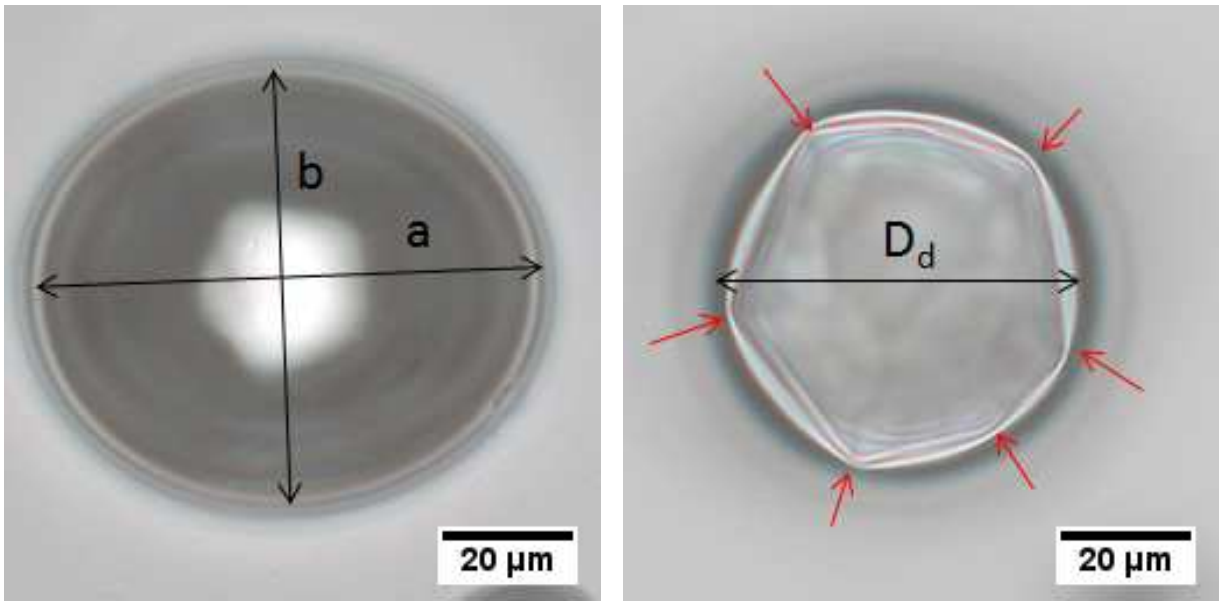


FIGURE 5.19 – Images de microscopie optique d'une même capsule de 10 bicouches présentant une déformation anisotrope, dans un gel d'acrylamide à 20%. L'image de gauche montre l'équateur de la capsule, et l'image de droite le contour de la dépression. Les dimensions mesurées pour déterminer la loi de dégonflement des capsules sont : a grand axe et b petit axe de la capsule, D_d diamètre de la dépression. Le nombre de rides (indiquées par flèches rouges) W est compté : a = 80 µm, b = 69,3 µm, D_d = 57,1 µm et W = 6.

Une capsule est considérée comme n'ayant pas subi de déformation anisotrope, si b > 0,9a avec a et b respectivement le grand axe et le petit axe mesuré. Nous posons alors D = b. Les dépressions observées sont toujours uniques et de forme polygonale, que la capsule soit en coeur ou en périphérie d'échantillon. De plus, elles ne présentent pas d'anisotropie particulière et sont semblables à celles de coques isotropes [Quilliet et al., 2008, Quilliet, 2012]. Elles sont toujours inscriptibles dans un cercle pour les capsules en coeur d'échantillon et dans la majorité des cas des capsules en périphérie d'échantillon.

III.3.4 Élasticité des capsules multicouches XG/CNC

III.3.4.1 Influence de la nature du gel

Comme il a été vu précédemment, le gel impose des déformations supplémentaires aux capsules, par rapport à un dégonflement de TSIM en solution. Comme les cavités donnent leur forme aux capsules, il est également possible que le gel influe sur les morphologies liées au dégonflement des objets qu'il contient. Nous nous intéressons donc à présent à l'effet que peut avoir le PAA sur les morphologies de dégonflement observées.

Des capsules à 10 bicouches sont incluses dans des gels de PAA de concentration 10%, 20% et 30%. Le gel et la paroi sont déshydratés et l'huile est ensuite évaporée du coeur des capsules sous vide. Les échantillons sont alors observés en microscopie optique.

La figure 5.20 présente le nombre de rides d'une déformation en fonction du diamètre de la capsule correspondante. Les points W = f(D) se confondent quelle que soit la concentration initiale en PAA (Fig. 5.20). Nous pouvons constater que cette concentration n'a pas d'influence détectable sur les propriétés élastiques des capsules.

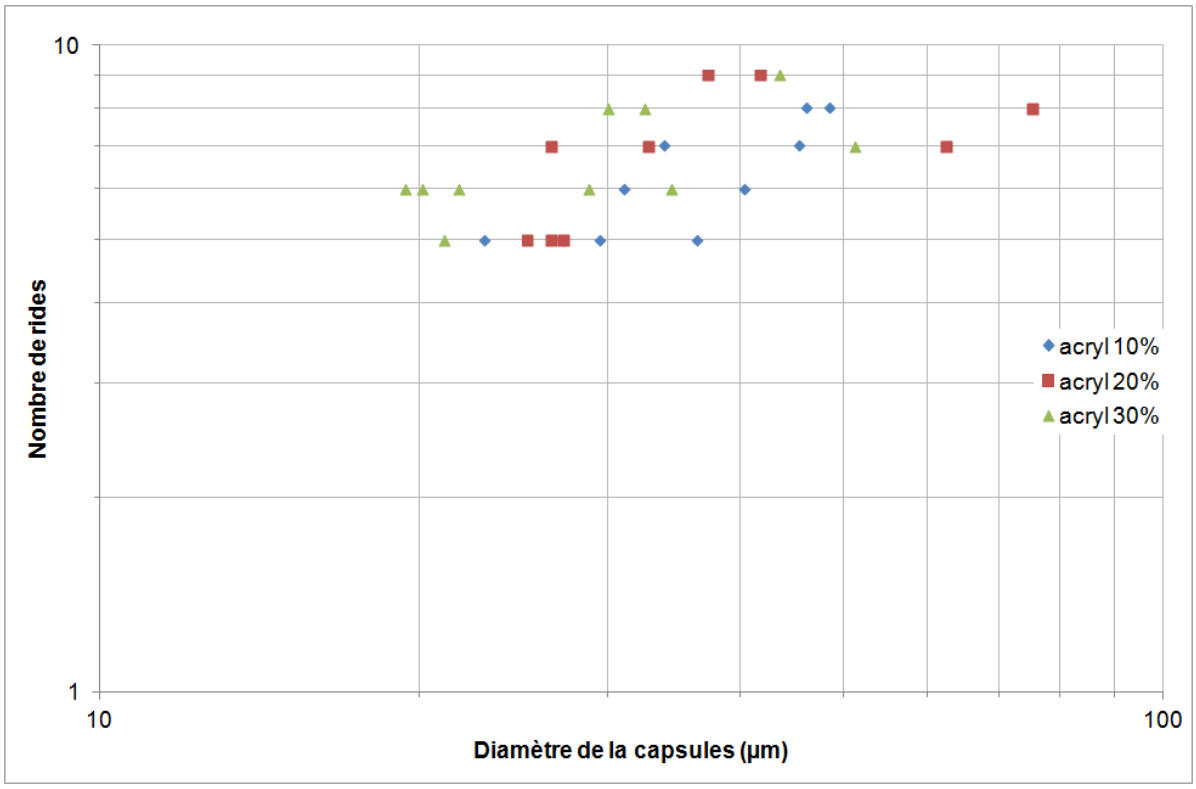


FIGURE 5.20 – Nombre de rides W de la dépression formée sur des capsules de 10 bicouches, après leur dégonflement, en fonction du diamètre de la capsule, dans des gel à différentes concentration d'acrylamide. Déshydratation : 7j, Dégonflement : 4h.

Ces expériences confirment (Fig. 5.20) que les interactions entre les capsules et le gel sont purement physiques, le PAA étant en contact avec la paroi, et non de nature chimique. C'est pourquoi la concentration initiale en acrylamide du gel n'a pas d'impact sur les déformations des capsules dues à leur dégonflement. Pour les mêmes raisons que citées précédemment, nous conservons une concentration en acrylamide de 20% pour former les gels qui servent à étudier l'élasticité des capsules.

III.3.4.2 Influence de l'épaisseur de la capsule

Sur les clichés de microscopie optique, le nombre de rides W est compté, le diamètre des capsules D est mesuré, ainsi que celui du cercle dans lequel s'inscrit la dépression polygonale D_d.

La longueur caractéristique de déformation d mesurable sur les clichés de microscopie optique est la distance entre deux rides. Sur une même capsule, nous considérons pour simplifier le

raisonnement que cette distance est la même entre toute les rides. Nous posons alors d $= \pi D_d/W$.

Pour étudier l'ensemble des morphologies observées nous nous inspirons de cette loi en comparant W à D. La figure 5.21 présente le nombre de rides en fonction du diamètre de la capsule D.

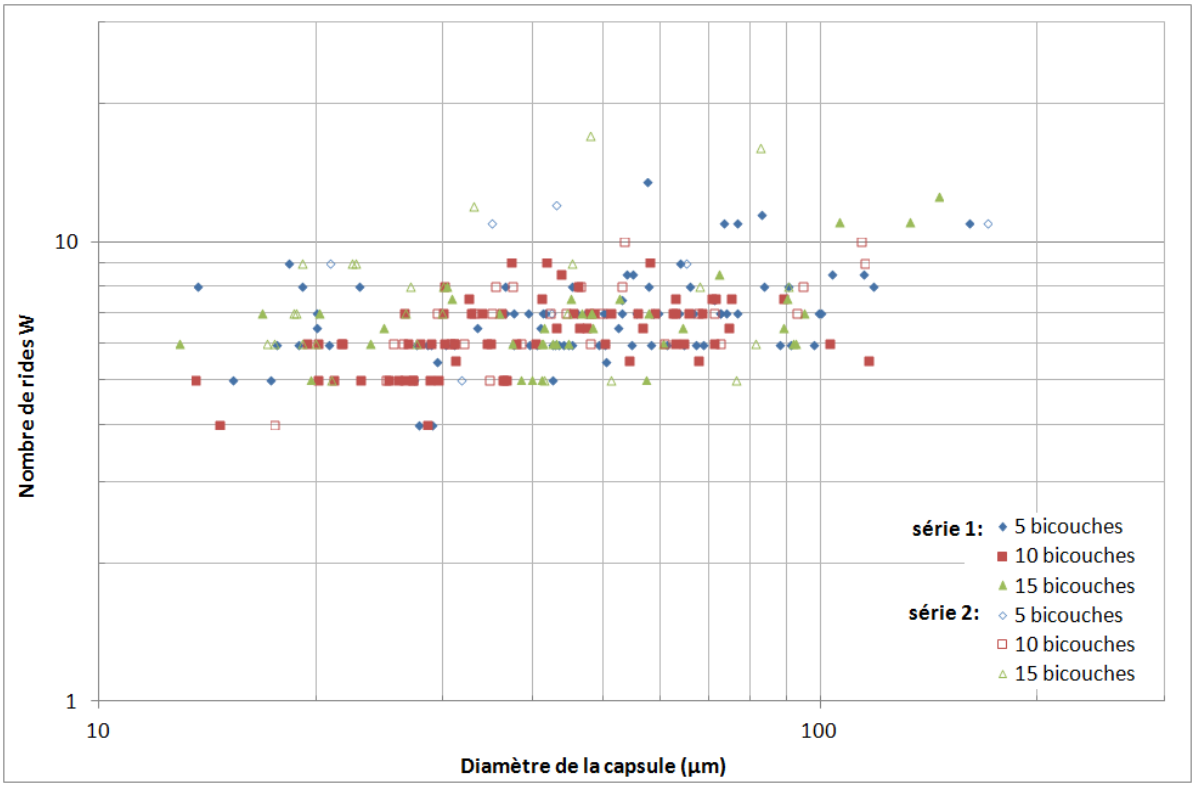


FIGURE 5.21 – Nombre de rides en fonction du diamètre D de la capsules pour des coques de 5,10 et 15 bicouches. Dans chaque cas deux lots de coques (1) et (2) sont observés.

D'après la figure 5.21 il apparaît que le nombre de rides W est indépendant de l'épaisseur de la paroi de la capsule contrairement aux TSIM. En effet, les points des capsules formées de 5, 10 et 15 bicouches se confondent. Toutefois, l'ensemble des points est relativement dispersé. Cela provient de la grande diversité de configuration entre les capsules du coeur de l'échantillon qui ne sont pas entièrement dégonflées et les capsules qui présentent une déformation anisotrope.

Vu la diversité des objets, il est difficile de dégager une tendance claire de cet ensemble de points. Afin de cerner plus précisément le comportement élastique des capsules multicouches nous sélectionnons uniquement les capsules de type coeur d'échantillon, et quasiment entièrement dégonflées. Seuls les objets respectant les conditions suivantes sont conservés :

1. la capsule est de type coeur d'échantillon : b $>$ 0,9a. Nous posons alors D $=$ 2b.
2. La déformation est inscrite dans un cercle : $b_d > 0{,}9a_d$. Nous posons alors $D_d = 2b_d$.
3. La capsule est complètement dégonflée : $D_d > 0{,}9D$.

Les points satisfaisant ces conditions sont présentés sur la figure 5.22.

