



HAL
open science

Vésicules lipidiques biomimétiques décorées par un assemblage multicouche nanocristaux de cellulose/xyloglucane : élaboration et caractérisation mécanique

Harisoa Radavidson

► **To cite this version:**

Harisoa Radavidson. Vésicules lipidiques biomimétiques décorées par un assemblage multicouche nanocristaux de cellulose/xyloglucane : élaboration et caractérisation mécanique. Polymères. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV051 . tel-01687288

HAL Id: tel-01687288

<https://theses.hal.science/tel-01687288>

Submitted on 18 Jan 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Sciences des polymères**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Harisoa RADAVIDSON

Thèse dirigée par **Laurent HEUX**

préparée au sein du **Centre de Recherche sur les
Macromolécules Végétales**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Vésicules lipidiques biomimétiques décorées par un assemblage multicouche nanocristaux de cellulose/xyloglucane : élaboration et caractérisation mécanique

Thèse soutenue publiquement le **15 décembre 2016**
devant le jury composé de :

M^{me} Laurence NAVAILLES

Directrice de recherche, Université de Bordeaux, Rapporteur

M^{me} Cécile MONTEUX

Chargée de recherche, Université Pierre et Marie Curie, Rapporteur

M^{me} Elisabeth CHARLAIX

Professeur, Université Grenoble Alpes, Présidente du jury

M. Emmanuel BELAMIE

Directeur d'études EPHE, Université de Montpellier, Examineur

M. Thomas PODGORSKI

Chargé de recherche, Université Grenoble Alpes, Examineur

M. Laurent HEUX

Directeur de recherche, Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse



Remerciements

Cette thèse a été effectuée au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales et je tiens en premier lieu à remercier Redouane Borsali et Anne Imberty, ses directeurs successifs, de m'y avoir accueillie.

J'adresse ensuite mes plus sincères remerciements à Laurent Heux, mon directeur de thèse, qui m'a accordé sa confiance dès mon stage de master alors que je n'avais jamais mis les pieds dans un laboratoire. Merci de m'avoir soutenue pour obtenir la bourse, merci de m'avoir confié des sujets de recherche ambitieux et originaux (avec tous les risques que cela comportait bien sûr !), merci d'avoir su être là dans les moments de doute, merci pour tous les échanges que nous avons eus, scientifiques ou non.

Je remercie tous les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ces travaux de thèse avec rigueur et bienveillance : Elisabeth Charlaix pour avoir endossé le rôle de présidente du jury, Laurence Navailles et Cécile Monteux pour avoir rapporté ce manuscrit, Emmanuel Belamie et Thomas Podgorski pour avoir été examinateurs. Je garderai un très bon souvenir de la discussion que nous avons eue tous ensemble lors de la soutenance, et suis très reconnaissante de l'enthousiasme que vous avez manifesté pour ces recherches.

Merci également aux membres de mon comité de suivi de thèse : Julien Bras, Thomas Podgorski (encore !) et Frédéric Dubreuil. Ca a été un réel plaisir d'échanger avec vous lors de ces deux comités qui m'ont permis de prendre un peu de distance vis à vis des difficultés expérimentales rencontrées pendant ces trois ans !

Comme un doctorant n'est jamais vraiment abandonné à son sort, je tiens à adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé à un moment ou un autre à ces travaux de thèse : Thomas Podgorski (toujours !) pour m'avoir initiée au monde merveilleux des vésicules géantes et aussi à l'enfer de la microfluidique; Hugues Bonnet pour les premiers essais de microscopie fluo (je ne sais d'ailleurs toujours pas après ces trois années s'il vaut mieux dire "à fluorescence", "de fluorescence" ou "en fluorescence"); Sigolène Lecuyer pour m'avoir formée à cet extraordinaire jouet qu'est le microscope confocal (ou le *dream crusher* comme j'aimais l'appeler vu que ce que j'y

voyais ne correspondait pas souvent à ce que je cherchais); Frédéric Dubreuil pour les mesures d'épaisseur en AFM; Christine Lancelon-Pin pour les essais d'inclusion en résine; Jean-Luc Putaux pour la cryo-MET au pied levé; Olivier Lerouxel pour toutes les interactions qu'on a pu avoir sur le plan scientifique ! J'adresse aussi mes remerciements à l'équipe RDP de l'ENS de Lyon : Arezki Boudaoud et Léna Beauzamy, qui m'ont accueillie dans leur labo pour l'indentation AFM. Merci Léna de t'être autant investie dans ces expériences, sans ta tenacité à toute épreuve on ne serait pas arrivés à tirer quoi que ce soit de ces capsules récalcitrantes !

Un doctorant n'est rien non plus sans son équipe, et quelle équipe ! Merci à tous les permanents des Glycomatériaux pour leur aide scientifique et technique, leurs conseils avisés et plus globalement pour la bonne ambiance qui règne dans l'extension (barbecues, repas de Noël, zombie walk dans les couloirs et autres) : Laurent Heux, Bruno Jean, Marie-France Metral, Pierre Sailler, Sonia Molina-Boisseau, Christine Lancelon-Pin, Yoshiharu Nishiyama, Jean-Luc Putaux, Karim Mazeau et *last but not least*, Henri Chanzy.

Merci à toutes les personnes du CERMAV que j'ai pu côtoyer de près ou de loin au cours de ces trois ans, et merci particulièrement à : Isabelle Caldara, Martine Morales, Martine Broué, Sandrine Coindet, Flora Reale pour tout ce travail d'administration et de gestion qui est si important pour le fonctionnement du labo, merci pour votre bonne humeur !

J'ai eu la chance de faire de l'enseignement pendant cette thèse, aussi je tiens à remercier toutes les personnes de Pagora que j'ai pu rencontrer à cette occasion : Isabelle Desloges pour avoir été ma tutrice, Nathalie Marlin et Aurélie Rattaz pour m'avoir transmis le savoir ancestral du blanchiment de la pâte à papier !

Vient alors le moment de rendre hommage à tous les copains, les doctorants, les post-docs, bref tous ces gens qui sont extrêmement importants pour mener une thèse jusqu'à son terme. Pour leur aide, leur soutien moral indéfectible, ou tout simplement leur présence, un énorme merci à : Clélia, Léa, Marlène, Lauric, Robin P., Agustin, Lisa, Julien, Emilie, Dominte, Tamiris, Félix C., Félix P., Yu, Nori, Mitsuru, Pan, Vikas, Eder, Khan, Djamila, Eric, Laurent G., Antoine, Rémi, Laurine, Emeline, Milène, Mélanie, Joao, Arnaud, Mickaël, Anna, Marina... Et parce qu'il n'y a pas que le CERMAV dans la vie, merci aussi à : Carine, Marie, Souad, Charles, Jérôme, Adèle,

Adrien, Valentin, Robin D., et tous ceux croisés au détour d'une soirée, d'une formation, d'une conférence en France et ailleurs, ou d'un apéro sauvage au PPM.

Je tiens à remercier plus particulièrement ceux qui ont eu à travailler avec moi d'un peu plus près : Yoann, Quentin & Corentin, Jérémy, Bastien et surtout Yotam ! Thank you for all this work and good luck for the future :)

Je souhaite terminer ce discours des Oscars en exprimant ma reconnaissance éternelle envers ma famille et en particulier mes parents qui m'ont toujours soutenue dans mes choix de vie, et qui continuent à le faire aujourd'hui. Je dédie ce manuscrit à Narindra & Iranja, qui un jour peut être auront l'envie (et le temps...) de le feuilleter.

Enfin, merci à Félix, pour cette belle histoire qui dure depuis 6 ans, pour tous ces aller-retours en train le weekend, pour tous ces moments partagés *à la ville comme à la scène*, et pour tous ceux encore à venir. Et merci aussi à toute ta famille de m'avoir si bien accueillie.

Liste des abréviations récurrentes

Composés utilisés

CNC	Nanocristaux de cellulose (Cellulose NanoCrystals)
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
GUV	Vésicule géante unilamellaire (Giant Unilamellar Vesicle)
PEI	Polyéthylèneimine
RBITC	Rhodamine B isothiocyanate
XG	Xyloglucane

Techniques de caractérisation

AFM	Microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy)
DIC	Contraste interférentiel différentiel (Differential Interference Contrast)
MCBL	Microscopie confocale à balayage laser
MET	Microscopie électronique en transmission

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Revue bibliographique.....	5
I La paroi primaire des cellules végétales.....	5
<i>I.1 Rôle et composition de la paroi primaire</i>	<i>5</i>
I.1.1 La cellulose.....	6
I.1.2 Les hémicelluloses.....	8
I.1.3 Les pectines	11
I.1.4 Les protéines structurales.....	12
<i>I.2 Architecture supramoléculaire de la paroi primaire</i>	<i>13</i>
I.2.1 Synthèse des constituants.....	13
I.2.2 Organisation de la paroi primaire.....	13
<i>I.3 Propriétés mécaniques de la paroi.....</i>	<i>17</i>
I.3.1 Paramètres physiques à quantifier	17
I.3.2 Caractérisation mécanique de la paroi	19
I.3.3 Module élastique de la paroi primaire : les données quantitatives	25
I.3.4 Mécanismes moléculaires de croissance	27
I.3.5 Anisotropie de l'élongation.....	30
<i>I.4 Systèmes modèles de paroi primaire.....</i>	<i>33</i>
I.4.1 Les nanocristaux de cellulose.....	33
I.4.2 Mélanges et films composites.....	35
I.4.3 Films multicouches.....	37
I.4.4 Capsules biomimétiques	40
II Les vésicules lipidiques : un modèle de membrane biologique.....	44
<i>II.1 Caractéristiques générales des membranes lipidiques.....</i>	<i>45</i>
II.1.1 Les différents types de vésicules lipidiques.....	45
II.1.2 Perméabilité	47
II.1.3 Déformation par choc osmotique.....	48
II.1.4 Propriétés électrostatiques de la membrane.....	51
<i>II.2 Les vésicules composites</i>	<i>52</i>
II.2.1 Modification du milieu interne.....	53
II.2.2 Modification de la membrane.....	54

III Propriétés mécaniques de capsules micrométriques	62
<i>III.1 Capsules multicouches</i>	<i>62</i>
III.1.1 Principe.....	62
III.1.2 Substrats.....	63
III.1.3 Matériaux déposés et interactions.....	63
III.1.4 Propriétés et applications	64
<i>III.2 Propriétés mécaniques des capsules multicouches</i>	<i>65</i>
III.2.1 Déformation par pression osmotique.....	65
III.2.2 Micromanipulation de capsules individuelles	70
Chapitre 2 : Matériels, méthodes et techniques de caractérisation ...	79
I Préparation des briques élémentaires	79
<i>I.1 Les vésicules lipidiques.....</i>	<i>79</i>
I.1.1 Lipides utilisés.....	79
I.1.2 Préparation de vésicules géantes par électroformation.....	80
I.1.3 Dilution des GUV pour observation en microscopie.....	81
I.1.4 Préparation de LUV par extrusion de GUV.....	81
<i>I.2 Nanocristaux de cellulose et xyloglucanes.....</i>	<i>82</i>
I.2.1 Préparation et caractérisation des suspensions de CNC.....	82
I.2.2 Préparation des solutions de xyloglucane.....	85
I.2.3 Marquage fluorescent de la cellulose et du xyloglucane	86
II Elaboration et déformation des capsules multicouches.....	90
<i>II.1 Protocole couche-par-couche</i>	<i>90</i>
II.1.1 Dépôt d'une couche de CNC.....	90
II.1.2 Rinçage et dépôt de la couche de XG	91
II.1.3 Protocole final.....	91
<i>II.2 Déformation des capsules par pression osmotique.....</i>	<i>92</i>
III Techniques de caractérisation	93
<i>III.1 Diffusion dynamique de la lumière</i>	<i>93</i>
<i>III.2 Mesure de potentiel zeta</i>	<i>94</i>
<i>III.3 Techniques de microscopie.....</i>	<i>96</i>
III.3.1 Microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC).....	96
III.3.2 Microscopie en contraste de phase.....	97
III.3.3 Microscopie à fluorescence	98
III.3.4 Microscopie confocale à balayage laser	99
III.3.5 Microscopie électronique en transmission	100
III.3.6 Microscopie à force atomique.....	102

Chapitre 3 : Interactions vésicules lipidiques / nanocristaux de cellulose..	107
I Caractérisation des briques élémentaires.....	107
<i>I.1 Propriétés des vésicules lipidiques</i>	<i>107</i>
I.1.1 Charge de la membrane.....	107
I.1.2 Distribution en taille des GUV.....	109
<i>I.2 Propriétés des nanocristaux de cellulose</i>	<i>110</i>
II Observation des vésicules lipidiques en présence de CNC	112
<i>II.1 Effet du pH.....</i>	<i>112</i>
<i>II.2 Effet de la durée d'incubation.....</i>	<i>117</i>
<i>II.3 Aspect des vésicules recouvertes de CNC.....</i>	<i>118</i>
<i>II.4 Effet de la concentration en CNC.....</i>	<i>120</i>
III Conclusion.....	122
Chapitre 4 : Elaboration et caractérisation des capsules multicouches	123
I Elaboration des capsules.....	123
<i>I.1 Objectif.....</i>	<i>123</i>
<i>I.2 Mise au point du protocole expérimental</i>	<i>125</i>
I.2.1 Rinçage de la première couche de CNC	125
I.2.2 Dépôt de la première couche de XG.....	127
I.2.3 Généralisation du protocole couche-par-couche.....	130
II Suivi des dépôts par microscopie confocale	132
<i>II.1 Croissance de la paroi</i>	<i>132</i>
<i>II.2 Pérennité de la croissance</i>	<i>135</i>
III Caractérisation morphologique des capsules	137
<i>III.1 Evolution de la distribution en taille.....</i>	<i>137</i>
<i>III.2 Reconstruction 3D par microscopie confocale</i>	<i>139</i>
<i>III.3 Analyse des défauts structuraux.....</i>	<i>142</i>
IV Epaisseur de la paroi des capsules	144
<i>IV.1 Estimation à l'état sec par AFM.....</i>	<i>144</i>
<i>IV.2 Estimation à l'état hydraté par microscopie à fluorescence.....</i>	<i>146</i>
V Conclusion	148
Chapitre 5 : Caractérisation mécanique des capsules.....	149
I Etude de la déformation des capsules par dégonflement et gonflement	150
<i>I.1 Dégonflement.....</i>	<i>150</i>
I.1.1 Capsules à faible nombre de bicouches.....	150
I.1.2 Capsules à 5 et 10 bicouches	157

<i>I.2 Gonflement</i>	158
I.2.1 Capsules à faible nombre de bicouches.....	158
I.2.2 Capsules à 5 et 10 bicouches	164
II Nano-indentation par AFM	165
<i>II.1 Protocole de mesure</i>	165
II.1.1 Cadre théorique.....	165
II.1.2 Conditions expérimentales	166
II.1.3 Traitement des courbes de force	168
<i>II.2 Mesure des propriétés mécaniques des capsules</i>	169
II.2.1 Influence de l'épaisseur de la paroi	169
II.2.2 Influence de la vitesse d'indentation	171
III Conclusion	174
Conclusion et perspectives	175
Annexe	179
Références bibliographiques	187

Introduction générale

L'ingéniosité alliée à l'économie de ressources dont fait preuve la nature dans la conception de matériaux complexes a toujours été une source de fascination et d'inspiration pour les scientifiques. Parmi les nombreuses structures naturelles dont l'architecture et le fonctionnement ne sont pas complètement élucidées à ce jour, la paroi primaire des cellules végétales est un exemple de matériau multi-fonctionnel remarquable : ce tissu est en effet capable de moduler ses propriétés mécaniques à des fins biologiques.

La cellule végétale, unité structurale élémentaire des organismes végétaux, possède en effet la particularité d'être entourée d'une paroi extracellulaire, ce dont sont dépourvues les cellules animales. A la fois rigide pour protéger la cellule des diverses contraintes mécaniques externes, et à la fois extensible pour permettre l'élongation cellulaire, cette paroi joue un rôle essentiel dans les mécanismes de morphogénèse et de croissance des cellules. Formée d'un assemblage complexe de polysaccharides, son organisation peut être décrite en première approximation comme celle d'un matériau composite, formé d'un réseau de microfibrilles de cellulose liées entre elles par des hémicelluloses, l'ensemble étant maintenu par une matrice de pectines et de protéines. Cette description soulève néanmoins de nombreuses interrogations : comment ces différents polymères interagissent-ils entre eux ? Quel est le rôle de chacun de ces composants dans le comportement macroscopique de la cellule ? Comment sont-ils agencés et comment la paroi agit-elle sur cette architecture pour réguler ses propriétés mécaniques et permettre à la cellule de croître ? Il est encore difficile d'apporter des réponses qui fassent l'unanimité, car la caractérisation structurale et mécanique des parois primaires se heurte inévitablement à la complexité et à la variabilité du vivant.

Si l'approche biomimétique consiste bien souvent à observer la nature pour développer des technologies bio-inspirées au service de l'homme, elle peut aussi être employée pour mettre au point des modèles simplifiés des systèmes naturels, modèles qui de par leur caractère artificiel et donc maîtrisé, peuvent donner accès à des informations pertinentes quant aux relations structure/propriétés d'objets biologiques d'intérêt. Dans ce contexte, l'objectif du présent travail consiste à élaborer un système biomimétique de la paroi végétale dont l'architecture serait contrôlée, pouvant servir de modèle mécanique de cet assemblage naturel. A cette fin, des microcapsules destinées à imiter les parois végétales ont été produites en combinant trois briques élémentaires : les vésicules géantes unilamellaires, les nanocristaux de cellulose et le xyloglucane.

Les vésicules géantes unilamellaires (GUV) résultent de l'auto-assemblage dans l'eau de phospholipides en une structure sphérique fermée, et sont considérées comme des modèles

minimalistes de membrane cellulaire [Menger, 1998]: ces membranes lipidiques artificielles ont en effet permis de reproduire et ainsi d'étudier de nombreux processus cytologiques (endocytose, exocytose, fusion cellulaire, transport...). Avec un diamètre compris entre 5 et 50 μm compatible avec la taille des cellules végétales, les dimensions des GUV en font de parfaites candidates comme support de construction d'une paroi biomimétique.

Issus de l'hydrolyse acide de microfibrilles de cellulose [Ranby, 1949], les nanocristaux de cellulose (CNC) constituent notre deuxième brique élémentaire dans la construction d'une paroi artificielle. Ces nanoparticules se présentent sous la forme de bâtonnets cristallins, dont les dimensions dépendent de l'origine biologique de la cellulose de départ et des conditions d'hydrolyse : si leur largeur n'excède généralement pas quelques nanomètres, leur longueur s'étend sur une plus large gamme de valeurs, de la dizaine de nanomètres jusqu'à plusieurs microns. Leur surface spécifique élevée de l'ordre de 150-300 m^2/g ainsi que leurs excellentes propriétés mécaniques (module d'Young de l'ordre de 150 GPa, similaire à celui du Kevlar) en font des objets de prédilection dans le domaine des matériaux nanocomposites, en tant que charges renforçantes [Habibi et al., 2010]. Il a également été observé que ces objets colloïdaux étaient capables de s'auto-organiser en cristaux liquides cholésteriques au delà d'une concentration critique [Revol et al., 1992], générant des structures hélicoïdales similaires à l'organisation des microfibrilles de cellulose dans les parois secondaires. Dans notre cas, nous mettrons à profit leur capacité à s'associer avec le xyloglucane (XG), la plus abondante des hémicelluloses qui constituera notre troisième et dernière brique élémentaire. Ce polysaccharide présente en effet une forte affinité pour la cellulose, qui résulte de la combinaison d'interactions de Van der Waals, de liaisons hydrogène et d'effet hydrophobe [Hanus et al., 2006, Hayashi et al., 1987].

La technique couche-par-couche (ou *layer-by-layer*) a été développée dans les années 90 par [Decher et al., 1992] et repose sur l'adsorption séquentielle sur un support solide de composés ayant une affinité l'un pour l'autre. Initialement mise en place pour générer des films stratifiés d'épaisseur et de composition contrôlée, cette méthode a rapidement été transposée à des substrats sphériques pour aboutir au développement de capsules multicouches. Les composants habituellement utilisés pour former ces couches successives sont des polyélectrolytes synthétiques s'assemblant par des interactions électrostatiques, mais l'emploi de composés biosourcés tendant à se développer, des systèmes multicouches incluant des biopolymères ont aussi fait leur apparition, dont des films combinant nanocristaux de cellulose et xyloglucane [Cerclier et al., 2010, Jean et al., 2009]. Une première thèse au sein de l'équipe a été consacrée à la construction de capsules multicouches CNC/XG à la surface de gouttes d'huile [Bailly, 2012]. Ce système s'est finalement révélé difficile à caractériser en termes de propriétés mécaniques, notamment en raison du coeur d'huile servant de substrat de départ. C'est pourquoi pour le présent travail, les vésicules géantes ont été choisies pour remplacer les

émulsions d'huile dans l'eau comme support de construction de la paroi multicouche, ce qui nous a permis d'explorer leur comportement en déformation sous pression osmotique et de mesurer leur rigidité par nano-indentation en microscopie à force atomique. Ce manuscrit entend ainsi décrire les différentes étapes qui ont été suivies pour élaborer et caractériser ce nouveau système, et a été pour cela divisé en cinq chapitres.

Le premier chapitre consistera en une revue bibliographique, qui après quelques généralités sur la paroi primaire des cellules végétales, proposera un état de l'art des connaissances relatives à leur structure et à leurs propriétés mécaniques. Les systèmes modèles de la paroi primaire déjà existants seront également passés en revue. Les caractéristiques générales des différentes briques élémentaires que sont les nanocristaux de cellulose et le xyloglucane seront présentées. Nous nous attarderons ensuite sur les propriétés des vésicules lipidiques ainsi que leur modification par adsorption de composants, qui constituent une thématique nouvelle au sein de l'équipe. S'ensuivront quelques rappels concernant la mise en oeuvre de la méthode couche-par-couche pour produire des capsules, qui aboutiront à la présentation des différentes techniques permettant de caractériser les propriétés mécaniques de ces sphères micrométriques.

Le deuxième chapitre détaillera l'ensemble des protocoles expérimentaux et des techniques de caractérisation employés au cours de ces travaux.

Le troisième chapitre abordera l'interaction des vésicules lipidiques avec les nanocristaux de cellulose, qui constitue notre première et indispensable étape dans la construction de capsules multicouches. Après une rapide caractérisation de ces deux protagonistes, leur comportement sera observé une fois mélangés en microscopie à fluorescence et confocale, ainsi qu'en microscopie électronique, mettant en évidence l'existence d'une interaction.

Le quatrième chapitre présentera la démarche suivie pour élaborer les capsules multicouches, puis leur caractérisation par différentes techniques de microscopie. Les diverses difficultés expérimentales rencontrées lors de la production des capsules seront également discutées.

Enfin, le cinquième chapitre sera consacré à l'étude des propriétés mécaniques des capsules multicouches produites, qui combine deux approches complémentaires : la déformation sous pression osmotique, qui permet d'observer les morphologies de dégonflement des capsules mais aussi d'évaluer leur caractère extensible par des expériences de gonflement; et la nano-indentation par microscopie à force atomique, qui nous permettra d'accéder à des données plus quantitatives concernant la rigidité des capsules.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

I La paroi primaire des cellules végétales

I.1 Rôle et composition de la paroi primaire

Unité fonctionnelle élémentaire des organismes végétaux, la cellule végétale fait partie de l'ensemble des eucaryotes. Elle est composée du cytoplasme, dans lequel se trouve le noyau ainsi que d'autres organites (appareil de Golgi, mitochondries, ribosomes, réticulum endoplasmique...), le tout étant entouré d'une membrane plasmique (Figure 1.1). La taille des cellules végétales est variable d'une espèce à l'autre, allant de la dizaine à la centaine de micromètres, voire de quelques millimètres dans le cas de certaines algues monocellulaires géantes.

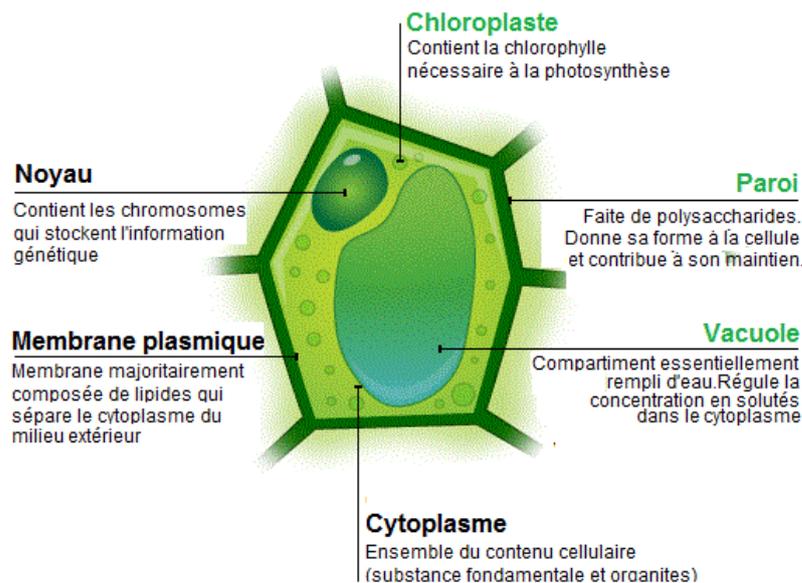


Figure 1.1 : Représentation schématique d'une cellule végétale (en vert : éléments spécifiques de la cellule végétale)

Les cellules végétales se distinguent de leurs homologues animales par la présence de vacuoles (compartiments remplis d'eau), de chloroplastes (organites responsables de la photosynthèse) et d'une enveloppe continue et solide entourant la membrane plasmique : la paroi. Cette dernière comprend trois domaines: la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire.

La lamelle moyenne constitue l'interface entre les cellules adjacentes. Principalement composée de pectines, elle assure l'adhésion intercellulaire et donc la cohésion du tissu. La paroi dite « primaire » est caractéristique des jeunes tissus en croissance : fine, souple et élastique, elle permet l'expansion sans la rupture. Lorsque la cellule arrive à maturation, celle-ci doit alors supporter d'importantes forces de compression et donc fournir une résistance élevée associée à une bonne rigidité : la paroi s'épaissit et se rigidifie par incorporation de lignine, devenant ainsi « secondaire ». La composition et la structure de ces deux types de paroi sont adaptées aux exigences de chaque tissu de la plante, d'où une très grande variété de systèmes pariétaux différents.

La paroi primaire est l'élément structural assurant l'intégrité mécanique de la cellule végétale. Elle contrôle l'expansion de celle-ci sous l'action de la pression de turgescence. La paroi joue donc un rôle crucial dans la forme, la croissance et le développement de la plante. Loin de n'être qu'une enveloppe inerte, cet exosquelette dynamique, à la fois rigide et élastique, constitue aussi une interface d'échange entre la cellule et le milieu qui l'entoure, sa porosité permettant la diffusion d'eau, de nutriments et d'hormones nécessaires au fonctionnement cellulaire. Elle sert également de barrière de défense contre les agents pathogènes bactériens ou fongiques [Robert et al., 1998].

Formée lors de la division cellulaire, la paroi primaire est fine (environ 0,1 μm d'épaisseur, soit un ordre de grandeur 100 fois inférieur à celui du diamètre de la cellule), élastique et majoritairement constituée de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et pectines représentent respectivement environ 30, 30 et 35% de la matière sèche) et de quelques protéines structurales (entre 1 et 5% de la matière sèche)[Cosgrove, 1997]. Des minéraux (1 à 5%) ainsi que des enzymes sont également présents en faible quantité. La paroi est avant tout un édifice fortement hydraté, l'eau pouvant représenter jusqu'à 70% de son volume [Monro et al., 1976].

D'un point de vue structural, la paroi est communément décrite comme un matériau composite, dans lequel les microfibrilles de cellulose forment un réseau de fibres pontées entre elles par les hémicelluloses ; le tout étant imbriqué dans une matrice de pectines assimilable à un hydrogel.

I.1.1 La cellulose

Il s'agit du principal composant de la paroi, qui représente 20 à 30 % de la matière sèche dans la paroi primaire (cette quantité peut varier en fonction du type de plante et de tissu considéré) [O'Neill et al., 2003]. Cet homopolysaccharide consiste en un enchaînement linéaire d'unités cellobiose, elles-mêmes constituées de deux motifs D-anhydroglucopyranoses reliés par des liaisons glycosidiques β -1,4, comme représenté sur la Figure 1.2.

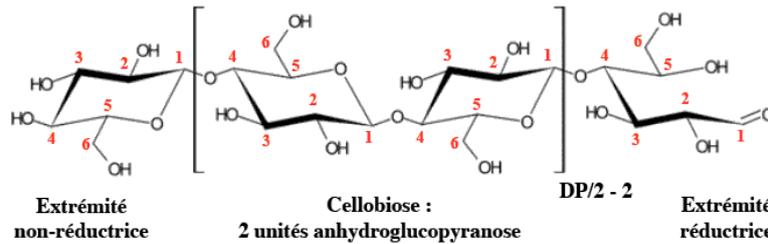


Figure 1.2 : Structure chimique de la cellulose et numérotation des carbones.

Les unités D-anhydroglucopyranoses adoptent une conformation en chaise dans laquelle les trois groupements hydroxyles se trouvent en position équatoriale, dans le plan du cycle, tandis que les atomes d'hydrogène sont en position axiale. Cette structure spatiale favorise la formation d'un réseau de liaisons hydrogènes inter et intramoléculaire très dense, à l'origine de la remarquable résistance de la cellulose aux dégradations physiques, chimiques ou enzymatiques. Ainsi assemblées les unes aux autres, les chaînes forment des arrangements cristallins compacts, les microfibrilles, générant une organisation structurale fibrillaire comme représenté sur la Figure 1.3-A (une microfibrille comprenant environ une trentaine de chaînes de cellulose).

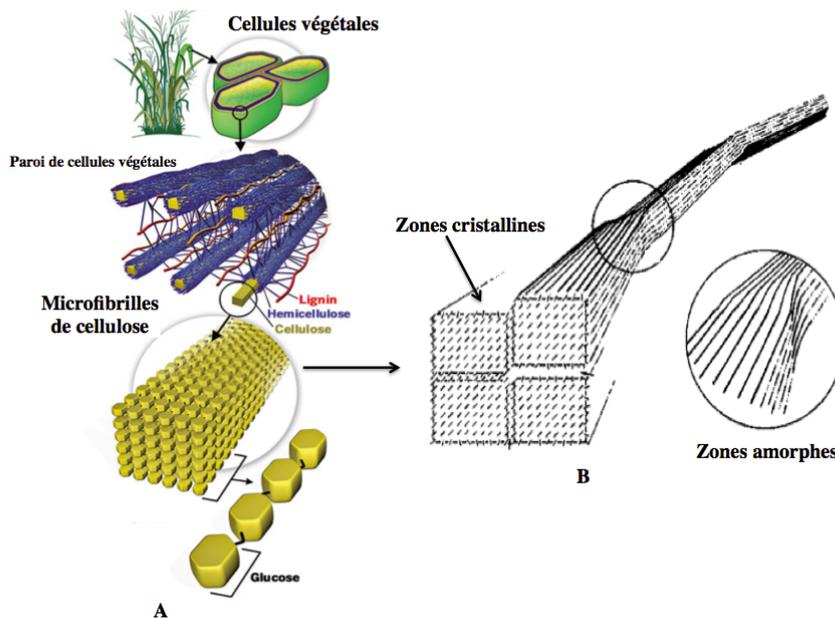


Figure 1.3 : (A) Représentation schématique de la hiérarchie de structure dans une fibre cellulosique au sein d'une paroi végétale (Genome management information system/ORNL). (B) Représentation schématique de l'alternance des zones cristallines et amorphes le long d'une microfibrille, d'après [Rowland et al., 1972]

Les microfibrilles de cellulose possèdent une structure semi-cristalline, caractérisée par une alternance de zones cristallines et de zones amorphes dans lesquelles les chaînes sont moins organisées (Figure 1.3-B). La cellulose native peut se présenter sous deux formes cristallines,

dites de type I : la forme monoclinique I_{β} que l'on trouve dans les parois secondaires et la forme triclinique I_{α} , présente dans les parois primaires [Atalla,1984][Vanderhart & Atalla, 1984][Sugiyama, 1991]. Conséquences directes du processus de biosynthèse, la morphologie et le degré de cristallinité des microfibrilles varient d'une source de cellulose à une autre, comme l'illustre la Figure 1.4 [Chanzy, 1990].

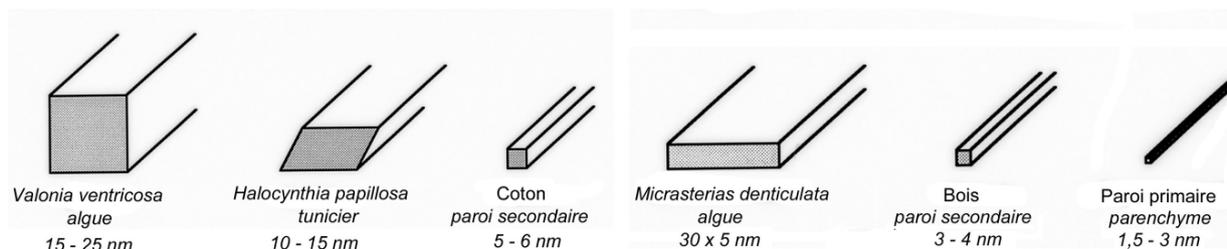


Figure 1.4 : Morphologie et dimensions de microfibrilles provenant de différentes sources de cellulose. D'après [Chanzy, 1990]

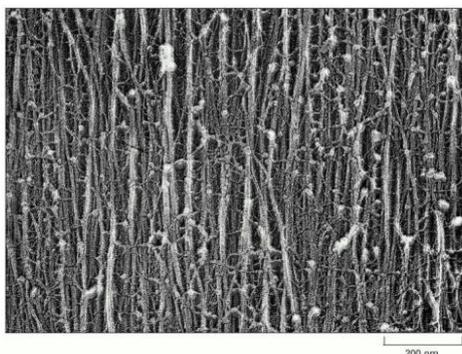


Figure 1.5 : Cliché de microscopie électronique de microfibrilles de cellulose d'une paroi primaire. D'après [Alberts et al., 2002]

La longueur exacte des microfibrilles n'est pas connue, mais des glucanes isolés contenant jusqu'à 14 000 unités glucose ont pu être observés, ce qui correspond à une longueur de 7 μm [Somerville, 2004].

I.1.2 Les hémicelluloses

Le terme générique d'« hémicellulose » a été initialement utilisé pour désigner les polysaccharides alcalinosolubles de la paroi. Cette définition peut être complétée d'un point de vue chimique : comme la cellulose, ces polymères possèdent un squelette qui consiste en l'enchaînement d'un même motif de monosaccharide. Néanmoins, contrairement à la cellulose, cette chaîne principale est ramifiée par d'autres sucres. Les motifs de base sont essentiellement des pentoses (xylose, arabinose), des hexoses (galactose, fucose, rhamnose) et des acides uroniques (acide glucuronique, 4-O-méthyl-D-glucuronique). La variété de ces unités monosaccharidiques et les nombreuses associations possibles entre elles laissent entrevoir la diversité et la complexité de cette classe de polysaccharides [O'Neill et al., 2003].

Ainsi, la famille des hémicelluloses regroupe entre autres les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes et les arabinogalactanes. Au sein de la paroi, la composition en hémicelluloses varie selon les espèces. Tandis que les xylanes prédominent chez les plantes graminées et dans les paroi secondaires des végétaux ligneux, les xyloglucanes sont les hémicelluloses majoritaires des dicotylédones¹ ainsi que des monocotylédones² non-graminées. [O'Neill&York, 2003].

Leur structure chimique, similaire à celle de la cellulose, consiste en un enchaînement linéaire d'unités D-glucopyranose liées en $\beta_{1\rightarrow4}$ (Figure 1.6). Les xyloglucanes se distinguent néanmoins par la présence de ramifications réparties régulièrement le long de leur chaîne. En effet, elles comptent en moyenne trois unités glucose sur quatre substituées en position O6 par des chaînes latérales de D-xylose. Ces dernières peuvent elles-mêmes être substituées en position O2 et former ainsi des chaînes latérales d'oligomères pouvant contenir du galactose, du fucose et/ou de l'arabinose.

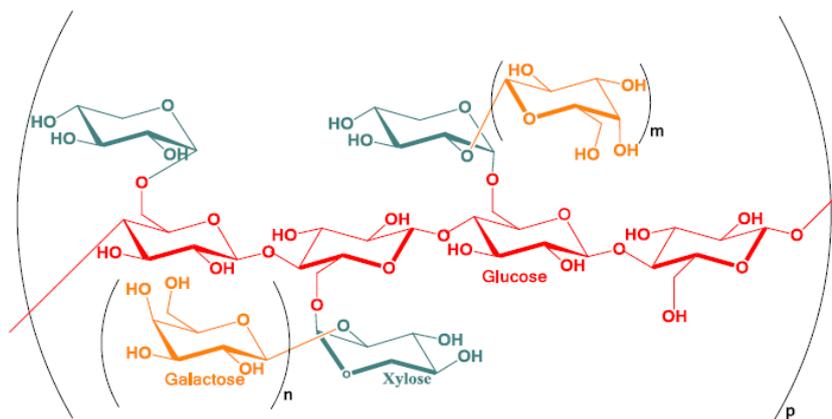


Figure 1.6 : Unité répétitive du xyloglucane issu de graines de tamarin ($m=0$ ou 1 ; $n=0$ ou 1)

Face à la variété des structures possibles pour ces oligosaccharides, une nomenclature internationale a été établie pour identifier chacune d'entre elles : ainsi, une unité glucose non ramifiée sera désignée par la lettre G, tandis qu'une unité glucose substituée par une unité xylose sera symbolisée par la lettre X. Aussi, une unité glucose substituée par une unité xylose comportant elle-même une unité galactose sera notée L. Enfin, la lettre F désigne une unité L dont l'unité galactose est substituée par un fucose [Fry et al., 1993].

La structure et la distribution de ces ramifications varient selon le tissu végétal considéré et l'espèce de laquelle il provient. Dans le cas du xyloglucane issu de graines de tamarin qui sera employé dans la suite de nos travaux, la plupart des sous-unités

¹ Plante dont la graine dispose de deux cotylédons (feuilles primordiales constitutives de la graine)

² Plante dont la graine dispose d'un seul cotylédon

oligosaccharidiques sont de type XLLG (environ 50%), alors que l'on compte respectivement 9, 28 et 13 % de XLXG, XXLG et de XXXG [Muller et al., 2011] (Figure 1.7).

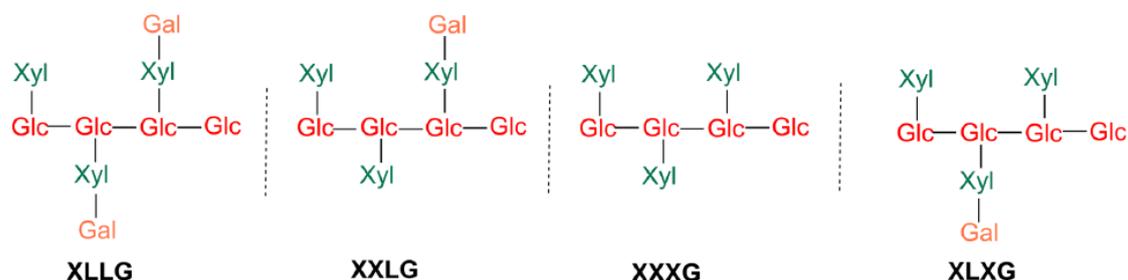


Figure 1.7 : Nomenclature des sous-unités oligosaccharidiques du xyloglucane

Trois domaines distincts d'interactions entre cellulose et xyloglucane ont été identifiés par Pauly et al. (1999) : un premier domaine de XG formant des pontages entre microfibrilles (en bleu sur la figure 1.8), un deuxième domaine très fortement associé à la surface de la cellulose (en rouge sur la figure 1.8) et un troisième domaine de XG à l'intérieur des microfibrilles, probablement piégés lors de la biosynthèse (en vert sur la Figure 1.8) [Hayashi, 1989] .

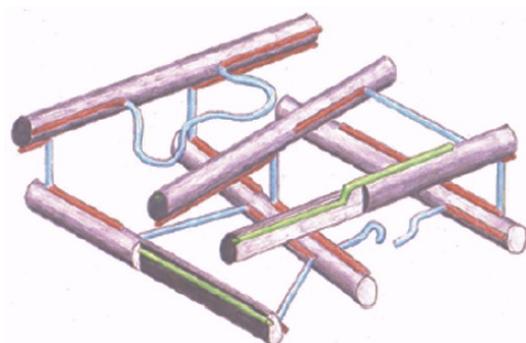


Figure 1.8 : Schéma représentatif des domaines d'interaction cellulose/xyloglucane. D'après [Pauly et al., 1999]

La nature de ces domaines est néanmoins discutée par Park et al. qui ont appliqué différentes enzymes à des parois d'hypocotyles³ de concombre, concluant que seule l'hydrolyse simultanée de la cellulose et du xyloglucane provoquait un relâchement de la paroi. Les XG joueraient un rôle non pas d'espaceurs mais d'adhésifs inter-microfibrilles, enchevêtrés dans les chaînes de cellulose, ce qui diffère nettement de la vision des hémicelluloses comme des attaches « tendues » du modèle classique (Figure 1.9) [Park et al., 2012].

³ Partie de la tige située entre sa base et les premiers cotylédons

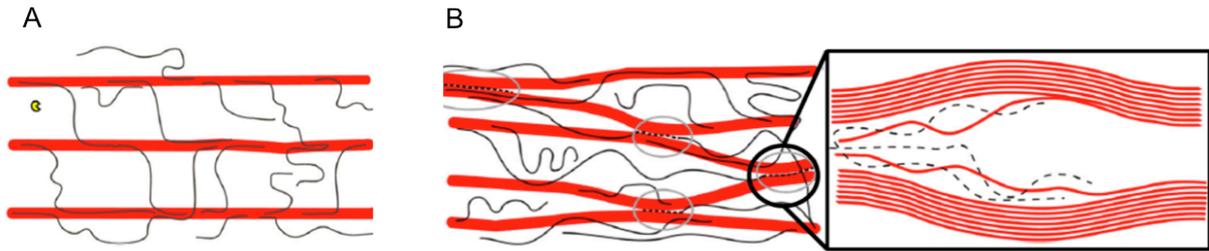


Figure 1.9 : (A) Représentation schématique du modèle dans lequel les xyloglucanes (en noir) liés à la surface de la cellulose espacent les microfibrilles en contact (en rouge). Le cercle jaune représente une enzyme. B) Modèle « révisé » dans lequel les xyloglucanes « porteurs » (en pointillés noirs) agissent comme des liants moléculaires entre microfibrilles, avec en insert un zoom sur les zones de jonction, dans lesquelles les chaînes de xyloglucane s'entrelacent aux glucanes de surface. D'après [Park et al. 2012]

Dans tous les cas, l'interaction cellulose/xyloglucanes résulte d'un mélange complexe de plusieurs contributions : liaisons hydrogène [Hayashi, 1987], forces de Van der Waals, forces électrostatiques, forces de dispersion et effet hydrophobe [Hanus & Mazeau, 2006]. Des expériences d'AFM ont par ailleurs montré que les interactions entre cellulose et xyloglucane sont irréversibles [Stiernstedt et al., 2006]. Nous verrons que cela peut être mis à profit dans la construction de systèmes modèles *in vitro*.

I.1.3 Les pectines

A l'instar des hémicelluloses, les pectines forment un groupe de polysaccharides relativement hétérogène. Leurs chaînes contiennent essentiellement des motifs acide uronique (glucuronique ou galacturonique) -ce qui leur confère une charge négative- entre lesquels viennent s'intercaler des unités rhamnose (typiquement 10% de substitution). Une partie de ces résidus rhamnoses sont substitués par des chaînes latérales neutres (galactanes et arabinanes, ou arabinogalactanes mixtes) et il est ainsi admis que les pectines comportent des zones dites « lisses » non-substituées, et des zones « hérissées ». L'arrangement exact de ces zones est encore débattu. Les pectines se caractérisent d'une part par leur caractère anionique modulable : les fonctions acide carboxylique portées par les monomères d'acide uronique peuvent être méthyl-estérifiées, d'où la possibilité d'ajuster la charge globale du polymère. D'autre part, les pectines sont capables de former des gels, les parties non estérifiées de ses chaînes pouvant être réticulées par des ions calcium [O'Neil & York, 2003].

Au sein des parois végétales, plusieurs types de pectines (représentés sur la Figure 1.10) peuvent être distingués :

- les homogalacturonanes (HG), polymères linéaires d'acide galacturonique.
- les xylogalacturonanes (XGA)
- les rhamnogalacturonanes de type I et II (RGI et RGII)

Si le ratio entre ces différents types de pectines est variable d'une espèce à une autre, les pectines HG et RGI sont très largement majoritaires.

Ces polysaccharides constituent l'essentiel des lamelles moyennes et assurent l'adhésion intercellulaire, garantissant ainsi le maintien des tissus végétaux.

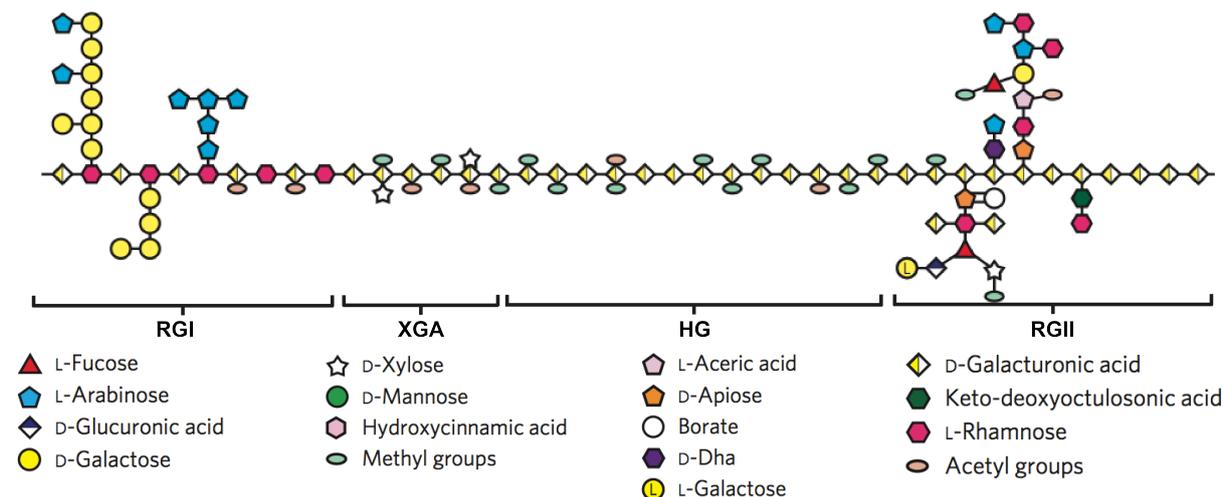


Figure 1.10 : Représentation schématique de la structure chimique des pectines. D'après [Burton et al., 2010]

I.1.4 Les protéines structurales

Réprésentant moins de 10% de la masse sèche de la paroi primaire, la fonction précise des protéines structurales n'est pas totalement connue. Elles interviendraient dans les mécanismes de défense contre les pathogènes et de guérison des blessures, ainsi que dans la régulation de la croissance. Il existe plusieurs classes de glycoprotéines, chacune étant caractérisée par la prédominance d'un type d'acide aminé : les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP), les protéines riches en glycine (GRP) et les protéines riches en tyrosine et en lysine (TLRP) [Showalter, 1993].

La classe des HRGP, la plus étudiée, inclut les protéines d'arabinogalactane (AGP), les protéines riches en proline (PRP) et les extensines. Cette dernière sous-famille de glycoprotéines est la mieux caractérisée de toutes et doit son appellation au rôle supposé qu'elle aurait dans l'ajustement de l'extensibilité de la paroi lors de la croissance. Les extensines sont capables de se réticuler entre elles par liens covalents via les groupements tyrosine [Held et al., 2004], mais elles sont aussi suspectées de se lier aux pectines et de former un réseau secondaire [Johnson et al., 2003]. En effet, à pH physiologique, les extensines présentent une charge positive en raison de la présence de groupements lysine (environ 10% des acides aminés), ce qui leur permettrait d'interagir avec les pectines chargées négativement [Showalter, 1993]. Il a de

plus été mis en évidence que des plantes déficientes en extensines se caractérisaient par un assemblage incomplet de la paroi, suggérant que celles-ci formaient un échafaudage nécessaire à la mise en place de la paroi primaire [Cannon et al., 2008].

I.2 Architecture supramoléculaire de la paroi primaire

I.2.1 Synthèse des constituants

Les microfibrilles de cellulose sont synthétisées par des complexes ordonnés de protéines appelés « rosettes » ou « complexes terminaux » (complexe cellulose-synthase, CESA) situés sur la membrane plasmique [Malcolm Brown Jr et al., 1996] et sont directement assemblées en microfibrilles à la surface de la cellule par un mécanisme d'extrusion (Figure 1.11-A). Les autres polysaccharides de la paroi (hémicelluloses, pectines) sont produits au niveau de l'appareil de Golgi puis amenés au niveau de la paroi par transport vésiculaire, avant d'être exocytés (Figure 1.11-B).

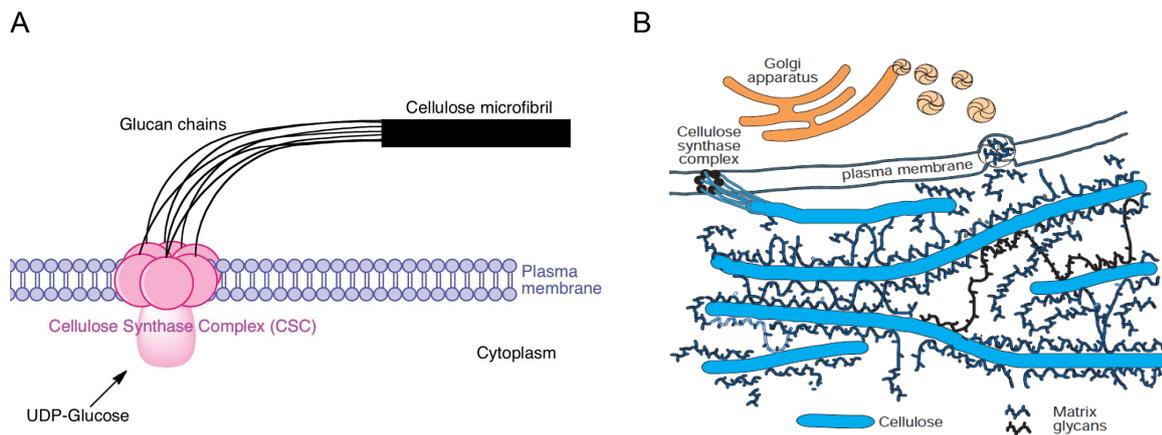


Figure 1.11: (A) Représentation schématique de la biosynthèse des MFC par les complexes de cellulose synthase. D'après [Wightman et al., 2010]. (B) Représentation schématique du mécanisme de synthèse des polysaccharides de la paroi. D'après [Cosgrove, 2000]

I.2.2 Organisation de la paroi primaire

I.2.2.1 Modèle d'Albersheim

L'un des premiers modèles de structure de la paroi a été proposé par Albersheim dès 1973, grâce à des expériences de digestion enzymatique de parois et d'analyse chimique des fragments résultants. Dans ce modèle, les xyloglucanes formeraient une monocouche liée à la surface des microfibrilles de cellulose par des liaisons hydrogène. Les microfibrilles voisines interagiraient entre elles via un réseau de polysaccharides : les xyloglucanes seraient liées de façon covalente aux pectines, et les pectines aux extensines [Keegstra et al., 1973] Cette

première tentative de description fût abandonnée par la suite, faute de preuves convaincantes de l'existence de ces liens covalents.

I.2.2.2 Modèle multi-réseaux

C'est en ayant recours à des extractions séquentielles de polysaccharides pariétaux, couplées à de la microscopie électronique haute résolution que McCann et al. établissent un nouveau modèle, décrivant la paroi comme un réseau cellulose/hémicellulose inclus dans une matrice pectique [McCann et al., 1990]. Par une synthèse de l'ensemble des données issues d'extractions, de microscopie, mais aussi de techniques analytiques comme la chromatographie ou encore la spectrométrie de masse, Carpita et Gibeaut complètent cette description trois ans plus tard par l'introduction d'un réseau de protéines structurales, aboutissant au modèle « multi-réseaux » (Figure 1.12) qui comprend désormais trois domaines indépendants (cellulose/hémicelluloses, pectines, protéines structurales) [Carpita & Gibeaut, 1993].

Ce modèle, également appelé le « tethered network model », fait largement consensus depuis qu'il a été proposé [Somerville et al., 2004], et suppose que le réseau cellulose/xyloglucane est la structure « porteuse » et qu'il détermine en grande partie les propriétés mécaniques de la paroi.

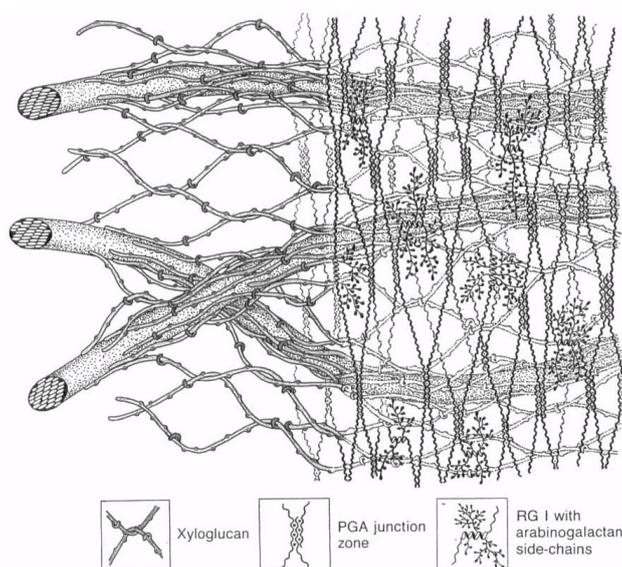


Figure 1.12 : Représentation schématique de l'organisation de la paroi primaire de type I (plantes supérieures dicotylédones et monocotylédones non-graminées). D'après [Carpita & Gibeaut, 1993]

En 2008, Cavalier et al. le remettent néanmoins en cause, rapportant qu'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* déficient en xyloglucanes détectables est viable, parvient à croître et se développer quasiment normalement (Figure 1.13), en dépit du fait que le xyloglucane est considéré comme un élément essentiel à la structuration de la paroi. Ces mutants déficients en xyloglucanes auraient des parois plus extensibles [Park and Cosgrove, 2012], ce qui encore une

fois va à l'encontre du « tethered network model » dans lequel l'absence de xyloglucanes devrait condenser la paroi en augmentant la friction entre microfibrilles de cellulose.



Figure 1.13: *Arabidopsis Thaliana* (28 jours). A gauche, le type sauvage. A droite, le mutant déficient en xyloglucanes détectables. D'après [Park and Cosgrove, 2012]

Ces observations remettent donc en question le rôle du xyloglucane dans la structure pariétale, et soulignent plus globalement la nécessité de concevoir d'autres modèles de paroi primaire.

I.2.2.3 Modèles alternatifs

Dans un article de revue, Cosgrove présente un récapitulatif des différents modèles de paroi primaire proposés dans la littérature [Cosgrove, 2001] que nous nous proposons de reprendre ici.

I.2.2.3.1 Modèle multi-couches

Les travaux de Talbott et Ray (1992) s'intéressent à l'extraction des polysaccharides pariétaux du pois et à l'étude de leur distribution en taille par chromatographie, couplée à de l'analyse de sucres. Les auteurs aboutissent à un modèle « multi-couches » (« multi-coat model ») dans lequel les microfibrilles de cellulose seraient enrobées de couches successives d'hémicelluloses (xyloglucanes, arabinanes et galactanes) ces couches étant liées de moins en moins fermement. La couche externe interagirait directement avec les pectines, ces dernières remplissant les interstices entre microfibrilles (Figure 1.13-A) [Talbott & Ray, 1992].

I.2.2.3.2 Modèle de la paroi stratifiée

Le modèle dit « de la paroi stratifiée » provient de l'étude de parois d'oignons par RMN ^{13}C du solide [Ha et al., 1997]. En comparant les temps caractéristiques de relaxation de protons de parois hydratées à ceux de parois séchées, les auteurs ont relevé des différences de mobilité moléculaire entre les différents composants pariétaux, ce qui leur a permis de proposer le modèle suivant : la paroi serait organisée en strates, les pectines servant d'espaceurs entre des couches de microfibrilles enrobées de xyloglucanes (Figure 1.9-B). Les microfibrilles réticulées seraient responsables de la rigidité dans les directions parallèles à la surface de la paroi, tandis que le gel pectique contrôlerait les propriétés mécaniques dans le sens de

l'épaisseur. Les xyloglucanes assureraient uniquement la réticulation des microfibrilles au sein d'une couche, mais pas entre couches successives, ce rôle revenant aux pectines.

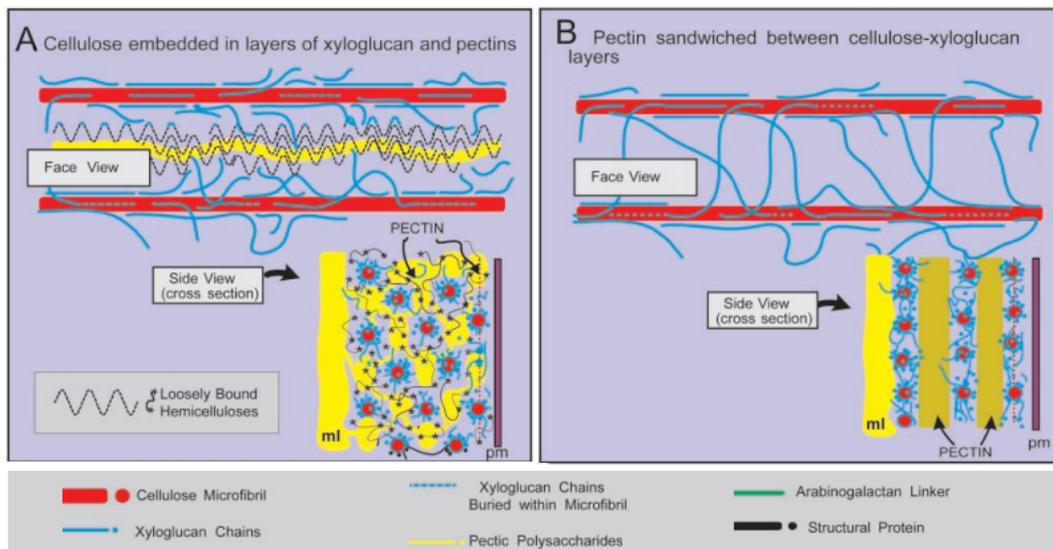


Figure 1.13 : Représentation schématique des différents modèles de parois.
(A) Modèle multi-couches (B) Modèle de la paroi stratifiée. D'après [Cosgrove, 2001]

I.2.2.3.3 Modèles incluant les pectines

Une des tendances qui se dégage de ces modèles alternatifs est l'existence d'interactions xyloglucanes/pectines [Thompson & Fry, 2000] [Cumming et al. 2005], et de la possibilité d'associations pectines/cellulose (via les chaînes latérales neutres des pectines) [Zykwinska et al., 2006][Gu & Catchmark, 2012]. Les travaux de Dick-Pérez et al. proposent ainsi un modèle dans lequel pectines, cellulose et xyloglucane forment un seul et même réseau, s'appuyant sur des données de RMN multidimensionnelle du solide (Figure 1.14) [Dick-Pérez et al., 2011]. Il semblerait donc que les polysaccharides pectiques, habituellement dépeints comme un domaine indépendant, interagissent directement avec le réseau cellulose/hémicellulose.

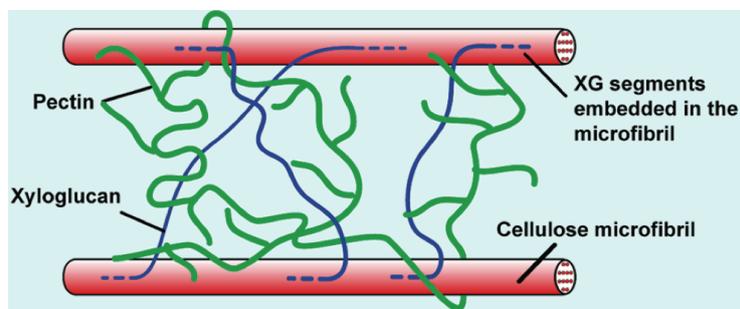


Figure 1.14 : Représentation schématique du modèle de paroi incluant les pectines. D'après [Dick-Perez et al., 2011]

I.3 Propriétés mécaniques de la paroi

Loin de n'être gouvernés que par des processus purement biochimiques, les tissus végétaux se différencient, croissent et se modèlent en réponse à des forces mécaniques [Hamant et al., 2008]. La quantification des propriétés physiques des cellules qui composent les tissus est donc indispensable pour comprendre comment la cellule individuelle est capable de moduler son comportement mécanique et *a fortiori* comment l'organisme végétal tout entier est capable de percevoir et de réagir aux forces extérieures qui s'exercent sur lui. En effet, la paroi répond à un cahier des charges contradictoire: elle doit pouvoir résister à d'importantes forces de compression et de pression de turgescence, tout en permettant une déformation réversible en réponse aux variations de pression osmotique, et même une déformation plastique irréversible lors de la croissance. Comment caractériser l'ensemble de ce comportement de façon quantitative ?

I.3.1 Paramètres physiques à quantifier

D'un point de vue biophysique, une cellule peut être décrite comme un système mécanique et hydraulique : chaque cellule est osmotiquement pressurisée. Cette pression interne crée une tension au niveau de la paroi, la cohésion de l'ensemble des cellules étant assurée par le ciment pectique qui les empêche de glisser les unes par rapport aux autres lors de fortes contraintes [Somerville, 2004]. Lors de la croissance notamment, c'est la pression de turgescence générée par un flux d'eau de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule qui va initier l'expansion. Cette relation entre pression interne et réaction de la paroi a été formalisée par l'équation de Lockhart [Lockhart, 1965] :

$$r = \begin{cases} m(P - P_y) & \text{si } P > P_y \\ 0 & \text{si } P < P_y \end{cases} \quad (1.1)$$

r : vitesse d'élongation de la cellule (h^{-1})
 m : extensibilité irréversible de la paroi ($\text{h}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$)
 P : pression interne (MPa)
 P_y : pression seuil en deçà de laquelle il n'y a pas d'expansion (MPa)

Dans ce modèle, la cellule croît proportionnellement avec la contrainte au dessus d'un seuil donné, comme un matériau viscoplastique (Figure 1.15-C), ce qui a été confirmé par des expériences de traction comme nous le verrons par la suite . En revanche, il ne s'applique que dans le cas d'une expansion irréversible, négligeant le fait que la paroi peut aussi se déformer de façon élastique en dehors des phases de croissance. Ortega introduit donc un terme élastique qui dépend du module d'Young E de la paroi [Ortega, 1985] :

$$r = \begin{cases} m(P - P_y) + \frac{1}{E} \frac{dP}{dt} & \text{si } P > P_y \\ \frac{1}{E} \frac{dP}{dt} & \text{si } P < P_y \end{cases} \quad (1.2)$$

Dans cette équation étendue, si la pression est inférieure à la pression seuil, le terme élastique aura une contribution non nulle si la pression évolue dans le temps. La croissance effective de la cellule résultera donc des contributions élastique et plastique. Une représentation schématique des deux modèles est présentée en Figure 1.15-C et 1.15-D. Plusieurs extensions ont été proposées pour prendre en compte d'autres effets (transpiration [Geitmann & Ortega, 2009], direction de la croissance [Baskin, 2005], incorporation de polysaccharides [Goriely & Tabor, 2003]...) mais il apparaît que l'équation de Lockhart reste la loi la plus simple pour décrire les fondamentaux des processus biophysiques mis en jeu au niveau de la cellule végétale, notamment lors de sa croissance.

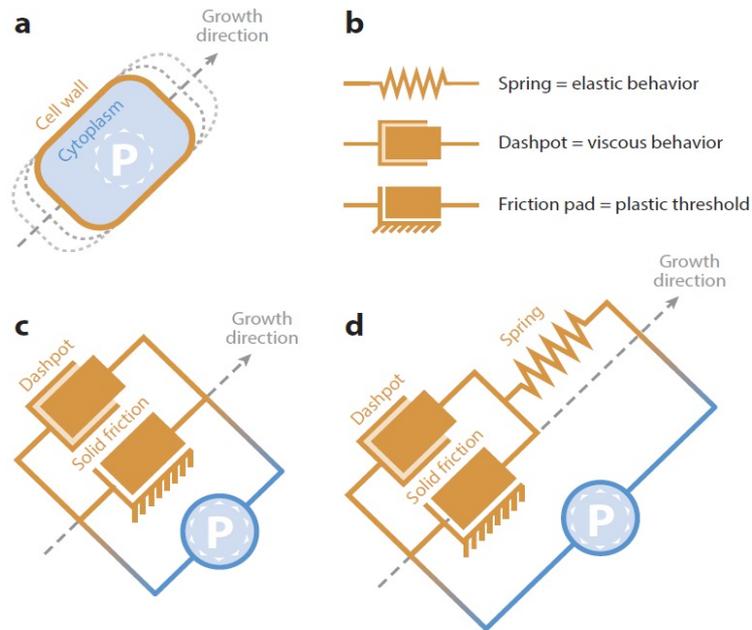


Figure 1.15: (A) Expansion de la cellule sous l'effet de la pression de turgescence notée P (B) Analogie entre les concepts physiques et leur représentation schématique (C) Modèle de Lockhart (D) Modèle d'Ortega. D'après [Ali et al., 2014]

Ainsi, vouloir caractériser les propriétés mécaniques de la paroi primaire revient à déterminer la déformabilité de la paroi, sa pression hydrostatique et son module d'Young, ces paramètres donnant accès aux autres variables biophysiques (extensibilité de la paroi, pression de turgescence).

I.3.2 Caractérisation mécanique de la paroi

I.3.2.1 Extensométrie

La paroi est un matériau hétérogène qui comprend à la fois des composants très résistants et d'autres beaucoup plus malléables, d'où un comportement complexe qui a pu être caractérisé par extensométrie. En effet, les méthodes les plus simples mises en oeuvre pour étudier la mécanique des tissus végétaux sont issues de la science des matériaux : traction, fluage et relaxation de contrainte. Les mesures sont souvent réalisées sur des plantules après germination dans lesquelles la zone d'élongation, située vers le sommet de l'organe, est extraite et montée dans un extensomètre.

Lors d'un test de traction (Figure 1.16-A), la paroi est mise en extension par une force prédéterminée, ce qui permet de générer des courbes de contrainte-déformation et d'en déduire les grandeurs caractéristiques d'un comportement élastique et/ou plastique. Autre méthode, la relaxation de contraintes consiste à étendre la paroi sous l'action d'une force prédéterminée et à la maintenir en extension. La diminution de la force due à la réorganisation du réseau de polymères porteurs de la paroi est ensuite mesurée [Cosgrove, 1989]. Enfin, le test de fluage est un test mécanique quasi-statique, considéré comme plus fidèle au processus naturel de croissance pariétale [Cosgrove, 1989]. L'échantillon est soumis à une sollicitation constante, puis sa déformation irréversible est suivie dans le temps.

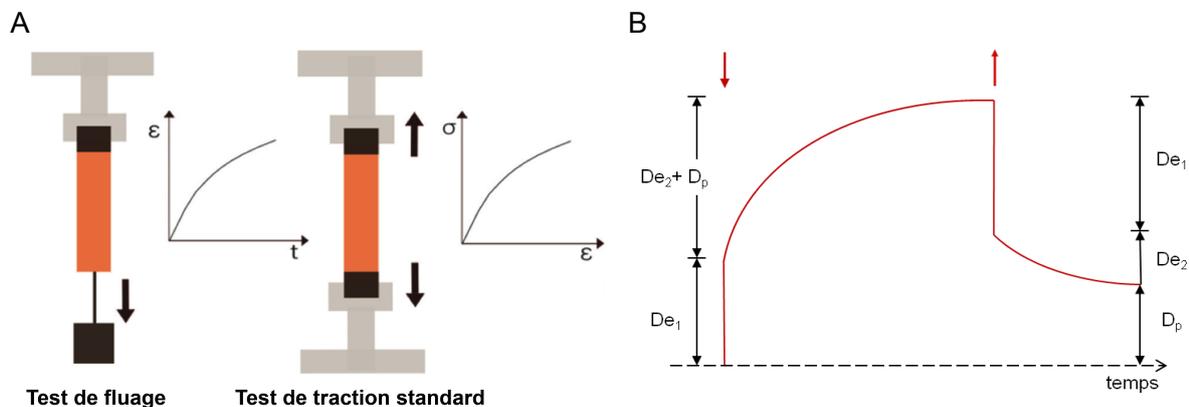


Figure 1.16: (A) Représentation schématique d'un test de fluage et d'un test de traction, avec respectivement les diagrammes de déformation en fonction du temps et de contrainte-déformation associés. D'après [Burgert et al., 2013] (B) Courbe d'extension d'une paroi isolée en fonction du temps, soumise à tension constante (entre les deux flèches rouges). déformation irréversible dans le temps, celle-ci résultant de l'élasticité instantanée (De_1), l'élasticité retardée (De_2) et de l'écoulement visqueux (D_p). D'après [Taiz, 1984]

Ces différents tests mécaniques ont permis de conclure que la paroi primaire était comparable à un matériau composite viscoélastique non linéaire capable d'expansion plastique

et de relaxation de contraintes dépendante du temps (ce qui s'explique par les réarrangements structuraux de ses polymères constitutifs) (Figure 1.16-B). Les courbes typiques de contrainte/déformation de parois primaires présentent également une forte hystérèse, caractéristique des matériaux viscoélastiques [Schopfer, 2006].

I.3.2.2 L'approche cytomécanique

Les tests mécaniques présentés précédemment sont quasiment toujours réalisés sur des tissus entiers, ce qui limite l'interprétation des données quant aux propriétés mécaniques de la paroi elle-même. C'est pourquoi un panel de méthodes capables de donner des informations plus locales ont été utilisées sur des cellules individuelles : c'est l'approche cytomécanique.

I.3.2.2.1 Mesure de la pression hydrostatique

Méthodes plasmolytiques

La pression de turgescence a longtemps été mesurée par des techniques dites plasmolytiques : leur principe est d'augmenter l'osmolalité du milieu externe à la cellule et à déterminer à partir de quelle valeur seuil le protoplaste commence à se désolidariser de la paroi (plasmolyse) ou à quel moment la cellule éclate (cytorrhysse) (Figure 1.17-A) (voir [Zimmermann, 1978] pour une revue). Les techniques osmométriques mesurent quant à elles un paramètre physico-chimique du cytoplasme (point de gel ou point de fusion...) pour les relier à la concentration en soluté à l'intérieur de la cellule et donc à la pression : l'osmométrie de point de gel consiste par exemple à refroidir le cytoplasme, la température à laquelle celui-ci commence à geler pouvant être reliée à la pression hydrostatique. Ces méthodes ne sont applicables qu'à des cellules suffisamment grandes pour que la résolution d'image soit suffisante et que le tissu analysé soit accessible aux solutions plasmolytiques.

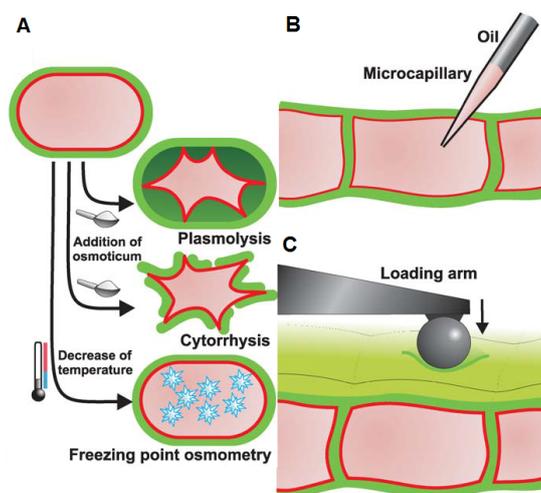


Figure 1.17: Schéma représentatif des techniques de mesure de pression interne. (A) Plasmolyse, cytorrhysse et osmométrie de point de gel. (B) Sonde de pression. (C) Tonométrie à balle. D'après [Geitmann, 2006]

Sonde de pression

La méthode la plus répandue pour mesurer la pression hydrostatique des cellules est celle de la sonde de pression (Figure 1.17-B), qui consiste à percer la paroi avec un microcapillaire (d'environ 4 μ m de diamètre) rempli d'huile pour l'introduire directement dans la vacuole, l'huile étant connectée à un réservoir dont la pression est contrôlée par un capteur [Husken et al., 1978]. La pression hydrostatique correspond à celle mesurée lorsque le ménisque huile/contenu cellulaire est maintenu au niveau de la membrane plasmique. Cette technique présente l'avantage majeur d'être directe et de permettre un suivi en temps réel de la pression à l'échelle d'une cellule individuelle, avec une précision de l'ordre de 10^{-3} MPa, ce qui est utile pour étudier les variations de pression induites par divers stimuli externes [Tomos et al., 1999]. La sonde de pression n'en est pas moins invasive et délicate à mettre en oeuvre, surtout sur des petites cellules.

Tonométrie à balle

Plus indirecte mais plus rapide, la tonométrie à balle offre une alternative intéressante à la sonde de pression [Lintilhac et al., 2000][Wei et al., 2001]. Une sonde sphérique (50 à 500 μ m de diamètre) vient appliquer une force déterminée à la surface de la cellule étudiée et l'aire de contact sonde/surface est mesurée (Figure 1.17-C). En négligeant l'élasticité de la paroi, la pression à l'équilibre peut être déterminée par le rapport entre la charge imposée et l'aire de contact. Cette technique non-destructive est néanmoins limitée par la nécessité de pouvoir nettement visualiser cette aire en microscopie optique, ce qui n'est pas le cas pour des échantillons opaques ou trop petits.

Comme l'illustre le tableau 1.1, la pression au sein d'une cellule végétale turgide oscille entre 0.1 et 1 MPa, ce qui est de l'ordre de grandeur de la pression d'un pneu de voiture. Cette valeur n'est pas figée et varie en fonction de l'état physiologique de la cellule : celle-ci est en effet capable de réguler sa pression osmotique selon les circonstances, soit en pompant des molécules du milieu extérieur (ou des cellules voisines), soit en hydrolysant certaines des macromolécules qu'elle contient pour modifier la concentration en molécules dissoutes. Plus qu'un mécanisme de régulation physiologique, la pression hydrostatique contribue aussi à la rigidité tissulaire et est essentielle à la croissance et donc au développement de la plante [Beauzamy et al., 2014]

Tableau 1.1 : Valeurs de pression hydrostatique pour différents types de cellules végétales à l'état turgide.

Origine des cellules	Technique	Pression	Références
Tissus de fruits de poivrons <i>Capsicum Annuum</i>	Sonde de pression	0.2-0.4 MPa	[Husken et al., 1978]
Halophyte ⁴ <i>Suaeda maritima</i>	Sonde de pression	0.1 MPa	[Clipson et al., 1985]
Tige de soja <i>Glycine max</i>	Sonde de pression	0.4 MPa	[Nonami et al., 1987]
Algues monocellulaires géantes <i>Nitella, Chara, Acetabularia</i>	Sonde de pression	0.1-0.6 MPa	[Tomos, 1988]
Trichome ⁵ de tabac <i>Nicotiana clevelandii</i>	Sonde de pression	0.4-0.6 MPa	[Oparka et al., 1992]
Racine de l'halophyte ¹ <i>Aster tripolium</i>	Sonde de pression	0.1-0.6 MPa	[Zimmermann et al., 1992]
Racines de jeunes plants de pin <i>Pinus Pinaster</i>	Sonde de pression	0.5 MPa	[Triboulot et al., 1995]
Racines de tomates <i>Lycopersicon esculentum</i>	Sonde de pression	0.3 MPa	[Griffiths et al., 1996]
Tubes polliniques de lys <i>Lilium longiflorum</i>	Plasmolyse	0.8 MPa	[Benkert et al., 1997]
	Sonde de pression	0.2 MPa	
	Microindentation	0.3 MPa	
Epiderme d'oignons <i>Allium Cepa</i>	Tonométrie à balle	0.2-0.6 MPa	[Lintilhac et al., 2000]
	Tonométrie à balle	0.5 MPa	[Wei et al., 2001]
Racine d' <i>Arabidopsis</i>	Sonde de pression	0.3 MPa	[Javot et al., 2003]
Cellules en suspension d' <i>Arabidopsis</i>	Sonde de pression	0.4 MPa	[Gerbeau et al., 2002]
Stomates ⁶ de fèves <i>Vicia Faba</i>	Sonde de pression	0.1-1 MPa	[Franks, 2003]
Cellules de tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	Sonde de pression	0.3 MPa	[Wang et al., 2006]
Algues monocellulaires géantes <i>Chara</i>	Sonde de pression	0.2-0.5 MPa	[Wei et al., 2007]
Feuilles d' <i>Arabidopsis Thaliana</i>	Nanoindentation	0.3-1.2 MPa	[Forouzesh, 2013]

⁴ Plante adaptée aux milieux à pression osmotique importante.

⁵ Fines excroissances sur l'épiderme des plantes.

⁶ Organes de régulation des échanges gazeux situés sur l'épiderme des feuilles et des tiges aériennes.

I.3.2.2.2 Mesure du module élastique de la paroi

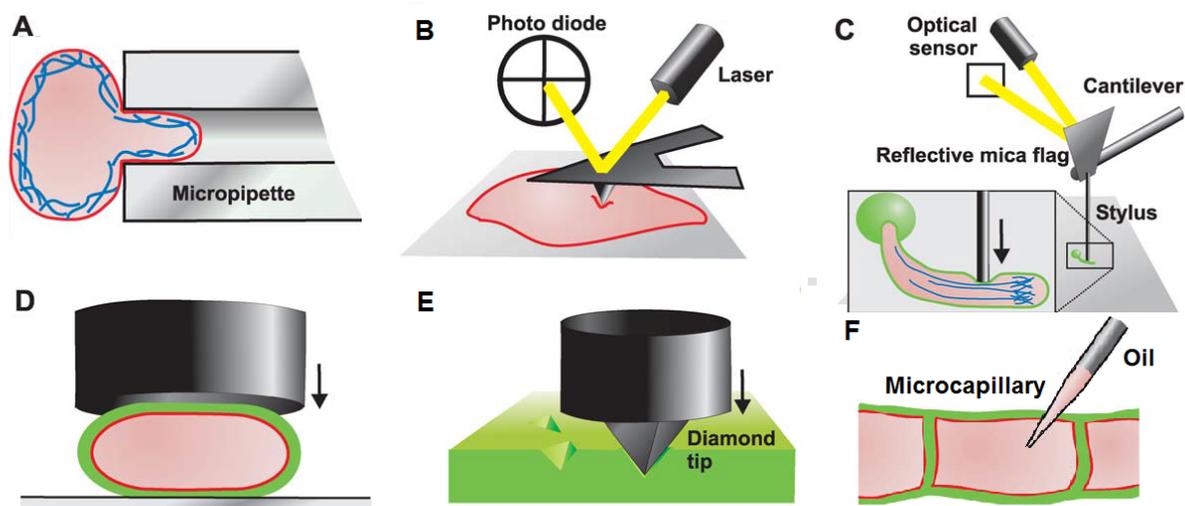


Figure 1.18 : Schémas représentatifs des différentes méthodes expérimentales de mesure de propriétés mécaniques de cellules individuelles. (A) Aspiration par micropipette. (B) Microscopie à force atomique (AFM). (C) Microindentation. (D) Compression plan/plan. (E) Nano-indentation. (F) Sonde de pression. D'après [Geitmann, 2006]

Aspiration par micropipette

L'aspiration par micropipette, très utilisée sur des cellules mammifères [Hochmuth, 2000] permet d'estimer l'élasticité de la paroi en mesurant la pression de succion nécessaire pour aspirer partiellement ou entièrement une cellule isolée dans une micropipette (diamètre de l'ordre du micron), sa déformation étant suivie par microscopie (Figure 1.18-A). Cette méthode n'a pas été pratiquée sur les cellules végétales, car elle est à la fois sensible à la paroi et aux éléments du cytosquelette.

Techniques d'indentation

La microscopie à force atomique (AFM) permet d'imager la topographie de la paroi mais aussi de mesurer des forces de l'ordre du piconewton. Une pointe de dimensions nanométriques montée à l'extrémité d'un levier flexible va interagir avec les atomes de surface de la paroi. Cette interaction entraîne une déflexion du levier, la déformation de celui-ci étant détectée par un rayon laser couplé à une photodiode (Figure 1.18-B). L'AFM peut ainsi servir de nanoindenteur (Figure 1.18-E), avec une résolution en profondeur de 0,02 nm [Bowen, 2000] : à l'aide d'une pointe en diamant, le matériau est indenté par une force calibrée, la profondeur de sa déformation étant liée à ses propriétés physiques. La variante dynamique de l'indentation par AFM est appelée nanoDMA [Hayot et al., 2012], et consiste à imposer une oscillation nanométrique (translation verticale) à la sonde, ce qui permet de caractériser le comportement viscoélastique de la paroi et d'en extraire le module élastique. Fonctionnant sur le même principe que la nanoindentation, la microindentation génère aussi des courbes de

force/déformation mais cette fois ci à l'échelle micrométrique. Au lieu d'une pointe, c'est un stylet en verre micrométrique qui est fixé au bout d'un levier, ce qui permet d'appliquer des déformations de plus grande amplitude qu'en AFM, avec une résolution en profondeur de l'ordre de 0.4 nm [Bowen et al., 2000](Figure 1.18-C). Développée plus récemment, la microscopie de force cellulaire (cellular force microscopy, CFM) entend combiner la haute résolution de la nanoindentation par AFM et l'amplitude de déformation de la microindentation classique, en appliquant des forces allant jusqu'à 1 millinewton, permettant ainsi d'indenter les cellules jusqu'à leur rupture [Routier-Kierzkowska et al., 2012]. Enfin, la tonométrie à balle déjà présentée précédemment dans les méthodes de mesure de pression peut aussi être utilisée pour sonder les propriétés mécaniques de la paroi [Lintilhac et al., 2000]. La figure 1.19 compare l'ensemble de ces méthodes, notamment en termes d'échelle et de profondeur d'indentation.

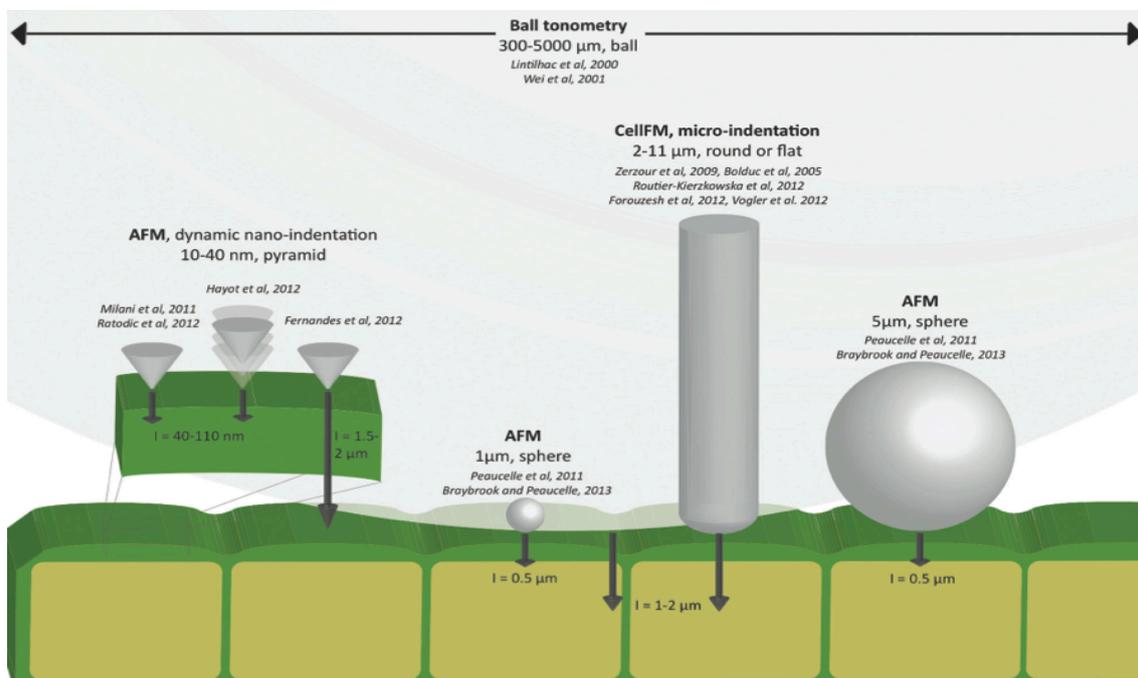


Figure 1.19 : Panorama des méthodes d'indentation appliquées aux cellules végétales. [Milani et al., 2013]

Compression

Une autre manière de mesurer les propriétés élastiques de la paroi consiste à comprimer une cellule isolée à l'aide d'une sonde de micromanipulation (Figure 1.18-D). En utilisant un modèle théorique approprié pour traiter les données, il est possible d'estimer le module d'Young de la paroi.

Sonde de pression

Enfin, la sonde de pression, dont le principe a déjà été décrit plus haut, permet aussi de mesurer le module élastique volumétrique : celui-ci est estimé en déterminant la variation

relative de volume de la cellule en réponse à une pression exercée via la sonde, cette variation dépendant principalement de la géométrie de la cellule et de l'élasticité de la paroi.

Le problème majeur de l'ensemble de ces tests cytomécaniques réside tout d'abord dans la difficulté qu'il y a à séparer les contributions respectives du cytosquelette, de la paroi et de la pression de turgescence. La paroi cellulaire ayant une épaisseur allant de 0,1 à quelques micromètres, les tests d'indentation dont la profondeur excède le micron peuvent rapidement s'avérer plus sensibles à la pression hydrostatique interne qu'aux propriétés de la paroi. De plus, d'un point de vue expérimental, un échantillon de cellule isolée est relativement petit et souvent de géométrie complexe. Enfin, la cellule étant un objet biologiquement actif, il ne faut pas oublier que l'application d'une force de l'ordre de 100 μN peut s'apparenter à l'action d'un pathogène et ainsi provoquer une réponse cellulaire pouvant potentiellement affecter les propriétés mécaniques (ré-organisation sub-cellulaire notamment) [Hardham et al., 2008].

I.3.3 Module élastique de la paroi primaire : les données quantitatives

Les techniques précédemment décrites ont été appliquées à une très grande variété de cellules, aussi, rappelons-nous que la diversité du règne végétal ne permet pas d'étudier une seule « cellule type », tant les formes d'organisation varient d'une espèce à l'autre. Au sein d'un même organisme, il existe différents types de tissus cellulaires ayant chacun des fonctions bien définies. On distingue les cellules méristématiques (équivalent végétal des cellules souches) des cellules différenciées. Cette spécialisation va de pair avec une différenciation morphologique qui impacte les propriétés mécaniques de la paroi. Il convient donc de toujours préciser le type de tissu dont proviennent les parois cellulaires testées afin de relier structure, fonction et propriétés. Aussi, la compréhension du développement et de la morphogénèse des plantes est la principale raison qui motive l'étude des propriétés mécaniques des parois primaires [Hamant et al., 2008], et c'est pourquoi les méristèmes ou les tubes de pollens, qui sont des zones spécifiques de croissance, sont des objets d'étude privilégiés : les cellules méristématiques, que l'on trouve au niveau de l'apex des racines, des bourgeons (apicaux et axillaires) et des entrenœuds, font partie des échantillons de choix pour étudier les mécanismes de croissance. De plus, d'un point de vue expérimental, les tissus faciles à manipuler seront privilégiés (c'est le cas des hypocotyles, très utilisés lors des tests de traction), ainsi que les espèces « modèles » comme *Arabidopsis Thaliana*, qui est de loin l'organisme de référence en recherche végétale. On rencontre également dans la littérature des études sur les organismes monocellulaires tels que les algues vertes (*Chara corallina*, *Nitella opaca*...): il s'agit de cellules géantes dont la taille peut atteindre quelques centimètres, ce qui les rend très pratiques à manipuler et à observer.

Ce rappel effectué, le tableau 1.2 présente ainsi un éventail non exhaustif de valeurs de module élastique obtenues par extensiométrie et par cytomécanique pour divers types de parois.

Tableau 1.2: Valeurs de module pour des parois issues de différentes espèces végétales.

	Origine des cellules	Technique	Paramètre	Valeur	Référence
Cellules individuelles	Cellules de tomates en suspension	Compression plan/plan	Module d'Young	2-3 GPa	[Wang et al., 2004]
			Module d'Young	100-2300 MPa	[Blewett et al., 2000]
	Cellules en suspension d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	AFM	Module d'Young	0.1-1 MPa	[Radotic et al., 2012]
	Algue géante <i>Nitella opaca</i>	Extensiométrie	Module d'Young	450-1000 MPa	[Probine et al., 1962]
	Algue géante <i>Chara corallina</i>	Extensiométrie	Module d'Young	213-361 MPa	[Wei&Lintilhac, 2007]
Cellules d'épiderme	Epidermes d'oignon <i>Allium Cepa</i>	AFM	Module d'Young	7-14 MPa	[Beauzamy et al., 2015]
		CFM	Rigidité apparente	2-22 N.m ⁻¹	[Routier-Kierzkowska et al., 2012]
		Extensiométrie	Module d'Young	3.5-8 MPa	[Wei et al., 2001]
	Feuilles d'épiderme d' <i>Arabidopsis Thaliana</i>	Nano DMA	Module d'Young	30-70 MPa	[Hayot et al., 2012]
		Nanoindentation	Module d'Young	79-124 MPa	[Forouzesh, 2013]
	Epiderme de fèves <i>Vicia faba</i>	Sonde de pression	Module élastique	2-40 MPa	[Franks et al., 2001]
	Tubes de pollen de <i>Lilium longiflorum</i>	Micro-indentation	Raideur	4 N.m ⁻¹	[Parre et al., 2005a, 2005b]
			Raideur apparente	0.2-0.4 N.m ⁻¹	[Zerzour et al., 2009]
		CFM	Module d'Young	20-98 MPa	[Vogler et al., 2013]
	Meristème ⁷ apical de la tige d' <i>Arabidopsis Thaliana</i>	AFM	Module d'Young	1.5-5 MPa	[Milani et al., 2011]
			Module d'Young	0.2-0.6 MPa	[Peaucelle et al., 2011]
	Entre-noeud de peuplier <i>Populus alba</i>	Extensiométrie	Module d'Young	3-4 MPa	[Park et al., 2004]
	Tiges d' <i>Aristolochia macrophylla</i> et <i>Aristolochia brasiliensis</i>	Extensiométrie	Module élastique	8-10 MPa	[Kohler et al., 2000]
Mésocotyles ⁸ de maïs	Extensiométrie	Module d'Young	1-4 MPa	[Schopfer et al., 2001]	
Hypocotyles d' <i>Arabidopsis Thaliana</i>	Extensiométrie	Module d'Young	21-28 MPa	[Ryden et al., 2003]	
Tissus de poivrons <i>Capsicum Annuum</i>	Sonde de pression	Module élastique	0.2 – 2.5 MPa	[Husken et al., 1978]	

L'ordre de grandeur du module élastique des parois végétales est de l'ordre du MPa jusqu'à la centaine de MPa, pouvant même atteindre quelques GPa dans le cas de cellules en

⁷ Tissu cellulaire spécialisé dans la croissance.

⁸ Premier entre-noeud souterrain des plantes graminées

suspension. Une limite maximum au module élastique de 150 GPa a été proposée, ce qui correspond au module élastique des microfibrilles de cellulose individuelles, qui sont les éléments pariétaux les plus rigides [Iwamoto et al., 2009].

Ces valeurs de module peuvent sembler très dispersées, ce qui s'explique par le fait qu'elles sont dépendantes de nombreux paramètres expérimentaux (type et âge du tissu étudié, géométrie de l'échantillon, type de pointe utilisée, vitesse d'indentation...) et des modèles utilisés pour extraire les données qui peuvent varier d'une étude à l'autre. Par exemple, les travaux de [Milani et al., 2011] et de [Peaucelle et al., 2011] s'intéressent tous deux au même type de tissu, utilisent la même technique (AFM) mais obtiennent néanmoins des ordres de grandeur légèrement différents pour le module d'Young. Une même cellule peut également présenter des variations locales de module élastique [Milani et al., 2011].

Malgré ces limitations, ces différents tests mécaniques sont autant d'outils expérimentaux qui s'avèrent très utiles lorsqu'il s'agit d'évaluer les modèles moléculaires décrivant l'assemblage de la paroi et notamment son comportement lors de la croissance.

I.3.4 Mécanismes moléculaires de croissance

Pour permettre l'expansion cellulaire, la paroi doit relâcher le maillage des réseaux de polymères qui la composent. Comment y parvient-elle ?

I.3.4.1 Relâchement et extensibilité de la paroi

Lors de la croissance, la cellule végétale subit une expansion contrôlée et irréversible à charge mécanique constante, imposée par la pression de turgescence : relativement fine, la paroi se retrouve soumise à une tension mécanique intense, équivalente à une contrainte en traction de 10 à 100 MPa [Cosgrove, 2003]. S'ajoute à ce mécanisme d'expansion une capacité à mettre en oeuvre une relaxation de contrainte prolongée, c'est à dire une diminution de la contrainte sans changement de dimensions. En effet, à la différence d'un fluage viscoélastique classique dans lequel un matériau s'étire passivement en réponse à une contrainte, le processus de croissance est dynamique car il résulte aussi de relâchement des liaisons entre les différents composants pariétaux. On parle ainsi de fluage chémiorhéologique. Simultanément, de nouveaux polymères sont déposés à la surface de la paroi, ce qui permet à celle-ci de poursuivre son expansion sans risquer de perdre toute cohésion mécanique.