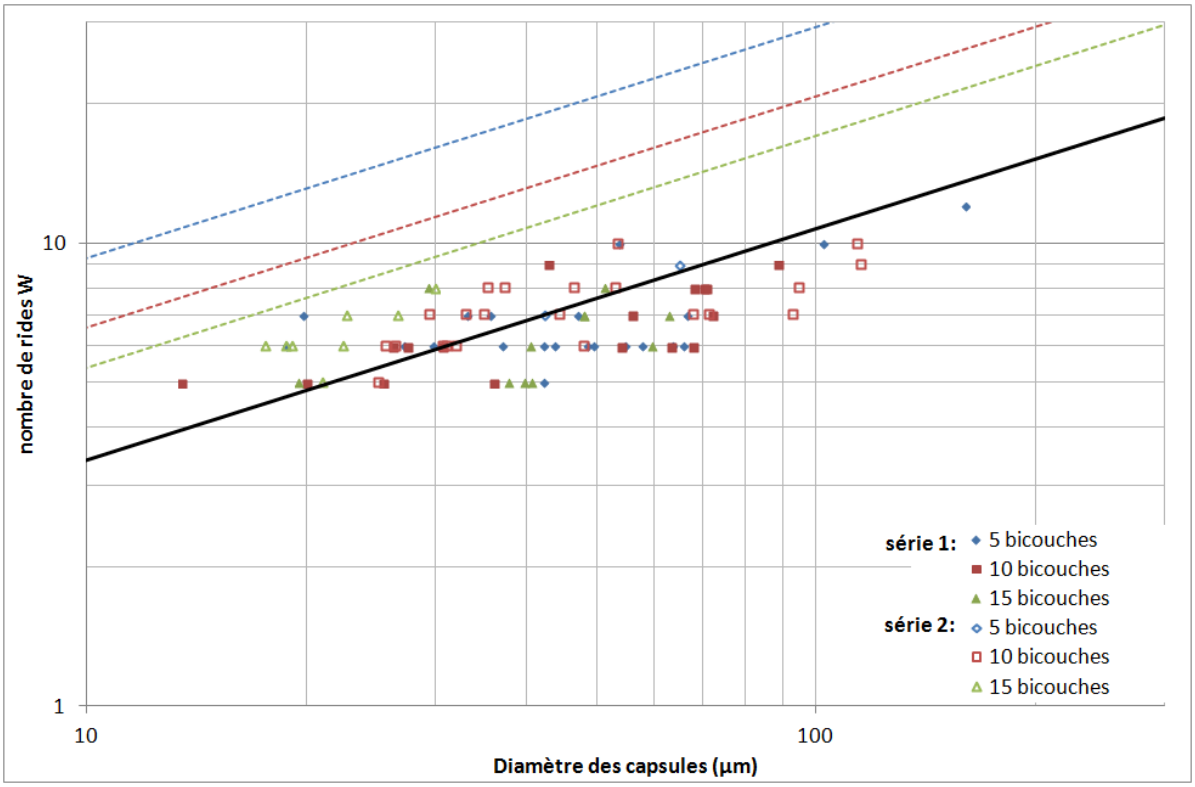


FIGURE 5.22 – Nombre de rides W en fonction du diamètre D de la capsules pour des parois de 5,10 et 15 bicouches. Dans chaque cas deux lots de capsules (1) et (2) sont observés. Ligne continue : W = 1,0765 $\sqrt{D}$. Les lignes en pointillés représentent la loi comportementale W = 0,94 $\sqrt{R/h}$ attendue pour des TSIM d'une épaisseur de 50 nm [bleue], de 100 nm [rouge] et 150 nm [verte], valeur extrapolée pour la paroi des capsules à 5, 10 et 15 bicouches.

Une fois le tri réalisé, il apparaît clairement que la longueur caractéristique de la déformation est indépendante de l'épaisseur de la capsule étudiée. Elle reste cependant dépendante de la taille de la capsule et compatible avec une loi du type W =k $\sqrt{D}$. D'après la figure 5.20, la loi en $\sqrt{D}$ qui représente le mieux la tendance exhibée par ces résultats expérimentaux est :

$$W \quad = \quad 1,08\sqrt{D}\ (= 1,52\sqrt{R}) \tag{5.10}$$

D'après Quilliet [Quilliet, 2012], pour une coque de matériau isotrope le nombre de ride est donnée par $W_{TSIM} = 0{,}94\sqrt{R/h}$. Par analogie, les capsules multicouches étudiées ici se comportent comme des TSIM d'une épaisseur h_0 = 380 nm. Cette valeur est deux à sept fois plus grande que l'épaisseur de la paroi des capsules. Cette longueur h_0 semble donc liée à la seule grandeur de cet ordre dans le système : la longueur des nanocristaux de cellulose.

IV Discussion et conclusion : composites CNC-XG et modèle de TSIM

Pour les capsules en suspension, les conditions utilisées sur d'autres systèmes pour les dégonfler ne sont pas adaptées. L'utilisation de solvant entraîne la dégradation ou la destruction des

capsules. L'effet destructeur de l'éthanol avait déjà été remarqué dans le chapitre précédent lors des observations en MET. Au-dessus de 5 bicouches déposées, nous n'avons pas réussi à observer une paroi intègre. Dans quelques rares cas, nous observons la formation de dépressions multiples caractéristique d'une coque solide autour des gouttes. Cependant ces conformations ne sont pas assez reproductibles pour être utilisées pour étudier le comportement élastique des capsules multicouches CNC/XG.

Nous avons mis au point un procédé qui a permis de dégonfler des capsules dont la paroi n'est pas gonflée d'eau. Il s'agit d'immobiliser les capsules dans un hydrogel, puis de déshydrater l'ensemble afin de renforcer la tenue mécanique de la paroi. Dans ces conditions, le coeur d'huile est préservé lors de la déshydratation, et le gel sert de support aux capsules qui ne sont alors pas écrasées et dégonflées comme dans le cas d'un simple séchage sur une surface plane (Fig. 5.3). Les capsules sèches peuvent alors être déformées par évaporation du coeur d'huile sous vide.

Par cette technique, nous avons pu dégonfler les capsules et observer des conformations reproductibles. Les capsules dégonflées présentent toutes une dépression unique à indentation polygonale. Ce type de morphologie est similaire à celle de TSIM dégonflées [Zoldesi and Imhof, 2005, Quilliet et al., 2008, Quilliet, 2012, Vliegenthart and Gompper, 2011]. Dans le modèle de TSIM, le nombre de rides formant l'indentation polygonale dépend de son épaisseur et de son rayon. La modélisation de la paroi (d'épaisseur non nulle) par une surface élastique permet de déterminer une longueur caractéristique de la déformation du matériau d $\sim \left(\frac{\kappa}{Y_{2D}}R^2\right)^{1/4}$, avec κ la constante de courbure du matériau et Y_{2D} le module d'Young en 2D. Cette relation est générale et peut décrire les déformations de TSIM, comme de coque constituée d'un matériau non isotrope. Cette longueur caractéristique est la taille typique du pli formé par le retournement de coque. C'est aussi la taille typique des rides d'une dépression à indentation polygonale [Quilliet, 2012]. Dans le cas des TSIM, $\kappa = Y_{3D}h^3/(12(1-\nu^2))$ et $Y_{2D} = Y_{3D}h$ avec h l'épaisseur de la coque, Y_{3D} son module d'Young en 3D et ν son coefficient de Poisson [Landau and Lifshitz, 1986, Quilliet, 2012]. Ainsi, la longueur caractéristique d'une TSIM peut être exprimé en fonction de son épaisseur et de son rayon : d $\sim \sqrt{hR}$. Lorsqu'il y a formation de rides, leur nombre W suit alors une loi $W = 0{,}940(h/R)^{-1/2}$, valide pour les TSIM.

En s'appuyant sur cette relation, et en traçant le nombre de rides en fonction du diamètre des capsules, nous avons observé que, dans le cas de nos objets, la déformation obtenue par dégonflement est indépendante de l'épaisseur de la paroi. Toutefois, le nombre de rides W n'est pas incompatible avec une dépendance avec le rayon des capsules. La diversité des objets ne permettant pas de dégager une tendance claire, nous nous sommes intéressés uniquement aux capsules quasiment entièrement déformées. Nous avons alors obtenu un nombre de rides compatible avec une loi en racine de R (le rayon de la capsule). Par analogie avec les TSIM, nous observons que les capsules, quelle que soit leur épaisseur, se comportent en dégonflement comme des TSIM d'une épaisseur de 380 nm, ce qui est supérieur à l'épaisseur effective de la paroi des capsules (50 nm à 150 nm en supposant que le régime de croissance de la paroi multicouche est linéaire).

Les nanocristaux contenus dans la paroi ont une longueur moyenne de 150 nm, ce qui est supérieur (ou égal) à l'épaisseur des capsules élaborées. Nous supposons donc que les propriétés mécaniques de la paroi sont régies par ce dopant. Cette situation nous paraît intéressante car l'élasticité ne dépend plus de l'épaisseur de la paroi mais des charges qu'elle contient. La situation dans laquelle nous nous retrouvons est schématisée simplement sur la figure 5.23. En l'absence de dopant, nous remarquons que le facteur limitant dans le flambage d'un film mince est son épaisseur. En effet, la courbure maximale pour le film est son épaisseur. Mais, en y ajoutant un dopant, des bâtonnets de longueur L supposés indéformables, intuitivement nous pensons que ces charges vont limiter la déformation et ainsi dominer sur la longueur caractéristique de flambage. L'impact des particules dopantes devrait disparaitre quand le film atteindra une épaisseur supérieure à la taille caractéristique de la particule, dans notre cas la longueur des bâtonnets.

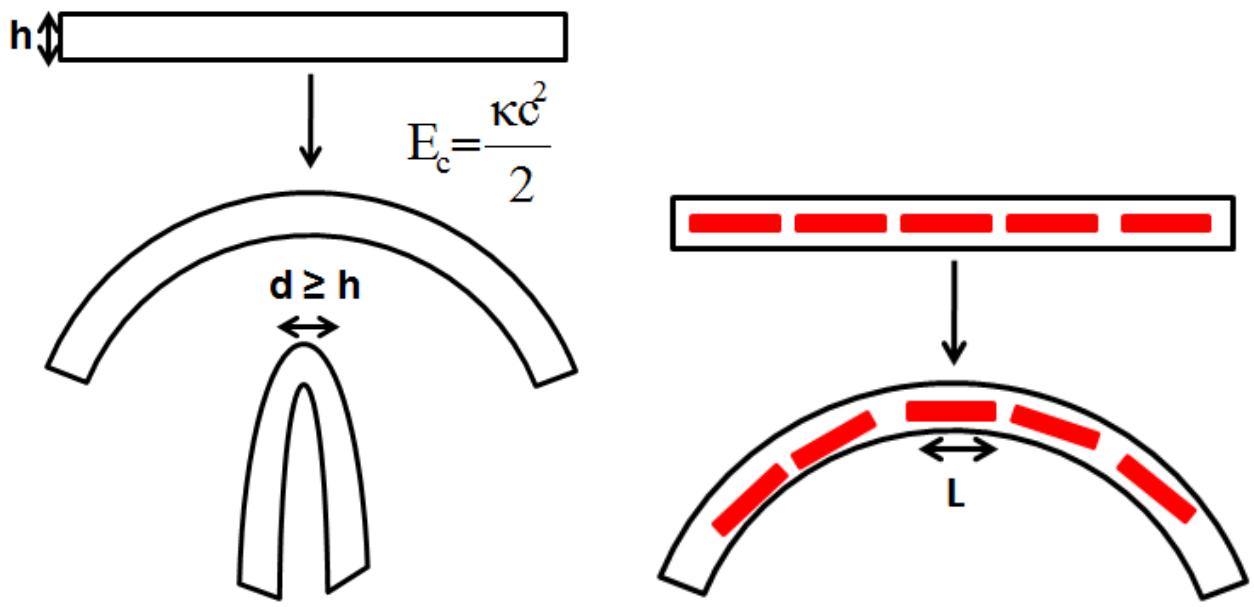


FIGURE 5.23 – Représentation schématique du flambage d'un film mince d'épaisseur h constitué d'un matériau isotrope [à gauche] et dopé par des bâtonnets indéformables de longueur L [à droite]

Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de construire des capsules dont la paroi posséderait une épaisseur supérieure à la longueur caractéristique de 380 nm. Nous pourrons ainsi observer s'il y a transition vers un régime où l'épaisseur de la paroi de la capsule domine sur l'élasticité. De plus, pour observer si les dimensions du dopant ont une influence sur l'élasticité de la paroi, il serait également intéressant d'utiliser des nanocristaux de tailles différentes.

Cette indépendance d'une longueur caractéristique de déformation par rapport à l'épaisseur du matériau à déjà été observée dans la mesure par flambage du module d'Young de film mince d'amidon dopé avec des nanoparticules de silice [Johansson and Wågberg, 2012]. La mesure de module d'Young par des méthode de traction est relativement difficile à mettre en place pour des films minces, et notamment les films multicouches, au vue de la fragilité des échantillons et de l'obtention de film multicouche détacher de leur substrat. Pour cela, une méthode à été mise au point par Stafford et son équipe dans les années 2000 [Stafford et al., 2004, Stafford et al.,

2005]. Elle consiste à déposer le film mince sur un substrat mou. En comprimant cette ensemble, la balance entre la courbure du film sous la contrainte et la déformation que cela entraîne sur le substrat entraîne la formation de rides, dont la longueur d'ondes dépend des propriétés mécaniques du film et du substrat mais également de l'épaisseur du film. En considérant que le film est constitué d'un matériau isotrope, le module d'Young du film peut être mesuré à partir de la longueur d'onde des rides avec la formule suivante :

$$E_f = 3.E_s \frac{1-\nu_f^2}{1-\nu_s^2}\left(\frac{\lambda}{2\pi h_f}\right)^3 \tag{5.11}$$

$$\lambda = 2\pi \sqrt[3]{\frac{1-\nu_s^2}{3E_s}\frac{E_f h_f}{1-\nu_f^2}} \tag{5.12}$$

Dans le cas des nanocristaux de cellulose, il a été observée qu'au dessus d'une épaisseur de 600 nm un film multicouche formé de CNC et de polyéthyleinimine se comporte comme un matériau isotrope [Cranston, 2012]. En effet, comme, nous pouvons l'observer sur la figure 5.24 il y a bien une dépendance linéaire entre la longueur d'onde des rides et l'épaisseur du film. Il serait intéressant de construire des capsules dont la paroi posséderait une épaisseur supérieure à la longueur caractéristique de 380 nm. Nous pourrons ainsi observer s'il y a transition vers un régime où l'épaisseur de la paroi de la capsule domine sur l'élasticité.