Compte tenu de la complexité de sa composition et de son architecture, il est peu probable que la paroi ne soit le siège que d'un seul et unique mécanisme de relâchement pour s'élargir, celui-ci pouvant notamment dépendre du stade de développement de la plante.

Plusieurs acteurs contribueraient ainsi à moduler l’extensibilité de la paroi végétale, recensés dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Différents agents de relâchement de la paroi et leur mode d’action.

Enzymes	Cibles	Mode d’action	Références
Expansines	Cellulose, xyloglucane	Rupture des liaisons hydrogène	[McQueen-Mason et al., 1992]
Endoglucanases	1,4- β -glucanes	Hydrolyse des liaisons glycosidiques	[Levy et al., 2002]
Radicaux hydroxyyles	Tous les polysaccharides	Coupure de liaisons glycosydiques	[Fry, 1998]
Xyloglucane endohydrolases (XEHs)	Xyloglucane	Coupure du squelette des XG	[Kaku et al., 2002]
Xyloglucane endotransglucosylase (XETs)	Xyloglucane	Coupure du squelette des XG et greffage des fragments sur d’autres chaines de XG	[Rose et al., 2002]
Transglycosylases	Hémicelluloses	Transfert d’un sucre d’une molécule à une autre	[Fry, 1995]
Pectinemethylesterases	Pectines	dé-méthylesterification des pectines	[Peaucelle et al., 2011]

Cosgrove propose de distinguer ces agents en deux catégories [Cosgrove, 1999] : d’une part les agents de relâchement primaires, catalysant directement l’extension pariétale (ces agents suffisent à initier l’extension *in vitro*) et d’autre part les agents de relâchement secondaires qui modifierait la structure de la paroi pour la rendre plus sensible à l’action des agents primaires. On se limitera à décrire de façon plus détaillée le mode d’action de deux agents de relâchement primaires : les expansines et les pectinemethylesterases.

I.3.4.2 Croissance acide et expansines

Emise dans les années 70, la théorie de la croissance acide stipule que l’afflux d’ions H^+ vers la paroi par les pompes à protons membranaires induit une baisse du pH local. Stimulé par les auxines (principale “hormone de croissance végétale”), cet “effet acide” causerait la rupture des liaisons hydrogène cellulose/xyloglucane et l’activation d’enzymes catalysant le clivage de liaisons chimiques, d’où une augmentation de la plasticité de la paroi et des glissements moléculaires, favorisant l’extension [Rayle, 1973]. Par la suite, il a été rapporté lors d’expériences de fluage *in vitro* que dans le cas de parois rendues inactives par traitement thermique, la relaxation de contraintes par effet acide n’est pas observée, à moins de remettre les parois en présence d’une certaine classe de protéines, les expansines [McQueen-Mason et al., 1992, McQueen-Mason, 1995](Figure 1.20). Confortant l’hypothèse d’un contrôle enzymatique de la croissance, il s’est avéré que l’application de ces protéines à des cellules vivantes stimulait leur expansion, montrant qu’elles sont actives *in vivo* [Fleming et al., 1997].

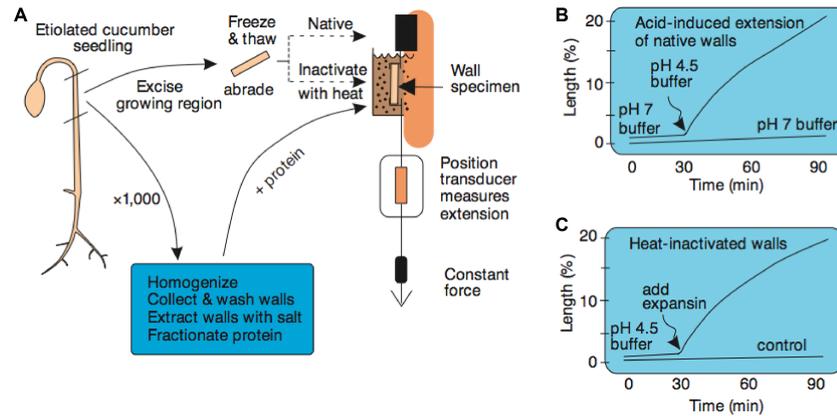


Figure 1.20 : A) Diagramme représentatif d'un test d'extensiométrie sur un tissu en croissance. B) Extension de parois natives à pH acide. C) Extension de parois thermiquement inactivées induite par l'ajout d'expansines. D'après [Cosgrove, 2000]

Si l'implication des expansines dans le relâchement de la paroi apparaît désormais comme un fait établi, leur mode d'action est encore loin d'être compris. Une première hypothèse consistait à dire que les expansines hydrolysaient les polysaccharides reliant les microfibrilles de cellulose entre elles [McQueen-Mason et al., 1995]. Faute de preuves expérimentales concluantes, un mécanisme alternatif a été proposé par Cosgrove, dans lequel les expansines affaibliraient les liaisons non covalentes entre polymères de la paroi [Cosgrove, 2000]. Le mouvement des expansines serait en fait limité à une diffusion latérale le long des microfibrilles de cellulose ; les expansines relâcheraient localement les attaches de la cellulose à la matrice, permettant le glissement des chaînes et donc une relaxation de contraintes comme illustré sur la Figure 1.21.

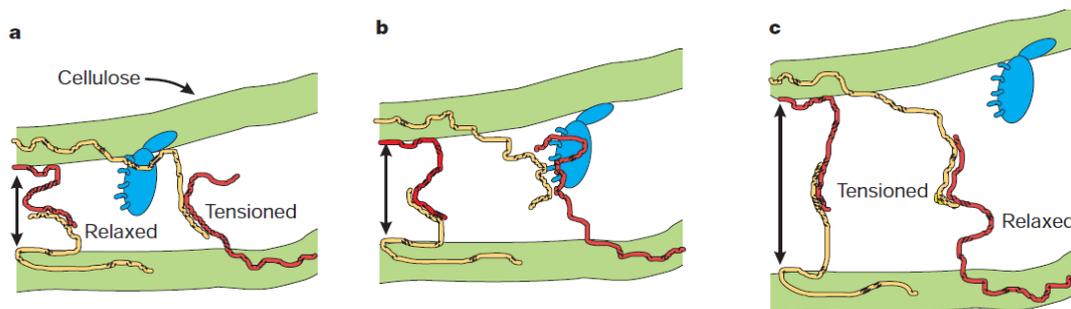


Figure 1.21 : Représentation schématique du relâchement de la paroi sous l'action des expansines. Les microfibrilles de cellulose (en vert) sont connectées par des hémicelluloses (en jaune et rouge). L'expansine (en bleu) va relâcher les liaisons hémicellulose/cellulose et/ou inter-hémicelluloses. Sous l'effet de la pression de turgescence, les polymères glissent les uns par rapport aux autres et la paroi s'étend. D'après [Cosgrove, 2000]

I.3.4.3 Modèle calcium pectate

Le réseau cellulose-hémicellulose est considéré comme la principale structure porteuse du point de vue mécanique, il semblerait que le réseau formé par les pectines ait également un rôle à jouer. Des expériences récentes de RMN ^{13}C multidimensionnelle du solide suggèrent que seule une faible proportion de XG est liée à la cellulose, et mettent en évidence l'existence de nombreuses interactions pectines-cellulose [Dick-Perez et al., 2012, Dick-Perez et al., 2011]. Se basant sur ces résultats, Peaucelle et al. émettent l'hypothèse que les pectines soient en compétition directe avec les xyloglucanes vis-à-vis de l'interaction avec la cellulose. Cette idée s'appuie également sur les travaux de [Park et al., 2011] : l'étude par extensiométrie des propriétés mécaniques de mutants d'*Arabidopsis* montre qu'en l'absence de xyloglucanes, ce sont les xylanes et les pectines qui jouent le rôle de polymères porteurs. Aussi, les différentes études mécaniques menées sur la paroi de *Chara corallina* [Proseus et al., 2006, 2007, 2012] dont la composition est similaire à celle des parois de plantes supérieures [Soerensen et al., 2011], ont amené l'équipe de Boyer à proposer un nouveau modèle d'expansion cellulaire, schématisé sur la Figure 1.22.

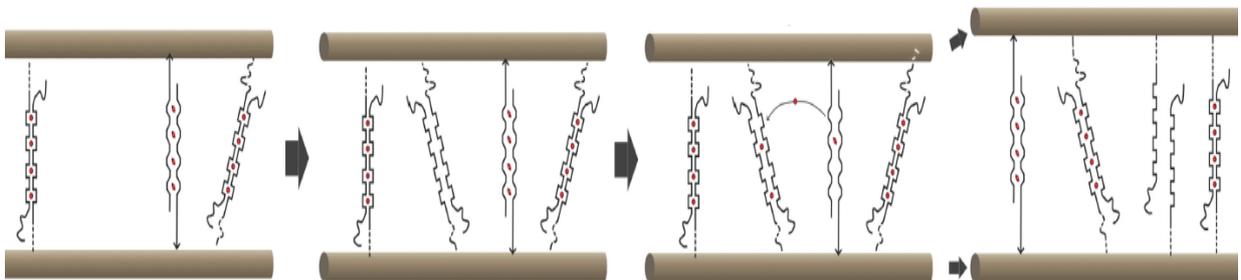


Figure 1.22 : Schéma du mécanisme de déplacement des ions calcium. D'après [Peaucelle et al., 2012]

Dans ce mécanisme non-enzymatique, ce sont les points de réticulation Ca^{2+} -pectate qui jouent le rôle de liaisons « porteuses ». En effet, le relâchement de la paroi est induit par l'incorporation de nouvelles chaînes pectates auxquelles les ions Ca^{2+} déjà présents vont venir se lier. Ce déplacement des ions calcium et donc la rupture de liaisons Ca^{2+} -pectate vont affaiblir la paroi, d'où l'expansion irréversible de celle-ci, jusqu'à ce que les nouveaux complexes Ca^{2+} -pectate deviennent porteurs à leur tour. Le cycle se répète ensuite par nouvelle incorporation de pectates [Boyer, 2009].

I.3.5 Anisotropie de l'élongation

Si la cellule végétale était entourée d'une paroi de structure homogène (isotrope), son expansion par la pression de turgescence lui donnerait la forme d'une sphère. Or, soumise à une contrainte strictement isotrope, l'expansion de la paroi est anisotrope, comme l'illustre la Figure 1.23. D'un point de vue strictement géométrique, cette élongation longitudinale est

contre-intuitive : en effet, dans une cellule cylindrique en croissance, la contrainte transverse imposée par la pression est plus intense que la contrainte longitudinale [Schopfer, 2006].

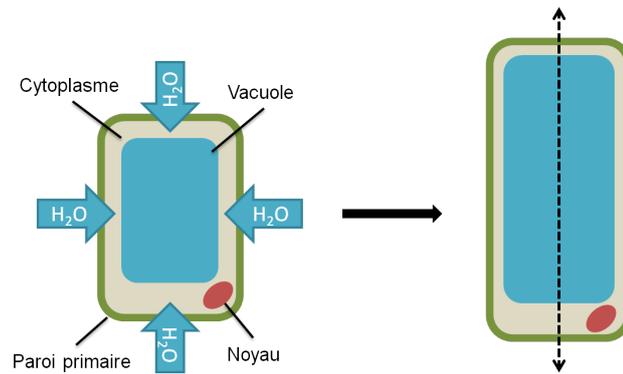


Figure 1.23 : Schéma représentatif de l'élongation anisotrope de la paroi

C'est en fait à l'orientation des microfibrilles de cellulose que la paroi doit cette capacité à s'allonger dans une direction préférentielle. Celles-ci sont déposées en faisceaux transverses à l'axe d'élongation, limitant l'expansion latérale et favorisant l'élongation axiale de la cellule. Cette orientation serait contrôlée par les faisceaux intracellulaires de microtubules corticaux, qui guideraient la synthèse des microfibrilles [Heath, 1974]. Cette hypothèse a été confirmée par des observations en microscopie confocale de CESA fluorescents, qui montrent que ces complexes se déplacent et suivent le même trajet que celui des microtubules lors de la polymérisation de la cellulose (Figure 1.24) [Paredez et al., 2006].

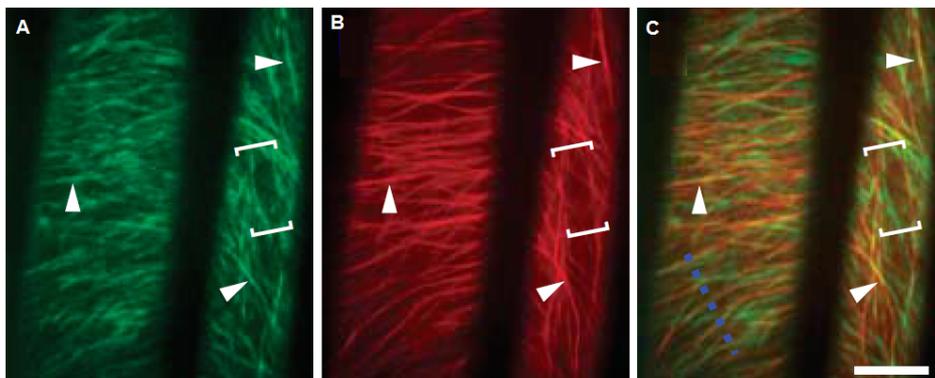


Figure 1.24 : Images de microscopie confocale d'une cellule d'*Arabidopsis*. (A) CESA. (B) Microtubules corticaux (C) Superposition. Les flèches blanches indiquent les zones de forte colocalisation des deux signaux [Paredez et al., 2006]

Néanmoins, d'autres travaux suggèrent une capacité d'auto-organisation de la cellulose en l'absence de microtubules [Himmelsbach et al., 2003][Sugimoto et al., 2003]. Des observations en microscopie confocale révèlent une organisation des CESA même lorsque les microtubules corticaux ne sont pas correctement polymérisés (Figure 1.25-A). Les auteurs de ces travaux suggèrent que l'orientation des microfibrilles résulte d'une limitation spatiale lors de leur

synthèse [Emons et al., 2000]. Concrètement, les CESA pouvant se déplacer uniquement au sein de la membrane plasmique (leur mouvement étant initié par la poussée que provoquent les forces de cristallisation des MFC), et les MFC étant apposées directement contre la surface de la membrane plasmique, le faisceau de MFC s'apparenterait à un ruban que l'on enroule en une seule couche à la surface d'un cylindre (Figure 1.25-B). Ainsi, l'angle γ formé entre l'orientation du ruban et l'axe du cylindre dépendrait uniquement de la densité de CESA actifs au sein de la membrane plasmique, de l'espacement entre les MFC et de la géométrie de la cellule.

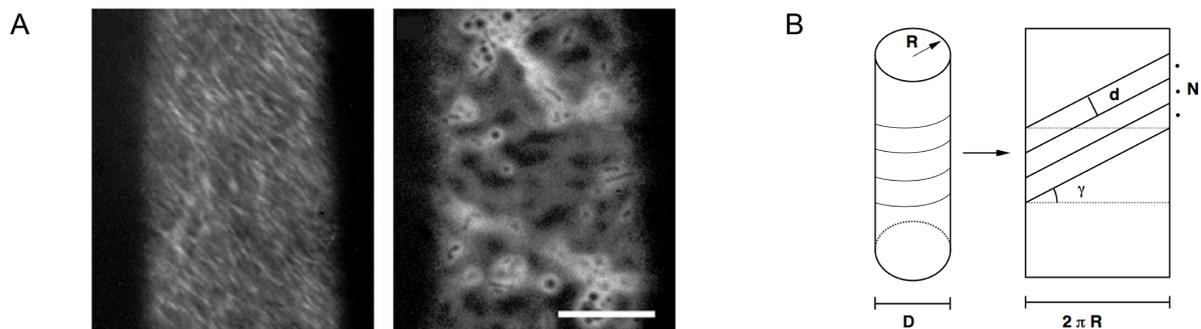


Figure 1.25 : (A) Images de microscopie confocale de CESA (gauche) et de microtubules corticales dépolymérisées (droite). D'après [Emons et al., 2007] (B) Schéma représentatif de la disposition des microfibrilles autour d'une cellule D'après [Mulder et al., 2001]

Les microfibrilles se réorganisent pendant la croissance en se réorientant progressivement par rotation dans le sens de l'axe d'élongation (Figure 1.26) [Anderson et al., 2010]. Ce processus de réorientation serait passif et simplement provoqué par la pression de turgescence, favorisé par l'action d'agents de relâchement de la paroi (cf Tableau 1.3) [Cosgrove, 2005].

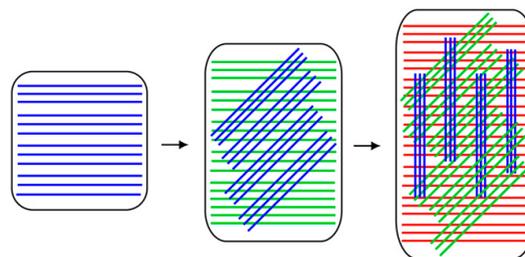


Figure 1.26 : Schéma représentatif de la rotation des microfibrilles de cellulose durant l'élongation cellulaire D'après [Anderson et al., 2010]

Cet état de l'art sur la paroi primaire des cellules végétales nous aura permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs zones d'ombres, notamment concernant l'architecture de la paroi et la façon dont celle-ci est modifiée lors de la croissance. La mise au point de systèmes artificiels simplifiés, permettant de s'affranchir de la complexité du vivant peut être un moyen d'obtenir des informations structure/propriétés pertinentes : c'est l'approche biomimétique.

I.4 Systèmes modèles de paroi primaire

Du grec *bios*, vie, et *mimésis*, imitation, le biomimétisme observe et s'inspire du vivant pour développer des procédés et/ou des matériaux fonctionnels. Dans le contexte du présent travail, nous allons nous intéresser aux systèmes biomimétiques de la paroi primaire des cellules végétales, qui sont autant d'outils permettant d'examiner séparément les contributions des différents constituants pariétaux en termes de propriétés mécaniques

I.4.1 Les nanocristaux de cellulose

Les nanocristaux de cellulose vont nous servir de briques élémentaires lors de la construction de nos systèmes biomimétiques de la paroi végétale ; il convient donc d'en présenter les caractéristiques générales dans cette partie consacrée aux systèmes modèles.

I.4.1.1 Préparation et morphologie

Désignés par les termes de « whiskers », « nanocristaux » voire de « nanofibrilles », les nanocristaux sont obtenus par hydrolyse acide de la cellulose native : les protons H^+ de l'acide vont diffuser préférentiellement dans les zones amorphes du polymère, et permettre ainsi une extraction des zones cristallines sous forme de bâtonnets de dimensions nanométriques (longueur comprise entre 20nm et 1 μm), et de facteur de forme (rapport de la plus grande sur la plus petite dimension) relativement élevé ; ces propriétés étant dépendantes de la source de cellulose (Figure 1.27).

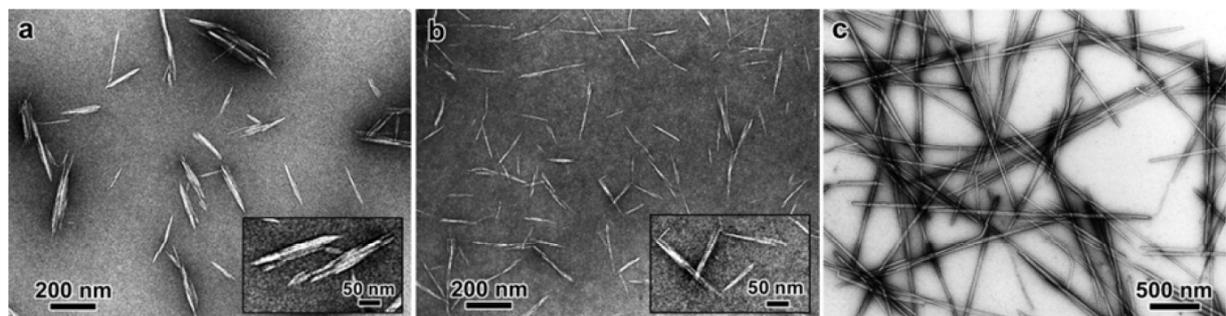


Figure 1.27 : Clichés de nanocristaux issus de différentes sources de cellulose observés en microscopie électronique en transmission. (A) Coton. (B) Avicel. (C) Tunicier. D'après [Elazzouzi-Hafraoui et al., 2009]

Aussi, en utilisant de l'acide sulfurique [Revol et al., 1992], des groupements esters sulfates chargés négativement vont se greffer à la surface des CNC, créant ainsi des répulsions électrostatiques entre eux et assurant la stabilité de la suspension colloïdale obtenue après hydrolyse (Figure 1.28) [Ranby, 1949][Marchessault et al., 1959].

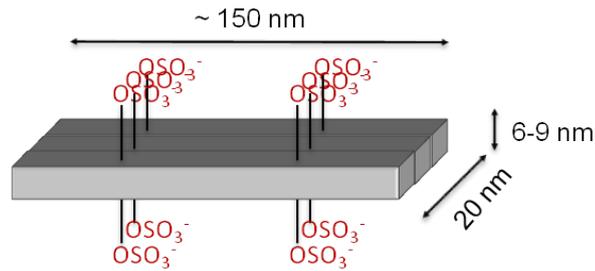


Figure 1.28 : Représentation schématique des CNC de coton et de leurs groupements esters sulfate

I.4.1.2 Auto-organisation en phase cristal liquide

Les nanocristaux de cellulose en suspension ont la particularité de présenter un comportement de type cristal liquide lyotrope [Marchessault et al., 1959]. En effet, en raison de leur facteur de forme élevé, les suspensions de nanocristaux vont opérer une séparation de phase au-dessus d'une concentration critique [Revol et al., 1992], en une phase supérieure isotrope et une phase inférieure anisotrope (Figure 1.29-B). Cette transition d'un liquide isotrope à une phase organisée dépend entre autres du facteur de forme des objets en suspension [Onsager, 1949], celui-ci variant selon la source de cellulose dans le cas des CNC. Au sein de la phase anisotrope, les CNC s'organisent sous la forme de cristaux liquides nématiques dont le vecteur directeur représentant leur orientation tourne d'un angle constant par rapport à l'axe cholestérique (Figure 1.29-A). Cette structure hélicoïdale, appelée chiral nématique ou cholestérique, possède des propriétés de biréfringence particulière. Elle est caractérisée par un pas P qui correspond à la distance entre deux plans après une rotation de 360° des CNC (Figure 1.29-A), les valeurs de pas variant entre quelques dixièmes et quelques dizaines de microns. Seule la propriété d'alignement des CNC dans une direction préférentielle peut présenter un intérêt d'un point de vue biomimétique, le caractère chiral n'étant pas présent au sein des parois primaires.

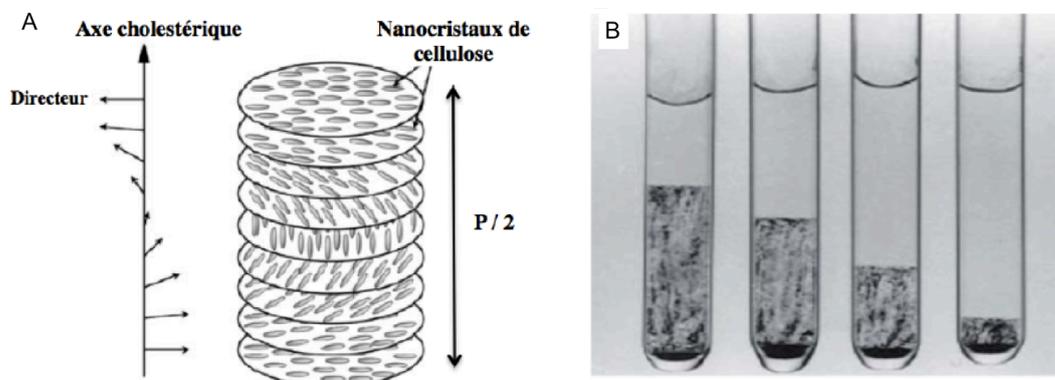


Figure 1.29 : (A) Schéma représentatif de l'organisation des CNC en phase cristal liquide cholestérique. (B) Visualisation de la variation de la fraction volumique de la phase anisotrope (phase inférieure) en fonction de la concentration en CNC (croissante de droite à gauche). D'après [Revol et al. 1992]

I.4.2 Mélanges et films composites

Plusieurs méthodes peuvent être distinguées dans l'élaboration *in vitro* d'analogues de paroi végétale. La première et la plus simple consiste à mélanger des polysaccharides extraits de la paroi, ce qui permet principalement d'étudier l'affinité d'un composant pour un autre la plupart du temps par la réalisation d'isothermes d'adsorption : les polymères sont simplement mélangés, l'ensemble centrifugé puis le surnageant analysé (pesée, composition en sucres). Le tableau 1.4 recense quelques exemples de mélanges xyloglucane/cellulose.

Tableau 1.4 : Analogues *in vitro* de paroi primaire obtenus par mélange simple.

Composition du mélange	Propriétés étudiées	Référence
XG de pois + cellulose de pois	Première mise en évidence d'interactions <i>in vitro</i> . Influence de la source de cellulose et de la compétition avec d'autres polysaccharides	[Hayashi et al., 1987]
XGO ⁹ de tamarin + cellulose microcristalline / amorphe / papier filtre	Influence du degré de polymérisation (DP) des XG	[Hayashi et al., 1994]
XG de tamarin + cellulose microcristalline Avicel	Influence du DP et du degré de galactosylation des XG, influence du pH	[Vincken et al., 1995]
XG de tamarin + cellulose microcristalline Avicel	Influence du degré de galactosylation des XG et la position des résidus	[de Lima et al., 2001]
XG de tamarin / haricot / copaïer + cellulose microcristalline Avicel	Influence du DP et du degré de fucosylation des XG	[Lima et al., 2004]
XG de rubus natifs et défucosylés + cellulose commerciale / cellulose de cellules rubus	Influence de la substitution des XG et de la cristallinité de la cellulose	[Chambat et al., 2005]
XG/XGO de tamarin /rubus + cellulose microcristalline / CNC / CNC désulfatés	Influence du DP, de la substitution et du degré d'acétylation des XG, de la cristallinité et de la charge de la cellulose	[Lopez et al., 2010]
XG de tamarin + CNC de coton	Isotherme d'adsorption, effet d'une endoglucanase, architecture du complexe	[Dammak et al., 2015]
	Cinétique de l'adsorption	[Villares et al., 2015]

Grâce à ces assemblages, la description de l'interaction cellulose/xyloglucane a pu être affinée par l'examen de divers paramètres dans le processus d'adsorption, comme la longueur du squelette de XG (au moins 5 résidus glucose pour que l'interaction ait lieu, l'affinité des XG pour la cellulose étant croissante avec son DP) ou encore la présence et l'arrangement de ses

⁹ XGO : oligomères de xyloglucanes

divers substituants. Cette approche par mélange de composants pariétaux a également été mise à profit pour montrer l'existence d'interactions cellulose/pectines [Agoda-Tandjawa et al., 2012, Zykwinska et al., 2005, 2007].

Une deuxième stratégie repose sur l'utilisation de cellulose bactérienne de type *Acetobacter xylinum*, l'ajout d'autres polysaccharides pendant la production de la pellicule de cellulose générant des films composites. Ces systèmes bactériens ont été employés pour caractériser l'interaction entre la cellulose et divers composants pariétaux : xyloglucanes [Whitney et al., 1995, 2000, 2006], glucomannanes et galactomannanes [Whitney et al., 1998], pectines [Chanliaud et al., 1999], arabinoxylanes [Martinez-Sanz et al., 2015]. Il est également possible avec cette méthode de générer des systèmes ternaires cellulose/xyloglucane/pectines [Chanliaud et al., 2002, Gu et al., 2014].

Ces travaux montrent que l'incorporation de xyloglucane [Whitney et al., 1999] ou de pectines [Chanliaud&Gidley, 1999] lors de la formation du film composite mène toujours à une diminution du module d'Young mais aussi à une augmentation de l'extensibilité, les matériaux incluant uniquement de la cellulose étant rigides mais cassants.

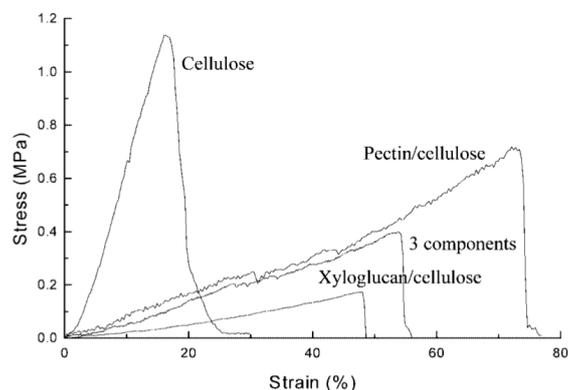


Figure 1.30 : Courbes de contrainte-déformations de différents composites obtenues par test de traction uniaxe D'après [Chanliaud et al., 2002]

Une autre façon d'obtenir des analogues artificiels de paroi consiste à produire les films de cellulose bactérienne et à les mélanger a posteriori avec d'autres polysaccharides [Cybulska et al., 2009, Dammström et al., 2005, de Souza et al., 2013]. Ces travaux ont notamment souligné l'importance du degré d'hydratation des composites en termes de propriétés mécaniques, leur module d'Young ayant tendance à diminuer lorsque le taux d'humidité augmente.

I.4.3 Films multicouches

Enfin, nous recenserons une troisième stratégie d'élaboration d'analogues de paroi végétale issue de la science des polymères et qui nous intéresse tout particulièrement pour ce travail : la méthode couche-par-couche.

I.4.3.1 Généralités sur la méthode couche par couche

Introduite dans les années 60 [Iler, 1966] puis développée par Decher dans les années 90 [Decher, 1992 ; 1997] la technique d'assemblage couche-par-couche (layer-by-layer ou LbL) est une méthode permettant de générer des films stratifiés d'épaisseur contrôlée, sans étape de modification chimique. La construction de tels films s'effectue par des séquences d'adsorption successives de deux composés ayant une affinité l'un envers l'autre sur un substrat préalablement traité (Figure 1.31). Ce mode opératoire rend donc possible l'élaboration de films nanostructurés, dont l'architecture est contrôlée dans la direction perpendiculaire au substrat.

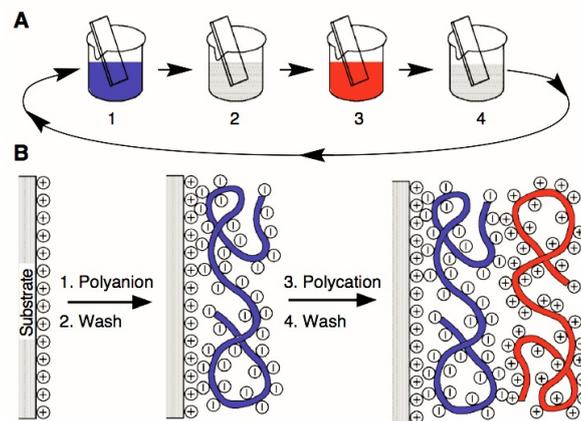


Figure 1.31 – (A) Schéma représentatif de la construction d'un film multicouche par trempage. Les étapes 1 et 3 représentent respectivement l'adsorption du polyanion et du polycation, les étapes 2 et 4 correspondent aux rinçages. (B) Représentation schématique des interactions entre les couches successives de polyélectrolytes. D'après [Decher, 1997]

Si les premiers films multicouches ont été construits avec des polyélectrolytes synthétiques, la gamme de composés employés s'est considérablement élargie depuis, jusqu'à inclure entre autres des biomacromolécules (polysaccharides notamment) ainsi que des particules colloïdales. Cette versatilité s'explique par le fait que ces films multicouches peuvent être assemblés autrement que par le biais d'interactions électrostatiques : les liaisons hydrogène, les interactions hôte-invité, les interactions hydrophobes ou encore les forces de van der Waals peuvent être mises à profit dans la construction de films. Le lecteur peut se référer aux nombreuses revues et ouvrages qui ont été écrits sur le sujet pour appréhender la diversité des matériaux élaborés avec cette technique [Ariga et al., 2012, Decher et al., 2012, Fakhrullin et al., 2012, Johal et al., 2007, Pauthe et al., 2014, Such et al., 2011].

I.4.3.2 Techniques de dépôt

En pratique, la manière la plus simple de déposer les composants sur le substrat est présentée en Figure 1.32-A, et consiste à tremper successivement le support dans des solutions/suspensions contenant les molécules d'intérêt : c'est le trempage (*dip-coating*). La durée de trempage doit être suffisamment longue (environ une vingtaine de minutes) pour que les espèces aient le temps de diffuser jusqu'à la surface pour s'y déposer. Les trempages sont ponctués d'étapes de rinçage permettant d'éliminer la matière non adsorbée, et peuvent être accompagnées de séchages intermédiaires.

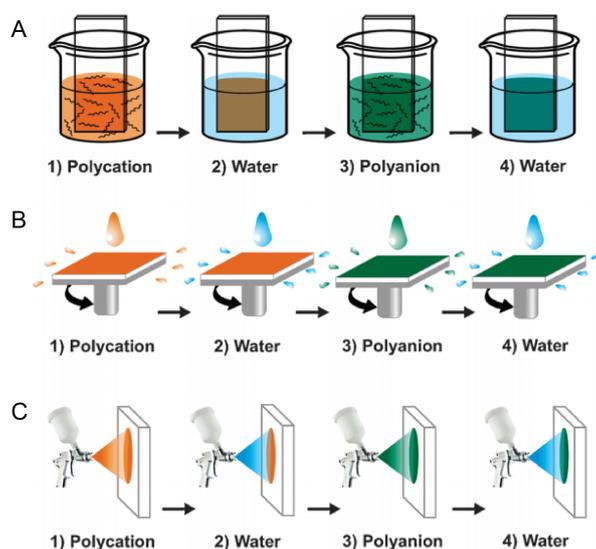


Figure 1.32 : Représentation schématique des procédés de fabrication des films multicouches. (A) Trempage (*dip-coating*) (B) Enduction par centrifugation (*Spin-coating*) (C) Pulvérisation (*Spraying*). D'après [Li et al., 2012]

Bien que simple à mettre en oeuvre, cette première méthode est relativement coûteuse en temps, d'où l'essor de deux autres techniques, l'enduction par centrifugation (*spin-coating*) [Cho et al., 2001] et la pulvérisation (*spraying*) [Schlenoff et al., 2000]. Dans les deux cas, les temps d'adsorption ne sont que de quelques secondes. A la différence du trempage dans lequel la construction du film repose uniquement sur un équilibre thermodynamique, des forces mécaniques rentrent aussi en jeu lors de la centrifugation ou de la pulvérisation (cisaillement, force centrifuge) et peuvent influencer l'architecture de l'assemblage.

I.4.3.3 Croissance des films

Les films élaborés avec la méthode couche par couche peuvent être distingués en deux catégories selon leur type de croissance :

- croissance linéaire : l'épaisseur du film est proportionnelle au nombre de couches, et il y a interpénétration des composants seulement entre couches adjacentes ;
- croissance non linéaire (dite exponentielle) : au moins un des composants diffuse librement dans les couches inférieures, d'où une quantité de matière adsorbée qui augmente plus rapidement qu'en croissance linéaire.

I.4.3.4 Films multicouches biomimétiques de la paroi végétale

De nombreux systèmes multicouches incluant la cellulose existent et ont déjà été passés en revue dans la littérature [Martin et al., 2014]. Nous nous bornerons ici à recenser les films multicouches comprenant au moins deux composants issus de la paroi végétale, qui sont présentés dans le tableau ci-dessous.

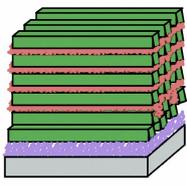
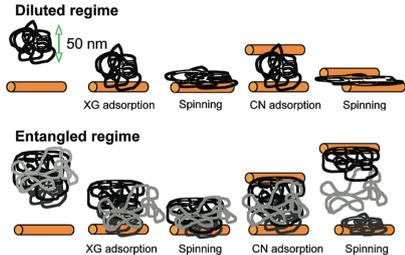
Tableau 1.5 : Films multicouches biomimétiques de la paroi végétale rencontrés dans la littérature

Systeme	Technique	Référence
CNC / XG	trempage	[Jean et al., 2009]
	enduction par centrifugation	[Cerclier et al., 2010, 2011]
Extensine / Pectines	trempage	[Valentin et al., 2010]
CNC / Xylane cationisé	enduction par centrifugation	[Dammak et al., 2013]

Etant donné que le cas des films de CNC/XG nous intéresse plus particulièrement, le tableau 1.6 se propose de confronter un peu plus en détail les caractéristiques des deux systèmes CNC/XG recensés dans la littérature. La concentration de la solution de XG est apparu comme étant un paramètre déterminant dans la construction des couches [Cerclier et al., 2010]. A haute concentration (en régime enchevêtré et dilué), la croissance atteint un plateau après 2 ou 4 bicouches alors que la croissance est illimitée pour de faibles concentrations (régime dilué non enchevêtré). En effet, à faible concentration, les chaînes de XG forment des pelotes individualisées pouvant interagir à la fois avec les couches inférieures et supérieures de CNC. En revanche, à forte concentration, les pelotes de XG sont très enchevêtrées, la probabilité pour qu'une chaîne de polymère interagisse avec la couche inférieure et supérieure à la fois devenant beaucoup plus faible. De plus, ces pelotes enchevêtrées sont plus facilement entraînées lors du rinçage, d'où l'impossibilité de faire croître les films.

Si l'on compare les films obtenus par trempage à ceux élaborés par enduction centrifuge pour une même concentration de XG (0.1% p/p), on constate que l'incrément par bicouche est sensiblement le même dans les deux cas, suggérant une adsorption des CNC en monocouche dense. On trouve néanmoins dans la littérature un exemple d'adsorption avec un incrément de 16 nm suggérant plutôt une double couche, cette différence étant attribuée au mode de dépôt combiné à la concentration en CNC (de 0.5% p/p dans ce cas) [Cerclier et al., 2011].

Tableau 1.6 : Films multicouches CNC/XG.

Référence	[Jean et al., 2009]	[Cerclier et al., 2010]			
Méthode de dépôt	trempage (avec rinçage intermédiaire)	enduction par centrifugation (sans rinçage intermédiaire)			
Densité de charge des CNC (e/nm^2)	0.58	0.04			
Concentration en CNC (% p/p)	7	0.1			
Concentration en XG (% p/p)	0.1	0.05	0.1	0.5	1
Incrément par bicouche (nm)	7-9	10.6	10.2	2.5	11.75
Rugosité (nm)	3.5	5.5			
Architecture	 <p>Alternance de monocouches denses de CNC (en vert) et de fines couches de XG (en rouge)</p>	 <p>Selon la concentration en XG, adsorption d'une couche plus ou moins épaisse de XG (en gris/noir) sur des monocouches de CNC (en orange)</p>			

En conclusion de cette partie dédiée aux films minces élaborés couche-par-couche, la principale limitation de cette technique est l'emploi d'un substrat sur lequel le film adhère, ce qui peut s'avérer limitant pour la caractérisation de ce dernier. Loin d'être une fatalité cependant, ce problème a pu être surmonté par diverses stratégies (emploi de sous-couches dites « sacrificielles » ou de substrats hydrophobes pour limiter l'adhésion du film) pour aboutir à la génération de films auto-supportés (*free-standing films*) [Caridade et al., 2013, Larkin et al., 2010, Ono et al., 2006].

Nous allons voir par la suite qu'un des points forts de l'assemblage couche-par-couche est qu'il est suffisamment robuste pour être transposé à des substrats sphériques, ce qui nous intéresse directement dans le cadre de notre démarche biomimétique.

I.4.4 Capsules biomimétiques

Dans cette partie, nous nous proposons de passer en revue les quelques systèmes modèles de paroi primaire tridimensionnels, car aucun des assemblages *in vitro* présentés précédemment n'intègre la géométrie de la cellule végétale sur laquelle s'appuie la paroi primaire. D'un point de vue « matériaux », la cellule végétale peut s'apparenter à une capsule à coeur liquide recouverte de couches de polymères et dans l'optique de mettre au point des objets biomimétiques, les émulsions peuvent constituer un bon point de départ.

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. Dans une émulsion simple, le liquide se trouvant sous forme de gouttelettes constitue la phase dispersée, au sein du second liquide appelé phase continue. Ces émulsions sont de types huile dans eau (H/E) ou eau dans huile (E/H). Thermodynamiquement instables, ces systèmes nécessitent l'emploi d'un stabilisant, dit émulsifiant, qui peut se présenter sous la forme de tensioactifs, de macromolécules ou de particules solides. Dans ce dernier cas, on parle plus spécifiquement d'émulsion de Pickering, la stabilisation ayant lieu par adsorption de particules à l'interface huile/eau (Figure 1.33).

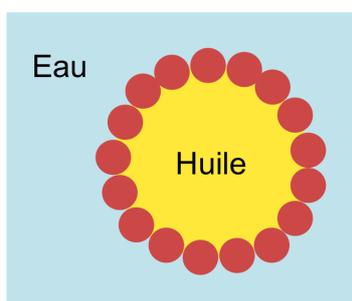


Figure 1.33 : Schéma représentatif de la stabilisation d'émulsion par des nanoparticules solides (en rouge).

Les premiers essais de stabilisation d'émulsions par de la cellulose ont utilisé cette dernière sous forme de microfibrilles (5-10 μm de long), et font état de la formation d'un réseau de MFC autour de gouttes d'huiles (ce qui les empêche de coalescer) plutôt que de gouttelettes individualisées [Ougiya et al., 1997, Oza et al., 1986]. Les autres études que l'on recense sur le sujet emploient des dérivés cellulosiques chimiquement modifiés : cellulose acétylée, silylée [Andresen et al., 2007, Blaker et al., 2009], ou partiellement O-acétylée et O-phthaloylée (phtalate d'hypermellose) [Wege et al., 2008].

Les travaux de Kalashnikova ont été les premiers à rapporter la stabilisation d'émulsions de Pickering par des nanocristaux de cellulose : des gouttes d'hexadécane et de styrène ont pu être dispersées dans l'eau à l'aide de nanocristaux issus de l'hydrolyse de cellulose bactérienne par l'acide chlorhydrique (BCNs : bacterial cellulose nanocrystals) (Figure 1.34) [Kalashnikova et al., 2011].

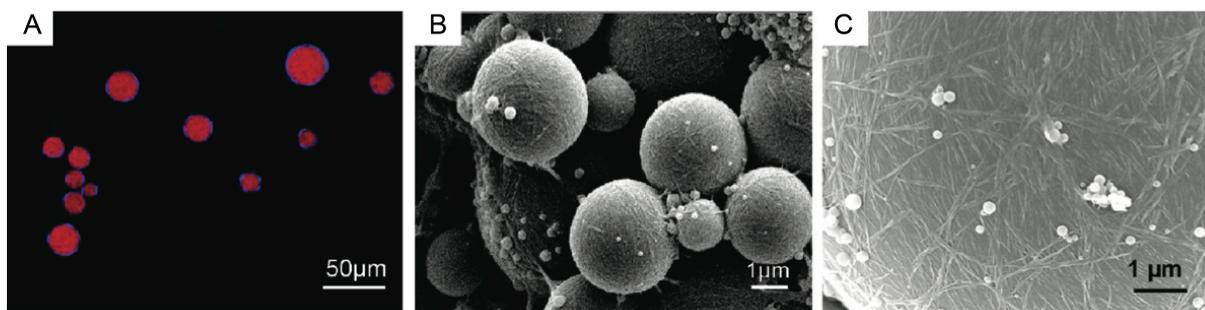


Figure 1.34 : (A) Cliché de microscopie confocale des gouttes d’huile marquées au BODIPY564/570 (en rouge) recouvertes de CNC marqués au calcofluor (en bleu) (B) Cliché MEB des gouttes d’huile recouvertes de CNC (C) Zoom sur la surface des gouttes. D’après [Kalashnikova et al., 2011]

Il est à noter que seuls les nanocristaux non chargés (0.017 e/nm^2) ont permis d’obtenir des émulsions stables : les CNCs classiquement obtenus par hydrolyse à l’acide sulfurique ont une densité de charge surfacique trop élevée, d’où une mouillabilité moindre qui nuit au mécanisme de stabilisation par adsorption. Dans la lignée de ces observations, les travaux de Svagan relatent l’élaboration d’émulsions d’hexadécane stabilisées par un mélange de nanofibres (NFC, de longueur inférieure à $1 \text{ }\mu\text{m}$) et de nanocristaux de cellulose non chargés (0.031 e/nm^2) (Figure 1.35). Cette paroi mixte de NFC/CNC est réticulée par un diisocyanate aromatique, ce qui confère aux capsules ainsi formées un module d’Young de 4.8 GPa pour une charge de 17% (p/p) en cellulose [Svagan et al., 2014].

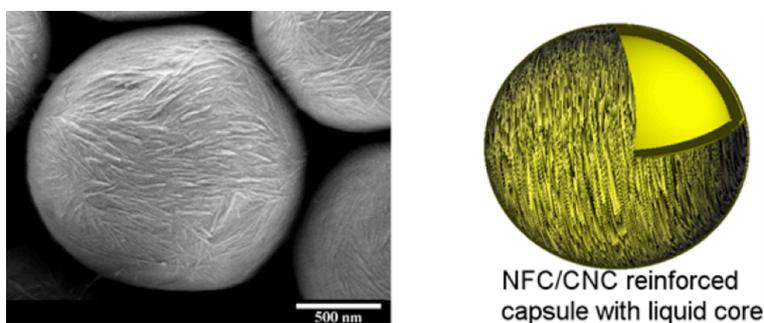


Figure 1.35 : Cliché MEB d’une capsule à coeur liquide renforcée par un mélange réticulé de NFC/CNC D’après [Svagan et al., 2014]

D’autres travaux se sont intéressés à l’influence du facteur de forme des nanocristaux sur la dispersion des gouttes d’huile, montrant que des cristaux plus longs ont un degré de recouvrement moindre et aboutissent à la formation d’un réseau de gouttes (comme dans le cas des MFC évoqué plus haut) [Kalashnikova et al., 2013].