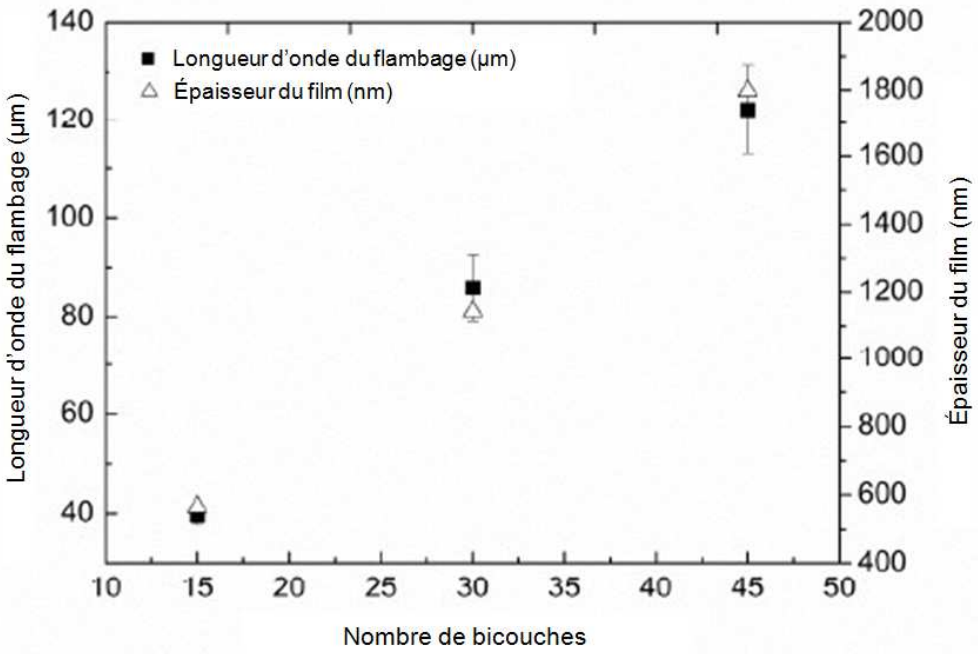


FIGURE 5.24 – Longueur d'onde de flambage après l'application d'une contrainte compressive (carré), et mesure de l'épaisseur de film multicouche de PAH(CNC/PEI) (triangle). D'après [Cranston, 2012].

Des films plus minces dopés ont été réalisé réalisée à partir d'amidon et de nanoparticules de silice. Des mesures de flambage de film mince, réalisés par Johansson et *al.* sont représentés sur la

figure 5.25.

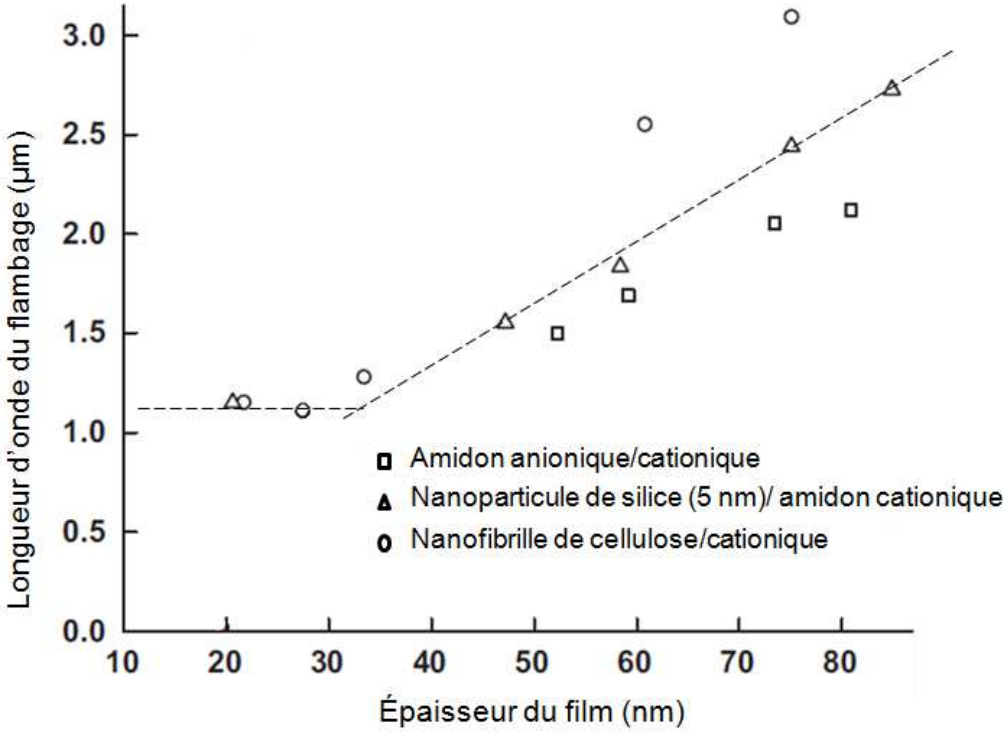


FIGURE 5.25 – Longueur d'onde de flambage de film multicouche d'amidon et du nanoparticules en fonction de l'épaisseur du film. PAH(AS/CS)x(squares), PAH(SNP/CS)x (triangles), and PAH(NFC/CS)x(circles). D'après [Johansson and Wågberg, 2012]

Nous observons que pour des films très fin (>30 nm) la longueur d'onde semble constante et indépendante de l'épaisseur du film. Rappelons que dans ces mesures les nanoparticules de silice ont un diamètre de 5 nm. Au-dessus d'une certaine épaisseur, le matériau retrouve une certaine homogénéité et se comporte comme un matériau isotrope. La technique de mesures mécaniques par flambage elastique induit par compression se base sur une mesure de la constante de courbure du film. Pour obtenir son module, le film est considéré comme un matériau isotrope où $\kappa \approx Y_{3D}h^3$. Ainsi, un film contenant des nanoparticules ne peut être considéré comme homogène tant que son épaisseur n'est pas plus importante que la taille du dopant. En dessous de cette taille, la valeur qui domine la longueur caractéristique de flambage est la dimension de la charge d'où une invariance en fonction de l'épaisseur (Fig. 5.22 & 5.25).

Afin de confirmer nos hypothèse, la méthode de flambage de film mince nous semblent tout à fait appropriée. Plus simple à mettre en oeuvre que les capsules elles nous permettrait d'étudier plus rapidement une large gamme d'épaisseur. De plus, afin de mettre en avant l'effet de la taille des particules sur la longueur caractéristique de déformation, il serait intéressant de réaliser la même expériences avec des nanocristaux de cellulose de taille différentes de ceux issus du coton.

Conclusion générale et Perspectives

Conclusion générale

Lors de cette thèse, nous avons étudié la fabrication de capsules multicouches et leurs propriétés mécaniques. Pour cela nous avons développé une méthode pour créer des émulsions huile dans eau, de taille micrométrique, stabilisées par des nanocristaux de cellulose. Ces objets nous ont servi de substrat à la construction de capsules multicouches composées de nanocristaux de cellulose (CNC) et de xyloglucanes (XG).

La préparation d'émulsions de type huile dans eau stabilisées par des nanocristaux de cellulose a été la première étape à franchir lors de ce projet. Une suspension de CNC stable ne peut être obtenue qu'en présence de charges à la surface des nanoparticules. Or, ceci est un frein à la stabilisation d'émulsion comme l'a montré une étude récente [Kalashnikova et al., 2012]. Nous avons résolu ce problème en couplant les nanocristaux de cellulose à un tensioactif qui améliore les propriétés émulsifiantes des nanoparticules. L'utilisation de ce complexe permet d'obtenir un substrat viable pour la construction de capsules multicouches formées de CNC et de xyloglucanes. De plus, une émulsification au travers d'une grille calibrée, inspirée par l'émulsification par membrane à pré-mélange, nous a permis de contrôler de manière relativement précise la taille moyenne des gouttes d'huile formées. Nous avons ainsi un dispositif permettant de définir la taille du substrat de nos capsules.

L'étude de films composites de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes nous a permis de déterminer un ordre de grandeur du module de l'assemblage CNC/XG qui constituera nos capsules. Les films ont montré une sensibilité à la concentration en charge (les CNC) et à l'humidité relative. Ainsi, dans les conditions où nous avons travaillé (concentration estimée de 75% de cellulose et de 25% de xyloglucanes) nous pouvons proposer une valeur de l'ordre de 4 GPa pour le module de la paroi des capsules. Cette valeur n'est qu'une estimation susceptible d'être réévaluée, mais nous avons montré que les paramètres expérimentaux (composition et degré d'humidité) n'avaient qu'une influence mesurée sur les valeurs de module d'Young.

La mise en place d'une paroi multicouche autour d'émulsions stabilisées par des nanocristaux de cellulose a été mise en évidence par microscopie. L'utilisation de polysaccharides marqués par un fluorophore nous a permis de suivre la croissance de la paroi par microscopie confocale. Dans nos conditions, ces observations ont mis en évidence le dépôt alterné de couches de cellulose et

de xyloglucanes, jusqu'à la formation de 15 bicouches. L'élaboration des capsules a montré le caractère critique du dépôt des premières couches. En effet, nous observons un recouvrement total de la surface des gouttes à partir de 3 bicouches déposées. Il semblerait donc que la formation d'une couche homogène de nanocristaux ne soit pas immédiate sur les gouttes lors de la formation de l'émulsion. Il s'agit d'une hypothèse née de considérations expérimentales sur la stabilité du système au cours de l'élaboration des capsules.

Le type de régime de croissance, linéaire ou exponentiel, n'a pu être mis en évidence lors de notre caractérisation. L'observation de la croissance en microscopie confocale n'a cependant pas montré de divergence notable de l'épaisseur, à la résolution de l'expérience. Si une dépendance linéaire de l'épaisseur en fonction du nombre de couches à pu être mise en évidence pour la formation de film plans [Jean et al., 2009], la sensibilité de notre système au solvant nécessaire à la préparation à l'observation en microscopie a rendu impossible l'observation de capsules possédant plus de 5 bicouches. Dans ce cas, nous avons mesuré une épaisseur de 10 nm par bicouche, ce qui est cohérent avec la valeur obtenue pour des films multicouches de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes [Jean et al., 2009]. Dans nos conditions expérimentales, par simple auto-association, nous avons pu obtenir une capsule formée d'un réseau percolant et isotrope de nanocristaux de cellulose maintenu dans une matrice de xyloglucanes. L'ordre organisationnel de la phase cholestérique n'a pas pu être transposé sur la surface des capsules.

Une étude de la déformation des capsules en suspension est difficile car les objets étudiés sont sensibles au solvant utilisé pour les dégonfler. Nous avons donc trouvé un moyen de déshydrater la paroi des capsules pour la rendre plus cohésive, tout en conservant son intégrité. L'inclusion dans un gel d'acrylamide nous à ainsi permis de mettre en évidence les propriétés élastiques des capsules. Même si les couches de cellulose ne sont pas organisées, la présence de bâtonnets rigides dans la paroi induit une élasticité qui diffère des modèles établit pour le dégonflement de coques minces, constituées d'un matériau isotrope (TSIM). En effet, il semble que ce sont les propriétés mécaniques du réseau de fibres qui régissent la morphologie des capsules dégonflées et non l'épaisseur de la paroi comme cela est le cas pour les TSIM. Nous avons en effet trouvé une longueur caractéristique de déformation de 380 nm indépendante et supérieure à l'épaisseur de la paroi de la capsule.

Perspectives

Même si les couches de nanoparticules ne présentent pas une organisation totalement similaire à la paroi primaire, ces capsules semblent être un bon point de départ pour la fabrication de systèmes plus proches de la structure naturelle. Il faut également se rappeler que ces systèmes présentent intrinsèquement une anisotropie mécanique due à la présence de particules allongées rigides en interaction plongées dans une matrice polymère. De plus, nous avons développé un système qui permet, en déposant quelques couches, d'obtenir des émulsions très stables de taille micrométrique.

Pour l'élasticité des capsules, la longueur caractéristique de déformation est très proche de celle des nanocristaux de cellulose utilisés, et totalement indépendante de l'épaisseur de la capsule. Nous pensons donc que les propriétés élastiques des capsules dépendent des propriétés mécaniques des nanocristaux. Nous sommes actuellement à la recherche d'un modèle physique pouvant expliquer ce comportement. Nous envisageons comme piste, de modéliser notre paroi par un réseau de fibres rigides, ce qui a déjà été décrit dans la littérature pour des matériaux massifs mais pourrait être adapté à la situation de ces capsules. Il a déjà été ainsi observé que pour des films minces, le facteur de forme des nanoparticules joue un rôle déterminant sur le module élastique [Bras et al., 2011a].

Dans un cadre plus général, les capsules élaborées semblent adaptées pour contenir des coeurs d'huile et être utilisées comme vecteur de molécules oléophiles [Grigoriev et al., 2007, Li and Stover, 2010]. Cependant pour être utilisées comme vecteur de produits hydrophiles, il est nécessaire, pour former la capsule, de trouver un autre substrat sacrificiel dont la dissolution n'endommage pas la paroi multicouche. Ceci est un des critères déterminant dans la fabrication de capsules multicouches [Georgieva et al., 2004, Peyratout and Dähne, 2004]. Une autre possibilité expérimentalement accessible est de renforcer cette paroi par réticulation physique ou chimique du réseau formé.

Il reste également à explorer les propriétés potentiellement inédites de ces capsules : un module d'Young très élevé, en raison de la rigidité intrinsèque des constituants de leur paroi et une anisotropie mécanique dont les conséquences restent encore à déterminer. De ce point de vue, la diversité de forme et de caractéristiques offertes par les briques de base naturelles en termes de composition ou de morphologie permet d'envisager une gamme importante de propriétés et de comportement. Pour étudier plus directement le comportement de tels composites le flambage de film mince semble être une technique de choix.

Il est bien sûr toujours possible d'imaginer de pousser le biomimétisme plus loin, par exemple par l'incorporation de ces capsules dans une matrice de pectines (qui sont le ciment naturel des celulles végétales) mimant cette fois-ci un assemblage de plusieurs cellules, et donc un "organe" artificiel. Sans aller plus loin dans la reconstruction in vitro, ceci pourrait être un moyen de mieux comprendre les effets de ce polymère sur la structure et les propriétés mécaniques de la paroi primaire. Il est bien sûr permis d'imaginer de créer des modèles de parois végétales afin de tester divers produits (insecticide, enzyme) et de voir leur pénétration et leur effet potentiel sur des systèmes simples, mais les nombreuses difficultés expérimentales et le réel travail scientifique de fond nécessaire à la fois à la compréhension des propriétés de ces systèmes puis à leur transposition aux systèmes naturels en font un défi très certainement de moyen terme.

Bibliographie

[Anderson et al., 2010] Anderson, C. T., Carroll, A., Akhmetova, L., and Somerville, C. (2010). Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in arabidopsis roots. *Plant Physiology*, 152(2) :787–796.

[Andresen and Stenius, 2007] Andresen, M. and Stenius, P. (2007). Water-in-oil emulsions stabilized by hydrophobized microfibrillated cellulose. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 28(6) :837–844.