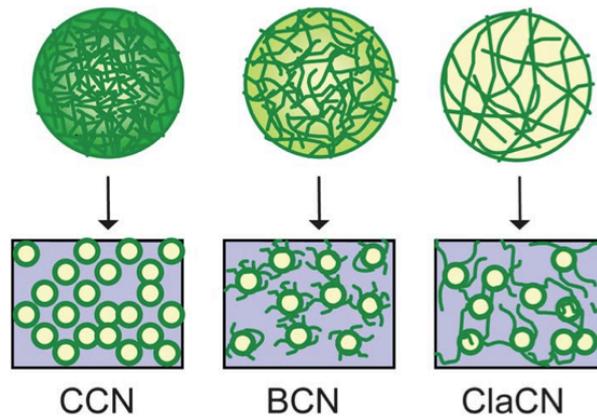


Figure 1.36 : Schéma représentatif d'émulsions de Pickering stabilisées avec des nanocristaux issus de trois sources différentes de cellulose : cellulose de coton (CCN), cellulose bactérienne (BCN), cellulose de l'algue *Cladophora rupestris* (ClaCN) D'après [Kalashnikova et al., 2013]

Les exemples évoqués précédemment ne mettent en jeu qu'un seul composant pariétal : la cellulose. Nous avons vu cependant que celle-ci était capable d'interagir *in vitro* avec l'hémicellulose la plus courante, le xyloglucane. D'autre part, l'approche couche-par-couche a depuis longtemps pu être transposée à des substrats sphériques [Donath et al., 1998].

Ces informations laissent logiquement imaginer la mise au point de capsules multicouches exploitant cette interaction spécifique cellulose/xyloglucanes pour la mise au point de modèles de paroi végétale. Cette stratégie a effectivement été mise en place lors de précédents travaux de thèse au sein de notre laboratoire, prenant comme substrat de départ des émulsions d'huile (octaméthylcyclotétrasiloxane, noté D4) dans l'eau [Bailly, 2012] (Figure 1.37-A). Utilisant des CNC chargés (obtenus par hydrolyse à l'acide sulfurique) combinés à un tensioactif cationique (le chlorure de cétylepyridinium, noté CPC), des émulsions de Pickering stables ont pu être formées et servir de support au dépôt de couches successives de xyloglucanes et de nanocristaux de cellulose, et ce jusqu'à une quinzaine de bicouches (Figure 1.37-B,C).

Le comportement élastique de ces objets a pu être caractérisé par flambage, par observation de leur morphologie de dégonflement (Figure 1.37-D). Cette étude n'a néanmoins pas permis de déterminer directement le module d'Young de la paroi des capsules, estimant que celui ci devait être de l'ordre de 4 GPa à l'état sec, valeur obtenue par des tests de traction sur des films composites CNC/XG.

En effet, si la goutte d'huile constitue un substrat suffisamment robuste (du fait de la tension interfaciale huile/eau) pour permettre les dépôts couche-par-couche, il n'en reste pas moins un coeur incompressible qui pose problème lorsqu'il s'agit d'étudier les propriétés mécaniques de la paroi : l'étude de la déformation par pression osmotique n'a pas été possible

sur ces capsules, la dissolution du coeur huileux entraînant la destruction de la paroi CNC/XG. Nous avons également vu au paragraphe I.3.2.2 qu'il n'est pas si simple de dissocier la contribution d'une paroi à celle de la pression interne lors de tests d'indentation.

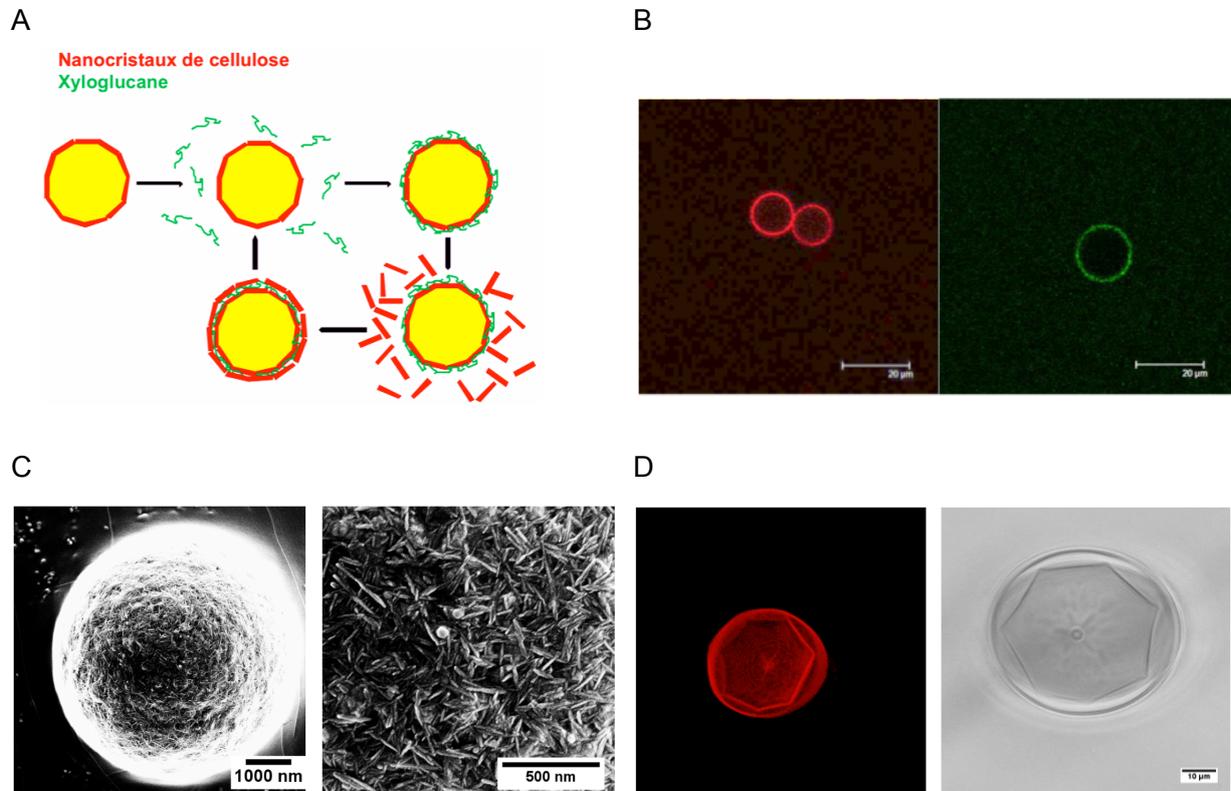


Figure 1.37 : (A) Représentation schématique du processus de dépôt de CNC et de XG sur les gouttes d'huile. (B) Clichés de microscopie confocale des capsules recouvertes de CNC (en rouge) et de XG (en vert). (C) Cliché MEB d'une capsule à 10 bicouches terminée par une couche de CNC. (D) Reconstruction 3D d'une capsule de 5 bicouches déformée par flambage. D'après [Bailly, 2012]

Pour ces raisons, nous avons décidé d'utiliser un autre substrat pour construire nos modèles de paroi végétale : les vésicules lipidiques sont apparues comme le support idéal dans le cadre de notre démarche biomimétique, étant donné qu'elles constituent une version simplifiée de membrane cellulaire.

II Les vésicules lipidiques : un modèle de membrane biologique

Composée de protéines, de lipides et de glucides, la membrane plasmique sépare l'intérieur de la cellule du milieu extérieur. Les lipides y sont organisés en une double couche au travers de laquelle sont insérées des protéines (Figure 1.38), l'ensemble ayant une épaisseur aux alentours de 8 nm. Cellules animales et végétales partagent ce même plan d'organisation

membranaire dit en bicouche phospholipidique [Gorter et al., 1927]. La membrane cellulaire est un objet fluide : les lipides et les protéines y sont en perpétuel mouvement, ce qui est essentiel au bon fonctionnement cellulaire car la membrane doit pouvoir se déformer, ouvrir des pores et les refermer lors de nombreux processus biologiques (transport de substances, adhésion, endocytose...).

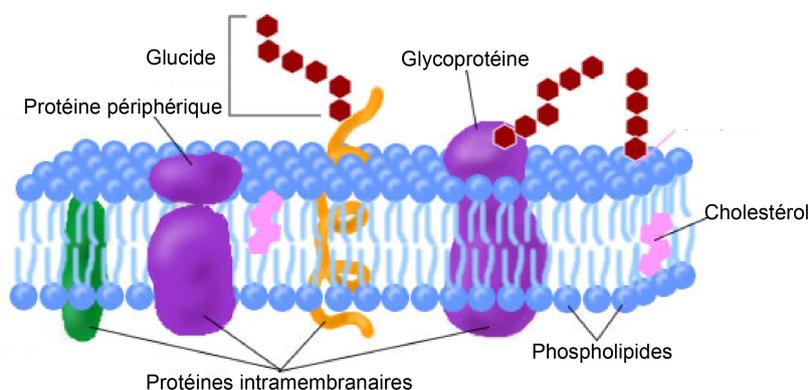


Figure 1.38 : Représentation schématique de la structure d'une membrane cellulaire (source : cours-pharmacie.com)

L'étude de la dynamique membranaire a été relancée par le développement des membranes artificielles dans les années 90 ; les bicouches et les vésicules lipidiques assemblées *in vitro* sont devenus les systèmes modèles incontournables dans la physique des membranes biologiques [Bangham et al., 1974]. Dans cette partie, nous nous attacherons à présenter les principales caractéristiques physico-chimiques de ces objets, pour nous attarder ensuite sur les différentes techniques de modifications de vésicules déjà décrites dans la littérature et passer en revue les stratégies qui ont été adoptées pour faire de ces systèmes simples un début de « cellules artificielles ».

II.1 Caractéristiques générales des membranes lipidiques

La description générale des différents types de lipides, de leur faculté d'auto-assemblage, ainsi que les informations relatives à la structure des membranes lipidiques et de leur modes de déformation se trouvent en Annexe A. Nous ne présenterons ici que les propriétés physico-chimiques des vésicules qui nous concerneront plus directement dans l'élaboration et la déformation d'analogues de paroi.

II.1.1 Les différents types de vésicules lipidiques

L'intérêt porté aux membranes cellulaires s'est heurté à la complexité de celles-ci, d'où l'avènement de modèles simplifiés tels que les vésicules lipidiques. Celles-ci ont permis d'étudier de nombreux phénomènes biophysiques comme la fusion, la reconnaissance moléculaire, l'adhésion cellulaire et le trafic membranaire. Leur utilisation dépasse d'ailleurs le cadre de la

recherche fondamentale, étant donné que les vésicules figurent en bonne place dans de nombreuses formulations industrielles : la cosmétique, l'agro-alimentaire, la pharmacologie sont autant de domaines dans lesquels leur faculté d'encapsulation de substances est régulièrement mise à profit [Lasic, 1998]. On distingue plusieurs sortes de vésicules, en fonction de leur taille et de leur caractère unilamellaire. Ces différentes familles sont répertoriées dans le tableau 1.7.

Tableau 1.7 : Nomenclature des différents types de vésicules lipidiques

Nom	Taille
Vésicules multilamellaires (<i>multilamellar vesicles</i> , MLV)	0.5 – 10 μm
Petites vésicules unilamellaires (<i>small unilamellar vesicles</i> , SUV ou liposomes)	2 -100 nm
Vésicules unilamellaires de grande taille (<i>large unilamellar vesicles</i> , LUV)	100 - 500 nm
Vésicules géantes unilamellaires (<i>giant unilamellar vesicles</i> , GUV)	0.5 -100 μm

Les vésicules multilamellaires sont des assemblages de plusieurs bicouches concentriques séparées par des couches d'eau : on parle souvent de vésicules en « oignon », le volume encapsulé étant faible par rapport au volume de la vésicule. Leur structure est schématisée sur la Figure 1.39.

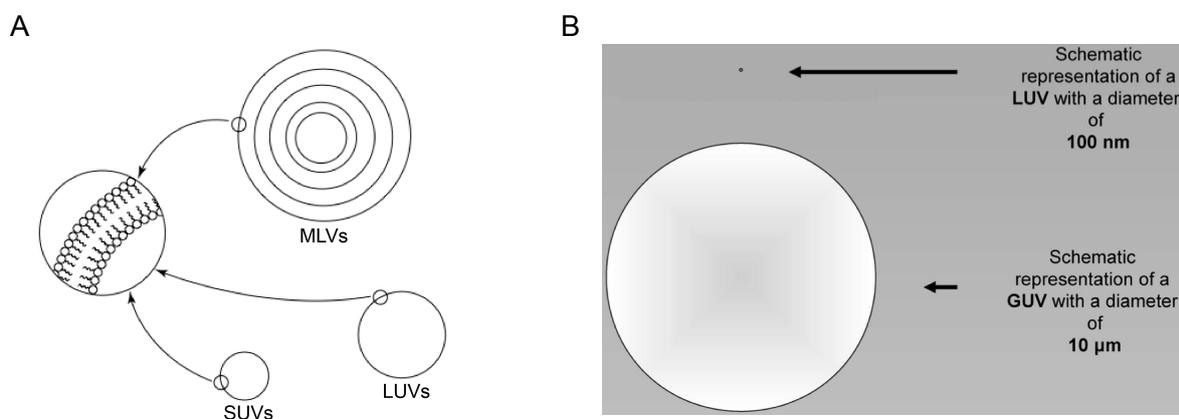


Figure 1.39 (A) Représentation schématique de la structure des vésicules unilamellaires et multilamellaires [Lasic, 1998] (B) Représentation schématique d'une GUV et d'une LUV à l'échelle. D'après [Walde et al., 2010].

Les SUV, LUV et GUV ont toutes une structure unilamellaire et ne diffèrent que par leur taille. Ce paramètre est néanmoins d'importance quant aux applications respectives de ces trois types de vésicules. Les dimensions colloïdales des SUV et des LUV en font de parfaits candidats pour vectoriser des substances actives (*drug delivery*), mais leur confèrent une courbure trop élevée (qui affecte l'empilement des lipides) pour qu'ils servent de modèle de membrane. Ainsi, pour imiter une cellule, les GUV apparaissent comme le système le plus

adapté, le caractère multilamellaire des MLV apportant uniquement une complication structurale sans intérêt d'un point de vue biomimétique [Menger et al., 1998] .

II.1.2 Perméabilité

Rappelons enfin que les membranes lipidiques en phase fluide sont des objets semi-perméables. Leur perméabilité dépend du type de phospholipides présents et de la nature des molécules dont on étudie la diffusion. Celle-ci est évaluée par un coefficient P, qui exprime le volume de molécules pouvant traverser une unité de surface de membrane par unité de temps. Ce coefficient peut être mesuré expérimentalement par aspiration à la micropipette, ou par dégonflement osmotique des vésicules [Boroske et al., 1981].

Tableau 1.8 Valeurs d'aire par lipide et de perméabilité à l'eau de membranes lipidiques à 30°C [Mathai et al., 2008]

Phospholipide	Aire/Lipide (\AA^2)	Perméabilité ($\times 10^{-3}\text{cm.s}^{-1}$)
DLPC	63.2 ± 0.5	10.4 ± 0.50
DMPC	60.6 ± 0.5	8.3 ± 0.76
POPC	68.3 ± 1.5	13.0 ± 0.44
DOPC	72.4 ± 0.5	15.8 ± 0.58
DOPC + 10% cholestérol	71.4 ± 1.0	14.5 ± 0.57
DOPC + 20% cholestérol	67.5 ± 2.0	11.5 ± 0.58
DOPC + 40% cholestérol	64.0 ± 1.0	6.8 ± 0.57

Ce tableau rapporte également quelques valeurs de perméabilité pour des membranes formées par mélange de lipides avec du cholestérol : présent uniquement dans les cellules animales, le cholestérol a pour effet de condenser les lipides (on observe une diminution de l'aire par lipide avec l'augmentation de la fraction en cholestérol), réduisant ainsi la perméabilité de la membrane [Edholm et al., 2005]. Notons que la perméabilité est aussi considérablement réduite lors de la transition en phase gel, qui comme nous l'avons évoqué précédemment, se caractérise par une organisation des lipides plus compacte.

Les petites molécules polaires non chargées (eau, formamide, urée) et les molécules hydrophobes (O_2 , CO_2 ...) peuvent diffuser à travers la membrane, ce qui n'est pas le cas des molécules polaires plus grosses (comme le glucose et le saccharose) ni des ions (Figure 1.40).

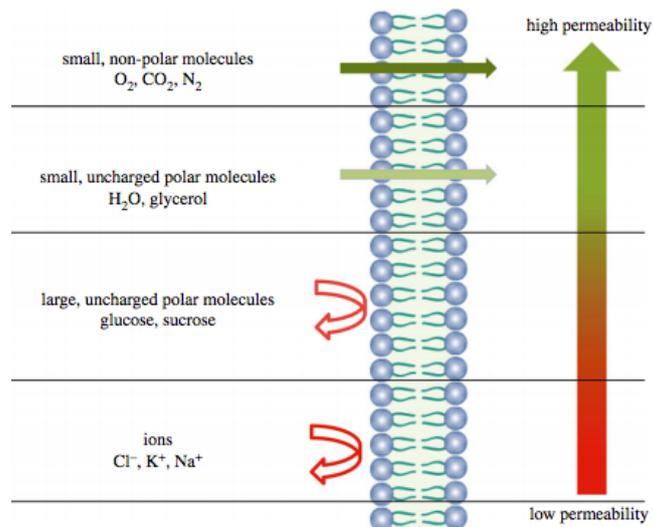


Figure 1.40 : Représentation schématique de la perméabilité des membranes lipidiques à différentes espèces chimiques. D'après [Monteiro et al., 2014]

Considérons une espèce chimique incapable de traverser la membrane : si celle-ci ne se trouve pas à la même concentration de part et d'autre de la bicouche, cela génèrera une différence de potentiel chimique. Celle-ci aura tendance à être équilibrée par un mouvement des molécules d'eau du compartiment le plus concentré vers le plus dilué, d'où l'apparition d'une pression osmotique s'exerçant sur la membrane.

Le fait de pouvoir appliquer une pression osmotique contrôlée sur les vésicules est l'une des principales raisons motivant leur utilisation comme support de construction de capsules biomimétiques dans notre travail. Le contenu des vésicules étant fixé au moment de leur formation, il est par la suite très simple d'appliquer une pression déterminée, par ajout de saccharose ou de glucose au milieu extérieur. Les vésicules soumises à ce type de stimuli se déforment en se dégonflant (ou en gonflant, selon le type de choc osmotique imposé), ce que nous verrons un peu plus en détail par la suite.

II.1.3 Déformation par choc osmotique

L'état de gonflement d'une vésicule peut être contrôlé en jouant sur la différence de concentration interne et externe d'une espèce chimique incapable de traverser la membrane. Une vésicule est donc sphérique à pression osmotique nulle, mais peut adopter toute une zoologie de formes lorsqu'elle se dégonfle (variation du volume à aire constante). Les diverses morphologies associées au dégonflement de vésicules sont observées expérimentalement depuis longtemps [Lipowski et al., 1995] et ont également fait l'objet d'études théoriques visant à les prédire.

Les formes d'équilibre sont calculées par minimisation de l'hamiltonien de Helfrich (noté H) qui exprime l'énergie totale d'une membrane fluide fluctuante et s'écrit :

$$H = \frac{\kappa}{2} \iint_S (c_1 + c_2 - c_0)^2 dA \quad (1.3)$$

Une large variété de formes d'équilibre peut être déterminée en fonction de différents paramètres comme par exemple le volume et la surface de la vésicule, la courbure spontanée de la membrane ou la température... Différents diagrammes de phases peuvent ainsi être obtenus selon le niveau d'élaboration du modèle utilisé.

II.1.3.1 Modèle de la courbure spontanée

Ce premier modèle prédit les formes dégonflées en minimisant l'hamiltonien de Helfrich pour un volume et une aire fixés. Pour décrire le taux de gonflement, un paramètre adimensionnel est introduit, le volume réduit v_R qui s'exprime comme le rapport entre le volume V de la vésicule sur le volume d'une sphère de même aire :

$$v_R = \frac{V}{\frac{4}{3}\pi R_0^3} \quad (1.4)$$

avec V le volume encapsulé par la vésicule et R_0 son rayon. Ce paramètre vaut 1 pour une vésicule sphérique et décroît lorsqu'elle se dégonfle.

Le modèle de la courbure spontanée considère simplement la membrane comme une surface élastique, et s'appuie sur les hypothèses suivantes : la bicouche est isotrope, fluide et les deux feuilletts qui la composent sont symétriques ; et la topologie de la vésicule ne peut pas changer. Ainsi, en minimisant l'hamiltonien pour différentes valeurs de volume réduit, plusieurs formes axisymétriques sont obtenues (Figure 1.41).

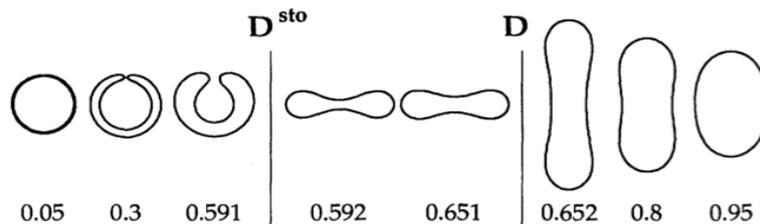


Figure 1.41 : Formes de vésicules dégonflées en fonction du volume réduit [Seifert et al., 1991]

Lorsque la vésicule se dégonfle, elle passe successivement d'une forme sphérique à un ellipsoïde allongé (prolate) puis aplati (oblate), pour adopter une forme discocyte puis

stomatocyte [Seifert et al., 1991]. Néanmoins, ce modèle ne permet pas de prévoir de formes non axi-symétriques qui ont pourtant pu être observées expérimentalement, d'où le besoin de modèles plus complexes pour une description du système plus fidèle à la réalité.

II.1.3.2 Modèle ADE

Le modèle de la courbure spontanée néglige le fait que les deux feuillet d'une bicouche lipidique ne contiennent pas forcément le même nombre de lipides. De plus, dans le cas d'une vésicule, l'aire de la face interne de sa membrane sera légèrement inférieure à celle de sa face externe. Il existe donc une différence d'aire intrinsèque ΔA_0 entre les deux feuillet, qui est fixée lors de la formation des vésicules [Miao et al., 1994, Mui et al., 1995]. Le modèle ADE (« Area Difference Elasticity ») tient compte de cette différence d'aire qui est à l'origine d'un terme élastique supplémentaire d'échelle d'énergie $\bar{\kappa}$ dans l'hamiltonien d'Helfrich :

$$H_{ADE} = \frac{\kappa}{2} \iint_S (c_1 + c_2 - c_0)^2 dA + \frac{\bar{\kappa}}{2} \frac{\pi}{Ad^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad (1.5)$$

Il en résulte un diagramme de phase plus complet, présenté sur la Figure 1.42.

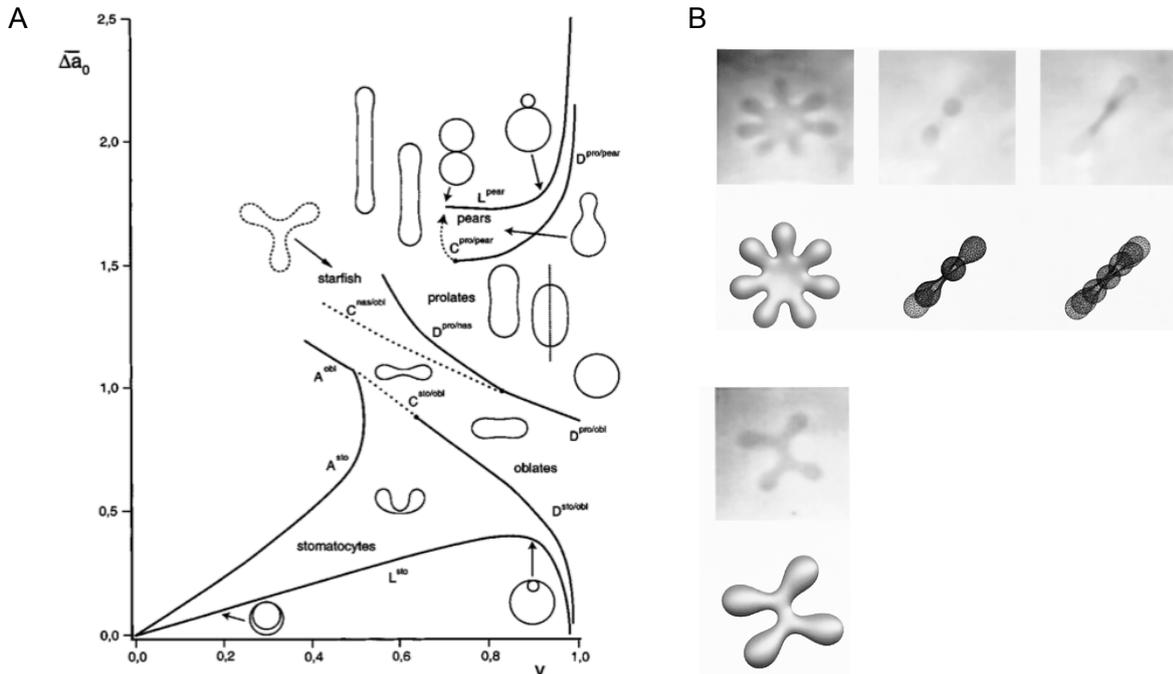


Figure 1.42 : (A) Diagramme de phase des formes de vésicules dégonflées calculées avec le modèle ADE [Dobereiner, 2000] (B) Clichés de microscopie en contraste de phase de vésicules non axisymétriques et modélisations numériques associées. D'après [Wintz et al., 1996]

Ce diagramme prévoit en effet des formes non axisymétriques comme les morphologies en « étoile de mer » qui ont été observées expérimentalement.

II.1.4 Propriétés électrostatiques de la membrane

Jusqu'à maintenant le fait que les membranes biologiques soient des objets électrostatiquement chargés n'a pas été évoqué. Il s'avère que cette charge joue un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques, comme l'adhésion, les interactions de la membrane avec d'autres cellules ou avec des molécules intra et extra-cellulaires. Même si l'on considère une simple bicouche modèle, les interactions électrostatiques sont à prendre en compte car elles ont une influence directe sur les propriétés structurales de la membrane (rigidité, dynamique, transitions de phases...) [Israelachvili, 1992].

En ce qui concerne le signe de la charge de surface, celle-ci dépend de la tête polaire des lipides utilisés pour former les vésicules. Considérons le cas d'un phospholipide ayant pour tête polaire la phosphatidylcholine (PC) comme ce sera notre cas par la suite. Il s'agit d'une tête polaire dite zwitterionique, car celle-ci comprend un groupement phosphate chargé négativement et un ammonium quaternaire chargé positivement (Figure 1.43-A). Pour autant, ce lipide ne peut pas être considéré comme rigoureusement neutre : en effet, si l'ammonium quaternaire conserve une charge positive de façon permanente, le groupement phosphate est plus ou moins dissocié en solution, selon un équilibre représenté sur la Figure 1.43-B.

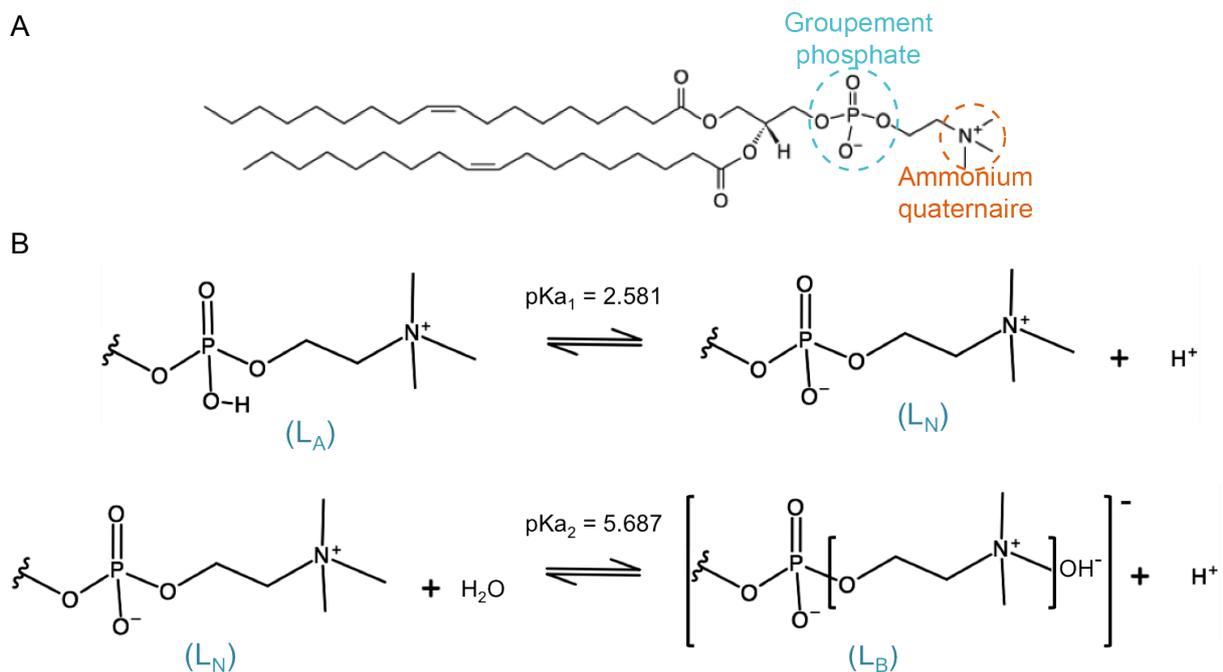


Figure 1.43 : (A) Structure chimique d'un phospholipide de type phosphatidylcholine. (B) Equilibres acido-basique du groupement phosphate, déplacé vers la gauche en milieu acide et vers la droite en milieu basique. D'après [Petelska et al., 2000]

Ainsi, en milieu acide, le groupement phosphate sera moins dissocié et donc peu ou pas chargé. La figure 1.44 présente l'évolution du degré de dissociation de groupement phosphate

en fonction du pH. Le pKa de cette dissociation a été estimé à 2,5 [Petelska&Figaszewski, 2000]. Cette même étude situe le point isoélectrique (point auquel il y a une parfaite compensation des charges) de la lécithine (un phospholipide de type PC) à pH=4,15. D'après ces données, la charge d'une membrane lipidique constituée de phospholipides à tête polaire PC peut être ajustée en jouant sur le pH.

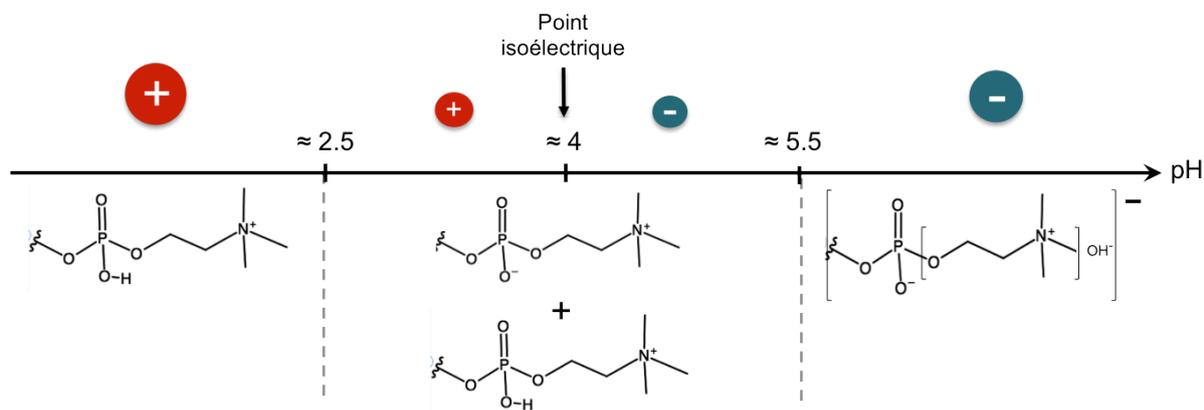


Figure 1.44 : Représentation schématique de la charge d'un phospholipide à tête polaire PC en fonction du pH.

En résumé, le sel et le pH sont des facteurs qui influencent fortement la charge de la membrane, ce qui n'est pas sans conséquence sur les propriétés structurales de celle-ci. L'effet de différents sels monovalents sur les bicouches lipidiques a été étudié expérimentalement mais aussi par simulations numériques, montrant que les ions affectent la mobilité des lipides et provoquent des réarrangements locaux dont l'ampleur dépend de leur taille et de leur charge [Sachs et al., 2004]. Il a été proposé que ces modifications structurales soient dues à la formation de complexes ions-lipides, les ions pénétrant la bicouche et venant se lier aux groupements carbonyles localisés à l'interface entre la chaîne hydrophobe et la tête polaire des lipides [Böckmann et al., 2003]. Des mesures de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) rapportent également une rigidification de la membrane en présence de sel [Pabst et al., 2007]. Gardons ainsi à l'esprit que la force ionique du milieu sera un paramètre à ne pas négliger lors de la formation de nos capsules.

II.2 Les vésicules composites

Si les vésicules constituent un modèle pertinent de la membrane cellulaire, elles n'en restent pas moins un système très simplifié, relativement éloigné de la complexité du vivant. Aussi, diverses modifications peuvent être apportées à ces objets pour se rapprocher des membranes biologiques et cette section se propose de décrire les différents moyens possibles pour y parvenir.

II.2.1 Modification du milieu interne

Bien que cela ne nous concerne pas directement dans ce travail, il est intéressant de relever que plusieurs travaux se sont employés à produire des modèles de cellules à partir de GUV en y incorporant des gels pour mimer le comportement visco-élastique du cytosquelette qui sous-tend la membrane cellulaire. Parmi eux, distinguons ceux de [Limozin et al., 2005] qui ont polymérisé des filaments d'actine à l'intérieur de vésicules géantes (Figure 1.45). Ils ont ensuite étudié les propriétés mécaniques de ces objets biomimétiques par une méthode proche de l'indentation, qui repose sur la manipulation de billes magnétiques et trouvé un module de courbure de $1000 k_B T$ soit un module d'Young d'environ 50 Pa.

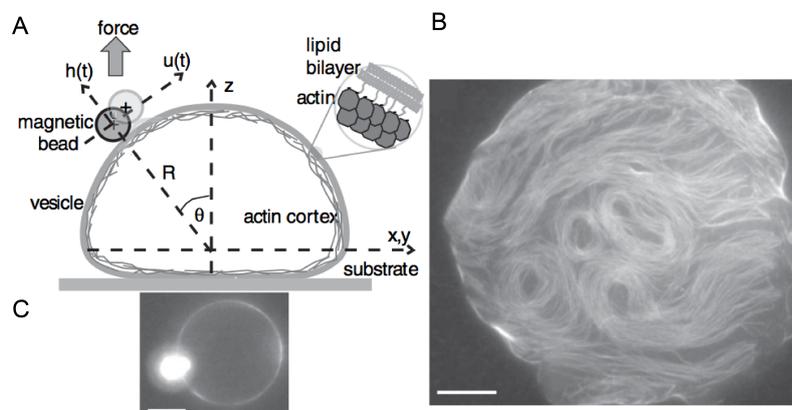


Figure 1.45 : (A) Représentation schématique en vue de côté d'une vésicule composite incorporant de l'actine en train d'adhérer à une surface. (B) Cliché de microscopie à fluorescence d'une vésicule composite, avec mise au point sur la zone d'adhésion et en (C) mise au point à l'équateur de la vésicule, la zone lumineuse correspond à la bille magnétique. D'après [Limozin et al., 2005]

Cette valeur est deux fois plus élevée que le module mesuré sur des cellules vivantes d'amibes [Merkel et al., 2000]. Nous profitons de cet exemple pour souligner au passage la différence d'ordre de grandeur significative avec le module d'Young de cellules végétales, généralement de l'ordre de plusieurs MPa et qui s'explique par l'absence de paroi chez les cellules animales. Nous ne citerons que deux autres exemples pour illustrer la fabrication de vésicules composites par incorporation de gel dans le milieu interne : les travaux de [Viallat et al., 2004] qui étudient le dégonflement sous pression osmotique de vésicules encapsulant un gel d'agarose, et ceux de [Campillo et al., 2009] dédiés à la caractérisation mécanique par aspiration à la micropipette de GUV remplies d'un gel de poly(NIPAM), un polymère thermosensible. Ces gel-GUV ont un module d'Young compris entre 0,5 et 25 Pa (le module augmentant avec le taux de réticulation du gel).

II.2.2 Modification de la membrane

Le fort intérêt que suscitent les liposomes pour la vectorisation de molécules est à l'origine d'une littérature abondante dédiée à la modification de SUV par greffages chimiques ou adsorption de polymères. C'est pourquoi, même si nous nous intéressons plutôt aux GUV comme modèles de membrane cellulaire, il serait dommage de passer sous silence les très nombreux exemples de vésicules modifiées que fournissent les domaines de la pharmacologie, l'agroalimentaire et la cosmétique.

L'idée d'utiliser les liposomes comme vecteurs de substances a émergé dès les années 70, et s'est heurtée aux problèmes d'instabilité inhérents à la nature colloïdale de ces objets. En effet, l'inconvénient des vésicules lipidiques pour ce type d'applications réside dans leur stabilité limitée au stockage et leur faible durée de vie en milieu biologique, ce qui est principalement dû à leurs propriétés de surface [Ruysschaert et al., 2004]. Les années de recherches qui ont suivi ont permis de mieux comprendre les caractéristiques physico-chimiques de ces systèmes [Israelachvili, 1992] et ont finalement abouti à la mise sur le marché de produits commerciaux dans les années 90 [Lasic, 1995,1998]. Parmi les stratégies qui ont été adoptées pour augmenter la stabilité des liposomes, nous pouvons ainsi recenser la modification de la composition chimique de la membrane, le greffage chimique de composants sur les lipides, et l'adsorption physique de polymères ou de particules à l'extérieur de la membrane.

II.2.2.1 Composition de la membrane

Il existe une très grande variété de lipides pouvant être librement combinés pour formuler une membrane artificielle, les caractéristiques individuelles des lipides influant la structure et donc les propriétés de l'assemblage formé. Le choix d'une formulation plutôt qu'une autre sera donc dépendant du type de propriétés visées.

Les combinaisons possibles étant infinies, nous ne citerons que quelques exemples de formulations. Si l'on souhaite rendre les liposomes plus stables dans le temps, l'introduction de lipides chargés permet de limiter les phénomènes d'agrégation et de fusion [Casals et al., 2003]. Si l'objectif est de rendre les vésicules mécaniquement moins fragiles, l'incorporation d'une fraction de cholestérol est reconnue depuis longtemps comme un moyen de diminuer la perméabilité de la bicouche, par un effet de condensation des lipides qui rend la membrane plus rigide [Edholm&Nagle, 2005, Finkelstein et al., 1979]. Les sphingomyélines, en formant des liaisons hydrogène intermoléculaires tendent également à rigidifier la membrane [Allen et al., 1987].

Enfin, une méthode plus radicale pour rendre les liposomes plus résistants d'un point de vue mécanique consiste à utiliser des lipides comprenant des groupements polymérisables (par

exemple des fonctions acétylène ou méthacrylate au niveau de la chaîne carbonée), et procéder à une réticulation de la bicouche [Shamsai et al., 1997, Stanish et al., 2001].

II.2.2.2 Greffage de composants

L'exemple le plus connu dans ce domaine est celui des liposomes « stabilisés stériquement ». La recherche du système idéal pour la vectorisation de substances actives à but thérapeutique a mené à la génération de liposomes « furtifs » (*stealth* liposomes) mis au point par couplage covalent d'un polymère hydrophile sur la tête polaire des lipides, le polyéthylène glycol (PEG) [Papahadjopoulos et al., 1991]. La couronne de PEG joue le rôle d'une barrière stérique autour de la membrane, ce qui « masque » le liposome et le rend moins facilement détectable par le système immunitaire (Figure 1.46).



Figure 1.46 : Représentation schématique de la structure d'un liposome stabilisé par greffage covalent de PEG. D'après [Woodle et al., 1992]

Une autre méthode dite de « greffage physique » s'inspire des mécanismes d'auto-assemblage par lesquels les protéines s'insèrent dans les bicouches pour former les membranes cellulaires naturelles. Un copolymère à blocs amphiphile est en effet capable de s'insérer dans la membrane simplement par effet hydrophobe [Kostarelos et al., 2005] et contribuer ainsi à rendre les vésicules plus robustes.

II.2.2.3 Adsorption de composants

II.2.2.3.1 Adsorption de polymères sur des SUV

Toujours dans l'optique de produire des liposomes plus stables en vue d'applications pharmacologiques, les premières tentatives d'adsorption en surface de la membrane lipidique ont utilisé des produits naturels et biocompatibles : des protéines, des glycoprotéines et notamment des polysaccharides. Le tableau 1.9. recense quelques exemples de recouvrement de liposomes.

Tableau 1.9 : Exemples de polymères utilisés pour décorer la surface de liposomes.

Polymère déposé	Références
o-palmitoyl pullulane, o-palmitoyl amylopectine	[Sunamoto et al., 1983]
dérivés de PAA	[Seki et al., 1984]
Poloxamères ¹⁰	[Jamshaid et al., 1988]
Carboxyméthyl chitine	[Dong et al., 1991] [Mobed et al., 1998]
ADN	[Kennedy et al., 2000]
PAH	[Ge et al., 2003]
Chitosane	[Guo et al., 2003] [Feng et al., 2004] [Thongborisute et al., 2006]
Poly-L-arginine	[Tsogas et al., 2005]
PLL	[Volodkin et al., 2007b, Yaroslavov, 2008]
poly(4-vinylpyridine)	[Yaroslavov, 2008]

L'interaction électrostatique n'est pas l'unique force motrice de l'adsorption des polymères sur la membrane : Dong et al. suggèrent une adsorption de la carboxyméthylchitine (sous sa forme non ionisée) sur la bicouche lipidique par des interactions hydrophobes. Seki et al. ont étudié le comportement de complexes lipides/polyélectrolytes en fonction du pH et de la force ionique par des mesures d'enthalpie de transition et soupçonnent l'établissement de liaisons hydrogène entre les groupements phosphodiester des têtes polaires de lipides et les groupements carboxyliques de leurs dérivés de PAA : les mesures de microcalorimétrie indiquent l'existence d'une interaction entre lipides et polymères de même signe, et dans le cas de signes opposés, l'interaction n'est que très faiblement impactée par la force ionique, ce qui n'est pas cohérent avec un mécanisme purement électrostatique.

Aussi, les vésicules lipidiques étant des objets mous et flexibles, les interactions électrostatiques peuvent s'avérer trop violentes pour la bicouche et provoquer sa rupture [Fukui et al., 2009, Ruysschaert et al., 2004]. Il a également été observé que l'adsorption de polyélectrolytes pouvait provoquer l'aggrégation irréversible des liposomes [Volodkin et al., 2007a] voire leur fusion [Gad et al., 1982]. Il est possible de limiter ces phénomènes en jouant sur la concentration en polymère : en deçà d'un certain rapport polyélectrolyte/lipides, la tendance sera plutôt à la formation d'agrégats tandis que si le polyélectrolyte est en excès, les vésicules seront recouvertes et individualisées (Figure 1.47).

¹⁰ Copolymères triblocs comprenant un bloc central hydrophobe poly(oxyde de propylène) entouré de deux blocs hydrophiles poly(oxyde d'éthylène).

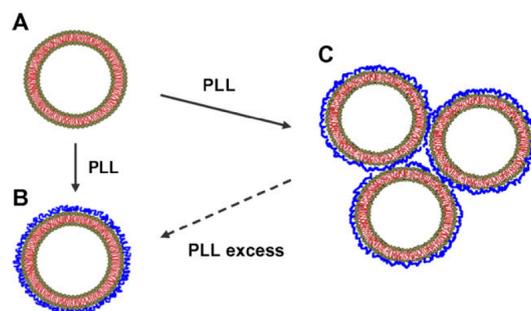


Figure 1.47 : Schéma représentatif de (A) Liposomes (B) Liposomes mis en présence d'une faible quantité de poly-L-lysine (PLL), formant des structures agrégées (C) Liposomes mis en présence d'un excès de PLL. D'après [Volodkin et al., 2007c]

L'ordre de mélange (titrer les lipides par la solution de polymères ou l'inverse) influencerait également sur le type de structure obtenu. Pour obtenir des vésicules décorées et non agrégées, il serait préférable de les introduire goutte à goutte dans la solution de polymères en excès, l'inverse ayant plutôt pour effet de créer des pontages entre vésicules [Kennedy et al., 2000] (des contre-exemples existent cependant [Ge et al., 2003])

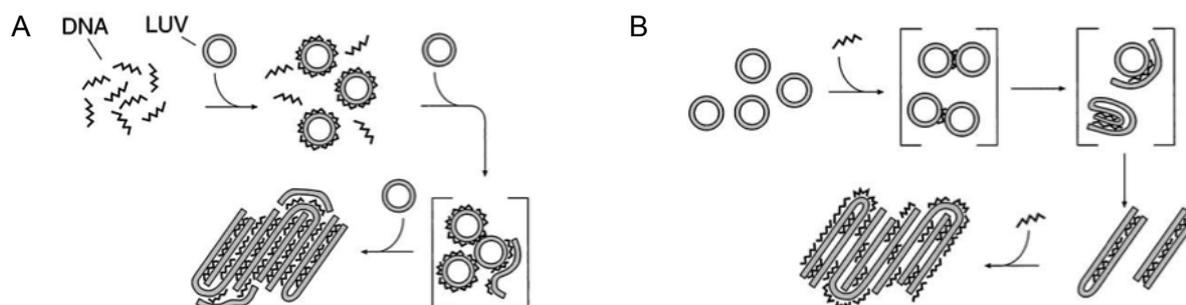


Figure 1.48 : (A) Représentation schématique de la titration d'ADN par des LUV (ADN en excès). (B) Représentation schématique de la titration de LUV par de l'ADN (LUV en excès). D'après [Kennedy et al., 2000]

L'adsorption d'une couche de polymères sur la membrane de vésicules est donc possible mais requiert d'être attentif à plusieurs paramètres expérimentaux : le pH, la force ionique, la concentration en vésicules/polymères et l'ordre dans lequel ils sont mélangés sont autant de variables à ne pas négliger pour optimiser l'adsorption sans nuire à l'intégrité des membranes lipidiques.

II.2.2.3.2 Les liposomes support de dépôt couche-par-couche

S'il est possible de recouvrir la membrane de vésicules lipidiques d'une couche de polymères ou de nanoparticules, il est possible d'envisager des dépôts successifs de composants par la méthode couche-par-couche.

Tableau 1.10 : Systèmes multicouches construits sur des liposomes

Polymères déposés	Nombre de bicouches	Référence
PSS/PAH	1	[Ruysschaert et al., 2004]
PLL/PAA	25	[Germain et al., 2006]
PLL/PGA	1	[Ciobanu et al., 2007]
PAA/PAH	1	[Jain et al., 2009]
Chitosane/sulfate de dextran	2	[Fukui&Fujimoto, 2009]
Chitosane/ADN	2	
Chitosane/Pectines methyl-estérifiées	3	[Chun et al., 2013]
Chitosane/ λ -carraghenanes	3	
Chitosane/Alginate de sodium	1	

Bien que ce tableau ne soit probablement pas exhaustif, une tendance se dégage de l'ensemble des travaux qui y sont répertoriés : le nombre de bicouches est rarement très élevé, à l'exception du cas de Germain et al. qui déposent jusqu'à 25 bicouches. Si ce faible nombre de dépôts relève a priori d'un choix délibéré (il n'est souvent pas nécessaire de déposer beaucoup de matière sur les vésicules pour accéder aux propriétés désirées), il semble également résulter de limitations expérimentales : la fragilité des vésicules (par rapport à des substrats colloïdaux solides) les rend plus vulnérables aux forces de déplétion qui peuvent typiquement s'établir si les polymères non adsorbés lors d'un dépôt restent en solution sans être évacués [Ruysschaert et al., 2004].

II.2.2.3.3 Adsorption de nanoparticules sur des SUV ou des GUV

Dans l'optique de construire des capsules biomimétiques de la paroi végétale, nous allons commencer par recouvrir les vésicules de nanocristaux de cellulose. Lorsqu'elles sont mises en présence de nanoparticules, les membranes lipidiques peuvent être affectées de diverses façons : étirement des chaînes de lipides au niveau du site d'interaction, modification de la courbure, modification de l'empilement des lipides, « pearling » (expulsion de vésicules 'filles' reliées entre elles, formant une structure comparable à un collier) [Schulz et al., 2012]... Pour comprendre ces effets macroscopiques, plusieurs éléments sont à considérer.

Tout d'abord, les membranes lipidiques sont des objets fluides, hautement élastiques et peuvent donc se déformer très facilement lorsque des nanoparticules interagissent avec elles, que ce soit par insertion ou par simple adsorption à leur surface. Ces déformations peuvent prendre la forme de bourgeonnement (« budding ») mais peuvent également aboutir à la fission de la membrane [Li et al., 2013, Noguchi et al., 2002]. D'ailleurs, les nanoparticules n'étant pas des objets suffisamment petits pour diffuser à travers la membrane, les nombreux cas d'internalisation observés expérimentalement ne résultent pas de phénomènes de diffusion

mais bien de mécanismes spécifiques de formation de pores dans la bicouche [Mahmoudi et al., 2014].

Aussi, la chimie de surface des nanoparticules, leur caractère hydrophile/hydrophobe, leur charge, leur taille et leur forme vont influencer la manière dont elles vont interagir avec la membrane [Roiter et al., 2008]. Par exemple, des particules hydrophiles s'adsorberont volontiers sur les têtes polaires des lipides. En revanche, elles s'inséreront difficilement à l'intérieur de la bicouche hydrophobe, et auront même pour effet de détruire celle-ci à trop forte concentration [Binder et al., 2007]. Si l'on prend l'exemple de particules chargées positivement, celles-ci s'adsorberont facilement par interaction électrostatique sur une membrane composée de lipides à tête anionique ou zwitterionique. Plus surprenant cependant, il apparaît que des particules chargées soient elles aussi capables de s'adsorber sur une membrane lipidique de même signe, mais en plus faible quantité [Li et al., 2013][Liu et al., 2013a].

II.2.2.3.4 GUV modifiées comme modèles de cellule

Les travaux qui s'intéressent à l'adsorption de composants sur des GUV ont deux types de motivations : soit il s'agit d'études de cytotoxicité visant à évaluer les effets d'un composant sur les cellules (les GUV y sont dans ce cas déjà considérées comme des modèles valables de cellules), soit l'objectif est de mettre au point des modèles de cellules plus « réalistes » par modification des GUV. Nous nous limiterons à proposer des exemples de la seconde catégorie, qui nous concerne plus directement.

Helfer et al. s'inscrivent clairement dans cette démarche biomimétique en recouvrant des GUV par des filaments d'actine, pour imiter le cytosquelette et en étudier les propriétés mécaniques (Figure 1.49).

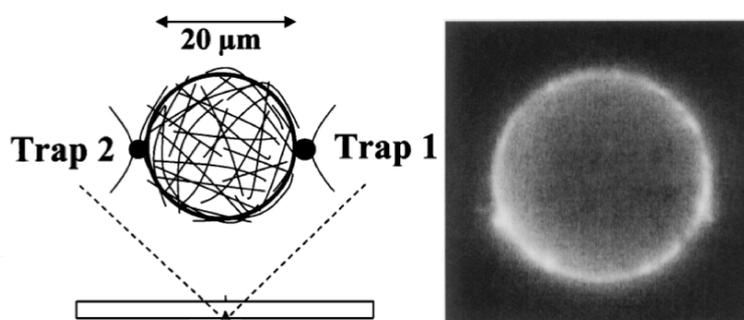


Figure 1.49 : Représentation schématique d'une GUV recouverte de filaments d'actine, avec le cliché de microscopie en fluorescence correspondant. D'après [Helfer et al., 2000]

Expérimentalement, l'élaboration de ce système repose sur la forte affinité biotine-avidine : une fraction des lipides utilisés pour former les GUV comportent un groupement

biotine greffé au niveau de la tête polaire, permettant à des filaments d'actine biotinylés d'y adhérer par la suite, et de se réticuler entre eux en présence de streptavidine. L'étude du comportement élastique de ces vésicules composites par analyse des fluctuations de la membrane révèle une augmentation du module de courbure après dépôt d'actine, qui se situe alors entre 5 et 50 Pa [Helfer et al., 2000].

Dieluweit et al. ont quant à eux étudié les propriétés mécaniques de vésicules biotinylées recouvertes de streptavidine et/ou d'avidine, en combinant AFM et aspiration à la micropipette (Figure 1.50). La cristallisation des protéines en surface des GUV leur confère un module d'Young relativement élevé, compris entre 50 et 110 MPa.

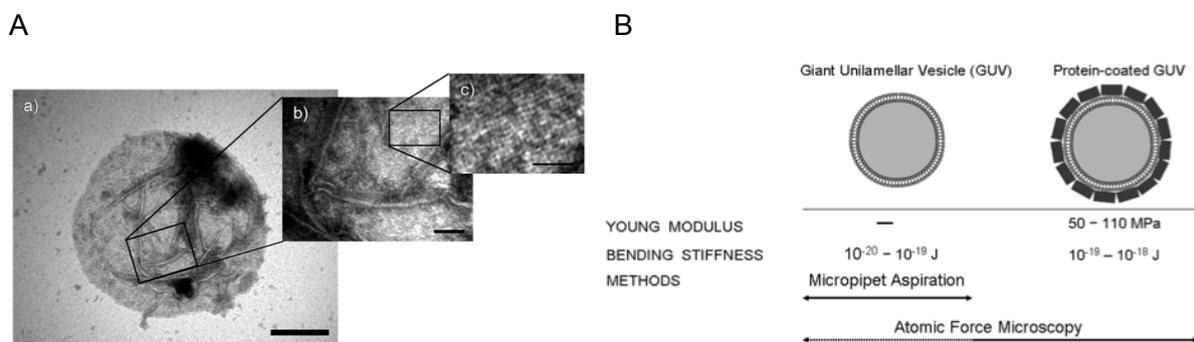


Figure 1.50 : (A) Image TEM d'une vésicule recouverte de streptavidine (B) Schéma représentatif des vésicules non-décorées et décorées. D'après [Dieluweit et al., 2010]

D'autres travaux se sont attelés à la décoration de GUV par un polysaccharide chargé positivement, le chitosane, ce qui nous intéresse tout particulièrement [Mertins et al., 2009, Quemeneur et al., 2007]. Ce polyélectrolyte est capable de s'adsorber sur des vésicules lipidiques de DOPC, dont la charge de surface peut être modulée en jouant sur le pH. L'interaction électrostatique ne serait pas seule responsable de cette adsorption, Quemeneur et al. montrant qu'il est possible d'adsorber sur une membrane un polyélectrolyte dont la charge est du même signe (Figure 1.51).

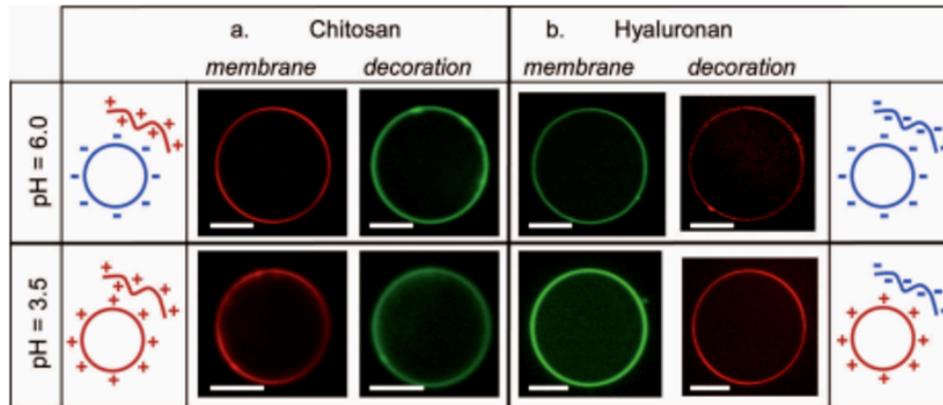


Figure 1.51 : Images de microscopie confocale de (A) Vésicules recouvertes de chitosane (B) Vésicules recouvertes d'acide hyaluronique. La barre d'échelle correspond à 10 μm . D'après [Quemeneur et al., 2010]

La caractérisation mécanique de ces objets a été réalisée par compression à l'aide d'un AFM (Figure 1.52). Lors de ces expériences, une sphère de verre de rayon 30 μm est montée sur le levier afin de se placer dans la situation d'une compression plan/plan, le rayon des vésicules géantes étudiées étant largement inférieur à celui de la sphère ($< 5 \mu\text{m}$). L'analyse des courbes de force révèle une augmentation de la rigidité des vésicules après décoration [Rinaudo et al., 2013].

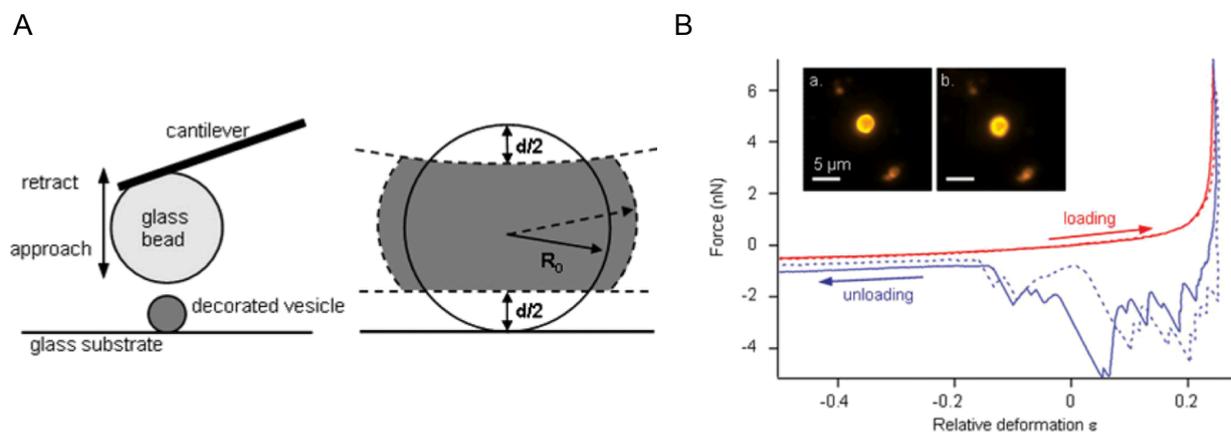


Figure 1.52 (A) Schéma représentatif de l'expérience de compression par AFM des vésicules recouvertes de chitosane (B) Réponse d'une GUV recouverte de chitosane en compression. En rouge, une courbe typique d'approche et en bleu une courbe de retrait avec en insert les clichés de microscopie en épifluorescence correspondants. D'après [Rinaudo et al., 2013].

Etant donné que les mécanismes d'adsorption de polysaccharides sur des GUV nous intéressent directement dans l'élaboration de nos capsules, nous nous sommes largement appuyés sur ces travaux et c'est pourquoi nous y ferons référence dans la suite de ce manuscrit pour discuter de nos résultats.

III Propriétés mécaniques de capsules micrométriques

Les modèles de paroi végétale que nous souhaitons construire à partir des GUV ne seront plus de simples vésicules lipidiques à l'issue de leur élaboration : les couches successives de polymères que nous auront déposées à la surface du substrat en feront des capsules multicouches que l'on peut décrire comme étant des coques sphériques minces. Le comportement élastique de ces objets a été décrit théoriquement et expérimentalement, ce que nous nous proposons d'examiner dans cette partie.

III.1 Capsules multicouches

III.1.1 Principe

La technique couche par couche qui permet de générer des films stratifiés, déjà présentée au §I.4.3.1 a rapidement été mise en oeuvre sur des substrats sphériques, moyennant quelques compromis: l'étape de rinçage, indispensable pour éviter les problèmes de flocculation dus aux polymères non adsorbés lors d'un dépôt a due être adaptée, tandis que les étapes facultatives de séchage intermédiaire ont dues être abandonnées.

Les premières capsules élaborées avec la technique couche-par-couche datent de la fin des années 90 [Donath et al., 1998, Sukhorukov et al., 1998]. Le substrat plan y est remplacé par des particules colloïdales trempées successivement dans les solutions de polyélectrolytes, avec des temps de dépôts toujours de l'ordre de quelques dizaines de minutes. Le rinçage consiste en une centrifugation, à l'issue de laquelle le surnageant contenant l'excès de matière non adsorbée est retiré, et le culot redispersé dans de l'eau déionisée. Une fois le nombre de couches désirées atteint, le substrat est dissout pour aboutir à la formation de capsules creuses. Ce procédé est représenté sur la Figure 1.53.

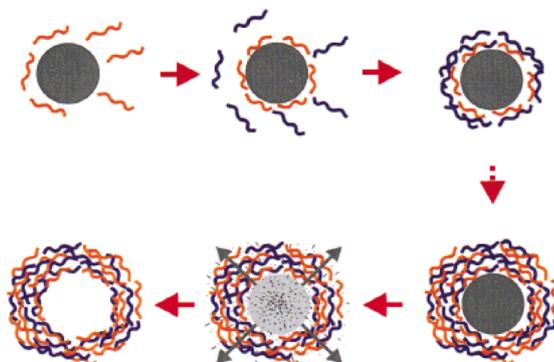


Figure 1.53 : Schéma représentatif de la construction de capsules multicouches : les espèces choisies s'adsorbent sur un substrat qui est dissout à l'issue des dépôts, générant une capsule creuse. D'après [Donath et al., 1998]

III.1.2 Substrats

Le substrat de départ doit répondre simultanément à plusieurs exigences : en plus d'avoir un minimum d'affinité avec la première couche de matière que l'on souhaite y déposer, le substrat doit également être suffisamment stable tout au long des dépôts et rinçages successifs mais doit pouvoir être dissout facilement et complètement (sans que l'espèce chimique nécessaire à sa dissolution n'entraîne la destruction des couches déposées). La nature chimique, la taille, la forme, la charge du substrat sont donc autant de paramètres à intégrer dans cette réflexion, en fonction des propriétés visées.

Ainsi, divers substrats ont été utilisés pour la construction de capsules multicouches micrométriques, les plus fréquemment rencontrés étant les particules de melamine formaldéhyde, les particules de latex de polystyrène, les billes de silice et les cristaux inorganiques comme le carbonate de calcium [Peyratout et al., 2004]. Dans un genre plus exotique, des hydrogels [Matsusaki et al., 2007, Sakaguchi et al., 2003], des cristaux d'enzymes [Caruso et al., 2000], des erythrocytes et des bactéries [Neu et al., 2001] ont également servi de support au dépôt de couches.

III.1.3 Matériaux déposés et interactions

Bien que les capsules PSS/PAH soient de loin le système le plus étudié dans la littérature (principalement car ces deux polymères sont des produits commerciaux très faciles à obtenir) une grande variété de composants a été utilisée pour construire des capsules multicouches: d'autres polyélectrolytes synthétiques (PEI, PAA, PVS...) des nanoparticules (silice, titane...), des biomolécules chargées (ADN, protéines...) dont des polysaccharides (chitosane, acide hyaluronique, carboxyméthylcellulose...) (voir [Peyratout&Dähne, 2004] pour une revue plus complète).

L'interaction électrostatique a naturellement été privilégiée car il a d'abord été supposé que les polymères non chargés, interagissant par exemple via des liaisons de type Van der Waals, formeraient des assemblages trop fragiles pour résister à l'étape de dissolution du coeur. Un choix de substrat judicieux peut permettre de contourner le problème et de générer des capsules creuses assemblées par liaisons hydrogène [Kharlampieva et al., 2005, Kozlovskaya et al., 2003, Zhang et al., 2003]. Dès lors, les possibilités de composants s'élargissent encore, n'étant plus exclusivement limitées aux polymères chargés [Quinn et al., 2007]. Enfin, les interactions covalentes et biospécifiques peuvent également être mises à profit pour assembler des capsules, comme par exemple dans le cas des interactions entre les bases complémentaires de l'ADN [Tong et al., 2012].

III.1.4 Propriétés et applications

Nous venons de le voir, l'approche couche par couche permet d'imaginer de très nombreuses combinaisons en termes de substrat et de composants pour élaborer des capsules. L'un des principaux avantages de cette technique est le contrôle de l'architecture qu'elle offre lors de la croissance de la paroi multicouches : le choix du nombre de couches permet d'ajuster l'épaisseur de la coque et donc de moduler ses propriétés. Habituellement mesurée par AFM (Figure 1.54-A) et par MET (Figure 1.54-B), l'épaisseur des capsules est généralement de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres.

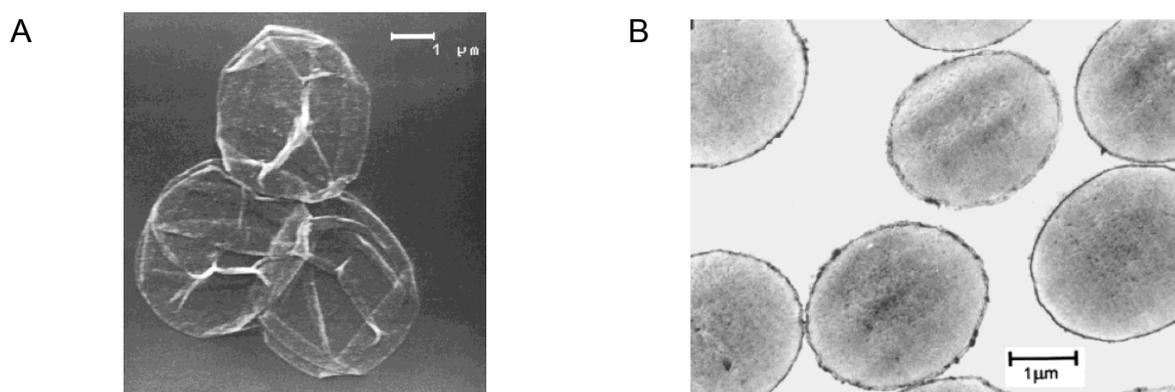


Figure 1.54 : (A) Image AFM de capsules de $(\text{PSS}/\text{PAH})_{4.5}$. Les plis observés sont caractéristiques d'une paroi séchée. (B) Cliché MET de capsules $(\text{PSS}/\text{PAH})_{4.5}$. L'épaisseur de la paroi est d'environ 20 nm. D'après [Donath et al., 1998]

Parmi les applications potentielles des capsules multicouches, l'encapsulation de substances figure en bonne place, ainsi que leur utilisation comme micro-réacteurs ou encore biocapteurs [Tong et al., 2012]. Dans cette optique et particulièrement lorsqu'il s'agit de vectoriser des molécules, la capacité qu'ont les capsules à incorporer des substances et à les relarguer ou non est une propriété déterminante, qui est classiquement évaluée par microscopie confocale : soit en utilisant un substrat fluorescent dont on observe la dissolution après dépôt des couches, soit en ajoutant une molécule fluorescente au milieu extérieur une fois la paroi construite, et en suivant sa diffusion à l'intérieur des capsules (Figure 1.55).

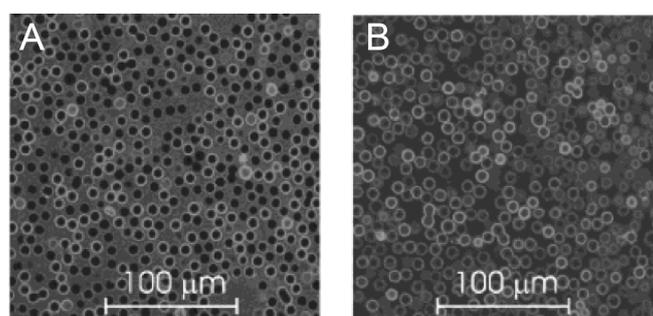


Figure 1.55 : Images de microscopie confocale à balayage laser montrant : (A) des capsules $(\text{PSS}/\text{PAH})_8$ après 24 h d'incubation avec du PAH-rhodamine (B) des capsules $(\text{PSS}/\text{PAH})_8$ après 24 h

d'incubation avec du PAH-rhodamine en présence de 10 mM de NaCl. L'analyse des intensités de fluorescence de ces images montre que la concentration en PAH-rhodamine est la même à l'intérieur et à l'extérieur des capsules en présence de sel. D'après [Ibarz et al., 2001]

Ce type d'expérience a mis en évidence l'influence de plusieurs paramètres affectant la perméabilité des capsules :

- l'épaisseur de la paroi : lorsque le nombre de bicouches est faible, la paroi peut comporter des défauts et des pores, d'où une perméabilité élevée qui diminue lorsque la paroi devient plus homogène au fur et à mesure des dépôts [Ibarz et al., 2002, Qiu et al., 2001].

- la force ionique : il a été montré qu'une concentration en sel croissante augmentait la perméabilité de capsules PSS/PAH. Le sel affaiblirait les interactions électrostatiques entre les couches de polyélectrolytes mais de façon réversible (Figure 1.X)[Ibarz et al., 2001]

- le pH : un effet similaire à celui du sel a pu être observé sur des capsules PSS/PAH [Antipov et al., 2002].

- les caractéristiques des polymères (densité de charge notamment) utilisés pour construire la paroi sont aussi à considérer lors de l'évaluation de la perméabilité ainsi que la nature hydrophile ou hydrophobe de la molécule dont la diffusion est étudiée [Qiu et al., 2001].

Enfin, quelque soit le type d'applications envisagées pour un système, il sera toujours nécessaire d'en évaluer les propriétés mécaniques. La variété des objets pouvant être utilisés dans la construction de capsules multicouches (polymères de masse molaire plus ou moins élevée, nanoparticules plus ou moins rigides...) laisse entrevoir une diversité de comportements possibles en réponse à une contrainte mécanique.

III.2 Propriétés mécaniques des capsules multicouches

Deux grandes catégories de méthodes peuvent être distinguées pour caractériser les propriétés mécaniques des capsules : celles utilisant la pression osmotique pour appliquer une force sur l'ensemble des objets, et celles reposant sur la micromanipulation de capsules individuelles. Dans les deux cas, le principe est le même et consiste à appliquer une force donnée sur les capsules, et de mesurer la déformation résultante. La difficulté réside essentiellement dans l'exploitation des données, qui implique toujours d'établir au préalable un modèle théorique décrivant le système, sans quoi il n'est pas possible d'extraire les paramètres d'intérêt comme le module élastique et/ou le module d'Young.

III.2.1 Déformation par pression osmotique

L'avantage de jouer sur la pression osmotique est de pouvoir observer le comportement de plusieurs objets en une seule manipulation. En introduisant un excès de polyélectrolyte ne

pouvant pas traverser la paroi à l'intérieur ou à l'extérieur des capsules, il est en effet possible d'induire un gonflement ou un dégonflement accompagné de flambage. L'emploi d'un modèle approprié reliant un paramètre mesurable (rayon des capsules, pression critique de flambage) au module d'Young permet d'estimer celui-ci, moyennant quelques approximations, ce que nous verrons à travers les exemples recensés dans le tableau 1.11.

Tableau 1.11 : Exemples de capsules étudiées par dégonflement osmotique

Type de capsule	Diamètre	Méthode	Module élastique	Référence
(PSS/PAH) ₁₀	4µm	dégonflement	500-750 MPa	[Gao, 2001a]
(PSS/PDADMAC) ₁₀	4µm	dégonflement	140 MPa	[Gao, 2001b]
(PSS/PAH) ₁₀	5 µm	dégonflement	500 MPa	[Fery et al., 2004]
(PSS/PAH) ₄₋₁₀	4-5 µm	gonflement	100-300 MPa	[Vinogradova, 2004]

Afin de commenter les valeurs ci-dessus et de comprendre d'où proviennent les différences d'ordre de grandeur observées pour un même système, nous allons présenter plus précisément le mode opératoire suivi lors de ces expériences et les modèles utilisés pour l'interprétation des résultats.

III.2.1.1 Dégonflement et flambage

Gao et al. ont étudié le comportement de capsules de PSS/PAH soumises à une pression osmotique imposée par l'introduction de PSS en excès au milieu extérieur (la paroi étant imperméable à ce polymère, à moins d'être endommagée). Le grand nombre de contreions associés à ce polyélectrolyte permettent d'exercer une pression suffisamment élevée pour déformer les capsules, la pression osmotique dépendant du nombre d'objets en solutions et non de leur nature. En l'absence de PSS, les capsules sont sphériques, mais au delà de 2,5% en masse de ce polyélectrolyte, elles sont pratiquement toutes déformées, passant d'une morphologie convexe à une morphologie concave, cette transition étant appelée flambage (Figure 1.56).

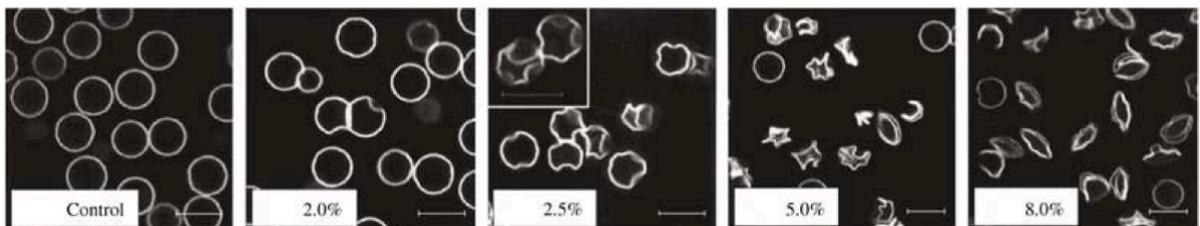


Figure 1.56 : Clichés de microscopie confocale de capsules (PSS/PAH)₁₀ soumises à une pression osmotique croissante (de gauche à droite) par ajout de PSS au milieu extérieur. D'après [Gao et al., 2001b]

En mesurant la fraction d'objets déformés en fonction de la concentration en PSS, une pression critique π_c a pu être déterminée, correspondant au seuil au delà duquel les capsules perdent leur géométrie sphérique [Gao et al., 2001a]. Comment relier cette pression critique aux propriétés mécaniques de la paroi ? D'après [Landau & Lifshitz, 1986] deux paramètres sont nécessaires pour suivre la déformation d'un corps élastique : K , le module de compressibilité et μ le module élastique. Ces deux paramètres sont reliés au module d'Young E par la relation suivante :

$$E = \frac{9K\mu}{3K+\mu} \text{ soit si } K \gg \mu : E \sim 3\mu \quad (1.6)$$

Les capsules perdent leur stabilité et donc se déforment lorsque le travail exercé par la pression externe est égal à l'énergie de déformation. Cette relation permet d'aboutir à une expression de la pression critique en fonction des paramètres K et μ , et si l'on considère que l'extension de la paroi est faible, on peut exprimer la pression critique uniquement en fonction du module élastique en négligeant les déformations plastiques :

$$\pi_c = 4\mu \left(\frac{h}{R}\right)^2 \quad (1.7)$$

Avec h l'épaisseur de la coque et R le rayon de la capsule.

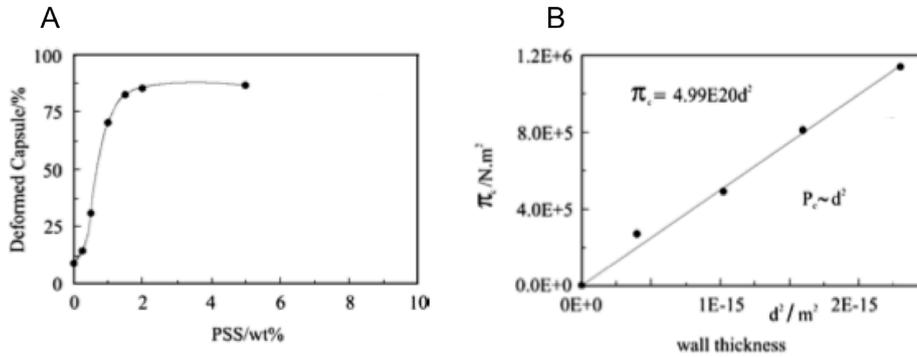


Figure 1.57 (A) Fraction de capsules déformées en fonction de la concentration externe en PSS (B) Variation de la pression critique en fonction de l'épaisseur de la paroi. D'après [Fery et al., 2004]

Ainsi, la différence de pression intérieur/extérieur de la capsule nécessaire pour induire une déformation est proportionnelle au carré de l'épaisseur de la paroi et inversement proportionnelle au rayon de la capsule (Figure 1.57). Autrement dit, plus une capsule est petite et plus l'épaisseur de sa paroi est élevée, moins elle sera sensible à la pression osmotique.

Les valeurs trouvées par Gao et al. et Fery et al. sur le même système PSS/PAH concordent et révèlent une rigidité très élevée avec un module d'Young de 1,5-2 GPa,

comparable à celle de matériaux polymères comme le PMMA ou les résines epoxy. Cet ordre de grandeur est nettement supérieur à celui de valeurs obtenues sur des films PSS/PAH à l'état humide, dont le module d'Young a été mesuré par SIEBIMM¹¹ et se trouvant plutôt aux alentours de 590 MPa [Nolte et al., 2005].

Ces différences peuvent être expliquées par les hypothèses utilisées lors de l'exploitation des mesures : le modèle utilisé par Gao et al. suppose une réponse strictement élastique du système. Pourtant, lors des expériences de dégonflement, il s'avère que les capsules changent de forme sans que cette transition soit précédée d'un étirement détectable à l'échelle macroscopique. Si la paroi des capsules répondait de façon purement élastique, les capsules s'effondreraient sur elles-mêmes d'un coup une fois la pression critique dépassée, ce qui n'est pas le cas expérimentalement. Des déformations plastiques partielles qui limitent la croissance de la zone de flambage peuvent expliquer ceci. En négligeant les déformations plastiques, le modèle utilisé aboutit donc à une surestimation du module [Fery et al., 2004]. Cette description suppose également une perméabilité de la paroi à l'eau infinie, ce qui n'est pas le cas des assemblages PSS/PAH [Antipov et al., 2003] et mène également à une sous estimation de la pression osmotique et donc à une surestimation du module.

III.2.1.2 Gonflement

L'autre façon de jouer sur la pression osmotique pour évaluer le module d'Young des capsules consiste à remplir celles-ci de polymères afin d'appliquer une pression interne. Dans la pratique, plusieurs méthodes existent pour préparer ces capsules remplies et sont décrites dans la revue de [Vinogradova et al., 2006].

Considérons une capsule contenant une solution de polyélectrolytes (la paroi de la capsule y étant imperméable), immergée dans un solvant de faible poids moléculaire. Le solvant va diffuser à l'intérieur de la capsule jusqu'à ce que la force élastique de la coque étirée contrebalance la pression osmotique (pression qui comprend la contribution du polyélectrolyte encapsulé mais aussi celle des contreions) : la capsule gonfle. Ce gonflement correspond à une déformation en pure extension, sans effets de courbure, ce qui simplifie l'interprétation. Quelques approximations sont nécessaires pour pouvoir définir une relation entre gonflement et module élastique :

- La solution interne de polyélectrolyte reste neutre (tous les contreions issus de la dissociation du polyélectrolyte restent à l'intérieur de la capsule).

¹¹ *Strain-Induced Elastic Buckling Instability for Mechanical Measurements : technique permettant de mesurer les propriétés mécaniques d'un film mince par flambage [Stafford et al., 2004]*

- Pour des petites déformations relatives, la réponse de la coque est purement élastique [Lulevich et al., 2003a].

Si la capsule gonfle en passant d'un rayon initial r_0 à un rayon final r , l'énergie d'extension G de la coque est donnée par la théorie des membranes élastiques [Landau, 1995] :

$$G = 4\pi \frac{E}{1-\nu} h(r - r_0)^2 \quad (1.8)$$

avec E le module d'Young, ν le coefficient de Poisson (0.5) et h l'épaisseur de la coque (avec $h \ll r_0$). Le travail exercé par la pression osmotique Π pour faire gonfler la capsule de r_0 à r vaut :

$$A = \int_{V_0}^V \Pi dV = 3Nk_B T \ln \frac{r}{r_0} \quad (1.9)$$

Pour trouver le rayon d'équilibre de la capsule, il faut minimiser l'énergie totale $F=G+A$, ce qui aboutit à une expression du rayon des capsules gonflées en fonction de la concentration c de la solution interne, de l'épaisseur h de la capsule et du module d'Young E :

$$r = r_0 \left(1 + \frac{r}{4h} \frac{\phi c R T}{E} \right) \quad (1.10)$$

où ϕ est un coefficient qui tient compte de la condensation des contre-ions sur les chaînes de polyélectrolytes (ce qui diminue la pression osmotique réelle), R la constante des gaz parfaits et T la température. Pour déterminer le module d'Young des capsules, il faut donc mesurer leur rayon en fonction de la concentration en soluté c et de l'épaisseur h , et ajuster les données obtenues à la courbe prédite par l'équation théorique [Vinogradova et al., 2004] (Figure 1.58).

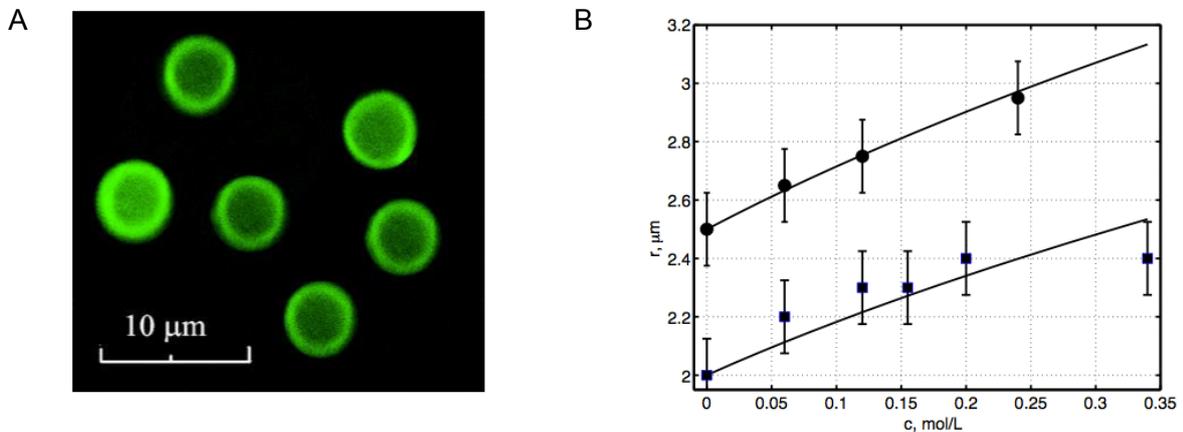


Figure 1.58 : (A) Image de microscopie confocale de capsules PSS/PAH remplies de PSS (B) Rayon des capsules gonflées en fonction de la concentration interne en PSS (points noirs :capsules utilisant des particules de $MnCO_3$ comme substrat. Carrés bleus : capsules utilisant des particules de melamine formaldéhyde comme substrat. Tracé continu: courbes théoriques). D'après [Vinogradova et al., 2004]

La valeur de 100 MPa proposée dans l'article, bien inférieure à celle de Gao et al. correspond aux ordres de grandeur observés pour les élastomères. D'après les auteurs, ce serait une valeur haute limite du module d'Young pour plusieurs raisons : le polymère encapsulé à l'intérieur des capsules n'est peut être pas totalement dissocié d'où une surestimation de la pression osmotique. De plus, comme le modèle précédent utilisé pour exploiter les expériences de flambage, cette description considère que la capsule se déforme uniquement de façon élastique, ce qui n'est valable que pour des déformations de faible amplitude. Encore une fois, la prise en compte des déformations plastiques aboutirait à un module d'Young plus faible que ce qui est annoncé.

[Kim et al., 2005a] ont ainsi appliqué un processus de gonflement suivi de dégonflement à des capsules PSS/PAH et ont pu mettre en évidence un caractère plastique : les capsules ont d'abord été gonflées par encapsulation d'une solution de PSS, puis plongées dans une solution concentrée en NaCl ce qui a eu pour effet de supprimer la pression osmotique interne. Il a été observé que les capsules ne revenaient pas à leur taille initiale en se dégonflant, indiquant une irréversibilité de l'étirement de leur paroi.

III.2.2 Micromanipulation de capsules individuelles

Bien que moins statistiques que le précédent type d'expérience, les méthodes de micromanipulation de capsules permettent d'avoir un meilleur contrôle des forces appliquées sur les objets (modification in situ par exemple).

III.2.2.1 Aspiration par micropipettes

La technique de la micropipette, couramment utilisée dans le domaine des cellules animales et des vésicules lipidiques, a été employée par [Bäumler et al., 2000] sur des capsules de polyélectrolytes (PSS/PAH)₅. Cette technique a permis de mettre en évidence un comportement plastique : après succion par la micropipette, les capsules sont déformées de façon irréversible (Figure 1.59).

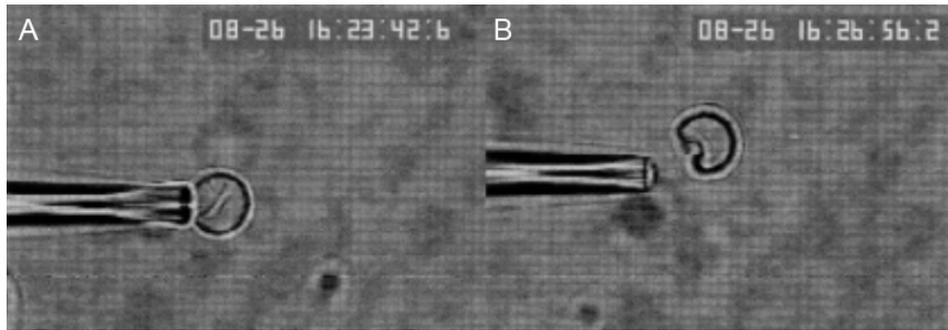


Figure 1.59 : (A) Aspiration d'une capsule de polyélectrolytes par micropipette (B) Capsule relâchée après aspiration, présentant une invagination irréversible (diamètre du capillaire $2\mu\text{m}$). D'après [Baumler et al., 2000]

Les forces nécessaires pour observer des déformations sont 1000 fois supérieures à l'ordre de grandeur des forces appliquées aux GUV [Fery et al., 2004]. Aussi, les capsules de polyélectrolytes n'incorporant aucune espèce chimique génératrice de pression osmotique, il n'y a donc aucun mécanisme permettant de garder le volume de la capsule constant et seul un comportement de déformation plastique peut être observé : les capsules ne montrent aucun signe de déformation jusqu'à ce que la pression critique soit atteinte et qu'elles se déforment de façon irréversible ou éclatent.

III.2.2.2 Compression et indentation par microscopie à force atomique

Déjà décrite au paragraphe I.3.2.2.2 la microscopie à force atomique permet d'étudier la déformation des capsules en leur appliquant une force déterminée. Le dispositif expérimental classiquement mis en oeuvre pour les capsules multicouches comprend une bille de verre de dimensions largement supérieures à celles des capsules collée sur le levier, afin de se placer dans une configuration de type compression plan/plan (Figure 1.60).

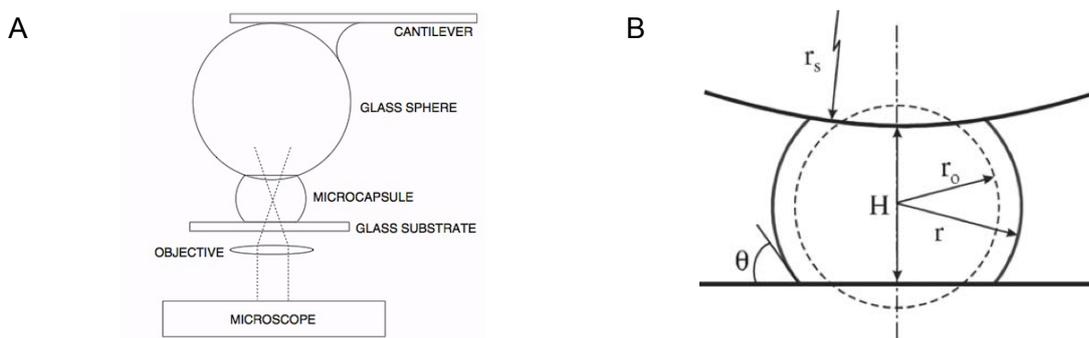


Figure 1.60 :(A) Schéma représentatif du dispositif expérimental d'une expérience de compression de capsule par AFM (B) Schéma représentatif de la capsule avant déformation (en pointillés) et après. D'après [Vinogradova, 2004]

Ce montage est complété par un microscope qui permet de suivre la déformation de la capsule étudiée, avec des variantes possibles : l'utilisation d'un microscope confocal offre la

possibilité de mesurer plus précisément la taille des objets avec une résolution maximale de 0.2 μm (Figure 1.61-A) tandis que l'emploi d'un microscope en mode RICM¹² permet de reconstruire la morphologie de la capsule à partir des motifs d'interférence générés (Figure 1.61-B).

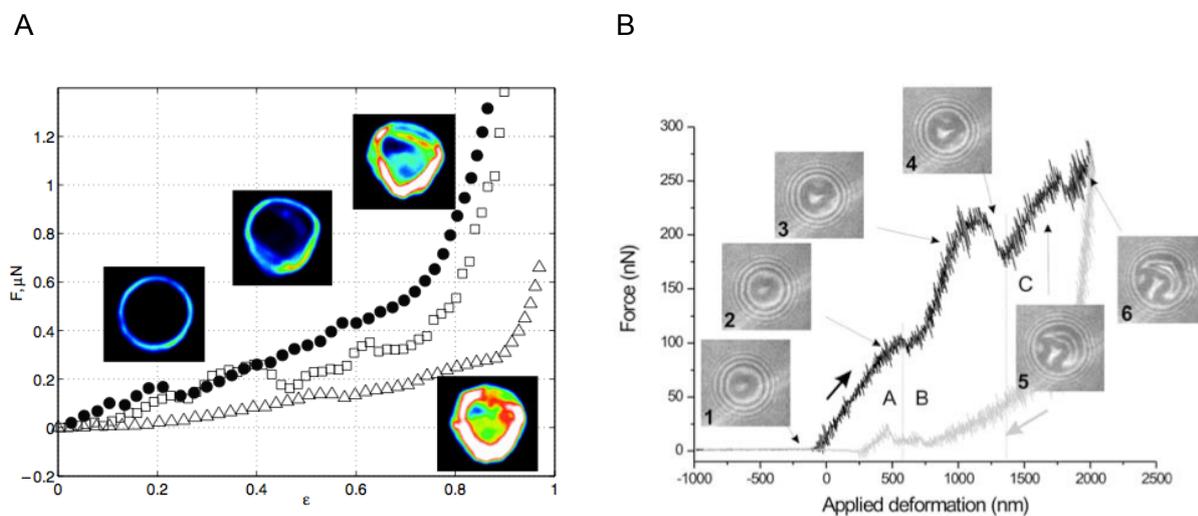


Figure 1.61 : (A) Courbes de force-déformation de capsules PSS/PAH, avec en insert les clichés de microscopie confocale correspondants. D'après [Vinogradova, 2004] (B) Courbe de force-déformation de capsules PSS/PAH avec en insert les clichés de microscopie RICM correspondants. D'après [Dubreuil et al., 2003]

Les courbes de force-déformation obtenues sont ensuite ajustées aux prédictions d'un modèle théorique, ce qui permet d'obtenir le module d'Young des capsules (Tableau 1.12). Les modèles utilisés varient en fonction de la situation expérimentale mais partent en général du principe que les capsules sont comparables à des coques minces d'élasticité isotrope [Landau et al., 1959]. Plusieurs hypothèses viennent ensuite compléter ce modèle de départ : les capsules sont a priori sphériques, conservent ou non leur volume pendant la compression et les déformations en courbure sont considérées négligeables. Ainsi, une équation reliant force, déformation, et caractéristiques de la capsule (épaisseur, rayon, module d'Young) permet de prédire des courbes de force-déformation théoriques qui peuvent être ajustées aux courbes expérimentales, le module d'Young servant de paramètre d'ajustement [Vinogradova et al., 2006].

Tableau 1.12 : Valeurs de module d'Young pour différents types de capsules multicouches

Type de capsule	Diamètre	E	Réf
(PSS/PAH) ₁₀₋₁₆	9 μm et 20 μm	1300-1900 MPa	[Dubreuil, 2003]
(PSS/PAH) ₄	2-8 μm	1-100 MPa	[Lulevich, 2003c]

¹² Reflection Interference Contrast Microscopy : microscopie de contraste d'interférences en réflexion. Cette technique permet d'étudier les phénomènes d'adhésion ou de mouillage au voisinage d'un substrat.

(PSS/PAH) ₅	9 μm et 16 μm	400 MPa	[Heuvingh et al., 2005]
(ADN/PAH) ₄	2 μm	100 MPa	[Vinogradova et al., 2005]
dendrimère/PAH	2 μm	70 MPa	[Kim et al., 2005b]

Dans la pratique, le modèle utilisé et donc la façon d’analyser les courbes de force-déformation a un impact sur les résultats finaux, ce qui peut expliquer en partie les différences d’ordre de grandeur observées sur un même système, comme par exemple sur les capsules PSS/PAH : tandis que Lulevich et al. appliquent une loi de puissance à la totalité de la courbe de force-déformation, Dubreuil et al. extraient le module d’Young à partir de la pente de la partie linéaire des courbes aux faibles déformations. De plus, les hypothèses de départ utilisées pour formaliser les équations décrivant le système ont également un rôle à jouer : [Lulevich, 2003c] pensent sous-estimer le module d’Young des capsules en négligeant le drainage de l’eau à travers la paroi. Enfin, les conditions de préparation de capsules (type de substrat et conditions de dissolution) peuvent différer d’une étude à l’autre et également expliquer les écarts observés en termes de propriétés mécaniques [Fery et al., 2004, Lulevich et al., 2003a].

Le traitement des données expérimentales s’intéresse quasi exclusivement aux courbes d’approche mais les courbes de retrait peuvent également apporter quelques informations complémentaires. Il est assez fréquent d’observer de faibles hystérèses entre courbes d’approche et de retrait, celles-ci étant attribuées au caractère viscoélastique de la capsule, à une éventuelle adhésion entre la sonde et la capsule, mais le plus souvent à la perméabilité de la membrane. En effet, sous l’effet de la compression, de l’eau peut être expulsée de la capsule de façon irréversible, d’où un comportement différent lors du retrait du levier. Identifier l’origine de l’hystérèse nécessite donc de réaliser des expériences complémentaires permettant de discriminer l’une ou l’autre de ces hypothèses.