[Anglès and Dufresne, 2000] Anglès, M. N. and Dufresne, A. (2000). Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposites. 1. structural analysis. *Macromolecules*, 33(22) :8344–8353.

[Araki and Kuga, 2001] Araki, J. and Kuga, S. (2001). Effect of trace electrolyte on liquid crystal type of cellulose microcrystals.

[Araki et al., 2001] Araki, J., Wada, M., and Kuga, S. (2001). Steric stabilization of a cellulose microcrystal suspension by poly(ethylene glycol) grafting. *Langmuir*, 17(1) :21–27.

[Araki et al., 1998] Araki, J., Wada, M., Kuga, S., and Okano, T. (1998). Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 142(1) :75–82.

[Araki et al., 1999] Araki, J., Wada, M., Kuga, S., and Okano, T. (1999). Influence of surface charge on viscosity behavior of cellulose microcrystal suspension. *Journal of Wood Science*, 45(3) :258–261.

[Arditty et al., 2003] Arditty, S., Whitby, C. P., Binks, B. P., Schmitt, V., and Leal-Calderon, F. (2003). Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions. *The European Physical Journal E : Soft Matter and Biological Physics*, 11(3) :273–281.

[Aulin, 2009] Aulin, C. (2009). *Novel oil resistant cellulosic materials.* PhD thesis, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm.

[Aveyard et al., 2003] Aveyard, R., Binks, B. P., and Clint, J. H. (2003). Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 100-102(0) :503–546.

[Azizi Samir et al., 2005] Azizi Samir, M. A. S., Alloin, F., and Dufresne, A. (2005). Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules*, 6(2) :612–626.

[Baron-Epel et al., 1988] Baron-Epel, O., Gharyal, P. K., and Schindler, M. (1988). Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta*, 175(3) :389–395.

[Bauer et al., 1973] Bauer, W. D., Talmadge, K. W., Keegstra, K., and Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls : Ii. the hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology*, 51(1) :174–187.

[Beck-Candanedo et al., 2005] Beck-Candanedo, S., Roman, M., and Gray, D. G. (2005). Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions. *Biomacromolecules*, 6(2) :1048–1054.

[Bendahou et al., 2009] Bendahou, A., Habibi, Y., Kaddami, H., and Dufresne, A. (2009). Physico-chemical characterization of palm from phoenix dactyliferal, preparation of cellulose whiskers and natural rubberbased nanocomposites. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 3(1) :81–90.

[Binks, 2002] Binks, B. P. (2002). Particles as surfactants-similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1-2) :21–41.

[Binks and Lumsdon, 2000a] Binks, B. P. and Lumsdon, S. O. (2000a). Effects of oil type and aqueous phase composition on oil-water mixtures containing particles of intermediate hydrophobicity. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(13) :2959–2967.

[Binks and Lumsdon, 2000b] Binks, B. P. and Lumsdon, S. O. (2000b). Influence of particle wettability on the type and stability of surfactant-free emulsions. *Langmuir*, 16(23) :8622–8631.

[Binks et al., 2007] Binks, B. P., Rodrigues, J. A., and Frith, W. J. (2007). Synergistic interaction in emulsions stabilized by a mixture of silica nanoparticles and cationic surfactant. *Langmuir*, 23(7) :3626–3636.

[Boudou et al., 2010] Boudou, T., Crouzier, T., Ren, K., Blin, G., and Picart, C. (2010). Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films : New biomedical applications. *Advanced Materials*, 22(4) :441–467.

[Bouligand, 1972] Bouligand, Y. (1972). Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue and Cell*, 4(2) :189–190, 192–217.

[Bras et al., 2011a] Bras, J., Viet, D., Bruzzese, C., and Dufresne, A. (2011a). Correlation between stiffness of sheets prepared from cellulose whiskers and nanoparticles dimensions. *Carbohydrate Polymers*, 84(1) :211–215.

[Bras et al., 2011b] Bras, J., Viet, D., Bruzzese, C., and Dufresne, A. (2011b). Correlation between stiffness of sheets prepared from cellulose whiskers and nanoparticles dimensions. *Carbohydrate Polymers*, 84(1) :211–215.

[Capadona et al., 2009] Capadona, J. R., Shanmuganathan, K., Trittschuh, S., Seidel, S., Rowan, S. J., and Weder, C. (2009). Polymer nanocomposites with nanowhiskers isolated from microcrystalline cellulose. *Biomacromolecules*, 10(4) :712–716.

[Capadona et al., 2008] Capadona, J. R., Shanmuganathan, K., Tyler, D. J., Rowan, S. J., and Weder, C. (2008). Stimuli-responsive polymer nanocomposites inspired by the sea cucumber dermis. *Science*, 319(5868) :1370–1374.

[Carpita and Gibeaut, 1993] Carpita, N. C. and 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. *The Plant Journal*, 3(1) :1–30.

[Caruso et al., 1998] Caruso, F., Caruso, R. A., and Möhwald, H. (1998). Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating. *Science*, 282(5391) :1111–1114.

[Cerclier et al., 2010] Cerclier, C., Cousin, F., Bizot, H., Moreau, C., and Cathala, B. (2010). Elaboration of spin-coated cellulose-xyloglucan multilayered thin films. *Langmuir*, 26(22) :17248–17255.

[Chanliaud et al., 2002] Chanliaud, E., Burrows, K., Jeronimidis, G., and Gidley, M. (2002). Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta*, 215(6) :989–996.

[Chanzy, 1990] Chanzy, H. (1990). *Aspects of cellulose structure, in Cellulose Sources and Exploitation.* Williams Eds.

[Šturcová et al., 2005] Šturcová, A., Davies, G. R., and Eichhorn, S. J. (2005). Elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers. *Biomacromolecules*, 6(2) :1055–1061.

[Chiarelli et al., 2001] Chiarelli, P. A., Johal, M. S., Casson, J. L., Roberts, J. B., Robinson, J. M., and Wang, H. L. (2001). Controlled fabrication of polyelectrolyte multilayer thin films using spin-assembly. *Advanced Materials*, 13(15) :1167–1171.

[Cho et al., 2001] Cho, J., Char, K., Hong, J. D., and Lee, K. B. (2001). Fabrication of highly ordered multilayer films using a spin self-assembly method. *Advanced Materials*, 13(14) :1076–1078.

[Cosgrove, 1997] Cosgrove, D. J. (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1) :171–201.

[Cosgrove, 2005] Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11) :850–861.

[Cranston, 2012] Cranston, E. D. (2012). Mechanical testing of thin film nanocellulose materials. In *1Tappi international conference on Nanotechnology for renewable materials, 2012.*

[Cranston et al., 2011] Cranston, E. D., Eita, M., Johansson, E., Netrval, J., Salajkova, M., Arwin, H., and Wagberg, L. (2011). Determination of young's modulus for nanofibrillated cellulose multilayer thin films using buckling mechanics. *Biomacromolecules*, 12(4) :961–969.

[Cranston and Gray, 2006a] Cranston, E. D. and Gray, D. G. (2006a). Formation of cellulose-based electrostatic layer-by-layer films in a magnetic field. *Science and Technology of Advanced Materials*, 7(4) :319–321.

[Cranston and Gray, 2006b] Cranston, E. D. and Gray, D. G. (2006b). Morphological and optical characterization of polyelectrolyte multilayers incorporating nanocrystalline cellulose. *Biomacromolecules*, 7(9) :2522–2530.

[Cranston and Gray, 2008] Cranston, E. D. and Gray, D. G. (2008). Birefringence in spin-coated films containing cellulose nanocrystals. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 325(1-2) :44–51.

[Cranston et al., 2010] Cranston, E. D., Gray, D. G., and Rutland, M. W. (2010). Direct surface force measurements of polyelectrolyte multilayer films containing nanocrystalline cellulose. *Langmuir*, 26(22) :17190–17197.

[Crowell et al., 2010] Crowell, E. F., Gonneau, M., Vernhettes, S., and Höfte, H. (2010). Regulation of anisotropic cell expansion in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 333(4) :320–324.

[Cui et al., 2011] Cui, D., Jing, J., Boudou, T., Pignot-Paintrand, I., De Koker, S., De Geest, B. G., Picart, C., and Auzély-Velty, R. (2011). Hydrophobic shell loading of biopolyelectrolyte capsules. *Advanced Materials*, 23(24) :200–204.

[Cybulska et al., 2010] Cybulska, J., Vanstreels, E., Ho, Q. T., Courtin, C. M., Craeyveld, V. V., Nicolaï, B., Zdunek, A., and Konstankiewicz, K. (2010). Mechanical characteristics of artificial cell walls. *Journal of Food Engineering*, 96(2) :287–294.

[Davidovitch et al., 2012] Davidovitch, B., Schroll, R. D., and Cerda, E. (2012). Nonperturbative model for wrinkling in highly bendable sheets. *Physical Review E*, 85(6) :066115.

[Davidovitch et al., 2011] Davidovitch, B., Schroll, R. D., Vella, D., Adda-Bedia, M., and Cerda, E. A. (2011). Prototypical model for tensional wrinkling in thin sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45) :18227–18232.

[de Souza et al., 2012] de Souza, C. F., Lucyszyn, N., Woehl, M. A., Riegel-Vidotti, I. C., Borsali, R., and Sierakowski, M. R. (2012). Property evaluations of dry-cast reconstituted bacterial cellulose/tamarind xyloglucan biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, (article in press).

[de Souza Lima and Borsali, 2004] de Souza Lima, M. M. and Borsali, R. (2004). Rodlike cellulose microcrystals : Structure, properties, and applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 25(7) :771–787.

[De Souza Lima et al., 2002] De Souza Lima, M. M., Wong, J. T., Paillet, M., Borsali, R., and Pecora, R. (2002). Translational and rotational dynamics of rodlike cellulose whiskers. *Langmuir*, 19(1) :24–29.

[Decher, 1997] Decher, G. (1997). Fuzzy nanoassemblies : Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 277(5330) :1232–1237.

[Donath et al., 1998] Donath, E., Sukhorukov, G. B., Caruso, F., Davis, S. A., and Möhwald, H. (1998). Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(16) :2201–2205.

[Dong and Roman, 2007] Dong, S. and Roman, M. (2007). Fluorescently labeled cellulose nanocrystals for bioimaging applications. *Journal of the American Chemical Society*, 129(45) :13810–13811.

[Dong et al., 1996] Dong, X. M., Kimura, T., Revol, J.-F., and Gray, D. G. (1996). Effects of ionic strength on the isotropic-chiral nematic phase transition of suspensions of cellulose crystallites. *Langmuir*, 12(8) :2076–2082.

[Dong et al., 1998] Dong, X. M., Revol, J.-F., and Gray, D. G. (1998). Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose. *Cellulose*, 5(1) :19–32.

[Dubief et al., 1999] Dubief, D., Samain, E., and Dufresne, A. (1999). Polysaccharide microcrystals reinforced amorphous poly(-hydroxyoctanoate) nanocomposite materials. *Macromolecules*, 32(18) :5765–5771.

[Eichhorn et al., 2010] Eichhorn, S., Dufresne, A., Aranguren, M., Marcovich, N., Capadona, J., Rowan, S., Weder, C., Thielemans, W., Roman, M., Renneckar, S., Gindl, W., Veigel, S., Keckes, J., Yano, H., Abe, K., Nogi, M., Nakagaito, A., Mangalam, A., Simonsen, J., Benight, A., Bismarck, A., Berglund, L., and Peijs, T. (2010). Review : current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 45(1) :1–33.

[Elazzouzi, 2006] Elazzouzi, S. (2006). *Auto-organisation de whiskers de cellulose en suspension dans l'eau ou dans les solvants organiques apolaires.* PhD thesis, UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER.

[Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008] Elazzouzi-Hafraoui, S., Nishiyama, Y., Putaux, J.-L., Heux, L., Dubreuil, F., and Rochas, C. (2008). The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. *Biomacromolecules*, 9(1) :57–65.

[Emons et al., 2007] Emons, A. M. C., Höfte, H., and Mulder, B. M. (2007). Microtubules and cellulose microfibrils : how intimate is their relationship ? *Trends in Plant Science*, 12(7) :279–281.

[Favier et al., 1995] Favier, V., Chanzy, H., and Cavaille, J. Y. (1995). Polymer nanocomposites reinforced by cellulose whiskers. *Macromolecules*, 28(18) :6365–6367.

[Fery and et al., 2004] Fery, A. and et al. (2004). Mechanics of artificial microcapsules. *New Journal of Physics*, 6(1) :18.

[Franklin and Wang, 2002] Franklin, J. and Wang, Z. Y. (2002). Refractive index matching : A general method for enhancing the optical clarity of a hydrogel matrix. *Chemistry of Materials*, 14(11) :4487–4489.

[Gao et al., 2001a] Gao, C., Donath, E., Moya, S., Dudnik, V., and Möhwald, H. (2001a). Elasticity of hollow polyelectrolyte capsules prepared by the layer-by-layer technique. *The European Physical Journal E : Soft Matter and Biological Physics*, 5(1) :21–27.

[Gao et al., 2001b] Gao, C., Leporatti, S., Moya, S., Donath, E., and Möhwald, H. (2001b). Stability and mechanical properties of polyelectrolyte capsules obtained by stepwise assembly of

poly(styrenesulfonate sodium salt) and poly(diallyldimethyl ammonium) chloride onto melamine resin particles. *Langmuir*, 17(11) :3491–3495.

[Garcia de Rodriguez et al., 2006] Garcia de Rodriguez, N. L., Thielemans, W., and Dufresne, A. (2006). Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate nanocomposites. *Cellulose*, 13(3) :261–270.

[Georgieva et al., 2004] Georgieva, R., Moya, S., Donath, E., and Bäumler, H. (2004). Permeability and conductivity of red blood cell templated polyelectrolyte capsules coated with supplementary layers. *Langmuir*, 20(5) :1895–1900.

[Ghannam and Esmail, 1997] Ghannam, M. T. and Esmail, M. N. (1997). Rheological properties of carboxymethyl cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 64(2) :289–301.

[Gidley et al., 1991] Gidley, M. J., Lillford, P. J., Rowlands, D. W., Lang, P., Dentini, M., Crescenzi, V., Edwards, M., Fanutti, C., and Grant Reid, J. S. (1991). Structure and solution properties of tamarind-seed polysaccharide. *Carbohydrate Research*, 214(2) :299–314.

[Goussé et al., 2002] Goussé, C., Chanzy, H., Excoffier, G., Soubeyrand, L., and Fleury, E. (2002). Stable suspensions of partially silylated cellulose whiskers dispersed in organic solvents. *Polymer*, 43(9) :2645–2651.