Un facteur à prendre également en compte lorsque l’on s’intéresse à la mécanique des capsules est la présence ou non d’espèces s’y trouvant à l’intérieur. Plus perméables aux composés de faible masse moléculaires que les vésicules ou les cellules [Antipov et al., 2001], les capsules multicouches ne sont pas sous tension, à moins que des polymères de masse suffisamment importante pour ne pas traverser leur paroi y soient encapsulés. [Dubreuil et al., 2003] comparent ainsi les capsules à des ballons qui « fuient » plutôt qu’à des ballons sous pression.

Ceci étant, lorsque l’on compare les courbes de force de capsules (PSS/PAH)₄ vides et de capsules remplies d’une solution de PSS, il s’avère que ces dernières ont une rigidité plus importante [Lulevich, 2003a]. Il faut en effet une force de 50 à 100 fois plus élevée pour déformer une capsule pleine autant qu’une vide.

Les auteurs attribuent cette rigidité accrue à une réorganisation des polymères de la paroi après le gonflement induit par l'introduction d'une solution interne de PSS, mais aussi à la pression osmotique exercée par la solution de PSS encapsulée. La concentration en contre-ions à l'intérieur de la capsule ayant été estimée à 0.1M, les capsules ont été plongées dans des solutions de force ionique croissante et il a effectivement été observé qu'à forte concentration en sel (donc en appliquant une pression osmotique), la rigidité des capsules diminuait.

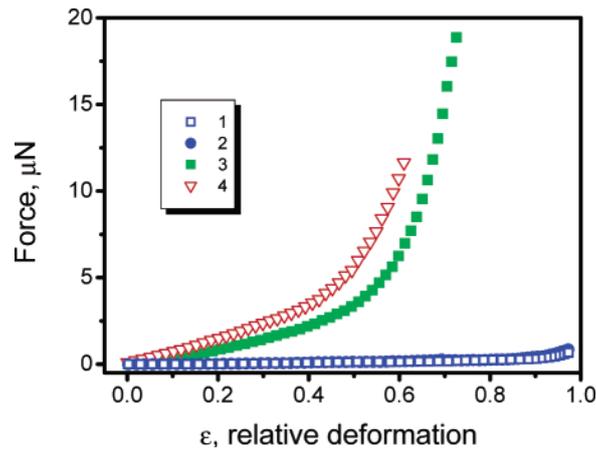


Figure 1.62 : Courbes force/déformation de capsules multicouches PSS/PAH vides (courbes 1 et 2) et de capsules pleines de PSS (courbes 3 et 4). D'après [Lulevich et al., 2003b]

La pression osmotique joue donc un rôle crucial dans la mesure de la rigidité des capsules, ce qui n'est pas sans rappeler la problématique déjà évoquée au paragraphe X sur les propriétés mécaniques des cellules végétales : comment dissocier la contribution de la paroi de celle de la pression interne ?

Vella et al. ont ainsi déterminé des expressions analytiques permettant de décrire le cas des coques minces sous pression, et testé leur validité expérimentale par indentation sur des cellules de levures [Vella et al., 2012] (Figure 1.63). Ce modèle est valide dans le cas où l'objet étudié est comparable à une coque mince (épaisseur de la paroi très faible devant le diamètre de l'objet), la profondeur d'indentation est inférieure ou comparable à l'épaisseur.

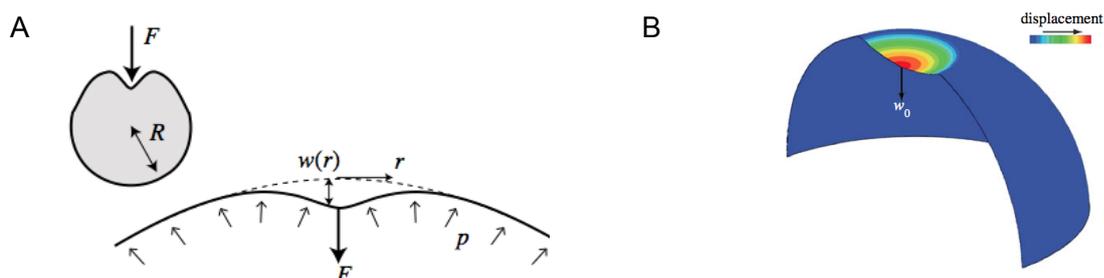


Figure 1.63 : (A) Schéma représentatif de l'indentation d'une capsule sphérique de rayon R sous

pression p . $w(r)$ correspond à la déflexion verticale et F à la force appliquée (B) w_0 correspond au déplacement au niveau du point d'application de la force [Vella et al., 2012]

Une forme linéaire est prédite pour la courbe force-déformation, dont la pente correspond à la rigidité apparente de la coque mince, notée k . Deux régimes peuvent être distingués sur les courbes de force-déformation de coques minces sous pression : un premier régime aux faibles déformations, de pente k_1 et un second aux grandes déformations de pente k_2 (l'amplitude de la déformation est relative à l'épaisseur de l'objet étudié).

Tableau 1.13 : Régimes de déformation de coques minces sous pression

Petites déformations ($w_0 \ll h$)	Grandes déformations ($w_0 \gg h$)
$F \sim k_1 w_0$	$F \sim k_2 w_0$
$k_1 \sim \frac{\pi p R}{\log 2\tau} ; \tau$	$k_2 \sim \pi p R$
$= \frac{1}{2} \sqrt{3(1-\nu^2)} \frac{p R^2}{E h^2}$	

Avec p la pression interne, h l'épaisseur, R le rayon, ν le coefficient de Poisson, E le module d'Young.

Expérimentalement, cela se traduit par le fait qu'aux faibles déformations, les courbes de force-déformation sont sensibles aux propriétés mécaniques de la paroi, tandis qu'aux plus grandes déformations la pression interne domine [Milani et al., 2011].

Beauzamy et al. ont utilisé cette approche pour étudier les propriétés mécaniques de parois de cellules d'oignon à différentes valeurs de pression osmotique: à partir d'une seule courbe de force-déformation et connaissant l'épaisseur approximative de la paroi, le module d'Young et la pression interne de cellules d'oignon ont pu être déterminés.

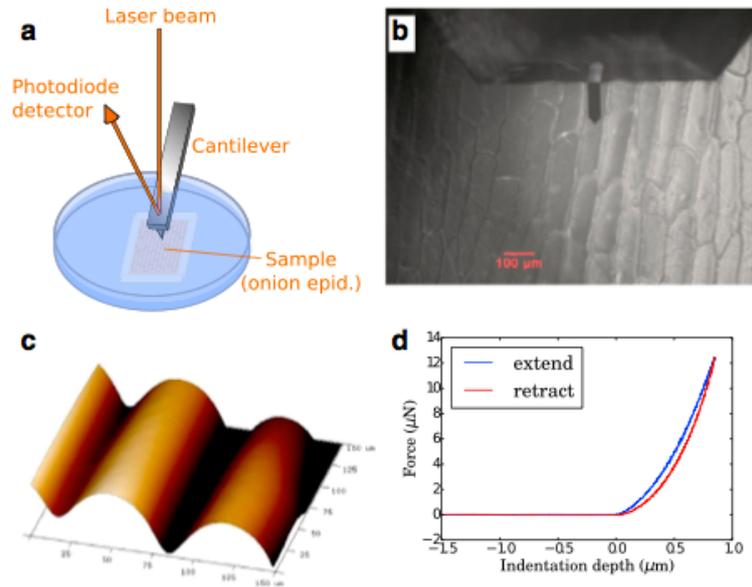


Figure 1.64 : (A) Schéma représentatif du dispositif expérimental (B) Cliché de microscopie optique du levier positionné à l'apex d'une cellule (C) Topographie de la cellule (D) Courbe de force-déformation typique des parois d'oignon étudiées (courbe d'approche en bleu, courbe de retrait en rouge). D'après [Beauzamy et al., 2015]

Ainsi, la pression interne des cellules d'oignon étudiées se trouve être de l'ordre de 0.3 MPa, et diminue lorsque la pression osmotique augmente (Figure 1.64-B). Le module d'Young de la paroi a été déduit de la partie des courbes de force correspondant aux faibles profondeurs d'indentation (de 0 à 300 nm, sachant que l'épaisseur de la paroi vaut environ 1.6 μm), et se situe aux alentours de 10 MPa. Il a également été observé que le module d'Young diminuait lorsque la pression osmotique exercée par la solution externe d'électrolyte augmentait, jusqu'à 1 MPa pour le milieu le plus concentré (Figure 1.65-A). Pour autant, cette observation ne remet pas en cause la validité du modèle utilisé : théoriquement, pour une profondeur d'indentation de l'ordre d'un quart de l'épaisseur de la paroi, le module augmente de moins de 20% quand la pression est doublée [Hayot et al., 2012], or dans le cas de [Beauzamy et al., 2015], le module est quasiment doublé, ce qui laisse penser que ce comportement provient plutôt des propriétés mécaniques intrinsèques de la paroi.

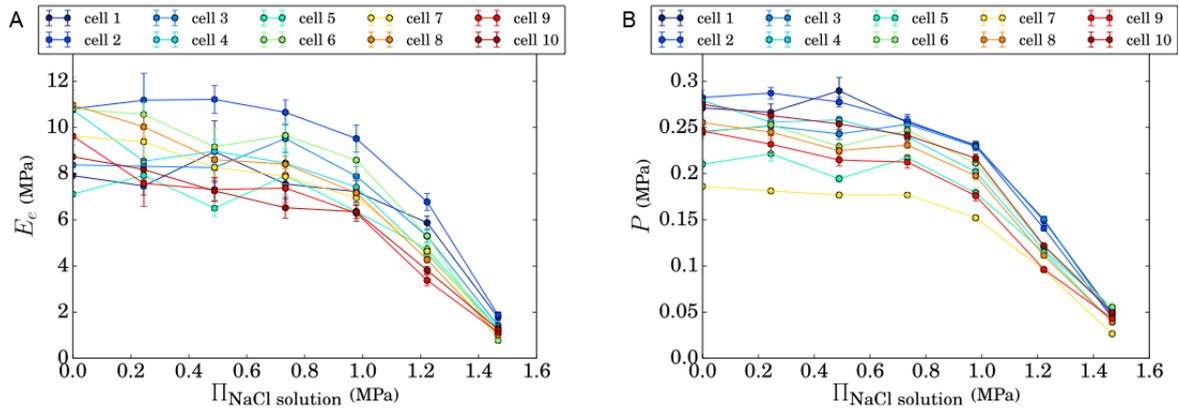


Figure 1.65 : (A) Evolution du module d'Young de la paroi de dix cellules différentes en fonction de l'osmolarité du milieu (B) Evolution de la pression interne de dix cellules différentes en fonction de l'osmolarité du milieu. D'après [Beauzamy et al., 2015]

En conclusion de cette partie consacrée aux capsules multicouches, il apparaît que l'effet de la pression osmotique n'a pas systématiquement été pris en compte dans les mesures de module d'Young par compression AFM, bien qu'elle semble bel et bien avoir une influence sur les propriétés mécaniques apparentes de la paroi. Cela s'explique notamment par le fait que l'encapsulation d'espèces osmotiquement actives à l'intérieur des capsules multicouches classiquement construites à partir de substrats solides n'est pas si aisée ; la dissolution du substrat n'étant pas forcément totale, la concentration en soluté à l'intérieur de la capsule n'est pas toujours parfaitement maîtrisée [Vinogradova et al., 2006].

Dans notre cas, l'utilisation de vésicules lipidiques comme support de départ nous permettra de contrôler la quantité d'espèce osmotiquement active encapsulée au moment de leur formation, et donc de travailler à pression osmotique fixée. Puis, en se limitant à des profondeurs d'indentation inférieures ou comparables à l'épaisseur de l'objet étudié il sera possible d'extraire le module d'Young de la paroi et c'est dans cette configuration que nous nous placerons pour étudier les propriétés mécaniques de nos capsules biomimétiques.

Chapitre 2 : Matériels, méthodes et techniques de caractérisation

I Préparation des briques élémentaires

I.1 Les vésicules lipidiques

I.1.1 Lipides utilisés

Les vésicules géantes unilamellaires ont été préparées à partir d'un mélange de deux lipides :

- le 1,2-dioléyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC, $M_w = 786,15$ g/mol, Avanti Polar Lipids Inc.), un phospholipide zwitterionique comportant deux chaînes de 18 carbones, chacune contenant une insaturation au 9^{ème} carbone.

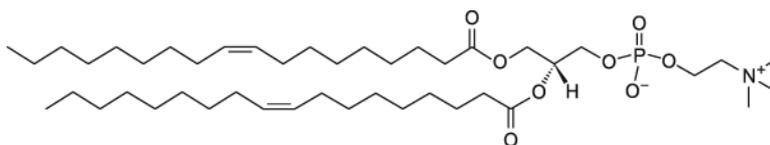


Figure 2.1 : Structure chimique du phospholipide utilisé

- le cholestérol ($M_w = 386,65$ g/mol, Sigma-Aldrich).

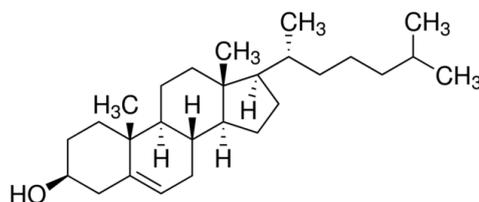


Figure 2.2 : Structure chimique du cholestérol

Deux formulations ont été utilisées : des GUV constituées uniquement de DOPC, et des GUV préparées à partir d'un mélange DOPC/cholestérol 70/30 %mol.

Il est également possible de marquer la membrane lipidique en mélangeant au DOPC un phospholipide fluorescent : le 1-oléyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine (NBD PC, $M_w = 882,09$ g/mol, Avanti Polar Lipids Inc.) qui comporte un groupement nitrobenzoxadiole fluorescent sur une de ses

chaînes carbonées (excitation/emission : 460/534 nm). Ce lipide fluorescent est mélangé au DOPC dans un rapport 1/50 (p/p) pour le marquage.

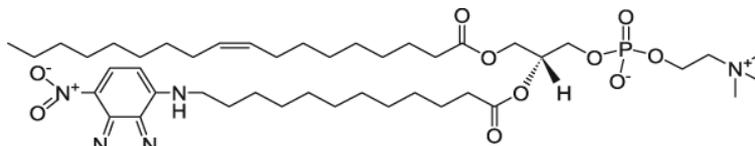


Figure 2.3 : Structure chimique du phospholipide fluorescent

Les lipides sont dissouts à 10 mg/mL dans un mélange chloroforme/méthanol (9/1 v/v) ; les solutions de lipides à 1 mg/mL utilisées pour l'électroformation des vésicules seront préparées par dilution de cette solution mère. L'ensemble de ces solutions est stocké à -20°C.

I.1.2 Préparation de vésicules géantes par électroformation

L'électroformation, qui consiste à hydrater un film sec de lipides sous un champ électrique alternatif [Angelova et Menger, 1998] est de loin la technique plus répandue pour la production de vésicules géantes, car elle présente l'avantage de produire un grand nombre de vésicules majoritairement unilamellaires. Le dispositif employé pour l'électroformation est une chambre comportant deux plaques de verre rendues conductrices par une fine couche d'oxyde d'indium-étain (ITO). Ces deux plaques sont espacées d'environ 1 mm l'une de l'autre. Ce dispositif provient du Laboratoire Interdisciplinaire de Physique (LiPhy).

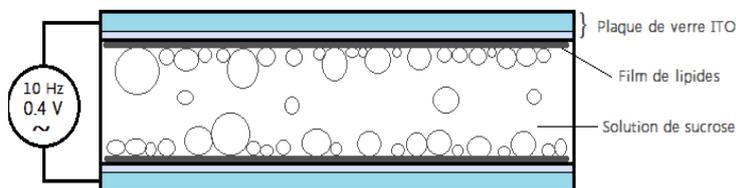


Figure 2.4 : Représentation schématique de la chambre d'électroformation vue en coupe

50 μ L de solution de DOPC à 1mg/mL sont déposés sur chaque plaque de verre et étalés à l'aide de l'aiguille d'une micro-seringue (Hamilton) de manière à former une couche de lipides fine et homogène. Le mélange chloroforme/méthanol étant très volatile, quelques minutes suffisent à ce que son évaporation soit complète. Une fois les films de lipides séchés, la chambre est assemblée et reliée à un générateur basse fréquence (Jeulin). La solution de saccharose 300 mM à encapsuler est alors introduite à la seringue ; ce remplissage se fait sous application d'un champ électrique alternatif sinusoïdal d'amplitude 0.3V et de fréquence 10Hz. Le tout est enfin hermétiquement fermé, et l'amplitude du champ augmentée à 0.4V.



Figure 2.5 : Schéma du mécanisme de l'électroformation des GUV. D'après [Walde et al. 2010]

L'application d'un champ électrique induit un déplacement périodique electro-osmotique de l'eau au voisinage des électrodes, ce qui « tire » les couches de lipides et permet la formation de structures en « champignon » (figure X 2 et 3) qui vont gonfler (figure X 4), fusionner entre elles, donnant naissance aux vésicules. Au moins 5 heures sont nécessaires à la formation de vésicules géantes, et idéalement l'électroformation se fait sur une nuit complète. La chambre est alors vidée délicatement avec une seringue (diamètre 1mm afin d'éviter de trop cisailer les vésicules). La suspension est stockée en eppendorf à 4°C et peut être conservée plusieurs semaines.

L'électroformation génère des suspensions polydisperses dont la fraction volumique en GUV est de l'ordre de quelques pourcents, pour un volume d'environ 3 mL par échantillon.

I.1.3 Dilution des GUV pour observation en microscopie

Afin de faciliter leur observation en microscopie, les vésicules sont diluées comme suit : à un volume V de GUV suspendues dans le saccharose 300mM est ajouté un volume $4V$ d'une solution iso-osmolaire de glucose. La membrane des vésicules n'étant pas perméable à ces deux molécules, cette dilution présente deux avantages : d'une part, elle crée un contraste entre l'intérieur et l'extérieur des GUV favorable à l'observation en microscopie, car saccharose et glucose ont des indices de réfraction différents. D'autre part, le saccharose étant plus dense que le glucose, la dilution induit une sédimentation des vésicules qui sera exploitée par la suite pour les étapes de décoration des GUV par les nanocristaux de cellulose et les xyloglucanes

I.1.4 Préparation de LUV par extrusion de GUV

Pour permettre l'étude de la charge de la membrane lipidique par zétamétrie, il s'est avéré nécessaire de générer des vésicules de plus petite taille : les LUVs (large unilamellar vesicles) dont la taille est de l'ordre de la centaine de nanomètres. Les LUVs ont été obtenues par extrusion des suspensions de GUV préparées par électroformation à travers un filtre de taille de pores $0.2 \mu\text{m}$ (Rotilabo®-syringe filters Mini Tip, membrane en nylon), comme illustré sur la Figure 2.6. Les LUVs préparées dans ces conditions sont unilamellaires avec un diamètre avoisinant les 200nm. L'avantage de cette méthode est de pouvoir obtenir des liposomes qui ont la même composition en lipides que les vésicules géantes de départ.

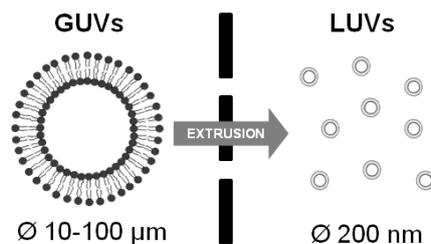


Figure 2.6 : Représentation schématique de l’extrusion d’une GUV à travers les pores d’un filtre pour former des LUV.

I.2 Nanocristaux de cellulose et xyloglucanes

I.2.1 Préparation et caractérisation des suspensions de CNC

I.2.1.1 Hydrolyse acide de la cellulose

Les nanocristaux de cellulose sont obtenus selon le protocole suivant, adapté de celui de [Revol et al., 1992]: 60 grammes de linters de coton (Buckeye Cellulose Corporation) sont ajoutés à 840 mL d’une solution d’acide sulfurique à 65% (p/p) dans un ballon tricol, l’ensemble étant chauffé à 63°C au bain-marie. La réaction se fait sous agitation mécanique et dure une demi-heure, durant laquelle la solution initialement blanche prend rapidement une teinte ivoire, pour finalement devenir beige. L’hydrolyse est alors stoppée par ajout de 100g de glace dans le milieu réactionnel, et en plaçant également le ballon dans un bain de glace.

I.2.1.2 Purification et dispersion en milieu aqueux

L’étape suivante sert à éliminer l’excès d’acide, et consiste en une centrifugation de 15 minutes à 9500 tours par minute (rpm), à l’aide d’une centrifugeuse 6K15 de Sigma (accélération maximale de 11200 rpm) : le surnageant contient l’acide sulfurique, on récupère donc le culot, sous la forme d’une pâte, que l’on redisperse dans 1L d’eau distillée. Pour enlever le maximum d’acide, cette opération de centrifugation/dispersion est effectuée trois fois de suite. La suspension aqueuse obtenue est ensuite mise à dialyser jusqu’à ce que la conductivité du bain de dialyse soit stable. Une fois dialysée, la suspension est homogénéisée aux ultrasons par part de 200 mL pendant 3 minutes à 30% dans un bain de glace; cette étape est effectuée deux fois, en utilisant un sonicateur de type Sonicator Ultrasonic Liquid Processor XL2020 de Misonix (puissance de 550W et fréquence de 20Hz, la sonde a un diamètre de 13 mm). Enfin, pour se débarrasser des éventuels agrégats restants, la dispersion est filtrée à l’aide d’un système de filtration sous pression Sartorius (SM162 49), successivement sur deux types de membranes en nitrate de cellulose, respectivement de diamètre 5 et 1 µm. Quelques milligrammes d’azoture de sodium sont ajoutés à la suspension pour éviter toute contamination

bactérienne, et le tout est stocké à 4°C. La teneur en matière sèche (siccité) de la suspension vaut environ 2,5% ; celle-ci est déterminée par évaporation de solvant à l'étuve.

I.2.1.3 Dosage des groupements sulfate par conductimétrie

Après l'obtention des nanocristaux de cellulose par hydrolyse à l'acide sulfurique des linters de coton, les groupements sulfates se trouvant à la surface de ces nanoparticules peuvent être dosés par conductimétrie. Ce dernier consiste en une titration des ions H_3O^+ , les contre-ions des groupements sulfates en suivant la variation de la conductance.

En pratique, une suspension de nanocristaux de cellulose de volume et de concentration massique connus est titrée par ajout d'une solution de NaOH à 0,01M. Ce dosage est effectué sous agitation constante en utilisant un conductimètre de type CDM 210 et une électrode CDM 614T. L'équivalence est repérée par le point d'inflexion de la courbe représentant la conductance en fonction du volume de soude, comme l'illustre la Figure 2.7.

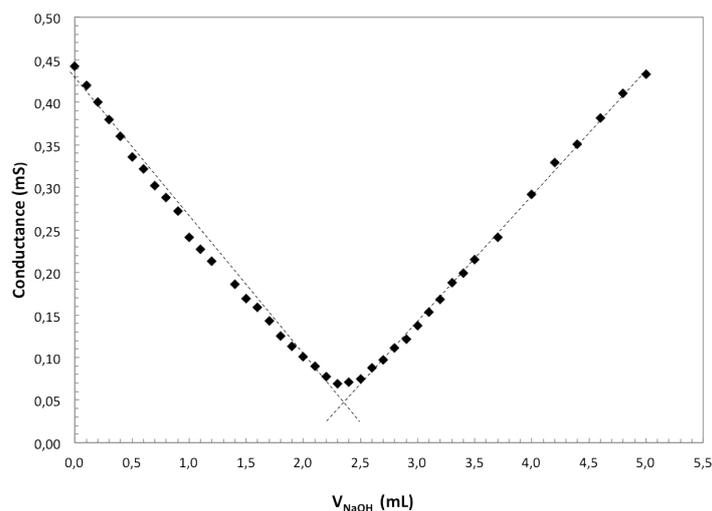


Figure 2.7 : Courbe de dosage conductimétrique d'une suspension de nanocristaux de cellulose par de la soude

A l'équivalence, la relation suivante est vérifiée :

$$V_{\text{éq}} \times C_{\text{NaOH}} = n_{\text{cellulose}} \times d_s \quad (2.1)$$

avec $V_{\text{éq}}$ le volume de NaOH ajouté, $n_{\text{cellulose}}$ le nombre de moles de résidus de glucose et d_s le degré de substitution représentant le nombre de groupements sulfates par unité de glucose. Or, nous savons que :

$$n_{\text{cellulose}} = \frac{m_{\text{cellulose}}}{M_{\text{moy}}} \quad (2.2)$$

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

$$M_{moy} = 162 \times (1 - d_s) + 242 d_s \quad (2.3)$$

où 162 g.mol^{-1} et 242 g.mol^{-1} sont respectivement les masses molaires d'une unité de glucose seule et d'une unité sulfatée. Les équations (2.1) et (2.2) nous permettent d'écrire :

$$d_s = \frac{V_{\acute{e}q} \times C_{NaOH} \times M_{moy}}{m_{cellulose}} \quad (2.4)$$

Nous obtenons donc un système de deux équations à deux inconnues (d_s et M_{moy}). La masse molaire moyenne d'un résidu de glucose substitué M_{moy} est donc calculée d'après la relation suivante :

$$M_{moy} = \frac{162}{1 - 80 \times \frac{V_{\acute{e}q} \times C_{NaOH}}{m_{cellulose}}} \quad (2.5)$$

Nous calculons ensuite d_s par l'équation (2.4) qui peut être converti en taux de soufre, τ_s , en utilisant la relation suivante :

$$\tau_s = \frac{32 \times d_s}{M_{moy}} = \frac{32 \times V_{\acute{e}q} \times C_{NaOH}}{m_{cellulose}} \quad (2.6)$$

Dans ces conditions, le volume équivalent de soude vaut $V_{\acute{e}q}=2,4 \text{ mL}$, ce qui correspond à un degré de substitution $d_s=0,05$ et à un taux de soufre de $0,8\%$.

I.2.1.4 Calcul de la charge de surface des CNC

En connaissant le degré de substitution d_s des nanocristaux de cellulose, il est possible de calculer leur charge de surface. Les CNC sont considérés comme des parallélépipèdes de longueur L , de largeur l et de hauteur h [Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008]. Dans le cas de CNC issus du coton (de type cellulose I), la longueur d'un monomère de cellulose est $c = 1,038 \text{ nm}$ [Nishiyama et al., 2002], ce qui correspond à deux molécules de glucose. Les distances entre les chaînes sont $b = 0,54 \text{ nm}$ dans le sens de la largeur du cristal et $a = 0,61 \text{ nm}$ dans le sens de la hauteur (Figure 2.8).

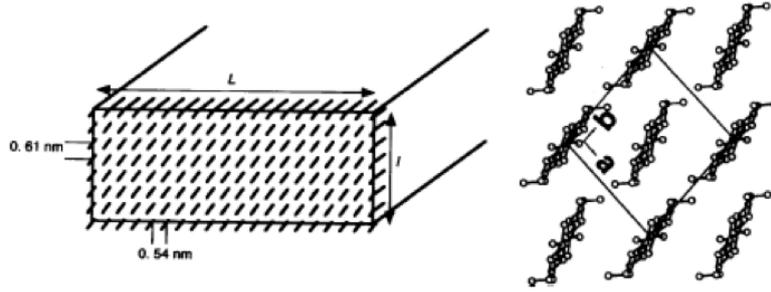


Figure 2.8 : Section transversale d'un nanocristal de cellulose. D'après [Goussé et al., 2002]

Le nombre de monomères N de glucose dans un nanocristal s'exprime donc :

$$N = \frac{L \cdot l \cdot h}{a \cdot b \cdot (c/2)} \quad (2.7)$$

La taux surfacique de charge σ_{CNC} d'un nanocristal de cellulose s'écrit alors :

$$\sigma_{CNC} = \frac{N \cdot d_s}{2(L \cdot l + L \cdot h + l \cdot h)} \quad (2.8)$$

En considérant $L = 155$ nm (valeur mesurée par microscopie électronique en transmission), $l = 26$ et $h = 6$ nm [Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008], nous avons calculé une densité de charge de $0,6$ e/nm².

I.2.2 Préparation des solutions de xyloglucane

Les solutions de xyloglucane sont préparées selon le protocole décrit par [Muller et al. 2011]. 3 grammes de xyloglucane en poudre sont mis à reflux dans 300mL de soude à 0,01M dans un ballon de 500mL, et ce à 100°C pour une durée de 3 heures (avec quelques milligrammes d'azoture de sodium pour éviter toute contamination bactérienne), sous agitation constante. A la fin de l'extraction, l'ensemble est laissé à refroidir jusqu'à être à température ambiante.

L'extraction terminée, la solution est centrifugée pendant 30 minutes à 9500 rpm à 4°C pour séparer les parties insolubles de la solution de xyloglucane. Le surnageant est alors récupéré puis dialysé jusqu'à ce que la conductivité de l'eau soit inférieure à $5\mu\text{S}^3/\text{cm}$. Des gouttes de chloroforme sont systématiquement ajoutées au bain de dialyse pour éviter la prolifération bactérienne (l'azoture de sodium ajouté pendant l'extraction est évacué lors de la dialyse). La siccité de la solution ainsi préparée se situe aux alentours de 0.5% (p/p). Celle-ci est alors conservée à 4°C avec quelques milligrammes d'azoture de sodium.

I.2.3 Marquage fluorescent de la cellulose et du xyloglucane

I.2.3.1 Fluorophores utilisés

[Nielsen et al., 2010] ont proposé une méthode simple de marquage fluorescent des nanocristaux de cellulose en une seule étape, reposant sur la réaction entre les groupements isothiocyanate (-N=C=S) d'une espèce fluorophore et les groupements hydroxyles (-OH) de la cellulose. Possédant le même squelette de glucose que la cellulose, les xyloglucanes peuvent être marqués selon le même procédé. Les fluorophores utilisés pour le marquage sont la Rhodamine B isothiocyanate (RBITC, $M_w=536,08 \text{ g.mol}^{-1}$, $\lambda_{ex}=540\text{nm}/\lambda_{em}=625\text{nm}$, Sigma Aldrich) pour les nanocristaux de cellulose, et la fluorescéine isothiocyanate (FITC, $M_w=389,38 \text{ g.mol}^{-1}$, $\lambda_{ex}=495 \text{ nm}/\lambda_{em}=521 \text{ nm}$, Sigma Aldrich) pour le xyloglucane. Ces deux fluorophores se présentent sous la forme de poudres.

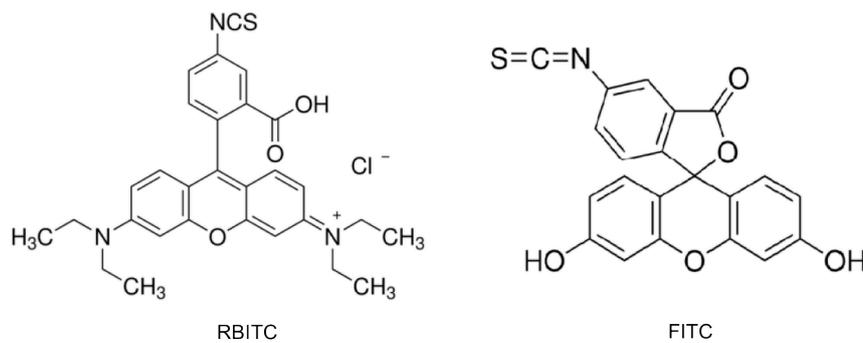


Figure 2.9 : Structure chimique des fluorophores utilisés

I.2.3.2 Protocole de greffage

Les quantités de fluorophore à utiliser pour les réactions de greffage sont déterminées par le calcul suivant, repris de [Dong and Roman, 2007] :

$$m_{RBITC}(\text{en mg}) = m_{CNC} \times 0.032 \times M_{w,RBITC} \quad (2.9)$$

$$m_{FITC}(\text{en mg}) = m_{XG} \times 0.32 \times M_{w,FITC} \quad (2.10)$$

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

La masse de RBITC a été divisée par 10 pour la cellulose, pour éviter de substituer trop de groupements hydroxyle, ce qui pourrait gêner les interactions avec le xyloglucane.

Pour calculer les masses de cellulose et de xyloglucane, le volume en millilitre de la suspension de CNC ou de la solution de XG est considérée comme équivalent à sa masse en gramme, soit :

$$m_{\text{CNC}} = \frac{C_{\text{CNC}} \times V_{\text{sus,CNC}}}{100} \approx \frac{C_{\text{CNC}} \times m_{\text{sus,CNC}}}{100} \quad (2.11)$$

avec C_{CNC} la concentration massique de la suspension de CNC, $V_{\text{sus,CNC}}$ le volume de la suspension de CNC en mL et $m_{\text{sus,CNC}}$ la masse de la suspension de CNC en g.

$$m_{\text{XG}} = \frac{C_{\text{XG}} \times V_{\text{sol,XG}}}{100} \approx \frac{C_{\text{XG}} \times m_{\text{sol,XG}}}{100} \quad (2.12)$$

avec C_{XG} la concentration massique de la solution de XG, $V_{\text{sol,XG}}$ le volume de la solution de XG en mL et $m_{\text{sol,XG}}$ la masse de la solution de XG en g.

Le protocole de la réaction de greffage est le suivant : le fluorophore est dissout dans la suspension de nanocristaux, ou dans la solution de xyloglucanes, selon les quantités indiquées précédemment. De la soude 0,2 M est ajoutée afin que le milieu réactionnel ait une concentration totale en soude de 0,1M. Le tout est laissé à réagir sous agitation pendant 72 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière.

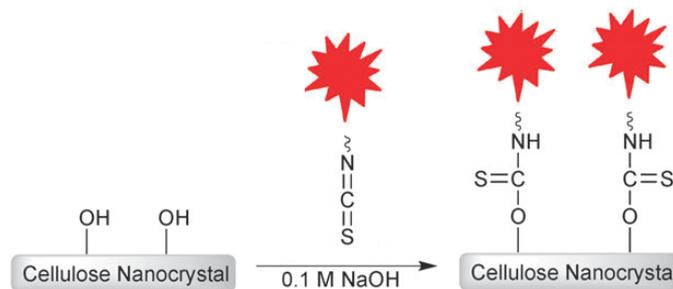


Figure 2.10 : Schéma de la réaction de greffage de la RBITC avec les CNC. D'après [Nielsen et al., 2010]

I.2.3.3 Purification des CNC marqués

La réaction de greffage terminée, la suspension est centrifugée à 11 200 rpm pendant 30 minutes. Le surnageant est retiré et le culot resuspendu dans une solution de soude à 0,1M. Cette étape est répétée deux fois supplémentaires, et suivie d'une dialyse. La purification se termine par un lavage dans une cellule d'ultrafiltration (Micon), en utilisant une membrane en cellulose régénérée de seuil de coupure 10kDa. Ce même dispositif permet de concentrer la suspension jusqu'à 3 à 5 %. Les suspensions de CNC marqués sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière, avec quelques milligrammes d'azoture de sodium pour empêcher la prolifération bactérienne.

I.2.3.4 Purification des XG marqués

Une fois le marquage terminé, la solution de xyloglucanes est placée dans une membrane de dialyse, et dialysée jusqu'à ce que le pH des eaux de dialyse soit stable. Dans ce cas, il n'y a pas de centrifugation étant donné que les xyloglucanes sont en solution et ne peuvent donc pas sédimenter. La solution est ensuite lavée par ultrafiltration avec une membrane en cellulose régénérée de seuil de coupure 10kDa pendant trois jours, et concentrée jusqu'à 0.2%, puis conservée à 4°C à l'abri de la lumière, avec quelques milligrammes d'azoture de sodium.

I.2.3.5 Caractérisation du greffage des fluorophores

Afin d'évaluer la quantité de fluorophore greffée sur les nanocristaux de cellulose et sur le xyloglucane, l'étude des spectres d'absorbance d'une suspension de CNC-RBITC à 2% (p/p) et d'une solution de XG-FITC à 0,1% (p/p) a été menée par spectrophotométrie UV-visible.

I.2.3.5.1 Principe de la mesure d'absorbance

L'absorbance d'un milieu est définie comme étant sa capacité à absorber la lumière qui le traverse. L'intensité de la lumière transmise I ayant traversé le milieu étudié est inférieure à celle de la lumière initialement émise I_0 . L'absorbance A s'exprime comme le logarithme décimal du rapport de ces deux intensités :

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.13)$$

La loi de Beer-Lambert relie l'absorbance à la concentration en chromophores de l'échantillon, selon :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (2.14)$$

Où ε est le coefficient d'absorption (ou coefficient d'extinction molaire) en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, l la longueur du trajet optique en cm et C la concentration en chromophores en $mol \cdot L^{-1}$. A partir de l'absorbance d'une solution, il est donc possible de remonter à la concentration en solutés chromophores.

I.2.3.5.2 Appareillage

L'absorbance d'une solution à une longueur d'onde se mesure à l'aide d'un spectrophotomètre, dispositif dont le fonctionnement est représenté sur la Figure 2.11. A partir d'une source lumineuse polychromatique (lumière visible ou ultraviolette), un monochromateur génère un rayon lumineux monochromatique, de longueur d'onde définie. La lumière incidente d'intensité I_0 traverse alors une cuve contenant l'échantillon à analyser puis l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. Le signal lumineux est alors collecté par une photodiode

qui convertit la lumière reçue en courant. Ce détecteur est relié à un enregistreur qui permet enfin d'afficher l'absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde étudiée. Il est également possible de produire le spectre d'absorbance complet de l'échantillon en opérant un balayage entre deux valeurs de longueur d'onde données.

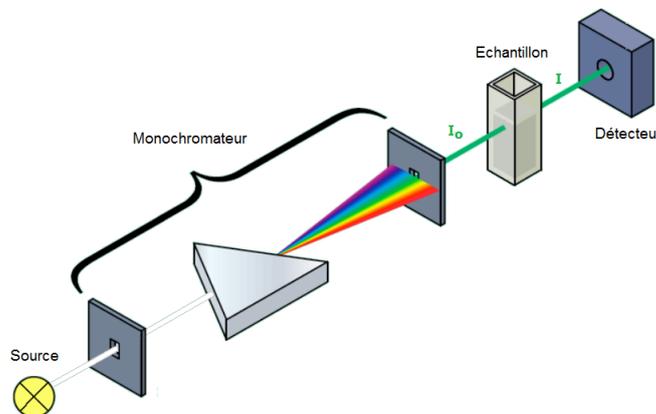


Figure 2.11 : Schéma de principe d'un spectrophotomètre UV-visible

L'appareil utilisé pour effectuer les mesures est un spectrophotomètre Cary-50 UV-VIS (Varian), piloté par le logiciel CaryWin UV. Lors d'une mesure, la solution à analyser est introduite dans une cuve de 1mL et de trajet optique $l = 1$ cm.

I.2.3.5.3 Courbes d'étalonnage des fluorophores

Dans un premier temps, il est nécessaire de réaliser une courbe d'étalonnage pour chacun des deux marqueurs fluorescents utilisés, c'est à dire de tracer l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration en fluorophore. A cette fin, des gammes de dilutions sont préparées pour chacun des marqueurs. Dans le cas de la FITC, celle-ci est solubilisée dans de la soude 0,1 M afin que seule sa forme dianionique (pic maximum à 495 nm) soit présente, et que la mesure d'absorbance soit quantitative [Nielsen et al. 2010]. La figure 2.12 présente ainsi les courbes d'étalonnage obtenues pour la RBITC et la FITC.

Pour une solution donnée, le spectre d'absorbance du solvant seul doit être préalablement enregistré, c'est ce qu'on appelle le « blanc » ; il servira ainsi de ligne de base et sera automatiquement déduit du spectre de l'échantillon correspondant. Dans le cas des gammes de dilutions, l'eau déionisée sert de blanc. Pour les échantillons de CNC-RBITC et de XG-FITC, sont respectivement utilisées comme blanc une suspension de CNC non marqués de même concentration et une solution de XG non marqués de même concentration.

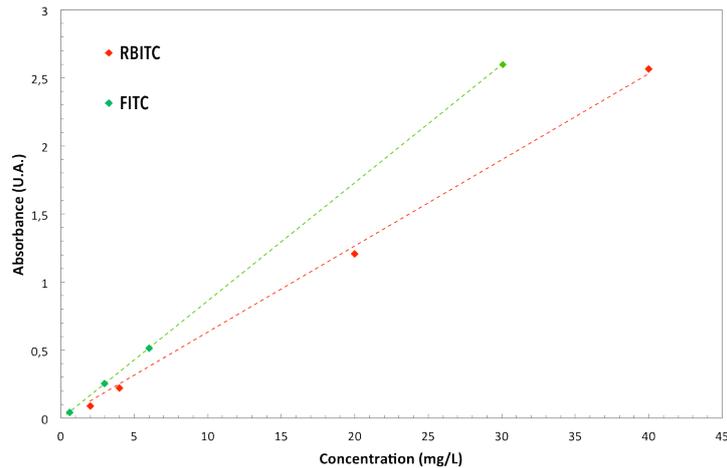


Figure 2.12 : Absorbance maximale d'une solution de RBITC et d'une solution de FITC en fonction de la concentration en fluorophore.

L'absorbance d'un échantillon de CNC-RBITC à 2% (p/p) a été mesurée et vaut 0,443. En utilisant l'équation trouvée par régression linéaire de la courbe d'étalonnage, on obtient finalement que la concentration en RBITC dans la suspension de CNC-RBITC vaut 7,0 mg/L. Le même raisonnement est appliqué pour la solution de XG-FITC à 0,1% (p/p), une absorbance de 0,401 est mesurée, correspondant à une concentration en FITC de 4,7 mg/L.

A partir de ces valeurs de concentration, nous pouvons déterminer le taux de greffage en fluorophore. La suspension de CNC-RBITC contient 2% en masse de CNC (20g/L) et 7.10^{-3} g/L de RBITC. Sachant que la masse molaire de la RBITC est de 536,08 g/mol, on peut en déduire le taux de greffage des CNC marqués, qui vaut $0,65 \mu\text{mol.g}^{-1}$. De même, pour la solution de XG-FITC à 0,1% (p/p) (1g/L) contenant $4,7.10^{-3}$ g/L de FITC, sachant que la masse molaire de la FITC est de 389,38 g/mol, le taux de greffage vaut $12,0 \mu\text{mol.g}^{-1}$.

II Elaboration et déformation des capsules multicouches

II.1 Protocole couche-par-couche

II.1.1 Dépôt d'une couche de CNC

Un volume V de la suspension de vésicules fraîchement formées dans une solution de saccharose 300mM/ NaCl 1mM est diluée dans $4V$ d'une solution de saccharose 300mM/NaCl 1mM tamponnée à pH 3,5 (tampon acétate 1mM). Ce pH d'incubation a été fixé pour optimiser l'interaction GUV/CNC (voir chapitre 3) en limitant le dégonflement des vésicules, leur dilution dans une solution de pH différent induisant un léger choc osmotique. 0,1 mL de cette suspension diluée de vésicules est introduit dans un eppendorf contenant 0,4 mL d'une suspension de nanocristaux de cellulose à 2% (p/p), également ajustée à 300mM en saccharose

et 1mM en NaCl. La fraction volumique en vésicules étant très faible (de l'ordre de quelques pourcents), nous considérons que les CNC sont en excès malgré la légère dilution due à l'ajout de la suspension de GUV. L'ensemble est homogénéisé manuellement en retournant délicatement l'éppendorf, puis laissé à incuber une vingtaine de minutes.

II.1.2 Rinçage et dépôt de la couche de XG

Les CNC ayant été introduits en excès afin d'assurer un recouvrement maximal de la membrane des GUV, l'étape de rinçage doit permettre de se débarrasser des CNC libres qui ne se sont pas adsorbés. Pour cela, l'éppendorf est complété par une solution de glucose à 300mM/NaCl 1mM. La différence de densité entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules les fera sédimenter au fond de l'éppendorf. Cette étape est relativement délicate car il est difficile d'estimer visuellement la délimitation entre le culot et le surnageant. Aussi, afin de s'assurer qu'un maximum de vésicules sédimentent et donc de limiter la perte d'objets, le rinçage par sédimentation s'effectue le temps d'une nuit ou d'une journée, à la suite de quoi le surnageant sera aspiré à l'aide d'une seringue jusqu'à ne laisser que 0,1mL de culot (ce qui correspond au volume initialement introduit de la suspension de vésicules). Un volume de 0,1 mL de tampon saccharose est enfin ajouté pour redisperser les vésicules. Une fois le rinçage effectué, la solution de XG à 0,01% (p/p), également ajustée à 300mM saccharose et 1mM en NaCl et préalablement filtrée sur filtre de 0,45µm est introduite en excès. L'ensemble est homogénéisé manuellement en retournant délicatement l'éppendorf, puis laissé à incuber une trentaine de minutes.

II.1.3 Protocole final

Les étapes d'incubation/rinçage sont ensuite répétées jusqu'à obtention du nombre de bicouches désiré, selon le protocole représenté sur la Figure 2.13.

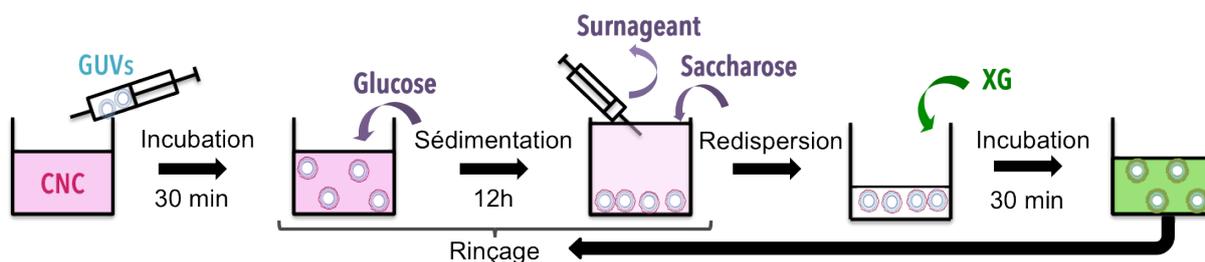


Figure 2.13 : Représentation schématique du procédé de construction de capsules multicouches

Par la suite, les capsules seront toujours terminées par une couche de CNC, sauf si mentionné. La répulsion induite par leur charge négative limitera l'agrégation des capsules. Cette charge permettra également de faire adhérer les capsules à un substrat chargé positivement, ce qui sera utile notamment pour les immobiliser lors de l'acquisition de courbes

de force par microscopie à force atomique. La nomenclature utilisée sera la suivante : une capsule formée par le dépôt de n bicouches de nanocristaux de cellulose et xyloglucanes sur une vésicule géante sera notée $\text{GUV}/(\text{CNC}/\text{XG})_n$. Si n est un entier, la capsule est recouverte par une dernière couche de XG, et si n est un demi-entier, par une couche de CNC.