[Greenspan, 1977] Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Physics*, 81A(1) :89–96.

[Grigoriev et al., 2007] Grigoriev, D. O., Bukreeva, T., Mohwald, H., and Shchukin, D. G. (2007). New method for fabrication of loaded micro- and nanocontainers : Emulsion encapsulation by polyelectrolyte layer-by-layer deposition on the liquid core. *Langmuir*, 24(3) :999–1004.

[Grunert and Winter, 2002] Grunert, M. and Winter, W. (2002). Nanocomposites of cellulose acetate butyrate reinforced with cellulose nanocrystals. *Journal of Polymers and the Environment*, 10(1-2) :27–30.

[Habibi and Dufresne, 2008] Habibi, Y. and Dufresne, A. (2008). Highly filled bionanocomposites from functionalized polysaccharide nanocrystals. *Biomacromolecules*, 9(7) :1974–1980.

[Habibi et al., 2008] Habibi, Y., Goffin, A.-L., Schiltz, N., Duquesne, E., Dubois, P., and Dufresne, A. (2008). Bionanocomposites based on poly(?-caprolactone)-grafted cellulose nanocrystals by ring-opening polymerization. *Journal of Materials Chemistry*, 18(41) :5002–5010.

[Habibi et al., 2010] Habibi, Y., Lucia, L. A., and Rojas, O. J. (2010). Cellulose nanocrystals : Chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical Reviews*, 110(6) :3479–3500.

[Hassan et al., 2009] Hassan, M., Oksman, K., El-Wakeel, N., Fade, S. M., and A., H. E. (2009). In *10_{th} International Conference on Wood & Biofiber Plastic Composites & Cellulose Nanocomposites Symposium, Madison.*

[Hayashi and Maclachlan, 1984] Hayashi, T. and Maclachlan, G. (1984). Pea xyloglucan and cellulose : I. macromolecular organization. *Plant Physiology*, 75(3) :596–604.

[Helbert et al., 1996] Helbert, W., Cavaillé, J. Y., and Dufresne, A. (1996). Thermoplastic nanocomposites filled with wheat straw cellulose whiskers. part i : Processing and mechanical behavior. *Polymer Composites*, 17(4) :604–611.

[Heux et al., 2000] Heux, L., Chauve, G., and Bonini, C. (2000). Nonflocculating and chiral-nematic self-ordering of cellulose microcrystals suspensions in nonpolar solvents. *Langmuir*, 16(21) :8210–8212.

[Holt et al., 2007] Holt, B., Lam, R., Meldrum, F. C., Stoyanov, S. D., and Paunov, V. N. (2007). Anisotropic nano-papier mache microcapsules. *Soft Matter*, 3(2) :188–190.

[Huang et al., 2007] Huang, J., Juszkiewicz, M., de Jeu, W. H., Cerda, E., Emrick, T., Menon, N., and Russell, T. P. (2007). Capillary wrinkling of floating thin polymer films. *Science*, 317(5838) :650–653.

[Jean et al., 2008] Jean, B., Dubreuil, F., Heux, L., and Cousin, F. (2008). Structural details of cellulose nanocrystals/polyelectrolytes multilayers probed by neutron reflectivity and afm. *Langmuir*, 24(7) :3452–3458.

[Jean et al., 2009] Jean, B., Heux, L., Dubreuil, F., Chambat, G., and Cousin, F. (2009). Non-electrostatic building of biomimetic cellulose-xyloglucan multilayers. *Langmuir*, 25(7) :3920–3923.

[Johansson and Wågberg, 2012] Johansson, E. and Wågberg, L. (2012). Tailoring the mechanical properties of starch-containing layer-by-layer films. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 394(0) :14–22.

[Joscelyne and Trägårdh, 2000] Joscelyne, S. M. and Trägårdh, G. (2000). Membrane emulsification - a literature review. *Journal of Membrane Science*, 169(1) :107–117.

[Junior de Menezes et al., 2009] Junior de Menezes, A., Siqueira, G., Curvelo, A. A. S., and Dufresne, A. (2009). Extrusion and characterization of functionalized cellulose whiskers reinforced polyethylene nanocomposites. *Polymer*, 50(19) :4552–4563.

[Kalashnikova et al., 2011] Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B., and Capron, I. (2011). New pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. *Langmuir*, 27(12) :7471–7479.

[Kalashnikova et al., 2012] Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B., and Capron, I. (2012). Modulation of cellulose nanocrystals amphiphilic properties to stabilize oil/water interface. *Biomacromolecules*, 13(1) :267–275.

[Keegstra et al., 1973] Keegstra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W. D., and Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls. *Plant Physiology : III. A Model of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells Based on the Interconnections of the Macromolecular Components*, 51(1) :188–197.

[Kharlampieva et al., 2009] Kharlampieva, E., Kozlovskaya, V., and Sukhishvili, S. A. (2009). Layer-by-layer hydrogen-bonded polymer films : From fundamentals to applications. *Advanced Materials*, 21(30) :3053–3065.

[Kimura et al., 2005] Kimura, F., Kimura, T., Tamura, M., Hirai, A., Ikuno, M., and Horii, F. (2005). Magnetic alignment of the chiral nematic phase of a cellulose microfibril suspension. *Langmuir*, 21(5) :2034–2037.

[King et al., 2012] King, H., Schroll, R. D., Davidovitch, B., and Menon, N. (2012). Elastic sheet on a liquid drop reveals wrinkling and crumpling as distinct symmetry-breaking instabilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25) :9716–9720.

[Kleinfeld and Ferguson, 1994] Kleinfeld, E. R. and Ferguson, G. S. (1994). Stepwise formation of multilayered nanostructural films from macromolecular precursors. *Science*, 265(5170) :370–373.

[Knoche and Kierfeld, 2011] Knoche, S. and Kierfeld, J. (2011). Buckling of spherical capsules. *Physical Review E*, 84(4) :046608.

[Kochumalayil et al., 2010] Kochumalayil, J., Sehaqui, H., Zhou, Q., and Berglund, L. A. (2010). Tamarind seed xyloglucan - a thermostable high-performance biopolymer from non-food feedstock. *Journal of Materials Chemistry*, 20(21) :4321–4327.

[Komura et al., 2005] Komura, S., Tamura, K., and Kato, T. (2005). Buckling of spherical shells adhering onto a rigid substrate. *Eur. Phys. J. E*, 18(3) :343–358.

[Landau and Lifshitz, 1986] Landau, L. d. and Lifshitz, M. (1986). *theory of Elasticity.* Elvesier, Butterworth-Heinemann, Oxford, 3rd edition.

[Lee et al., 2001] Lee, S.-S., Hong, J.-D., Kim, C. H., Kim, K., Koo, J. P., and Lee, K.-B. (2001). Layer-by-layer deposited multilayer assemblies of ionene-type polyelectrolytes based on the spin-coating method. *Macromolecules*, 34(16) :5358–5360.

[Li and Stover, 2010] Li, J. and Stover, H. D. H. (2010). Pickering emulsion templated layer-by-layer assembly for making microcapsules. *Langmuir*, 26(19) :15554–15560.

[Li et al., 2009] Li, Q., Zhou, J., and Zhang, L. (2009). Structure and properties of the nanocomposite films of chitosan reinforced with cellulose whiskers. *Journal of Polymer Science Part B : Polymer Physics*, 47(11) :1069–1077.

[Lopetinsky et al., 2006] Lopetinsky, R. J., Masliyah, J. H., and Xu, Z. (2006). *Solids-stabilized emulsions : a Review, In : Colloidal Particles at Liquid Interfaces.* Ed. Binks BP, Horozov TS. Cambridge University Press.

[Lvov et al., 1995] Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I., and Kunitake, T. (1995). Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. *Journal of the American Chemical Society*, 117(22) :6117–6123.

[Mabille and et al., 2003] Mabille, C. and et al. (2003). Monodisperse fragmentation in emulsions : Mechanisms and kinetics. *EPL (Europhysics Letters)*, 61(5) :708.

[Mabille et al., 1999] Mabille, C., Schmitt, V., Gorria, P., Leal Calderon, F., Faye, V., Deminière, B., and Bibette, J. (1999). Rheological and shearing conditions for the preparation of monodisperse emulsions. *Langmuir*, 16(2) :422–429.

[Malvern, 2012] Malvern, I. (2012). *Zeta Potential : An Introduction in 30 Minutes.* Malvern instruments.

[Mason and Bibette, 1996] Mason, T. G. and Bibette, J. (1996). Emulsification in viscoelastic media. *Physical Review Letters*, 77(16) :3481. Copyright (C) 2011 The American Physical Society Please report any problems to prola@aps.org PRL.

[Mason and Bibette, 1997] Mason, T. G. and Bibette, J. (1997). Shear rupturing of droplets in complex fluids. *Langmuir*, 13(17) :4600–4613.

[McCann et al., 1990] McCann, M. C., Wells, B., and Roberts, K. (1990). Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science*, 96(2) :323–334.

[Miller and Donald, 2003] Miller, A. F. and Donald, A. M. (2003). Imaging of anisotropic cellulose suspensions using environmental scanning electron microscopy. *Biomacromolecules*, 4(3) :510–517.

[Moon et al., 2011] Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., and Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review : structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40(7) :3941–3994.

[Muller et al., 2011] Muller, F., Manet, S., Jean, B., Chambat, G., Boué, F., Heux, L., and Cousin, F. (2011). Sans measurements of semi-flexible xyloglucan polysaccharide chains in water reveal their self-avoiding statistics. *Biomacromolecules*, pages null–null.

[Nan, 1993] Nan, C.-W. (1993). Physics of inhomogeneous inorganic materials. *Progress in Materials Science*, 37(1) :1–116.

[Nielsen et al., 2010] Nielsen, L. J., Eyley, S., Thielemans, W., and Aylott, J. W. (2010). Dual fluorescent labelling of cellulose nanocrystals for ph sensing. *Chemical Communications*, 46(47) :8929–8931.

[Nishiyama et al., 2002] Nishiyama, Y., Langan, P., and Chanzy, H. (2002). Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose i-alpha from synchrotron x-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 124(31) :9074–9082.

[Onsager, 1949] Onsager, L. (1949). The effects of shape on the interaction of colloidal particles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51(4) :627–659.

[P. Binks and O. Lumsdon, 1999] P. Binks, B. and O. Lumsdon, S. (1999). Stability of oil-in-water emulsions stabilised by silica particles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1(12) :3007–3016.

[P. Velikov et al., 1997] P. Velikov, K., D. Velev, O., G. Marinova, K., and N. Constantinides, G. (1997). Effect of the surfactant concentration on the kinetic stability of thin foam and emulsion films. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 93(11) :2069–2075.

[Palczewska-Tulinska and Oracz, 2005] Palczewska-Tulinska, M. and Oracz, P. (2005). Selected physicochemical properties of hexamethylcyclotrisiloxane, octamethylcyclotetrasiloxane, and decamethylcyclopentasiloxane. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 50(5) :1711–1719.

[Paredez et al., 2006] Paredez, A. R., Somerville, C. R., and Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of Cellulose Synthase Demonstrates Functional Association with Microtubules. *Science*, 312(5779) :1491–1495.

[Park et al., 2001] Park, S.-H., Yamaguchi, T., and Nakao, S.-i. (2001). Transport mechanism of deformable droplets in microfiltration of emulsions. *Chemical Engineering Science*, 56(11) :3539–3548.

[Pauly et al., 1999] Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W. S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal*, 20(6) :629–639.

[Peresin et al., 2010] Peresin, M. S., Habibi, Y., Vesterinen, A.-H., Rojas, O. J., Pawlak, J. J., and Seppa ?la ?, J. V. (2010). Effect of moisture on electrospun nanofiber composites of poly(vinyl alcohol) and cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules*, 11(9) :2471–2477.

[Peyratout and Dähne, 2004] Peyratout, C. S. and Dähne, L. (2004). Tailor-made polyelectrolyte microcapsules : From multilayers to smart containers. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(29) :3762–3783.

[Picart et al., 2002] Picart, C., Mutterer, J., Richert, L., Luo, Y., Prestwich, G. D., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Lavalle, P. (2002). Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20) :12531–12535.

[Podsiadlo et al., 2005] Podsiadlo, P., Choi, S.-Y., Shim, B., Lee, J., Cuddihy, M., and Kotov, N. A. (2005). Molecularly engineered nanocomposites : Layer-by-layer assembly of cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules*, 6(6) :2914–2918.

[Pranger and Tannenbaum, 2008] Pranger, L. and Tannenbaum, R. (2008). Biobased nanocomposites prepared by in situ polymerization of furfuryl alcohol with cellulose whiskers or montmorillonite clay. *Macromolecules*, 41(22) :8682–8687.

[Quemeneur et al., 2012] Quemeneur, F., Quilliet, C., Faivre, M., Viallat, A., and Pépin-Donat, B. (2012). Gel phase vesicles buckle into specific shapes. *Physical Review Letters*, 108(10) :108303. PRL.

[Quilliet, 2012] Quilliet, C. (2012). Numerical deflation of beach balls with various poisson's ratios : From sphere to bowl's shape. *The European Physical Journal E : Soft Matter and Biological Physics*, 35(6) :1–9.

[Quilliet et al., 2008] Quilliet, C., Zoldesi, C., Riera, C., van Blaaderen, A., and Imhof, A. (2008). Anisotropic colloids through non-trivial buckling. *The European Physical Journal E : Soft Matter and Biological Physics*, 27(1) :13–20.

[Revol, 1982] Revol, J. F. (1982). On the cross-sectional shape of cellulose crystallites in valonia ventricosa. *Carbohydrate Polymers*, 2(2) :123–134.

[Revol et al., 1992] Revol, J. F., Bradford, H., Giasson, J., Marchessault, R. H., and Gray, D. G. (1992). Helicoidal self-ordering of cellulose microfibrils in aqueous suspension. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14(3) :170–172.

[Revol et al., 1994] Revol, J.-F., Godbout, L., Dong, X.-M., Gray, D. G., Chanzy, H., and Maret, G. (1994). Chiral nematic suspensions of cellulose crystallites ; phase separation and magnetic field orientation. *Liquid Crystals*, 16(1) :127–134.

[Richert et al., 2004] Richert, L., Lavalle, P., Payan, E., Shu, X. Z., Prestwich, G. D., Stoltz, J.-F., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Picart, C. (2004). Layer by layer buildup of polysaccharide films : Physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir*, 20(2) :448–458.