II.2 Déformation des capsules par pression osmotique

Le dispositif utilisé pour observer la déformation des capsules soumises à un choc osmotique reproduit le montage de [Bernard et al., 2008] et est représenté sur la Figure 2.14. Un espaceur de diamètre 20 mm et de profondeur 2 mm (Press-to-seal silicone isolator, Sigma-Aldrich) est collé sur une lamelle de verre : 600 μL de la suspension de capsules à observer sont introduits dans ce premier compartiment, cette suspension ayant été préalablement diluée dans une solution iso-osmolaire de glucose de concentration c_0 , afin que les objets sédimentent. L'ensemble est ensuite recouvert d'une membrane inorganique AnodiscTM25 (Whatman) de taille de pores 0,2 μm , puis surmonté de plusieurs espaceurs, formant un second compartiment d'un volume de 2mL. Ce second compartiment est ensuite rempli d'une solution de concentration supérieure ou inférieure à c_0 pour induire respectivement le dégonflement ou le gonflement des capsules. Le comportement des capsules à la suite du choc osmotique est ensuite observé à l'aide d'un microscope inversé.

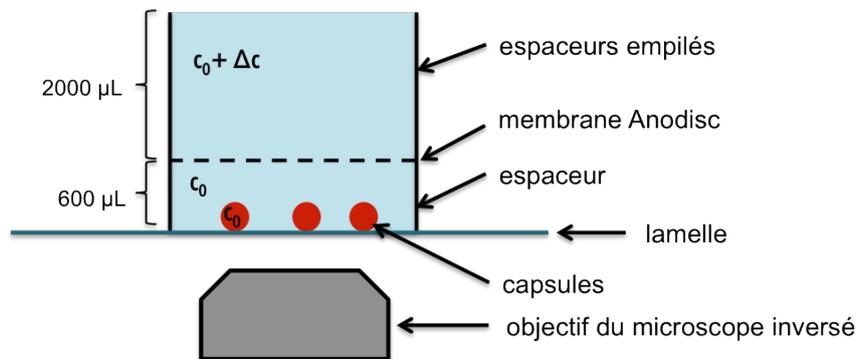


Figure 2.14 : Représentation schématique du dispositif employé pour la déformation de capsules par pression osmotique

Afin de juger de l'élasticité de la paroi des capsules, nous avons également tenté de réaliser des séquences de gonflement suivies de dégonflement. Ces essais ont été effectués selon le mode opératoire illustré sur la Figure 2.15 : une solution de glucose hypertonique est introduite dans le compartiment supérieur et laissée à diffuser dans le compartiment inférieur (Figure 2.15-A) jusqu'à ce que les concentrations s'équilibrent et que les capsules aient atteint leur rayon d'équilibre (Figure 2.15-B). Le compartiment supérieur est alors vidé (Figure 2.15-C), pour être rempli cette fois d'une solution hypertonique, qui va induire un dégonflement des capsules.

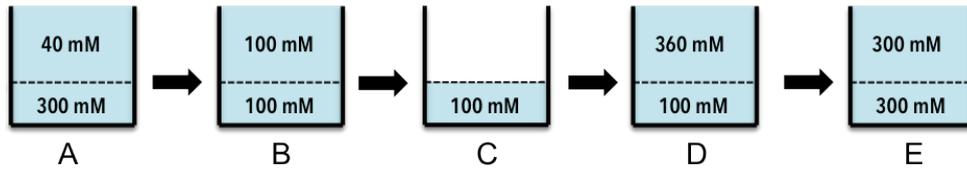


Figure 2.15 : Représentation schématique d'une séquence de gonflement/dégonflement par pression osmotique.

III Techniques de caractérisation

III.1 Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering) est une technique d'analyse non invasive permettant de mesurer la taille de particules colloïdales, ou de molécules dont la taille est comprise entre le nanomètre et le micromètre. Elle consiste à observer la diffusion de la lumière par les nanoparticules (diffusion de Rayleigh) qui se déplacent sous l'effet du mouvement Brownien, leur vitesse de déplacement étant reliée à leur taille. En effet, plus une particule est petite, plus celle-ci est sensible aux chocs avec les molécules de solvant et plus elle se déplace rapidement (Figure 2.16.A).

L'évolution de l'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps permet de définir une fonction dite d'auto-corrélation, qui correspond à la comparaison du signal mesuré avec lui-même à deux instants très proches, t et $t+\Delta t$: cette fonction décroît avec le temps. Le temps caractéristique de cette décroissance est lié au coefficient de diffusion D des nanoparticules selon :

$$\frac{1}{\tau} = DQ^2 \quad (2.15)$$

où τ est le temps de relaxation, D le coefficient de diffusion et Q le vecteur d'onde.

Le coefficient de diffusion ainsi calculé donne accès au diamètre hydrodynamique D_H des particules par la relation de Stokes-Einstein.

$$D_H = \frac{K_B T}{3\pi\eta_s D} \quad (2.16)$$

où K_B est la constante de Boltzmann, T la température et η_s la viscosité.

Cette relation étant valable uniquement pour des particules sphériques, la DLS est tout à fait adaptée dans le cas des liposomes. En revanche, les tailles mesurées dans le cas des CNC

qui sont des bâtonnets, correspondent au diamètre hydrodynamique de sphères qui auraient le même coefficient de diffusion, et donnent une indication plus qu'une valeur géométrique réelle.

Les mesures ont été effectuées sur l'appareil Zetasizer NanoSeries (Malvern Instruments). La source lumineuse est un laser hélium-néon à lumière monochromatique (633nm), focalisé sur l'échantillon par des lentilles. L'échantillon va alors diffuser la lumière dans toutes les directions mais cette lumière diffusée ne sera collectée par le photodétecteur qu'à un angle fixe. L'appareil dont nous disposons détecte la lumière diffusée à un angle de 90° par rapport au trajet du rayon lumineux incident (Figure 2.16-B).

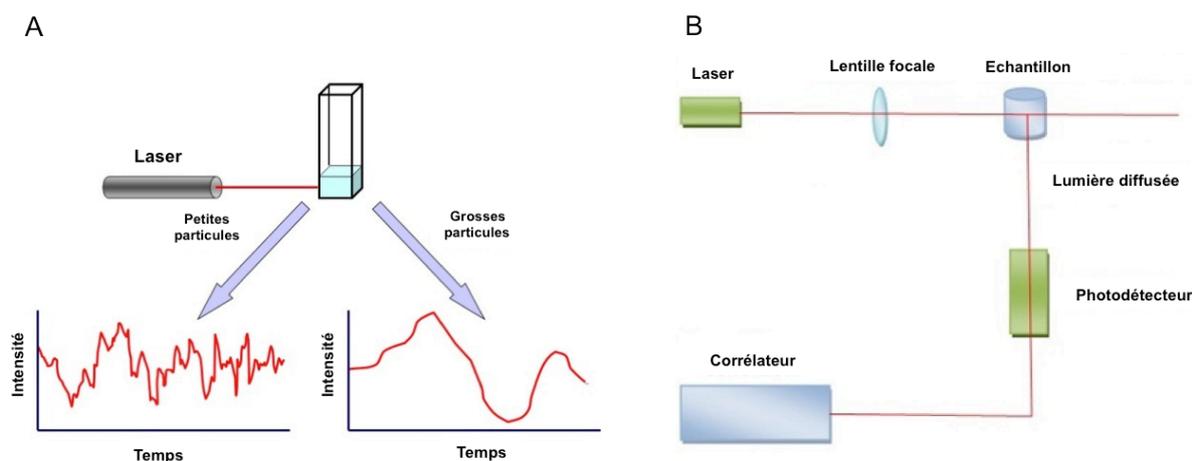


Figure 2.16 : (A) Représentation schématique des fluctuations d'intensité en fonction de la taille des particules. (B) Représentation schématique d'un appareil de DLS avec détection à 90°

Les fluctuations d'intensité ainsi détectées sont converties en signaux électriques et envoyés dans un corrélateur digital. C'est ensuite à partir de la fonction d'auto-corrélation que la distribution en taille des objets étudiés est extraite.

Dans le cas des CNC les mesures ont été effectuées sur des suspensions diluées à 0.1% (p/p) contenant 1mM de NaCl.

III.2 Mesure de potentiel zeta

La zetamétrie a été utilisée pour mesurer la charge des nanocristaux de cellulose, ainsi que pour étudier la charge de la membrane lipidique.

Une particule chargée en solution va modifier la distribution des ions se trouvant à proximité de sa surface: la concentration en contre-ions dans cette zone interfaciale va augmenter, créant autour de la particule une double couche électrique. La région la plus proche

de la surface de la particule est appelée couche de Stern, et correspond à une zone dans laquelle les ions lui sont fortement liés. Cette première couche est entourée d'une deuxième, la couche diffuse, dans laquelle les ions sont moins attirés par la particule. Au sein de cette seconde couche, il est possible de délimiter une zone limite dans laquelle les ions et la particule forment une entité stable. Lorsque la particule est en mouvement, les ions en deçà de cette limite se déplacent aussi, tandis que ceux qui se trouvent au-delà ne sont pas affectés et restent dans le solvant. Le potentiel zeta se définit alors comme le potentiel mesuré à cette limite, qui est le plan de cisaillement (Figure 2.17).

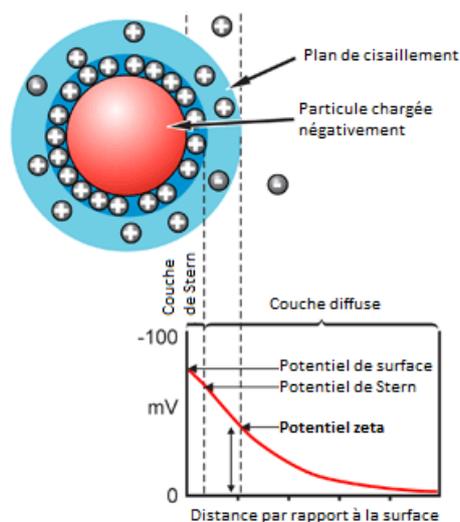


Figure 2.17 : Représentation schématique de la double couche électrique et définition du potentiel zeta.

L'appareil utilisé est un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments), qui peut estimer le potentiel zeta comme suit : lorsque la suspension de particules chargées est soumise à un champ électrique E , celles-ci vont se déplacer vers l'électrode de signe opposé, mais vont également être freinées par les forces de frottement dus à la viscosité du milieu. A l'équilibre, ces deux forces antagonistes se compensent et les particules se déplacent à une vitesse constante V . Cette vitesse de migration permet de définir la mobilité électrophorétique μ , selon le rapport :

$$\mu = \frac{V}{E} \quad (2.17)$$

où μ est la mobilité électrophorétique en $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}$, V la vitesse en $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et E le champ électrique en $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Zetasizer Software. Les mesures ont été effectuées ainsi : environ 1 mL d'une suspension de nanocristaux diluée à 0,01% (p/p) est

introduite dans une cuve de spectrophotométrie, chaque échantillon faisant l'objet de trois mesures consécutives.

Cette technique a également été employée afin d'étudier la charge de surface de la membrane des GUV. Etant donné que l'appareil de mesure ne peut pas détecter d'objets de dimensions supérieures à $1\mu\text{m}$, des vésicules plus petites (LUVs, large unilamellare vesicles) ont été produites par extrusion comme présenté précédemment au paragraphe X.X. Afin de créer un contraste détectable en DLS entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules, les LUVs sont diluées dans un mélange saccharose 200mM/glucose 100mM. En effet, les immerger dans une solution de glucose 300mM les ferait sédimenter, ce qui rendrait la mesure impossible.

III.3 Techniques de microscopie

Plusieurs techniques de microscopie ont été utilisées pour observer les vésicules : la microscopie en contraste de phase, la microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC, differential intensity contrast), la microscopie de fluorescence et la microscopie confocale à balayage laser (MCBL). La microscopie à force atomique (AFM, atomic force microscopy) a elle été employée pour deux finalités distinctes : tout d'abord pour mesurer l'épaisseur des capsules produites, puis pour étudier leur comportement mécanique par l'acquisition de courbes de forces.

III.3.1 Microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC)

Les GUV peuvent modifier la phase des ondes lumineuses qui les traversent, ce à quoi l'oeil n'est pas sensible. Le principe de la microscopie à contraste interférentiel (DIC, differential interference contrast) est de transformer cette variation de phase en variation d'intensité lumineuse, et donc de créer un contraste visible. Cette technique repose sur l'interférence entre le faisceau lumineux traversant l'échantillon et la lumière émise par la source : le dispositif représenté sur la Figure 2.18 montre le trajet optique suivi par la lumière. Emise par la source, la lumière est polarisée puis séparée en deux par un premier prisme. L'un des faisceaux traverse l'échantillon et voit sa phase modifiée, tandis que l'autre est directement transmis. Ces deux faisceaux sont ensuite recombinaés par un second prisme, traversent l'analyseur et interfèrent entre eux, générant un contraste d'intensité lumineuse observable.

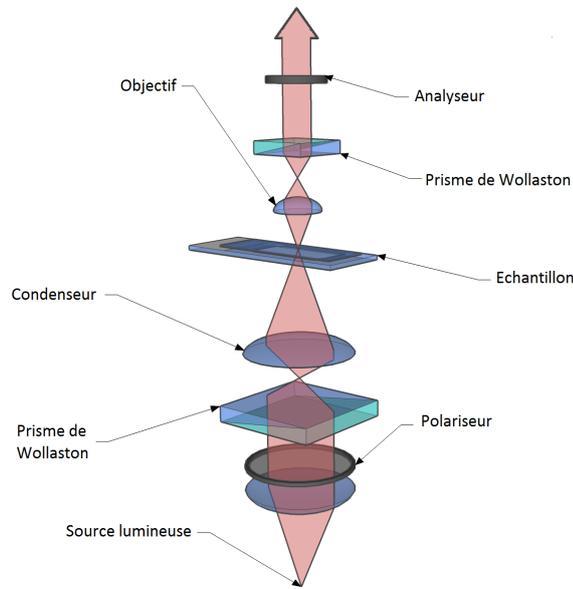


Figure 2.18 : Représentation schématique du dispositif de microscopie DIC

Les observations ont été réalisées sur un microscope optique droit Zeiss Axiopot 2 comprenant un polariseur et un analyseur croisés, et disposant de trois objectifs de grandissement (2.5x, 10x, 40x). Une caméra CCD ColorView12 de SIS nous a permis de réaliser des acquisitions d'images, par le biais du logiciel AnalySIS.

III.3.2 Microscopie en contraste de phase

Très proche de la microscopie DIC, la microscopie en contraste de phase est une autre méthode de choix pour observer les détails d'un milieu transparent et/ou incolore. Elle met en oeuvre le même principe d'interférence entre lumière traversant l'échantillon et lumière issue de la source, en transformant un déphasage en variation d'intensité lumineuse.

Le dispositif, représenté sur la Figure 2.19 repose essentiellement sur l'emploi de deux anneaux de phase : un premier (diaphragme annulaire) placé au niveau du condenseur et un second (plaque de phase) au niveau de l'objectif. Les rayons lumineux sur la périphérie (en jaune) sont directement transmis tandis que les rayons centraux (en rouge) vont être diffractés par l'échantillon et déphasés de $\pi/2$ par la plaque de phase. C'est ce déphasage différentiel qui crée du contraste .

Les observations en contraste de phase ont été effectuées à l'aide d'un microscope inversé AxioVert A1 (Zeiss) piloté par le logiciel Zen.

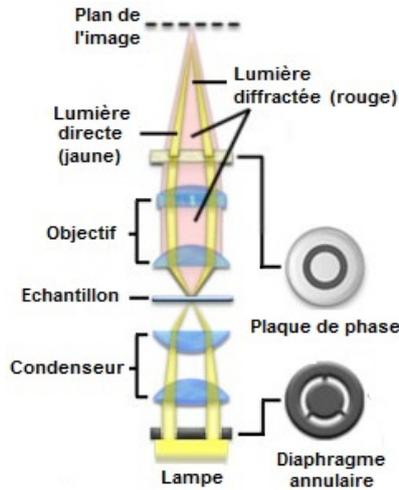


Figure 2.19 : Schéma du dispositif de microscopie à contraste de phase

III.3.3 Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence permet de visualiser des objets spécifiquement marqués par des fluorophores, ce qui s'avèrera particulièrement utile ici pour contrôler les dépôts successifs de nanocristaux de cellulose et de xylogucane. Cette technique exploite le phénomène de fluorescence, qui est basé sur un processus d'excitation-émission, représenté sur la figure X.a ci contre. Lorsque le fluorophore absorbe un photon, il passe de l'état fondamental à un état excité. La gamme de longueurs d'onde pour laquelle cette absorption a lieu définit son spectre d'excitation. En relaxant vers l'état fondamental, une partie de l'énergie est dissipée (par réorganisation interne de la molécule), le reste étant réémis sous la forme d'un photon, les longueurs d'onde ainsi émises définissant le spectre d'émission du fluorophore.

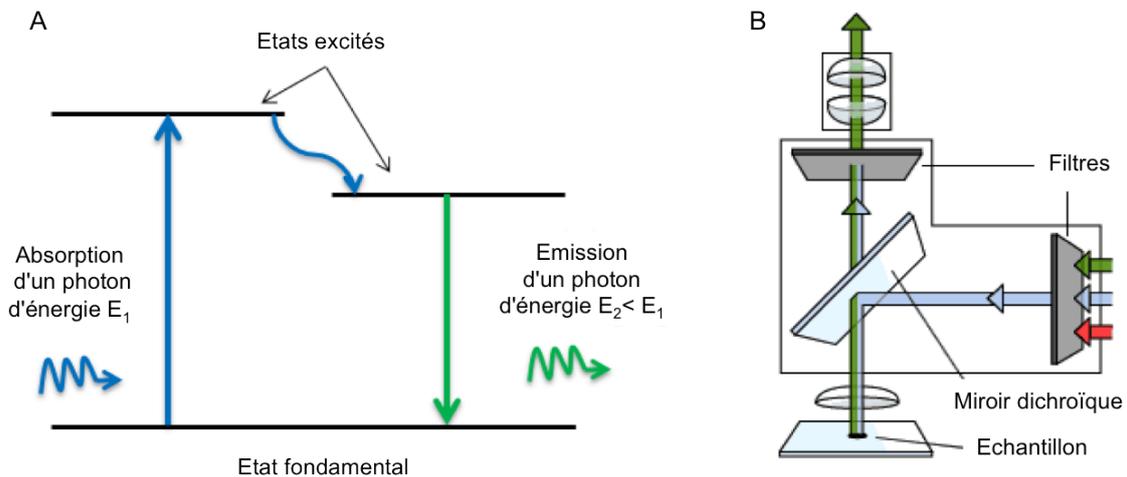


Figure 2.20 : (A) Schéma représentatif du phénomène de fluorescence. (B) Schéma représentatif du dispositif de microscopie à fluorescence.

Le dispositif d'un microscope à fluorescence est représenté sur la Figure 2.20-B ; il permet, grâce à un jeu de filtres, d'éclairer l'échantillon à la longueur d'onde d'excitation du

fluorophore, mais de recueillir uniquement les rayons lumineux de longueurs d'onde plus élevées : ce système permet d'observer uniquement la lumière d'émission de l'échantillon fluorescent. Les observations d'échantillons fluorescents ont été effectuées à l'aide d'un microscope inversé AxioVert A1 (Zeiss) piloté par le logiciel Zen.

III.3.4 Microscopie confocale à balayage laser

III.3.4.1 Principe

Si la microscopie à fluorescence permet une visualisation spécifique d'objets marqués par des fluorophores, elle présente néanmoins un désavantage : l'ensemble de l'échantillon étant illuminé, le signal fluorescent récolté ne provient pas seulement du plan focal, et l'on observe également un « bruit de fond » parasite. La microscopie confocale à balayage laser permet de s'affranchir de ce problème.

Dans ce cas, la source d'excitation utilisée est une lumière laser, qui est focalisée par un objectif sur un volume unitaire de l'échantillon fluorescent appelé voxel (équivalent tridimensionnel du pixel). La fluorescence émise est alors focalisée en un point auquel est placé un diaphragme (*pinhole* d'émission), avant d'être détectée par une photodiode. Ce dispositif permet donc de ne recueillir que la lumière émise à partir du point focal. L'obtention d'une image résulte ensuite du balayage que le faisceau laser effectue point par point sur une section donnée de l'échantillon (Figure 2.21).

Les observations ont été réalisées au Laboratoire Interdisciplinaire de Physique (LiPhy, Grenoble) qui dispose d'un microscope confocal Leica TCS SP8 équipé d'un objectif x40 à immersion huile. L'ensemble est piloté par le logiciel Leica Application Suite X.

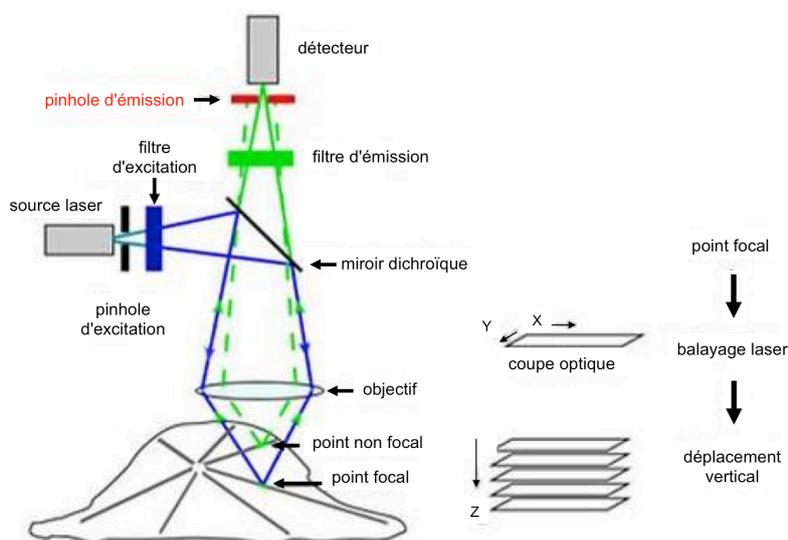


Figure 2.21 : Schéma représentatif du fonctionnement d'un microscope confocal à balayage laser

Le microscope confocal permet d'opérer un découpage « en tranches » de l'objet observé en générant une pile d'images constituant les coupes optiques. Une reconstruction tridimensionnelle de l'objet peut ensuite être effectuée à l'aide du logiciel Image J. Pour pouvoir réaliser ces reconstructions, il est impératif que les objets observés soient immobiles lors du balayage en z. Afin de ne pas écraser les microcapsules entre lame et lamelles, celles-ci ont été placées dans des chambres d'observation composées d'une lame, surmontées d'un espaceur (Press-to-seal silicone isolator, Sigma-Aldrich), refermées par une lamelle : le fait que la chambre soit fermée supprime la convection et donc le mouvement des objets.

III.3.4.2 Mesures quantitatives

Des mesures de fluorescence azimuthale le long de la membrane des vésicules ont été réalisées afin de mesurer l'hétérogénéité de la fluorescence émise en différents points de la membrane d'une même vésicule. Pour ce faire, les images de microscopie confocale sont traitées en utilisant le module *Azimuthal Average* du logiciel Image J qui consiste à encadrer la membrane de la vésicule par deux cercles concentriques formant une couronne épaisse de 10 pixels, comme illustré sur la Figure 2.22, puis à découper ce périmètre en tranches d'épaisseur $\Delta\alpha$ sur lesquelles la fluorescence moyenne est mesurée. Une courbe de la quantité de fluorescence en un point de la membrane en fonction de l'angle auquel ce point est situé est ainsi obtenue.

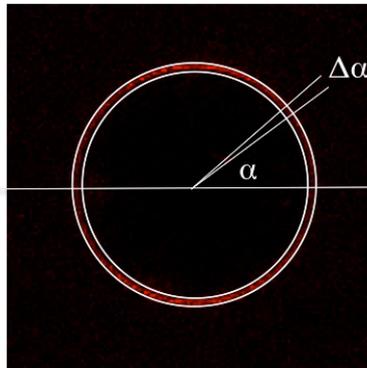


Figure 2.22 Principe de la mesure de la quantité azimuthale de fluorescence émise par une vésicule. Deux cercles concentriques encadrent la membrane de la vésicule, et à chaque azimuth, la quantité moyenne de fluorescence sur une tranche d'épaisseur est mesurée.

III.3.5 Microscopie électronique en transmission

Afin de visualiser plus directement l'interaction entre vésicules lipidiques et nanocristaux de cellulose, ces deux ont été observés par microscopie électronique en transmission (MET). Cette technique permet d'atteindre des grossissements très élevés (de $\times 2000$ à $10\ 000$) avec une haute résolution, en éclairant un échantillon mince (d'épaisseur

inférieure à 200 nm) par un faisceau d'électrons. Les électrons sont produits par un canon à électrons situé au sommet de l'appareil, avant d'être accélérés et de traverser un ensemble de lentilles magnétiques associées à des diaphragmes, appelé système condenseur. Ces électrons traversent l'échantillon et leur détection forme une image qui est focalisée par un système de lentilles magnétiques. L'image est alors agrandie sur un écran à fluorescence, des films photographiques ou une caméra. La Figure 2.23 donne une représentation schématique de ce dispositif.

Le faisceau d'électrons interagit avec l'échantillon suivant l'épaisseur, la densité ou la nature chimique de celui-ci, ce qui conduit à la formation d'une image plus ou moins contrastée. En effet, les électrons qui traversent l'échantillon peuvent subir des chocs élastiques et être déviés avec de grands angles, auquel cas il ne peuvent être détectés. La probabilité de subir une déviation augmente avec le numéro atomique des constituants de l'échantillon et l'épaisseur de celui-ci. C'est pourquoi les éléments lourds et les zones plus denses apparaissent plus sombres, tandis que les éléments légers et les zones plus fines apparaissent plus clairs.

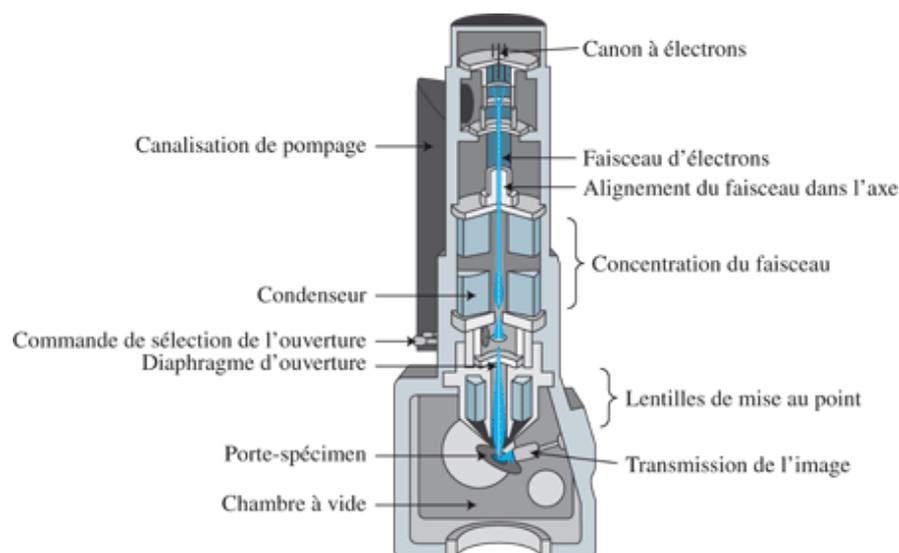


Figure 2.23 : Schéma représentatif d'un microscope électronique en transmission

Pour l'observation de suspensions de CNC, celles-ci ont été diluées à 0,001% (p/p) puis déposées sur des grilles de cuivre recouvertes d'un mince film de carbone amorphe (NetMesh, Pelco). Le contraste a été renforcé par coloration négative, par ajout d'une solution aqueuse à 2% (p/p) d'un sel d'atomes lourds (acétate d'uranyle).

Nous avons observé des mélanges CNC/liposomes par cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-MET) : cette méthode consiste à congeler très rapidement des échantillons sous forme hydratée, de manière à les figer dans une glace amorphe. Les échantillons de cryo-MET ont été préparés en congelant des films minces de suspension

CNC / liposomes (1mL de CNC à 0,01% p/p mélangés sous agitation à 1mL d'une suspension de liposomes de concentration en lipides 1mM) formés sur des grilles de carbone dans de l'éthane liquide, à l'aide d'un automate de cryofixation Leica EM-GP équipée d'une chambre de température et d'humidité contrôlées (Figure 2.24).

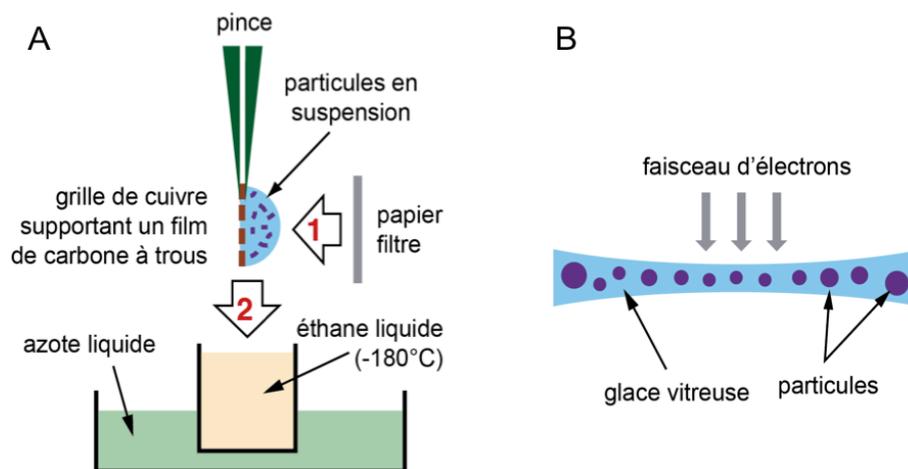


Figure 2.24 : Principe de la préparation d'échantillons pour la cryo-TEM. (A) Une goutte de suspension est déposée sur une membrane de carbone à trous. L'excès de liquide est absorbé avec du papier filtre (1) puis la grille est rapidement plongée dans de l'éthane liquide (2), lui-même refroidi par de l'azote liquide. (B) Après transfert de la grille, le mince film vitreux contenant les particules est observé à basse température (-180°C) et sous faible illumination. D'après [Durrieu, 2004].

Le film ainsi congelé est introduit dans un porte-échantillon Gatan 626 refroidi à l'azote liquide, transféré dans le microscope et observé à basse température (-176 °C), sous faible illumination. Toutes les observations ont été effectuées sur un microscope Philips (FEI) CM200 'Cryo' fonctionnant à 200 kV. Les images ont été enregistrées par une caméra TVIPS F216 TemCam (2040×2040 pixels).

III.3.6 Microscopie à force atomique

III.3.6.1 Principe

Appartenant à la famille des microscopies dites à champ proche, la microscopie à force atomique (AFM) permet d'analyser le relief de matériaux non conducteurs avec une résolution spatiale allant du dixième de nanomètre à la dizaine de micromètres. Son principe de fonctionnement repose sur l'interaction entre une sonde de petite taille (la pointe) et les atomes de surface de l'échantillon à analyser. Lorsque la sonde balaye la surface, une image tridimensionnelle de celle-ci est générée, reflet de l'interaction sonde-surface.

Le dispositif, représenté en Figure 2.25, comprend donc un levier sur lequel est montée la pointe : le levier se déforme selon les forces de très faible intensité qui lui sont appliquées par l'échantillon (interaction de type Van der Waals ou électrostatiques). Un rayon laser

envoyé sur l'extrémité du levier est réfléchi vers une photodiode qui détecte la variation de flexion du levier. La dernière composante de l'AFM est le système de déplacement ou de balayage qui consiste en une cale piezoélectrique. Cette dernière permet le déplacement du support d'échantillon dans les directions x et y pour sonder la surface. Ensuite, étant reliée à la photodiode, elle permet d'ajuster la hauteur z de l'échantillon pour conserver une valeur de force constante entre la pointe et l'échantillon. Tous ces déplacements sont enregistrés et la topographie de l'échantillon peut ainsi être déterminée.

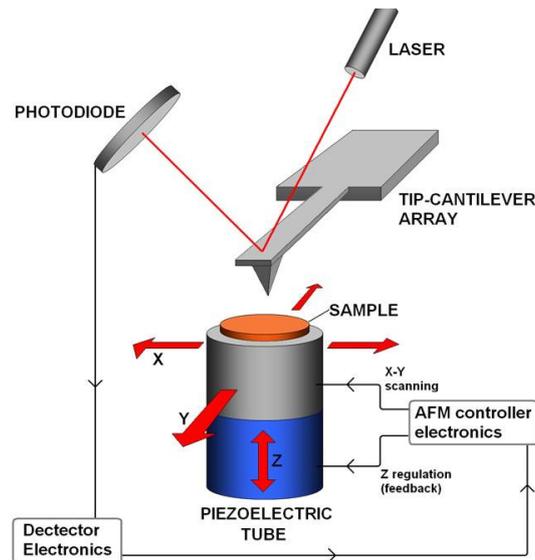


Figure 2.25 : Schéma d'un microscope à force atomique

L'AFM peut être utilisée selon différents modes : le mode contact, le mode contact intermittent (tapping) et le mode non-contact.

III.3.6.2 Mesure de l'épaisseur des capsules

L'AFM est couramment employée dans le domaine des capsules multicouches pour mesurer l'épaisseur de la paroi. Dans ce cas, la surface du support doit être la plus plane possible. Aussi, des wafers polis de silicium $\langle 001 \rangle$ sont rincés successivement à l'eau et à l'éthanol avant d'être séchés à l'air comprimé. Ils sont ensuite soumis à un cycle d'effluage au plasma qui permet de charger négativement leur surface. Les wafers sont ensuite immergés dans une solution de poly(éthylèneimine) à 2g/L pendant une heure. Le dépôt d'une couche de ce polymère cationique ramifié (Figure 2.26) permettra aux vésicules (toujours recouvertes d'une dernière couche CNC chargés négativement) de se déposer et d'adhérer à la surface.

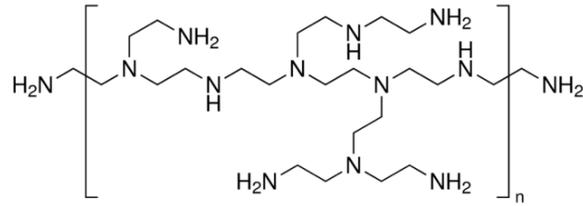


Figure 2.26 : Structure chimique de la poly(éthylèneimine) (PEI)

La mesure d'épaisseur de la paroi s'effectue sur capsule dégonflée par séchage. Une goutte de capsules est déposée sur le wafer. Les capsules, immergées dans du glucose sont laissées à sédimenter pendant au moins une heure puis l'ensemble est rincé à l'eau déionisée, afin de retirer le maximum de sucre de l'échantillon pour éviter que celui-ci ne soit « collant ». Le tout est ensuite laissé à sécher au dessiccateur avant observation.

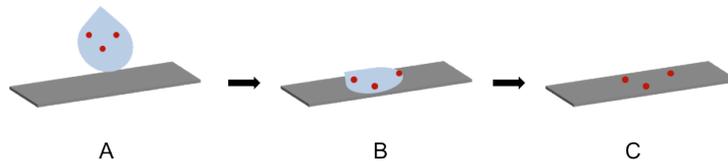


Figure 2.27 : Schéma représentatif de la préparation des échantillons pour AFM. (A) Dépôt d'une goutte de la suspension. (B) Sédimentation et adhésion des capsules à la surface du wafer. (C) Rinçage à l'eau déionisée.

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un AFM Pico plus de Molecular Imaging piloté par le logiciel PicoView 1.12.4. Les pointes utilisées sont des pointes de silicium Vista probes (Nanoscience instruments) recouvertes d'aluminium de constante de raideur 48 N.m^{-1} . Toutes les images ont été traitées en utilisant le logiciel Gwyddion.

III.3.6.3 Nano-indentation

III.3.6.3.1 Préparation des échantillons

Les mesures de force devant être effectuées en milieu liquide, une goutte de la suspension de capsules est déposée dans une boîte de Petri dont le fond a été traité avec du PEI (2g.L^{-1}) (Figure 2.28-A). Les capsules sont ensuite laissées à sédimenter au moins une heure (Figure 2.28-B). La boîte de Petri est enfin remplie d'une solution de glucose 300mM contenant 1mM de NaCl (Figure 2.28-C), ce qui permettra au levier de l'AFM d'être complètement immergé lors des mesures.

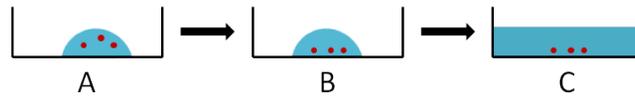


Figure 2.28 : Schéma représentatif de la préparation des échantillons pour analyse AFM. (A) Dépôt d'une goutte de la suspension de capsules. (B) Sédimentation et adhésion à la surface de la boîte de Petri. (C) Remplissage de la boîte.

III.3.6.3.2 Appareillage et acquisition des courbes de force

Toutes les expériences d'indentation sur capsules ont été réalisées par Léna Beauzamy au laboratoire de Reproduction et de Développement des Plantes (RDP, ENS Lyon) au sein de l'équipe « Biophysique et développement » dirigée par Pr. Arezki Boudaoud. L'appareil utilisé pour réaliser les acquisitions de courbes de force est un modèle Catalyst (Bruker, Santa Barbara, CA) couplé à un microscope optique droit (Leica) qui permet de positionner le levier au-dessus des objets.

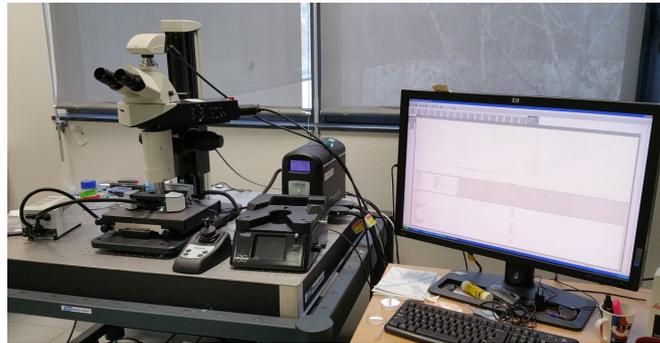


Figure 2.29 : Photo du microscope à force atomique utilisé pour les mesures de forces. RDP, Lyon.

Toutes les mesures ont été effectuées en milieu liquide, en mode contact. Nous avons utilisé des leviers de constante de raideur $0,4 \text{ N.m}^{-1}$ (Veeco scanasyst air, Bruker), dont la pointe conique a une hauteur comprise entre $2,5$ et $8,0 \mu\text{m}$ et un rayon de 2 nm .



Figure 2.30 : (A) Image MEB du levier utilisé (B) Zoom sur la pointe du levier. *Source : brukerafmprobes.com*

La constante de raideur du levier utilisé a systématiquement été déterminée avant chaque expérience par la méthode du bruit thermique. La sensibilité de deflexion du levier a été calibrée avant et après chaque série d'expériences. Pour chaque mesure, le levier est positionné au-dessus de la capsule à étudier à l'aide de la visualisation par microscopie optique. Nous avons utilisé la fonction "Point and Shoot" du logiciel Bruker, qui permet d'acquérir une image topographique de l'objet (de dimensions $6 \times 6 \mu\text{m}$) et de sélectionner plusieurs points à indenter sur la zone scannée. Pour chaque objet, 9 points sont indentés, ces points étant choisis proches de l'axe de la capsule pour s'assurer d'exercer une force normale à la surface de celle-ci. Chaque point est indenté trois fois. Dans tous les cas, la profondeur maximale d'indentation des objets était de 200 nm.

Chapitre 3 : Interactions vésicules lipidiques / nanocristaux de cellulose

L'objectif de ce travail étant de mettre au point des analogues artificiels de la paroi végétale afin d'en étudier les propriétés mécaniques, le choix d'utiliser les GUV comme support de construction des multicouches CNC/XG est séduisant pour son caractère biomimétique de la membrane plasmique, mais aussi car elles constituent un support souple dont la pression osmotique interne peut être contrôlée lors de leur formation.

Comme il a été présenté au chapitre 1, la littérature fournit de nombreux exemples d'interactions entre des vésicules lipidiques (SUV, LUV et GUV) et des nanoparticules de taille, de forme et de charge variées (nanoparticules d'or, de silice, quantum dots...). Cependant, nous n'avons à ce jour pas recensé de travaux s'intéressant à l'adsorption de nanocristaux de cellulose sur les membranes lipidiques.

Ce chapitre se propose donc de répondre aux questions suivantes : est-il possible d'adsorber des nanocristaux de cellulose sur des vésicules ? Si oui, dans quelles conditions ? Nous ne proposerons pas ici une caractérisation exhaustive de cette interaction mais cherchons simplement à montrer sa faisabilité, ce qui constituera notre indispensable premier pas dans la construction de capsules multicouches biomimétiques de la paroi végétale.

Nous nous emploierons dans un premier temps à étudier l'interaction entre la membrane des vésicules et les nanocristaux de cellulose : après une caractérisation rapide de ces deux briques élémentaires, nous montrerons par microscopie en fluorescence qu'elles sont capables d'interagir entre elles, et ce sans provoquer de déformation de la membrane lipidique à l'échelle macroscopique.

I Caractérisation des briques élémentaires

I.1 Propriétés des vésicules lipidiques

I.1.1 Charge de la membrane

Dans un premier temps, nous avons voulu effectuer une brève étude de la charge de surface de la membrane lipidique. Les vésicules géantes que nous avons préparées ont été

formées à partir d'un phospholipide zwitterionique, le 1,2-dioléyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) [Quemeneur et al., 2010] rapportent que les vésicules de DOPC voient leur charge de surface varier en fonction du pH, ce qui leur permet de changer de signe en fonction de l'acidité du milieu. Avant toute mesure, nous avons décidé de travailler à concentration fixée en sel, la force ionique du milieu étant un paramètre pouvant influencer la charge des objets. La technique d'électroformation classique n'étant adaptée que pour des milieux de faible force ionique [Walde et al., 2010], aussi nous sommes nous limités à une concentration à 1mM en NaCl. L'observation des GUV préparées dans ces conditions par microscopie DIC confirme que l'ajout de cette faible quantité de sel dans la solution d'électroformation n'a pas d'impact ni sur leur morphologie, ni sur leur nombre comme le montre la Figure 3.1. Le faible contraste qu'elles présentent à l'observation, avec ou sans sel, tend à confirmer leur caractère unilamellaire.

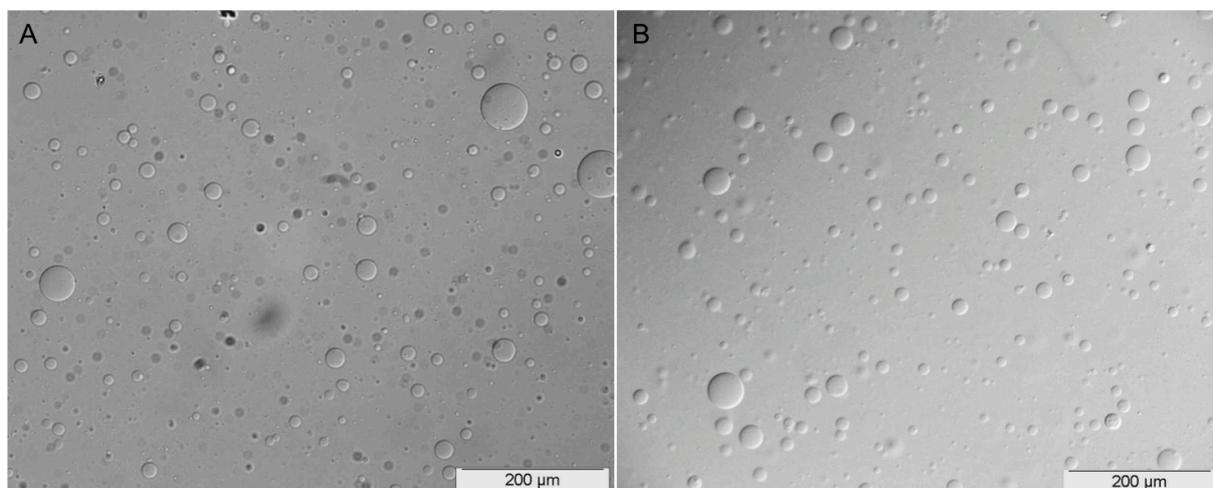


Figure 3.1 : Images de microscopie DIC de GUV préparées par électroformation. (A) GUV formées dans du saccharose 300 mM (B) GUV formées dans du saccharose 300 mM à 1mM en NaCl.

Par la suite, nous travaillerons donc toujours à concentration en sel constante de 1 mM. Afin d'effectuer des mesures de potentiel zeta pour déterminer la charge de la membrane des vésicules et vérifier cette dépendance au pH, des LUV de diamètre 200 nm ont été produites par extrusion de GUV préparées par électroformation, l'instrument que nous utilisons pour cette mesure ne pouvant détecter que des objets de taille inférieure à 5 μm. Les LUV ainsi produites possèdent la même composition que les GUV de départ et sont ensuite suspendues dans des solutions de saccharose dont le pH a été ajusté par ajout d'acide (HCl) ou de base (NaOH). La Figure 3.2 présente les valeurs de potentiel zeta obtenues sur des LUV à trois différents pH.

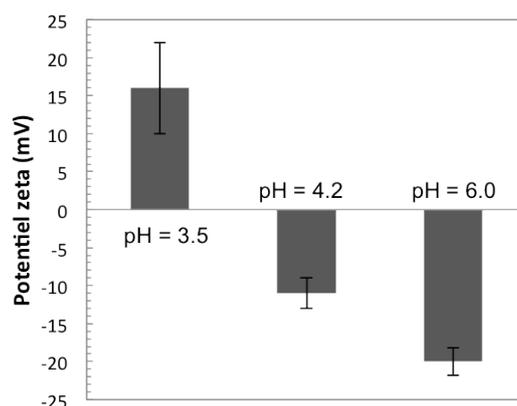


Figure 3.2 : Variation du potentiel zeta de LUV de DOPC en fonction du pH

Nous retrouvons effectivement une évolution décroissante du potentiel zeta en fonction du pH, qui passe d'une valeur positive à pH=3,5 à des valeurs négatives à pH=4,2 et pH=6,0. Comme nous l'avons déjà mentionné dans la partie bibliographique au chapitre 1 § II.1.4, ce changement de signe en fonction du pH provient de la tête polaire zwitterionique du lipide : celle-ci comprend un ammonium quaternaire chargé positivement quoiqu'il arrive, et un groupement phosphate dont le degré de dissociation dépend du pH. Lors de la mise en présence des GUV avec les CNC, deux situations différentes pourront donc être explorées selon le pH du milieu : les objets pourront présenter une charge de même signe ou de signes opposés.

I.1.2 Distribution en taille des GUV

Il est possible de produire des vésicules fluorescentes en incorporant une faible fraction de lipides contenant un groupement fluorophore au moment de l'électroformation (voir chapitre 2 §I.1.1). En effet, à la faible épaisseur de la membrane des vésicules (de l'ordre de 4,5 nm) s'ajoute le fait que le milieu interne est identique au milieu externe (bien que cette différence d'indice optique puisse être accentuée en immergeant les GUV dans une solution de glucose iso-osmolaire). Les vésicules marquées à l'aide d'un fluorophore permettent de s'affranchir de ce manque de contraste, permettant l'utilisation d'un outil de mesure automatique des objets avec le programme ImageJ. La Figure 3.3 illustre ce processus : l'image d'origine (Figure 3.3-A) est binarisée (Figure 3.3-B), puis les objets sont détectés et mesurés (Figure 3.3-B).