[Roman and Bico, 2010] Roman, B. and Bico, J. (2010). Elasto-capillarity : deforming an elastic structure with a liquid droplet. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 22(49) :493101.

[Roman and Winter, 2004] Roman, M. and Winter, W. T. (2004). Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. *Biomacromolecules*, 5(5) :1671–1677.

[Roohani et al., 2008] Roohani, M., Habibi, Y., Belgacem, N. M., Ebrahim, G., Karimi, A. N., and Dufresne, A. (2008). Cellulose whiskers reinforced polyvinyl alcohol copolymers nanocomposites. *European Polymer Journal*, 44(8) :2489–2498.

[Rouse and Lillehei, 2002] Rouse, J. H. and Lillehei, P. T. (2002). Electrostatic assembly of polymer/single walled carbon nanotube multilayer films. *Nano Letters*, 3(1) :59–62.

[Rusli et al., 2010] Rusli, R., Shanmuganathan, K., Rowan, S. J., Weder, C., and Eichhorn, S. J. (2010). Stress-transfer in anisotropic and environmentally adaptive cellulose whisker nanocomposites. *Biomacromolecules*, 11(3) :762–768.

[Sacanna et al., 2011] Sacanna, S., Irvine, W. T. M., Rossi, L., and Pine, D. J. (2011). Lock and key colloids through polymerization-induced buckling of monodisperse silicon oil droplets. *Soft Matter*, 7(5) :1631–1634.

[Sakurada et al., 1962] Sakurada, I., Nukushina, Y., and Ito, T. (1962). Experimental determination of the elastic modulus of crystalline regions in oriented polymers. *Journal of Polymer Science*, 57(165) :651–660.

[Sawalha et al., 2008] Sawalha, H., Fan, Y., Schroën, K., and Boom, R. (2008). Preparation of hollow polylactide microcapsules through premix membrane emulsification-effects of nonsolvent properties. *Journal of Membrane Science*, 325(2) :665–671.

[Siqueira et al., 2010a] Siqueira, G., Abdillahi, H., Bras, J., and Dufresne, A. (2010a). High reinforcing capability cellulose nanocrystals extracted from syngonanthus nitens (capim dourado). *Cellulose*, 17(2) :289–298.

[Siqueira et al., 2008] Siqueira, G., Bras, J., and Dufresne, A. (2008). Cellulose whiskers versus microfibrils : Influence of the nature of the nanoparticle and its surface functionalization on the thermal and mechanical properties of nanocomposites. *Biomacromolecules*, 10(2) :425–432.

[Siqueira et al., 2009] Siqueira, G., Bras, J., and Dufresne, A. (2009). Cellulose whiskers versus microfibrils : Influence of the nature of the nanoparticle and its surface functionalization on the thermal and mechanical properties of nanocomposites. *Biomacromolecules*, 10(2) :425–432.

[Siqueira et al., 2010b] Siqueira, G., Bras, J., and Dufresne, A. (2010b). *Luffa Cylindrica* : A new lignocellulosic source of fiber, microfibrillated cellulose and cellulose nanocrystals. *BioResources*, 7 :727–740.

[Somerville, 2006] Somerville, C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1) :53–78.

[Stafford et al., 2005] Stafford, C. M., Guo, S., Harrison, C., and Chiang, M. Y. M. (2005). Combinatorial and high-throughput measurements of the modulus of thin polymer films. *Review of Scientific Instruments*, 76(6) :062207.

[Stafford et al., 2004] Stafford, C. M., Harrison, C., Beers, K. L., Karim, A., Amis, E. J., Van-Landingham, M. R., Kim, H.-C., Volksen, W., Miller, R. D., and Simonyi, E. E. (2004). A buckling-based metrology for measuring the elastic moduli of polymeric thin films. *Nature Materials*, 3 :545–550.

[Sukhorukov et al., 1998] Sukhorukov, G. B., Donath, E., Lichtenfeld, H., Knippel, E., Knippel, M., Budde, A., and Möhwald, H. (1998). Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 137(1-3) :253–266.

[Surh et al., 2008] Surh, J., Jeong, Y. G., and Vladisavljevic, G. T. (2008). On the preparation of lecithin-stabilized oil-in-water emulsions by multi-stage premix membrane emulsification. *Journal of Food Engineering*, 89(2) :164–170.

[Suzuki et al., 1996] Suzuki, K., Shuto, I., and Hagura, Y. (1996). Characteristics of the membrane emulsification method combined with preliminary emulsification for preparing corn oil-in-water emulsions. *Food Science and Technology International, Tokyo*, 2(1) :43–47.

[Szarpak et al., 2008] Szarpak, A., Pignot-Paintrand, I., Nicolas, C., Picart, C., and Auzély-Velty, R. (2008). Multilayer assembly of hyaluronic acid/poly(allylamine) : Control of the buildup for the production of hollow capsules. *Langmuir*, 24(17) :9767–9774.

[Talmadge et al., 1973] Talmadge, K. W., Keegstra, K., Bauer, W. D., and Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls : I. the macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology*, 51(1) :158–173.

[Tambe and Sharma, 1994] Tambe, D. E. and Sharma, M. M. (1994). The effect of colloidal particles on fluid-fluid interfacial properties and emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, 52(0) :1–63.

[Toole et al., 2001] Toole, G. A., Gunning, P. A., Parker, M. L., Smith, A. C., and Waldron, K. W. (2001). Fracture mechanics of the cell wall of *Chara corallina*. *Planta*, 212(4) :606–611.

[Tsapis et al., 2005] Tsapis, N., Dufresne, E. R., Sinha, S. S., Riera, C. S., Hutchinson, J. W., Mahadevan, L., and Weitz, D. A. (2005). Onset of buckling in drying droplets of colloidal suspensions. *Physical Review Letters*, 94(1) :018302. PRL.

[Varade et al., 2005] Varade, D., Joshi, T., Aswal, V. K., Goyal, P. S., Hassan, P. A., and Bahadur, P. (2005). Effect of salt on the micelles of cetyl pyridinium chloride. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 259(1-3) :95–101.

[Vella et al., 2010] Vella, D., Adda-Bedia, M., and Cerda, E. (2010). Capillary wrinkling of elastic membranes. *Soft Matter*, 6(22) :5778–5782.

[Vladisavljević et al., 2004] Vladisavljević, G. T., Shimizu, M., and Nakashima, T. (2004). Preparation of monodisperse multiple emulsions at high production rates by multi-stage premix membrane emulsification. *Journal of Membrane Science*, 244(1-2) :97–106.

[Vladisavljevic et al., 2006] Vladisavljevic, G. T., Shimizu, M., and Nakashima, T. (2006). Production of multiple emulsions for drug delivery systems by repeated spg membrane homogenization : Influence of mean pore size, interfacial tension and continuous phase viscosity. *Journal of Membrane Science*, 284(1-2) :373–383.

[Vladisavljević and Williams, 2005] Vladisavljević, G. T. and Williams, R. A. (2005). Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 113(1) :1–20.

[Vliegenthart and Gompper, 2011] Vliegenthart, G. A. and Gompper, G. (2011). Compression, crumpling and collapse of spherical shells and capsules. *New Journal of Physics*, 13(4) :045020.

[Whitney et al., 1999] Whitney, S. E., Gothard, M. G., Mitchell, J. T., and Gidley, M. J. (1999). Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant Physiology*, 121(2) :657–664.

[Whitney et al., 1995] Whitney, S. E. C., Brigham, J. E., Darke, A. H., Reid, J. S. G., and Gidley, M. J. (1995). In vitro assembly of cellulose/xyloglucan networks : ultrastructural and molecular aspects. *The Plant Journal*, 8(4) :491–504.

[Wiley, 1954] Wiley, R. M. (1954). Limited coalescence of oil droplets in coarse oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid Science*, 9(5) :427–437.

[Yamanaka et al., 2000] Yamanaka, S., Yuguchi, Y., Urakawa, H., Kajiwara, K., Shirakawa, M., and Yamatoya, K. (2000). Gelation of tamarind seed polysaccharide xyloglucan in the presence of ethanol. *Food Hydrocolloids*, 14(2) :125–128.

[Yoshiharu et al., 1997] Yoshiharu, N., Shigenori, K., Masahisa, W., and Takeshi, O. (1997). Cellulose microcrystal film of high uniaxial orientation. *Macromolecules*, 30(20) :6395–6397.

[Yuguchi et al., 2004] Yuguchi, Y., Kumagai, T., Wu, M., Hirotsu, T., and Hosokawa, J. (2004). Gelation of xyloglucan id water/alcohol systems. *Cellulose*, 11(2) :203–208.

[Zimmermann et al., 1980] Zimmermann, U., Hüsken, D., and Schulze, E. D. (1980). Direct turgor pressure measurements in individual leaf cells of *Tradescantia virginiana*. *Planta*, 149(5) :445–453.

[Zoldesi and Imhof, 2005] Zoldesi, C. I. and Imhof, A. (2005). Synthesis of monodisperse colloidal spheres, capsules, and microballoons by emulsion templating. *Advanced Materials*, 17(7) :924–928.

[Zoldesi et al., 2008] Zoldesi, C. I., Ivanovska, I. L., Quilliet, C., Wuite, G. J. L., and Imhof, A. (2008). Elastic properties of hollow colloidal particles. *Physical Review E*, 78(5) :051401. Copyright (C) 2011 The American Physical Society Please report any problems to prola@aps.org PRE.

[Zoldesi et al., 2007] Zoldesi, C. I., Steegstra, P., and Imhof, A. (2007). Encapsulation of emulsion droplets by organo-silica shells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 308(1) :121–129.

[Zoldesi et al., 2006] Zoldesi, C. I., van Walree, C. A., and Imhof, A. (2006). Deformable hollow hybrid silica/siloxane colloids by emulsion templating. *Langmuir*, 22(9) :4343–4352.

[Zoppe et al., 2012] Zoppe, J. O., Venditti, R. A., and Rojas, O. J. (2012). Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 369(1) :202–209.

Annexe A

Méthodes de caractérisation et d'observation

I Microscopie optique

Le microscope optique utilisé (*Axiophot 2*, **Zeiss**) est couplé à une caméra (*colorview 12* **Olympus**) pour l'acquisition d'images. Les échantillons sont observés soit dans des capillaires scellés à la flamme (**Vitrocom**, 0,2*2*100mm), soit entre lame et lamelle. Les images acquises sont traitées avec le programme *Analysis* ou *ImageJ*.

II La microscopie confocale

L'imagerie confocale à balayage laser (MCBL) est une technique permettant l'observation de sections fines d'un spécimen entier. Pour cela les propriétés fluorescentes de l'échantillon sont utilisées.

Une molécule fluorescente à l'état stable peut absorber l'énergie de photons et atteindre un état excité. Lors du retour à l'état stable une partie de l'énergie est perdue dans la molécule, le reste est réémis sous forme de photon. La figure A.1 illustre le phénomène d'excitation-émission caractéristique de la fluorescence. La gamme de longueur d'onde absorbée par le fluorophore, le plaçant dans un état excité est appelée spectre d'excitation. Les longueurs d'ondes réémises par la molécule constituent son spectre d'émission. Les spectres d'excitation et d'émission sont propres à chaque molécule fluorescente.

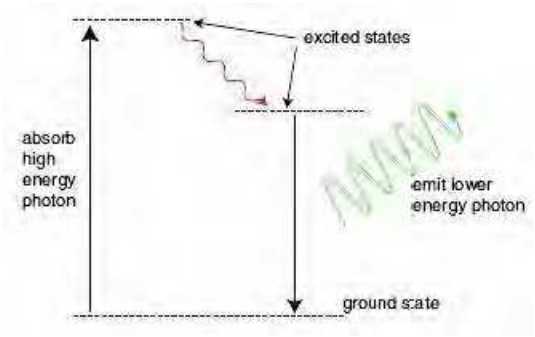


FIGURE A.1 – Représentation schématique du phénomène de fluorescence

En MCBL, un laser (source d'excitation) passe au travers d'un *pinhole* et est focalisé grâce à un objectif sur un petit volume élémentaire dans l'échantillon fluorescent, appelé voxel (1x1x0,2 µm). La fluorescence émise est récupérée grâce à un miroir dichroïque et un second *pinhole*, puis elle est détectée par une photodiode. Pour former une image, le laser balaye l'échantillon sur une section donnée. Le signal de fluorescence est récupéré et mesuré pour chaque voxel. Un schéma descriptif du fonctionnement d'un microscope confocal à balayage laser est présenté sur la figure A.2.

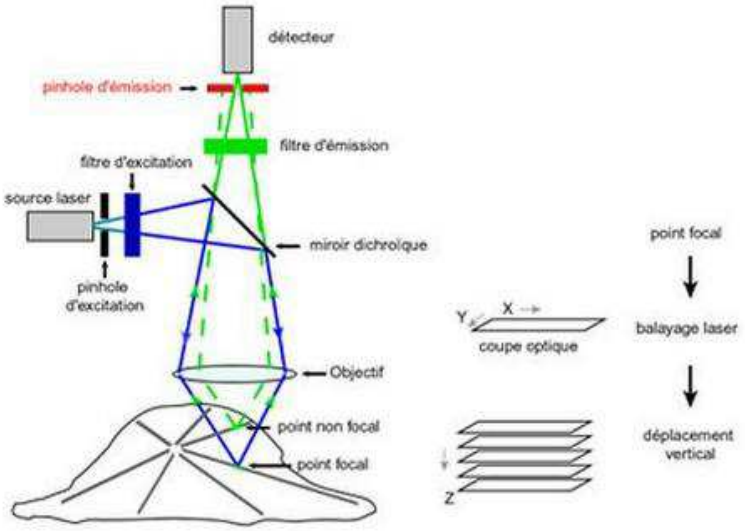


FIGURE A.2 – Schéma représentatif du fonctionnement d'un microscope confocale à balayage laser

Les sources d'excitation les plus utilisées pour la microscopie confocale sont les lasers à argon Ar (457, 488, 514 nm), et les lampes hélium-néon HeNe (543 nm,633nm). Les microscopes utilisés dans cette étude sont le *TCS SP2 AOBS (Acoustico OPtical Beam Splitter)* (**Leica**, LBFA [1] Grenoble) et l'*Axiovert 100M* (**Zeiss**, IAB [2] Grenoble).

1. Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
2. Institut Albert Bonniot

III La microscopie électronique en transmission

III.1 Principe de la microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission (MET) permet d'obtenir de très forts grossissements (x2000 à 100000) avec une haute résolution. Elle offre la possibilité d'observer les structures internes des objets étudiés. L'image est enregistrée en détectant les électrons qui traversent l'échantillon. Grâce à un système de lentilles magnétiques, l'image est focalisée et agrandie sur un écran à fluorescence, des films photographiques ou une caméra. La représentation schématique d'un MET conventionnel est présentée sur la figure A.3.

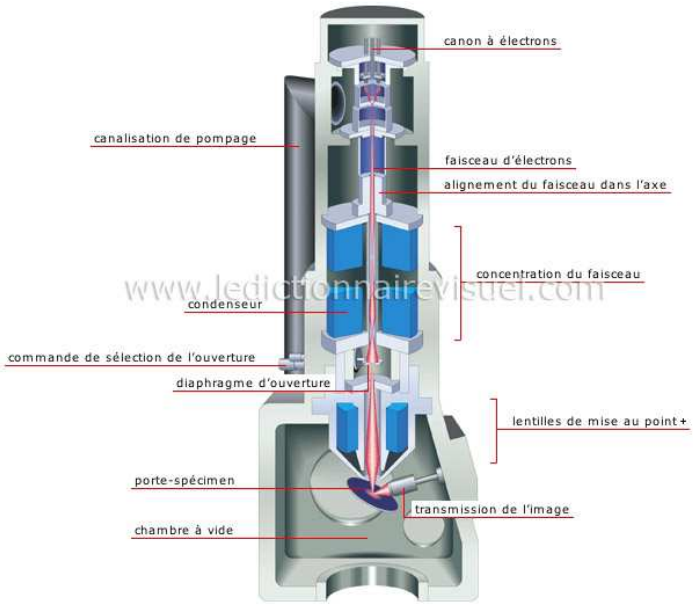


FIGURE A.3 – Schéma représentatif d'un microscope électronique en transmission

Tout en haut, la cathode est chauffée et produit un faisceau d'électrons. Ce faisceau est ensuite focalisé à l'aide d'une lentille condenseur, en un rayon fin, petit et cohérent, qui frappe l'échantillon. Les électrons qui traversent l'échantillon servent à former l'image. Le degré de déflection dépend de la densité électronique de l'objet. Plus la masse est grande, plus la déflection est grande. Généralement, l'échantillon demande un traitement avec un agent de contraste (métaux lourds). Après avoir passés l'échantillon, les électrons diffusés sont collectés grâce à un objectif. L'image est formée par un jeu de lentilles. Sur l'image, les zones les plus foncées correspondent aux parties de l'échantillon que peu d'électrons ont traversés (zone épaisse ou dense). Les zones les plus claires correspondent aux parties de l'échantillon que beaucoup d'électrons ont traversées (zone mince ou peu dense).

Les échantillons étudiés en MET ne doivent pas avoir un épaisseur excédent 200 nm pour que les électrons puissent les traverser. Pour des échantillons excédant cette taille, il est possible de les couper en lamelle fine (< 150 nm). Pour cela nous utilisons un ultramicrotome.

III.2 L'ultramicrotomie

L'ultramicrotomie est une technique qui permet d'obtenir des coupes fines (50 nm et 1 µm) de matériaux massifs. S'il est de taille macroscopique le matériau peut être directement coupé. Pour des objets micrométriques tels que des cellules, des particules colloïdales ou des capsules, ils doivent être inclus dans une résine pour être coupés à l'ultramicrotome. Dans ces conditions, nous parlerons de blocs d'inclusion. Les coupes possédant une épaisseur de 150 nm à 1 µm sont appelées coupes semi-fines, celle inférieure à 150 nm d'épaisseur sont appelées coupes ultra-fines.

Nous avons utilisé un microtome *Leica UC6* équipé d'un couteau diamant d'angle 35° serti dans une pièce métallique réduisant les vibrations du tranchant. Les coupes sont récupérées dans l'eau d'un réservoir fixé sous le couteau. Elle sont ensuite recueillies sur des grilles de cuivre carbonées puis observées par MET. Des coupes semi-fines de 1µm sont préparées avec le même appareil pour des observations en microscopie optique. La figure A.4 présente l'appareil utilisé. La qualité des coupes dépend de :

- La dureté et l'homogénéité du matériau ou du bloc découpé.
- La vitesse de coupe. Elle est en générale de 1 mm/s mais peut varier de 0,1 à 15 mm/s. Il est préférable d'utiliser une vitesse élevée lorsque le matériau est mou et lente lorsque le matériau est dur.
- Le niveau d'eau dans le réservoir. Il doit être ajusté avec précision pour affleurer le tranchant du couteau.

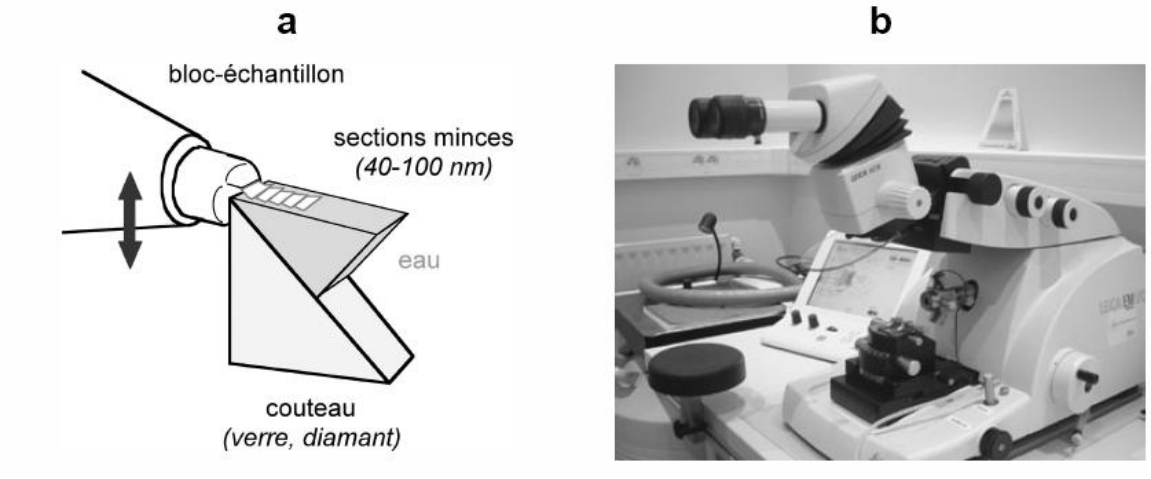


FIGURE A.4 – a : Coupe de sections par ultramicrotomie ; b : Ultramicrotome Leica UC6 du CERMAV

III.3 Inclusion dans de la résine pour l'observation en microscopie électronique en transmission

Les inclusions ont été réalisées dans une résine hydrophobe : la résine LR White (*London Resin Company*). Avant d'être inclus dans la résine, les objets étudiés ont été traités suivant le protocole ci-dessous.

III.3.1 Fixation et post-fixation

La fixation est un procédé qui permet de réticuler les objets entre eux avant inclusion. Cela permet de rigidifier les structures et d'éviter de les endommager lors de la phase d'inclusion. Pour ce faire du glutaraldéhyde est utilisé. Les échantillons sont fixés pendant 1h-1h30 à température ambiante dans du glutaraldéhyde à 2,5 %, dans des tubes eppendorf de 0,5 ml ou 1,5 ml. À l'issue du temps de fixation, les échantillons sont rincés 3 fois, par centrifugation et resuspendus dans de l'eau déionisée. Pour accentuer le contraste, les objets sont plongés dans une solution de tétroxyde d'osmium à 1 %, pendant 1h. Les échantillons sont ensuite rincés.

III.3.2 Déshydratation, Imprégnation et Inclusion

La résine n'étant pas miscible à l'eau, les échantillons sont progressivement déshydratés par des solutions à degré croissant en éthanol. Ils sont plongés successivement dans des bains à 25 %, 50 %, 75 % et 80 %. Chaque bain dure 20 minutes et est répété deux fois.

Pour imprégner les échantillons de résine, l'alcool est progressivement remplacé par celle-ci. Comme pour la déshydratation, les objets sont plongés successivement dans des bains suivant : 20 minutes dans un mélange 1 volume de résine et 2 volumes d'alcool à 80 %, 20 minutes un mélange 1 volume de résine et 1 volume d'alcool à 80 %, 20 minutes un mélange 2 volumes de résine et 1 volume d'alcool à 80 %, 2 fois 30 minutes dans de la résine pure et enfin 1 nuit dans la résine pure à 4 °C.

Pour l'inclusion, la résine est changée et mise à polymériser pendant 4 jours à 60 °C sans accélérateur. Il est très important que les objets à étudier se trouvent au fond de l'eppendorf pour les couper à l'ultramicrotome et les observer en MET.

IV Microscopie électronique à balayage

IV.1 Principe de la microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique utilisée pour la caractérisation de la morphologie de surface. En MEB, l'image est formée par un faisceau d'électrons qui est focalisé sur la surface de l'échantillon. Un schéma d'un MEB est présenté Fig.A.5.

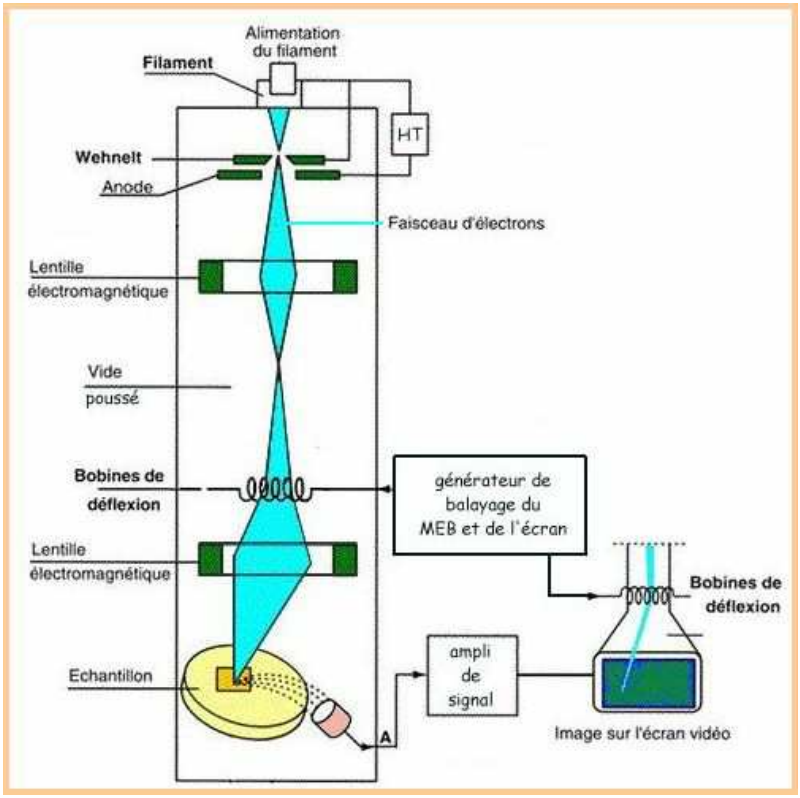


FIGURE A.5 – Schéma représentatif d'un microscope électronique à balayage

Le faisceau suit un trajet vertical dans la colonne du microscope. Les lentilles électromagnétiques focalisent et dirigent ce faisceau sur la surface de l'objet. L'échantillon est bombardé d'électrons sur une petite surface. Arrivé à l'échantillon, les électrons peuvent être rétro-diffusés [3], absorbés et donner naissance à des électrons secondaires de basses énergies et à des rayons X, ou enfin être absorbés et créer de la lumière visible. Tout ces effets peuvent être utilisés pour former une image. L'échantillon est balayé par le faisceau d'électrons. Des détecteurs collectent les électrons secondaires ou les électrons retro-diffusés en chaque point.

La résolution de l'image dépend de la source d'électron utilisée. Les sources de MEB classiques permettent une résolution de l'ordre du micromètre. Les canons à effet de champ apportent une résolution supérieure, équivalente à celle d'un MET, soit de l'ordre de la dizaine de nanomètres.

IV.2 Métallisation pour l'observation en microscopie électronique à balayage .

Pour l'observation, le microscope utilisé est Zeiss ultra 55 FEG-SEM (CMTC-INPG, Grenoble) avec une tension de 2kV. Il possède un canon à effet de champ (MEB-FEG). La surface de l'échantillon doit être conductrice pour permettre l'évacuation des électrons absorbés et ainsi empêcher la charge de la surface. Les métaux étant conducteurs, ils ne demandent pas de traitement

3. Réflection élastique des électrons sans pertes d'énergie

particulier. Les échantillons non-conducteurs, comme les capsules, dont la paroi est composée de polymères, doivent être recouverts d'une couche fine de matériau conducteur.

Une goutte de capsules dans l'eau est déposée sur une pastille de "scotch" carbone collé sur un plot de MEB. Elle est séchée pendant 24h dans une armoire sèche. Enfin, l'échantillon est recouvert d'une couche de 10 nm d'or paladium à l'aide d'un métalliseur .

V Mesure de l'absorbance

V.1 Définition de l'absorbance

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité de la lumière transmise I est donc inférieure à I_0. L'absorbance de la solution est définie comme :

$$A = \log \frac{I_0}{I} \tag{A.1}$$

La mesure d'absorbance permet par exemple de déterminer la concentration inconnue d'un échantillon ou de suivre une réaction chimique.

V.2 La spectrophotométrie

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultra-violette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée. La figure A.6 présente une représentation schématique d'un spectrophotomètre.

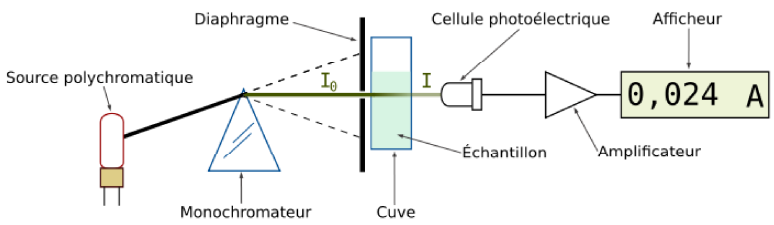


FIGURE A.6 – Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible monofaisceau

Le spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer de manière instantanée une absorbance à une longueur d'onde donnée, ou pour produire un spectre d'absorbance (spectrophotomètre à

balayage). Dans ce dernier cas, le dispositif monochromateur décrit en un temps court l'ensemble des longueurs d'onde comprises entre deux valeurs choisies par l'opérateur.

VI Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique non invasive permettant de mesurer la taille de molécules ou particules allant du nanomètre au micromètre. Des applications typiques de la DLS sont la mesure de la taille moyenne et de la distribution en taille d'émulsions, de molécules dissoutes ou de particules en suspensions (ex : protéines, polymères, micelles, carbohaydrates, nanoparticules, suspensions colloïdales).

Les particules, les émulsions et les molécules sous soumises au mouvement Brownien [4]. En illuminant les particules ou les molécules d'un faisceau laser, l'intensité de la lumière diffusée va varier à une fréquence dépendant de la taille des particules. Plus la particule est petite plus elle est sensible aux chocs avec les molécules du solvant et donc plus sa vitesse sera élevée. L'analyse de ces variations d'intensité donne la vitesse du mouvement brownien et donc la taille des particules via l'équation de Stokes-Einstein.

Le diamètre mesuré en DLS est appelé le diamètre hydrodynamique. Il décrit comment la particule diffuse dans le liquide. Il correspond à une sphère possédant le même coefficient de diffusion que la particule étudiée. Le coefficient de diffusion ne dépend pas seulement de la taille du coeur de la particule mais également des structures présentes à sa surface, de la concentration en particule et du type d'ions présents dans le milieu. Cette taille moyenne trouvée en DLS peut donc être plus grande que celle mesurée en microscopie électronique où la particule est retirée de son milieu initial.

L'appareil de mesure utilisé est *Nanosizer Nano-ZS* (**Malvern Instruments**). La lumière diffusée est récupérée à 90° par rapport à la lumière incidente Fig.A.7. La source de lumière est un laser hélium-néon à lumière monochromatique (633nm) et cohérente, focalisée sur l'échantillon par des lentilles.

La lumière est diffusée par les particules dans toutes les directions. Cependant, un appareil de DLS possèdant un seul détecteur ne peut détecter la lumière diffusée qu'à un angle donné. Historiquement la valeur prise est 90°. Les fluctuations d'intensité sont converties en signaux électriques envoyés dans un corrélateur digital. La fonction d'autocorrélation permet d'obtenir les données appropriées. L'utilisation d'un angle fixe permet la reproductibilité des mesures de tailles moyennes sur des échantillons polydisperses.

4. Mouvement induit par les chocs avec les molécules du solvant qui se déplacent grâce à leur énergie thermique

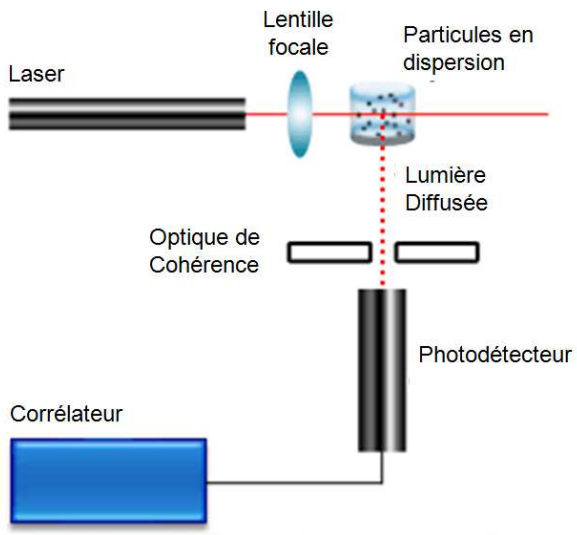


FIGURE A.7 – Représentation schématique d'un appareil de DLS à 90°

VII Potentiel zeta

La couche liquide qui entoure une particule en suspension est composée de deux parties : une région interne (la couche de Stern) où les ions sont très fortement liés à la particule, et une couche externe (diffuse) où ils sont moins liés à celle-ci. Dans la couche diffuse, il existe une limite à l'intérieur de laquelle les ions et la particule forment une entité stable. Quand la particule bouge, sous l'effet de la gravité par exemple, les ions contenus dans cette couche limite se déplacent avec elle, alors que les ions au-delà de cette limite restent dans le solvant. Le potentiel à cette limite correspond au potentiel zeta ζ Fig.A.8.

La valeur du potentiel zeta permet de déterminer la stabilité colloïdale. Une suspension colloïdale est supposée stable pour $|\zeta| > 30$mV. Dans ce cas, les répulsions électrostatiques sont assez fortes pour éviter l'agrégation des colloïdes. Pour des valeurs plus petites, la formation d'agrégats est possible, entraînant la floculation des particules et une potentielle sédimentation des agrégats.

Dans un champ électrique, les particules chargées en suspension dans l'électrolyte sont attirées par l'électrode de charge opposée. Leur vitesse est mesurée par la technique de l'anémométrie Doppler Laser. Le laser est séparé en un rayon incident et en un rayon de référence. le rayon incident traverse la cellule de mesure et la lumière diffusée est détectée. L'intensité de lumière détectée varie à une fréquence dépendant de la vitesse des particules, cette mobilité est convertie en potentiel zeta.

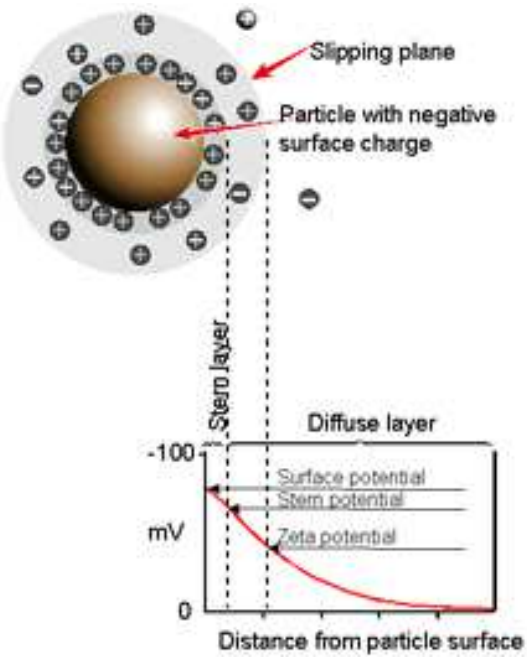


FIGURE A.8 – Représentation schématique du potentiel zeta [Malvern, 2012]

Annexe B

Calculs détaillés

I Calcul du taux de soufre et de la charge de surface de CNC par conductimétrie

I.1 Mesure du taux de soufre des CNC

Dans le cas de nanocristaux de cellulose préparés avec de l'acide sulfurique, une autre donnée importante à connaître est leur taux de soufre τ_s, soit la quantité de groupement sulfates greffée sur les CNCs. Ces groupements sont responsables de la stabilité colloïdale des suspensions de CNC, les répulsions électrostatiques empêchent l'agrégation des nanoparticules.

Ce taux de soufre est mesuré par dosage conductimétrique. Nous avons utilisé un conductimètre de type *CDM 210* et une électrode *CDM 614T*. La titration est réalisée avec du NaOH à 0,01M. La soude est ajoutée graduellement dans une suspension de cellulose de volume et de concentration connus. La conductivité est mesurée régulièrement. La suspension est agité durant toute la durée du dosage.

A l'équivalence :

$$V_{eq}.C_{NaOH} = n_{cellulose}.d_S \tag{B.1}$$

Avec V_{eq} le volume équivalent de soude, C_{soude} la concentration de la solution de soude, $n_{cellulose}$ le nombre de mole de résidu de glucose et d_S le degré de substitution soit le nombre d'atomes de soufre par unité glucose. De plus :

$$n_{cellulose} = \frac{m_{cellulose}}{M_{moy}} \tag{B.2}$$

Avec $m_{cellulose}$ la masse sèche de cellulose dosée et M_{moy} la masse molaire moyenne d'un résidu

de glucose substitué défini par :

$$M_{moy} = 162.(1 - d_S) \ + \ 242.d_S \tag{B.3}$$

Où 162 g.mol^{-1} et 242 g.mol^{-1} sont respectivement les masses molaires d'une unité de glucose pure et d'une unité sulfatée. Les inconnues du système sont le taux de substitution d_S et la masse molaire moyenne M_{moy}. Toutes les autres données sont connues (conditions expérimentales et résultat du dosage).

En utilisant (B.1) et (B.2), l'équation suivant est obtenue :

$$d_S = \frac{V_{eq}.C_{soude}.M_{moy}}{m_{cellulose}} \tag{B.4}$$

En combinant (B.3) et (B.4), la masse molaire moyenne est donnée par la formule suivante :

$$M_{moy} = \frac{162}{1 - 80.\frac{V_{eq}.C_{soude}}{m_{cellulose}}} \tag{B.5}$$

Une fois M_{moy} obtenu, d_S est obtenu par l'équation (B.4). Enfin, le taux de soufre τ_S est donnée par la relation suivante :

$$\tau_S = \frac{32.d_S}{M_{moy}} = \frac{32.V_{eq}.C_{soude}}{m_{cellulose}} \tag{B.6}$$

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

I.2 Calcul de la charge de surface des CNC

La charge de surface des nanocristaux de cellulose peut être calculée à partir du degré de substitution. Les CNC sont considérés comme des parallélépipède de longueur L, de largeur l et de hauteur h. Dans un CNC issu du coton (cellulose I_β), la longueur d'un monomère de cellulose est c = 1,038 nm[Nishiyama et al., 2002] (correspondant à deux molécules de glucose). Les distances entre les chaînes sont b = 0,54 nm dans le sens de largeur du cristal et a = 0,61 nm dans le sens de la hauteur du cristal Fig.B.1.

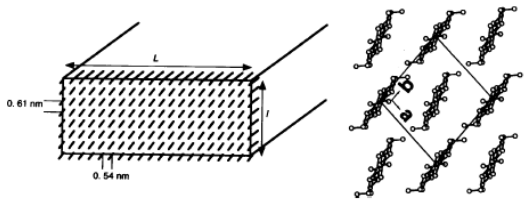


FIGURE B.1 – Représentation schématique de la section d'un nanocristal de cellulose I_β [Goussé et al., 2002]

Le nombre de monomères de glucose dans un nanocristal est donc :

$$N_{glucose} = \frac{Llh}{ab(c/2)} \tag{B.7}$$

La charge de surface du nanocristal de cellulose est donc :

$$\sigma_{CNC} = \frac{N_{glucose} d_S}{2(Ll + Lh + lh)} = \frac{d_S Llh}{abc(Ll + Lh + lh)} \tag{B.8}$$

II Calcul de la viscosité de la phase aqueuse lors de l'émulsification sur grille calibrée

Du carboxyméthyle cellulose (CMC) a donc été utilisé pour augmenter la viscosité du milieu. D'après Ghannam et al [Ghannam and Esmail, 1997], la viscosité du CMC dépend du taux de cisaillement. Il est donc important de connaître le cisaillement que subit notre mélange dans notre enceinte lors de l'émulsification. Le taux de cisaillement est définit par le rapport entre une vitesse et une taille caractéristiques.

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{a} \tag{B.9}$$

avec v la vitesse du liquide lorsqu'il traverse la toile à bluter et a la taille de la maille.

La vitesse v est mesurée à partir du débit Q du liquide et de la surface totale de la membrane S_m en contact avec le liquide.

$$v = \frac{Q}{S_m} \tag{B.10}$$

Lors de l'émulsification, 55 ml de liquide (50 ml de phase continue et 5 ml de phase dispersée) passe à travers la toile à bluter en 5 à 10s, soit Q $\in$ [5,5 ;11] ml/s. Sachant que le rayon de la toile à bluter est de 2 cm, la vitesse v $\in$ [4,4 ;8,8] mm/s. Enfin, en considérant un maille de 21µm le taux de cisaillement appliqué aux liquides est compris entre 200-400 s^{-1}. La phase continue à une concentration à 3% en CMC et en supposant que les 0,1% de CNC et de CPC n'affecte pas la viscosité, d'après [Ghannam and Esmail, 1997] η $\in$ [400-500] mPa.s. Or, l'huile utilisée à une viscosité à température ambiante de 25mPa.s. Ainsi le rapport de viscosité est de l'ordre de 0,055 ce qui est inclus dans le domaine trouver par Bibette pour l'obtention d'une émulsion monodisperse sous cisaillement [Mabille and et al., 2003].

Résumé

Le but de ce travail est d'élaborer des microcapsules biomimétiques possédant des structures semblables à des parois végétales, et d'explorer leur déformation sous contrainte mécanique. Pour ce faire, nous avons profité de la forte interaction des nanocristaux de cellulose (les sous-éléments des microfibrilles) avec le xyloglucane (l'hémicellulose la plus courante) déjà utilisés pour construire des systèmes multicouches plans. Afin de reproduire la géométrie de la cellule, nous avons réussi à construire des microcapsules en combinant des émulsions huile dans eau de dimensions d'environ 30 µm et le dépôt couche par couche de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes conduisant à des microcapsules biomimétiques. La régularité du dépôt de la couche a été suivie par marquage fluorescent sélectif et l'épaisseur de la paroi et l'organisation ont été caractérisées par microscopie électronique. Après séchage et évaporation du coeur huileux, les microcapsules dégonflées présentent des formes diverses comme l'a révélé la reconstruction 3D à partir de coupes de microscopie confocale. Le contrôle de la taille de la capsule et de l'épaisseur permet d'explorer différentes situations en termes de comportement à la déformation. Les propriétés élastiques de la capsules sont indépendantes de l'épaisseur de leur paroi contrairement aux cas des TSIM. La longueur caractéristique de la déformation semble dominée par celle des nanocristaux de cellulose qui constituent la paroi.

Abstract

The goal of this work is to elaborate biomimetic microcapsules with structures similar to the plant primary walls and explore their deformation under mechanical stress. For that purpose, we took advantage of the strong interaction of cellulose nanocrystals (the microfibrils sub-elements) with xyloglucan (the most common hemicellulose) already used to build planar multilayer systems. In order to reproduce the cell geometry, we successfully build multilayered microcapsules from cellulose nanocrystals and xyloglucans, by combining oil in water emulsions with dimensions around 30 µm with layer-by-layer deposit, leading to biomimetic microcapsules. The regularity of the layer deposition has been followed by selective fluorescent tagging and the wall thickness and organization was characterized by electron microscopy. Upon drying and evaporation of the oily core, the deflated microcapsules exhibited various shapes as revealed by 3D reconstruction from confocal microscopy slices. The control of the capsule size and thickness allows exploring various situations in terms of deformation behavior. The elastic properties of the capsules does not depend of their wall thickness, which is the case for TSIM. The characteristic length of deformation appears to be related to the length of the cellulose nanocrystals that constitute the wall.