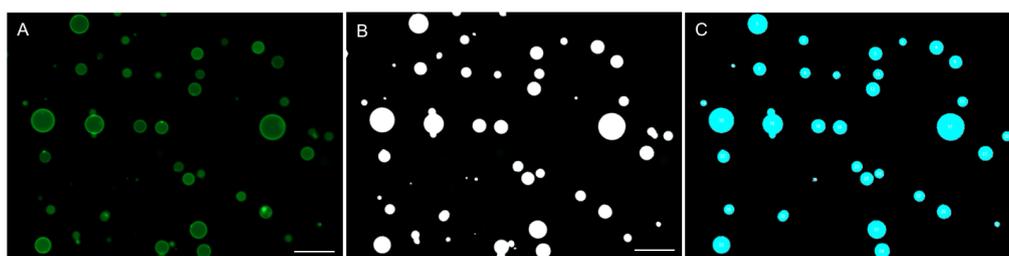


Figure 3.3 : Illustration du principe de mesure de taille avec Image J (A) Image initiale de GUV observées en microscopie à fluorescence (B) Image binarisée (C) Détection et mesure des objets. Barres d'échelle : 30 μm .

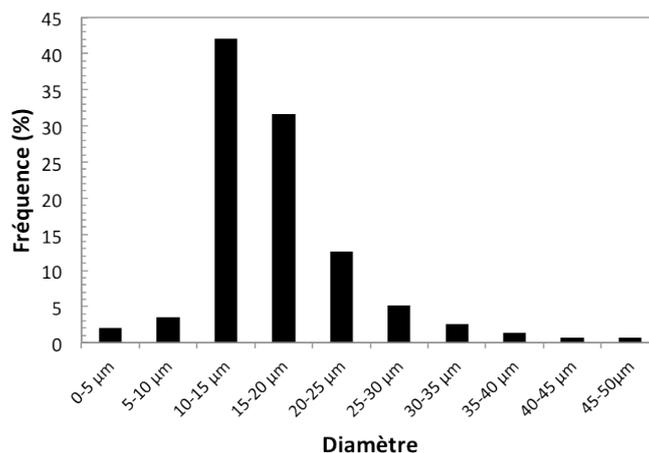


Figure 3.4 : Histogramme de la distribution en taille des GUV après électroformation

Nous trouvons un diamètre moyen de 17 μm avec un coefficient de variation de 46%. Leur diamètre est donc bien compris entre 5 et 50 μm , la plupart mesurant entre 15 et 20 μm , ce qui est cohérent avec les dimensions des cellules végétales. Comme il était attendu, les vésicules présentent une importante polydispersité en taille, inhérente à leur technique de fabrication. Bien qu'il soit possible de « trier » les GUV en fonction de leur diamètre, par exemple à l'aide de dispositifs microfluidiques [Srivastav et al., 2012], il peut être intéressant de conserver cette distribution et de voir si celle-ci joue un rôle notamment au niveau des propriétés mécaniques des objets et de leur comportement en déformation. Il peut être également pertinent d'étudier l'influence des dépôts de couches successifs sur la distribution en taille des objets de départ.

I.2 Propriétés des nanocristaux de cellulose

A ce jour et à notre connaissance, aucun système combinant les nanocristaux de cellulose à des vésicules lipidiques n'a encore été décrit dans la littérature. En revanche, les assemblages vésicules/nanoparticules déjà existant soulignent l'importance de plusieurs paramètres en ce qui concerne l'interaction nanoparticules/bicouche lipidique dont entre autres la taille, la charge et la chimie de surface des particules [Schulz et al., 2012]. Dans le cas des nanocristaux de cellulose, nous savons d'ores et déjà que leur surface recouverte de groupements hydroxyles leur confère un caractère globalement hydrophile, ce qui laisse supposer que les CNC auraient tendance à interagir avec les têtes polaires des lipides plutôt qu'à s'insérer dans la partie hydrophobe de la bicouche, si interaction il y a.

Au sein des parois végétales, la cellulose se trouve sous la forme de microfibrilles dont les dimensions sont de l'ordre de quelques dizaines de microns de longueur et de 50 à 100 nm de diamètre. Les CNC ont une longueur plutôt de l'ordre de la centaine de nanomètres, aussi ne permettent-ils pas de reproduire exactement la configuration des parois naturelles, mais

rappelons que notre objectif est d'arriver à construire des capsules individualisées pour permettre leur caractérisation mécanique par AFM. A cette fin, l'emploi de microfibrilles qui sont du même ordre de grandeur que nos objets apparaît contre-indiqué, étant donné que des fibres trop longues auront tendance à créer des pontages entre objets, aboutissant à leur agrégation [Kalashnikova et al., 2013]. De plus, la tendance qu'ont les microfibrilles de cellulose à former des gels même à faible concentration nous paraît difficilement compatible avec la nature des GUV, qui sont des objets sensibles au cisaillement et à la pression osmotique.

En ce qui concerne leur morphologie, les nanocristaux de cellulose que nous utilisons sont préparés par hydrolyse à l'acide sulfurique de cellulose de coton selon le protocole décrit au chapitre 2 §I.2.1.1. Un exemple d'observation par MET des suspensions obtenues est présenté en Figure 3.5-A.

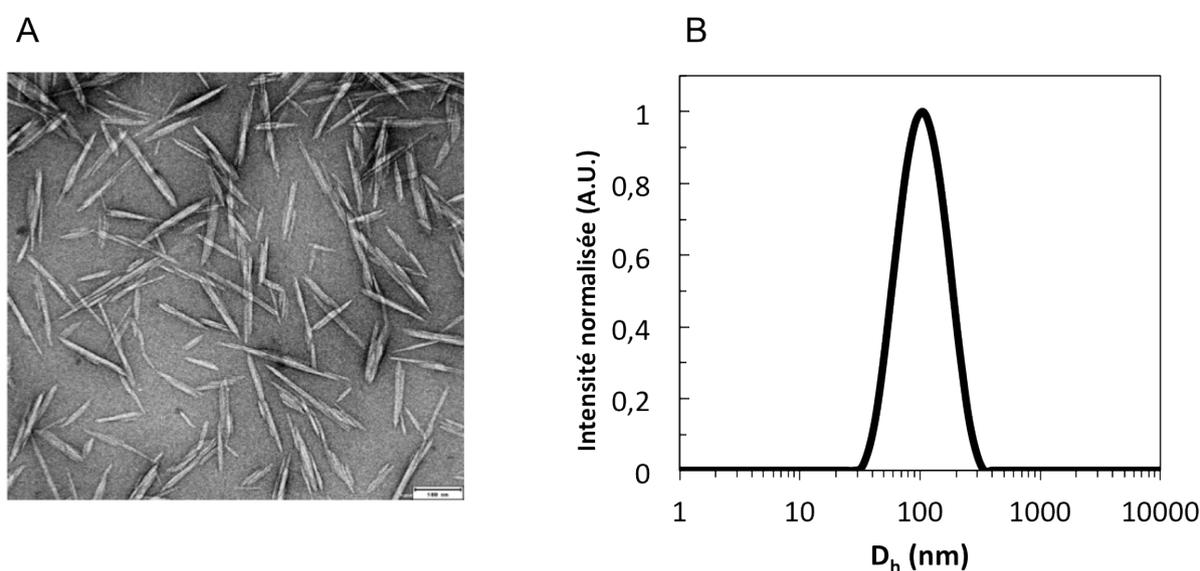


Figure 3.5 : (A) Image de microscopie électronique en transmission de nanocristaux de cellulose obtenus par hydrolyse à l'acide sulfurique (B) Exemple de mesure du diamètre hydrodynamique des CNC par DLS.

La mesure des dimensions des CNC obtenus par ce procédé ayant déjà fait l'objet d'une étude approfondie [Elazzouzi-Hafraoui et al., 2008], nous avons simplement vérifié à partir d'un faible échantillonnage (environ cent mesures) que la longueur de nos objets correspondait à ce qui est attendu dans ces conditions expérimentales. Nous mesurons ainsi une longueur moyenne de 155 ± 26 nm, ce qui est en accord avec les valeurs obtenues par Elazzouzi et al. Nous reprendrons ainsi les données de largeur et de hauteur présentées dans cette étude, qui valent respectivement 26 et 6 nm. Les images de MET révèlent l'absence d'agrégats, ce qui est confirmé par la présence d'un seul pic d'intensité en DLS (Figure 3.5-B). Enfin, la charge de surface des CNC a également été vérifiée par des mesures de potentiel zeta, qui montrent que

celle-ci est négative quel que soit le pH, valant $-42 \pm 0,6$ mV (mesures effectuées à 1mM en NaCl).

II Observation des vésicules lipidiques en présence de nanocristaux de cellulose

Rien ne laisse supposer que les GUV conservent leur intégrité lors de l'incubation : la membrane des liposomes étant très souple, une interaction trop forte entre sa surface et les bâtonnets rigides et chargés que sont les CNC pourrait l'endommager et aboutir à sa rupture [Fukui&Fujimoto, 2009] [Ruysschaert et al., 2004, Tribet et al., 2008]. Le comportement des vésicules géantes en présence de CNC a donc été observé en microscopie à fluorescence et microscopie confocale. La durée d'incubation des GUV dans la suspension de nanocristaux de cellulose a tout d'abord été fixée à une heure, ce qui correspond aux temps pratiqués dans les travaux s'intéressant à la décoration de vésicules géantes par des polymères [Mertins et al., 2013, Quemeneur, 2010].

II.1 Effet du pH

Afin de visualiser directement le comportement des vésicules après incubation avec les CNC, ces derniers ont été marqués avec un fluorophore, la rhodamine B isothiocyanate comme décrit au chapitre 2 §I.2.3.2. Comme nous venons de le voir, deux situations sont possibles en terme de charge de surface, selon le pH du milieu. Lors de ces essais d'incubation, 0,1 mL d'une suspension de GUV préalablement diluées dans un tampon de pH 3,5 ou 6 est introduit dans 0,4 mL d'une suspension à 2% (p/p) en CNC, dont le pH a également été ajusté à 3,5 ou 6. Pour éviter tout choc osmotique, la suspension de CNC contient elle aussi 300 mM de saccharose et 1mM de NaCl. La Figure 3.6 compare ainsi les images obtenues d'échantillons incubés à ces deux différents pH : dans les deux cas nous pouvons visualiser des sphères rouges correspondant aux GUV recouvertes de CNC fluorescents.

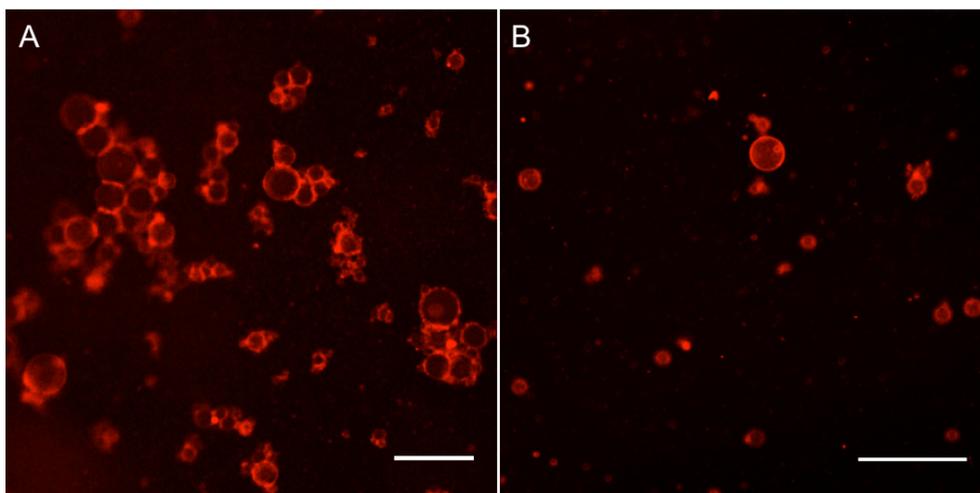


Figure 3.6 : Observation par microscopie à fluorescence de GUV incubées dans un excès de nanocristaux de cellulose à 2% (p/p) (A) à pH=6 (B) à pH=3.5. Barres d'échelle : 50 μm . Le fond apparaît noir par un effet de contraste : des CNC fluorescents non adsorbés sont présents dans toute la suspension mais le signal lumineux des CNC adsorbés sur la membrane des GUV est beaucoup plus intense.

Nous constatons cependant une très nette différence entre les échantillons incubés à pH=6 et ceux incubés à pH=3,5. Dans le premier cas, nous assistons à un phénomène d'agrégation des GUV, les « clusters » ainsi formés pouvant regrouper plus d'une dizaine d'objets pour atteindre des dimensions de l'ordre de la centaine de microns. A pH=3,5 nous observons également des GUV accolées les unes aux autres (Figure 3.7-A) mais surtout une majorité de GUV isolées (Figure 3.7-B).

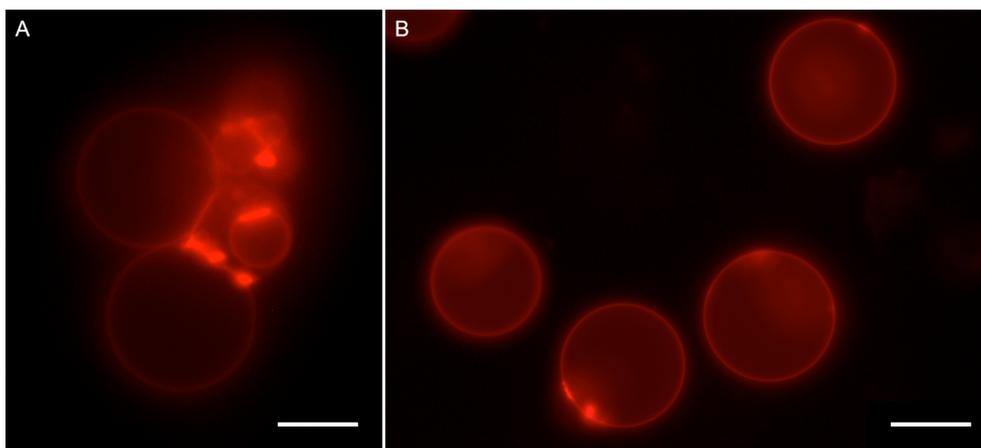


Figure 3.7 : Observation par microscopie à fluorescence d'un même échantillon de GUV incubées dans un excès de nanocristaux de cellulose à 2% et à pH 3,5. (A) Vésicules agrégées. (B) Vésicules isolées. Barres d'échelle : 20 μm .

La Figure 3.7 montre également des zones fortement lumineuses à la périphérie des GUV, qui sont le signe d'une hétérogénéité dans l'adsorption des CNC, ce que nous examinerons de plus près ensuite par microscopie confocale.

Les CNC sont donc capables d'interagir avec la membrane lipidique, et ce même lorsque leurs charges de surface respectives sont de même signe. Afin de visualiser plus directement cette interaction, des observations complémentaires de films vitrifiés de liposomes et de CNC ont été réalisées par cryo-MET. Le protocole suivi pour réaliser la cryofixation des échantillons a été décrit en détail au chapitre 2 § III.3.5, mais nous pouvons cependant rappeler ici qu'il consiste à vitrifier par congélation rapide un mince film de suspension déposée sur un film de carbone à trous : les objets sont donc figés à l'intérieur du film de glace vitreuse d'une épaisseur comprise entre 100 et 200 nm. Cette épaisseur étant du même ordre de grandeur que les dimensions des objets qui nous intéressent, ceux-ci subissent des effets de confinement non négligeables dans le film liquide avant congélation, effets dont il est difficile de s'affranchir complètement. Pour cette raison, nous attirons l'attention sur le fait que les échantillons préparés pour l'observation par cryo-MET n'ont pas été réalisés avec un excès de CNC par rapport aux vésicules comme c'était le cas précédemment pour les observations par microscopie à fluorescence, mais au contraire avec un excès de liposomes par rapport aux CNC, et ce pour faciliter la visualisation d'objets individualisés. Le fait de travailler dans ces conditions permet d'ailleurs d'observer des zones où les objets ne sont pas en contact. Nous pouvons ainsi voir sur la Figure 3.8-A des images de cryo-MET d'une suspension à pH=3 (CNC et liposomes de charges opposées). L'image 3.8-A correspond à une région qui ne contient que des liposomes. Cette image montre qu'en l'absence de nanocristaux de cellulose, les bicouches des liposomes voisins ne sont pas en contact, ayant plutôt tendance à se repousser malgré les effets de confinement. Nous observons en revanche sur la Figure 3.8-B que lorsqu'ils sont présents, les CNC jouent un rôle analogue à celui d'un agent réticulant, en venant s'adsorber à la surface des membranes.

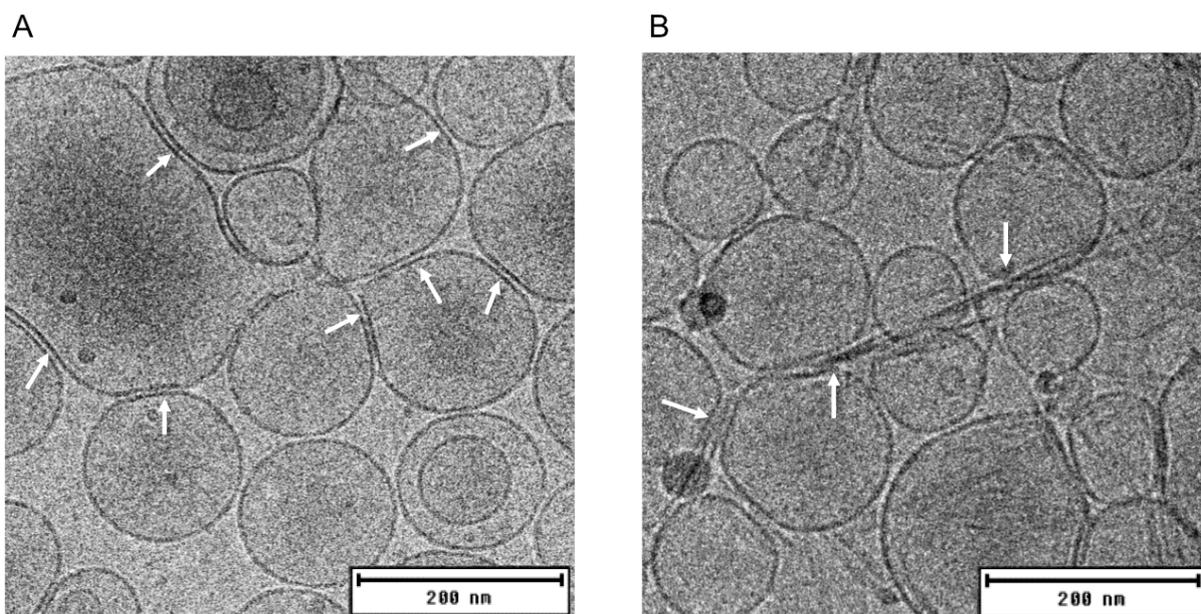


Figure 3.8 : (A) Observation par cryo-MET de liposomes (pH=3). Les flèches indiquent les zones où l'on visualise nettement un espace entre les membranes de liposomes voisins. (B) Observation par cryo-MET de liposomes en présence de CNC (pH=3). Les flèches pointent les CNC réticulant les liposomes.

Ces expériences avec des liposomes dont le diamètre est du même ordre de grandeur que la longueur des bâtonnets de CNC soulignent aussi l'influence du rayon de courbure des vésicules lors de l'adsorption : nous avons en effet observé des liposomes déformés ayant épousé la surface des CNC, donnant lieu à des formes polygonales comme le montrent les images de cryo-MET de la Figure 3.9.

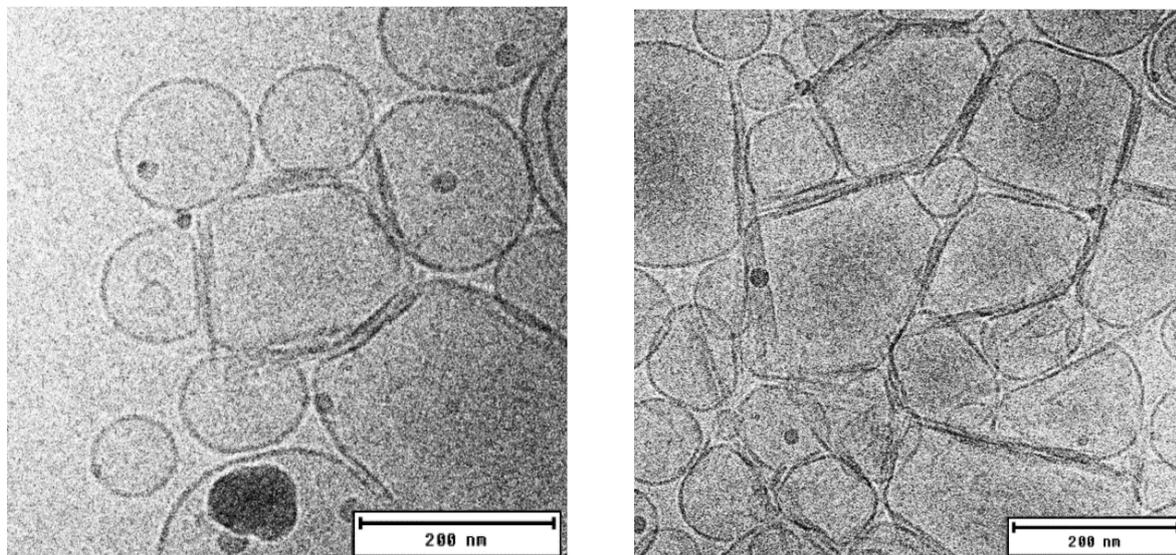


Figure 3.9 : Observation par cryo-MET de liposomes déformés par la présence de CNC (pH=3).

Même si ces formes en polygone peuvent être dues en partie au confinement des objets, elles témoignent néanmoins du caractère flexible des membranes lipidiques à laquelle s'oppose la rigidité des bâtonnets de cellulose. Nous ne retrouvons pas ce type de morphologie facettée lors de l'incubation avec les GUV : à l'échelle des CNC, la membrane des GUV est identique à une surface plane sur lequel les nanocristaux s'adsorbent probablement à plat. La Figure 3.10 montre ainsi un exemple proche de ce cas de figure : nous observons un liposome isolé et décoré de CNC ayant conservé sa forme sphérique.

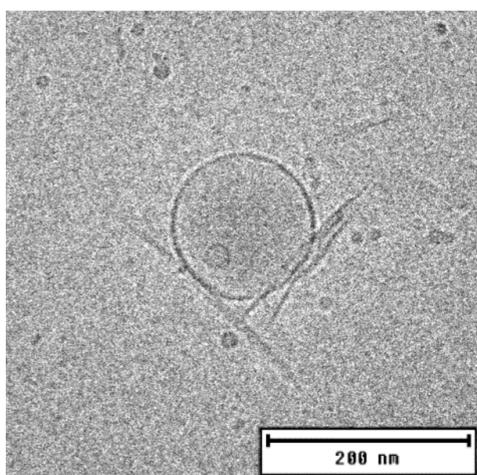


Figure 3.10 : Observation par cryo-MET d'un liposome décoré de CNC (pH=3)

Il pourrait être intéressant de réaliser les mêmes observations en utilisant des CNC plus courts, afin d'avoir un rapport de taille d'objets similaire à celui des mélanges GUV/CNC.

Les images par cryo-MET de mélanges liposomes/CNC préparés à pH=5 (liposomes et CNC chargés négativement) montrent qu'à ce pH, les vésicules sont en majorité multilamellaires. Par ailleurs, on observe des structures originales dans lesquelles les nanocristaux s'alignent pour former des assemblages quasi-fibrillaires recouverts de liposomes (Figure 3.11).

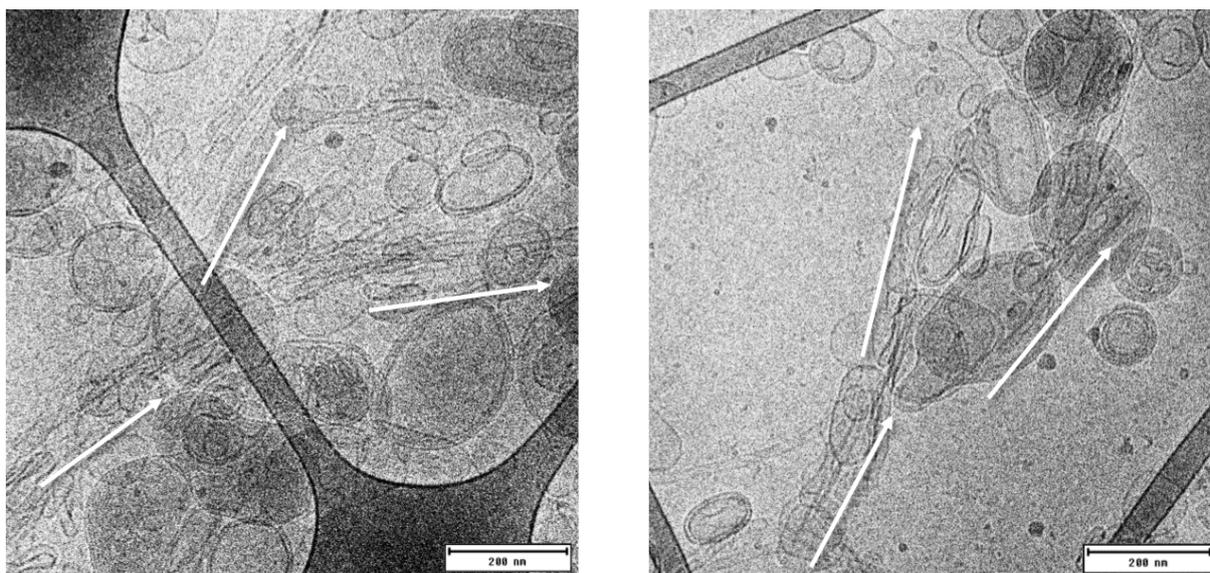


Figure 3.11 : Observation de liposomes en présence de CNC par cryo-MET à pH=5. L'échantillon comporte un très grand nombre de vésicules multilamellaires. Les flèches indiquent l'orientation des « fibres » de CNC.

Ces images sont à rapprocher des observations par microscopie à fluorescence de GUV et de CNC tous deux chargés négativement (Figure 3.6-A) : le même phénomène d'agrégation a lieu aux deux échelles. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme de formation de ces structures. Il est en effet difficile d'expliquer ce comportement étant donné que l'on devrait plutôt s'attendre à voir les objets se repousser, mais nous pouvons avancer que des charges de signes opposés comme c'est le cas à pH=3 ou pH=3.5 donnent lieu à une interaction plus forte, ce qui favorise un meilleur recouvrement des vésicules par les CNC. Une fois ces vésicules complètement recouvertes, celles-ci auraient moins tendance à s'agréger.

Quoi qu'il en soit, ces différentes observations par microscopie confirment l'existence d'une interaction lipides/CNC. L'objectif principal de notre travail étant d'utiliser les GUV décorées de CNC comme plateforme de départ de capsules multicouches individualisées, nous avons choisi par la suite de ne nous placer que dans la situation où CNC et GUV ont des

charges de surface de signes opposés afin d’avoir des objets isolés. Toutes les images de GUV-CNC que nous montrerons par la suite correspondront donc à des systèmes préparés à $\text{pH}=3,5$.

II.2 Effet de la durée d’incubation

Dans la perspective de multiplier les dépôts en vue de la construction de capsules multicouches, nous avons voulu réduire le temps d’incubation des vésicules dans la suspension de CNC, temps que nous avons initialement fixé à une heure. La figure 3.12 présente ainsi des images de microscopie confocale de GUV ayant été observées après 5, 15 30 et 60 minutes d’incubation. Toutes ces images ont été acquises dans les mêmes conditions d’observation (intensité du laser et gain identiques).

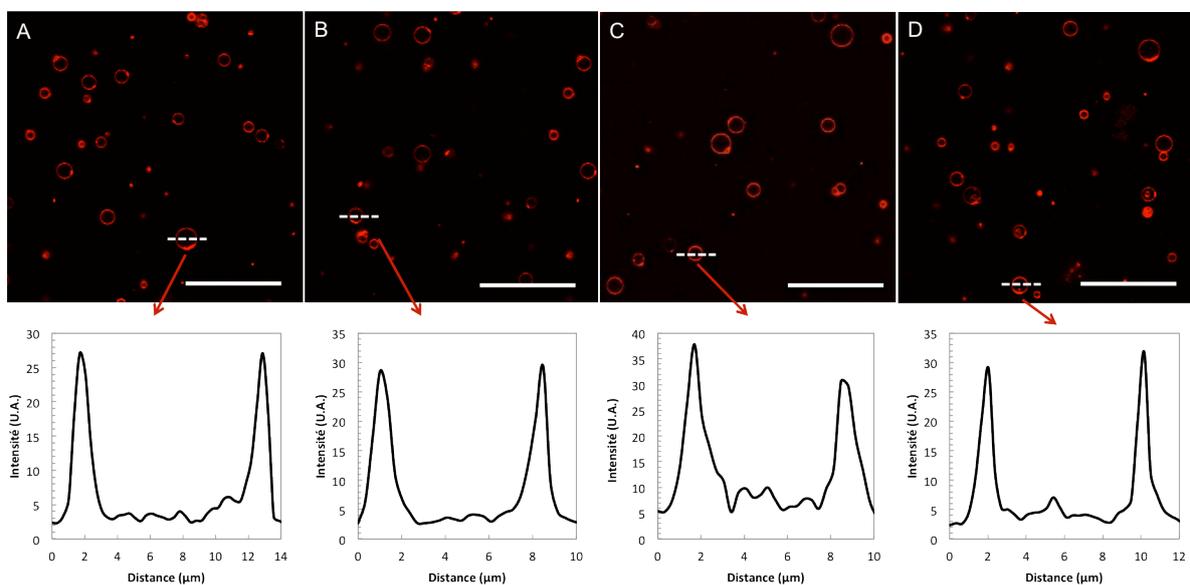


Figure 3.12 : Clichés de MCBL et profils d’intensité de GUV incubées dans une suspension de CNC 2% pendant différentes durées (A) 5 minutes (B) 15 minutes (C) 30 minutes (D) 1 heure. Barres d’échelle : 50 μm .

D’après ces images, il semblerait que la durée d’incubation n’ait que peu d’incidence sur le processus d’adsorption des CNC à la surface des vésicules lipidiques, les valeurs maximales des profils d’intensité restant du même ordre de grandeur dans le temps. Nous retrouvons ici un comportement déjà observé dans le cas des systèmes multicouches plans mettant en jeu les CNC avec des polycations [Jean et al., 2008, Podsiadlo et al., 2007], qui ont tendance à s’adsorber de façon relativement dense dès les premières secondes de contact avec la surface de signe opposé.

Nous observons de plus sur ces images qu'au sein d'un même échantillon, l'intensité de fluorescence des GUV décorées semble relativement homogène d'un objet à l'autre comme l'illustre la Figure 3.13.

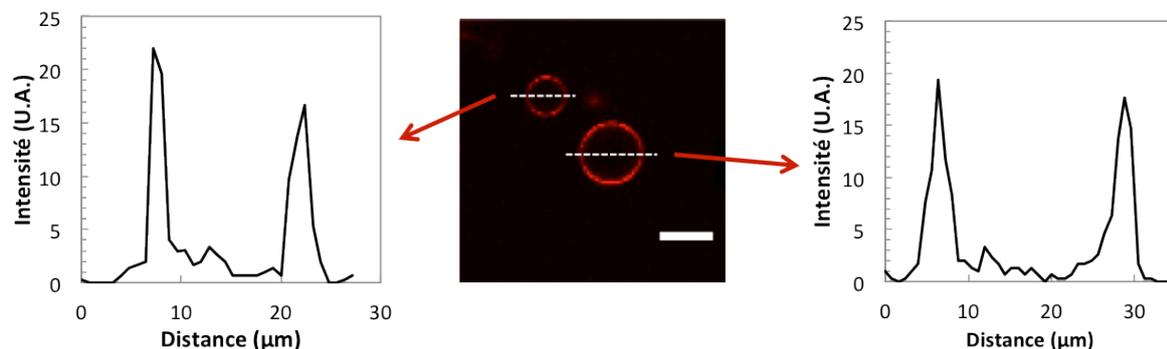


Figure 3.13 : GUV incubées dans une suspension de CNC et profils d'intensité correspondants. Barre d'échelle : 20 μm

II.3 Aspect des vésicules recouvertes de CNC

Plusieurs types de perturbations de la membrane ont pu cependant être observés régulièrement sur certaines vésicules comme l'illustre la Figure 3.14. Le recouvrement de la surface des vésicules n'est pas toujours homogène, comme le montre la Figure 3.14-A qui fait apparaître des zones plus lumineuses en certains points de la membrane. La Figure 3.14-B montre quant à elle le même type de phénomène plus prononcé : les zones plus lumineuses apparaissent cette fois visiblement plus épaisses que le reste de la membrane. Le même commentaire peut être émis sur la Figure 3.14-C qui révèle en plus la présence de protubérances à l'extérieur et à l'intérieur de la vésicule. Nous observons enfin sur la Figure 3.14-D un exemple de vésicule complètement illuminée de l'intérieur, signe que des CNC ont été internalisés.

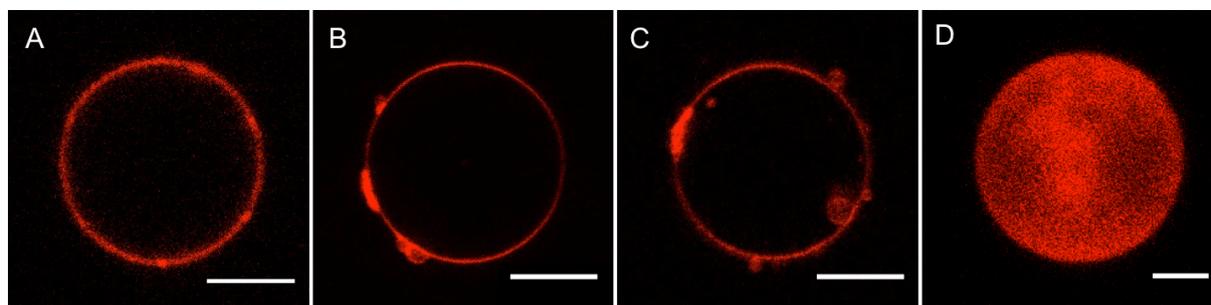


Figure 3.14 : GUV incubées dans une suspension de CNC 2%. Barres d'échelle : 5 μm

En dépit du fait que les suspensions de CNC seules soient stables et ne présentent pas d'agrégats lorsqu'analysées en DLS, le processus d'adsorption à la surface des GUV s'avère être

générateur d'agrégats. Ces observations sont à rapprocher d'autres exemples de décoration de vésicules géantes de la littérature. Mertins et al., qui recouvrent des GUV par du chitosane relèvent également une distribution hétérogène du signal de fluorescence du polysaccharide adsorbé lors d'observations en microscopie confocale [Mertins&Dimova, 2013], et l'attribuent à un manque d'homogénéisation du milieu : l'adsorption aurait lieu beaucoup plus rapidement que le processus de mélange entre les GUV et la solution de chitosane. Dans le cas de l'adsorption de nanoparticules, la formation d'agrégats voire d'une « croûte » relativement épaisse à la surface de la membrane lipidique a été rapportée par [Li&Malmstadt, 2013], qui étudient l'interaction entre des GUV et des nanobilles de polystyrène cationiques. Le même phénomène a également pu être rapporté dans le cas de l'adsorption de nanoparticules d'or recouvertes de citrate [Montis et al., 2014]. Ces différents exemples sont illustrés sur la figure 3.15.

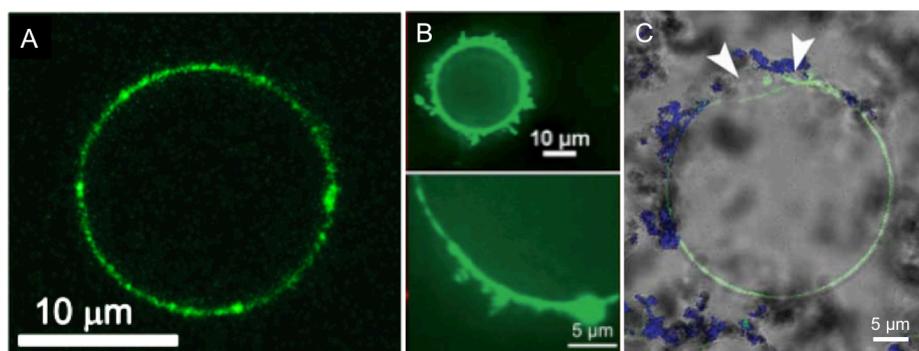


Figure 3.15 : (A) GUV recouverte de chitosane fluorescent observée en MCBL. D'après [Mertins&Dimova, 2013]. (B) GUV recouverte de nanoparticules de polystyrène fluorescentes. D'après [Li&Malmstadt, 2013]. (C) GUV recouverte de nanoparticules d'or-citrate. D'après [Montis et al., 2014].

Si l'adsorption non homogène montrée en Figure 3.15-A peut effectivement être la conséquence du seul manque d'agitation du milieu, Montis et al. expliquent l'apparition d'une « croûte » épaisse de la façon suivante : lorsqu'une nanoparticule vient s'adsorber sur la membrane d'une GUV, seule une partie de sa surface se retrouve couverte de lipides. La particule cherche alors à minimiser son excès d'énergie de surface en attirant d'autres particules du milieu environnant [Montis et al., 2014], les répulsions électrostatiques entre les objets ne suffisant pas à empêcher ce phénomène d'agrégation.

La formation de protubérances à l'intérieur ou à l'extérieur de la bicouche lipidique et l'internalisation de CNC témoignent aussi de mécanismes complexes : la taille des nanoparticules ne leur permettant pas de diffuser à travers la membrane lipidique, l'internalisation doit découler d'un processus analogue à l'endocytose, qui implique que la bicouche vienne « envelopper » les particules, formant des invaginations et aboutissant à l'entrée des CNC dans la vésicule. Ce processus d'entrée de nanoparticules à l'intérieur de

GUV a par exemple pu être observé par Tahara et al. par microscopie confocale comme le montre la Figure 3.16.

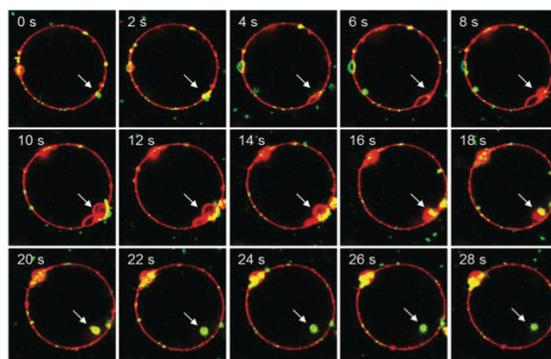


Figure 3.16 : Images de microscopie confocale d'une nanoparticule de poly (D,L-lactide-co-glycolide) (en vert) internalisée par une GUV (en rouge). D'après [Tahara et al., 2012]

II.4 Effet de la concentration en CNC

Afin d'étudier l'influence de la concentration en CNC sur le recouvrement des vésicules, des GUV respectivement incubées dans des suspensions de 0.25, 0.5, 1 et 1.5% ont été observées par microscopie confocale, dans les mêmes conditions d'illumination. Des profils azimuthaux d'intensité de fluorescence ont ensuite été enregistrés sur chacune des images, selon la méthode présentée au chapitre 2 § III.3.4.2 : l'intensité du signal provenant de la couche de CNC est mesurée le long d'une couronne large de 10 pixels. Des exemples de profils sont présentés sur la Figure 3.17 pour chaque concentration en CNC testée.

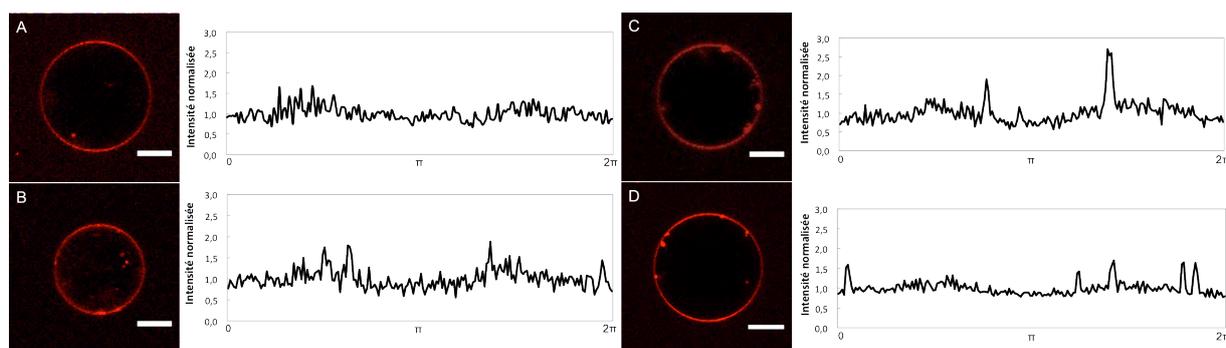


Figure 3.17 : Clichés de microscopie confocale de GUV incubées dans des suspensions de CNC et tracés correspondants des profils d'intensité de fluorescence azimuthale normalisée par sa valeur moyenne. Les concentrations des suspensions de CNC utilisées sont : (A) 0,25% (p/p) (B) 0,5% (C) 1% (D) 1,5%. Barres d'échelle : 5 μm .

Les fluctuations du signal qui sont observées sur l'ensemble des profils de la Figure 3.17 sont dues au bruit, qui dépend de la sensibilité de la détection. Les pics d'intensité traduisent quant à eux la présence de zones plus lumineuses donc de zones plus concentrées en CNC. Ces

pics peuvent atteindre jusqu'à 2,5 fois la valeur moyenne mesurée sur le contour de la membrane, et comme le montrent les exemples présentés en Figure 3.17, ont tendance à être plus nombreux lorsque la concentration augmente.

L'acquisition de ces profils d'intensité nous permet de calculer une valeur moyenne de la fluorescence émise par les CNC adsorbés sur les GU, pour chaque concentration. Ces valeurs peuvent ensuite être comparées étant donné que les images des différents échantillons ont été enregistrées au même gain. La figure 3.18 présente une courbe d'étalonnage de la fluorescence moyenne de suspensions de CNC-RBITC de différentes concentrations, ainsi que les valeurs moyennes de fluorescence déterminées pour chaque concentration en CNC sur le contour de plusieurs vésicules.

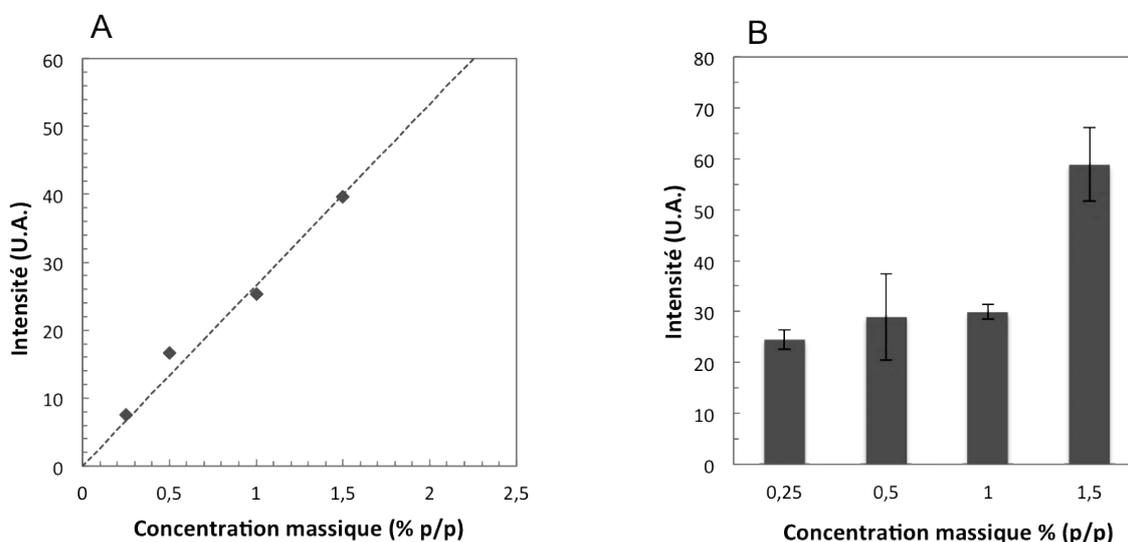


Figure 3.18 : (A) Courbe d'étalonnage de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en CNC-RBITC. (B) Intensité de fluorescence moyenne des CNC-RBITC sur le contour de la membrane des GU.

L'intensité de fluorescence provenant de la couche adsorbée de CNC-RBITC semble être relativement constante lorsque les vésicules sont incubées dans des suspensions de concentration 0,25% (p/p), 0,5% (p/p) et 1% (p/p) et correspondrait à une concentration locale en CNC d'environ 1% (p/p) d'après la courbe d'étalonnage. L'intensité moyenne est deux fois plus élevée lors de l'incubation à 1,5% (p/p) ce qui témoigne d'un recouvrement plus dense correspondant à une concentration locale en CNC plutôt de l'ordre de 2,2%. Dans la perspective de pouvoir déposer du xyloglucane à la surface des GU décorées de CNC, nous resterons donc à une concentration supérieure à 1,5% (p/p) en CNC lors des incubations afin d'assurer un bon recouvrement de la surface et donc d'optimiser l'interaction avec la couche suivante.

III Conclusion

Bien que préliminaires, les observations expérimentales présentées dans ce chapitre sont encore inédites dans le domaine : il est possible d'adsorber des nanocristaux de cellulose à la surface de vésicules lipidiques (liposomes ou GUV), ce qui n'a pour l'instant pas été rapporté dans la littérature. Nous avons de plus observé que cette interaction a lieu quelque soit la charge de surface des deux protagonistes : lorsque GUV et CNC ont une charge de signe opposé, mais aussi lorsque ils portent une charge de même signe. Un constat similaire a d'ailleurs été émis dans le cas de l'adsorption de chitosane et d'acide hyaluronique sur des GUV elles aussi préparées avec du DOPC [Quemeneur, 2010], ou encore entre des GUV et des nanoparticules de silice fonctionnalisées [Laurencin et al., 2010]. La nature de l'interaction entre ces lipides zwitterioniques et la cellulose n'est donc pas entièrement électrostatique et inclut peut être la contribution d'un effet hydrophobe ou de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyyles des CNC et la tête polaire des phospholipides, ce qui justifie la présence de patches.

Bien que notre but soit de travailler avec des vésicules géantes pour construire des analogues de cellule végétale, les observations en cryo-MET réalisées avec des liposomes permettent de visualiser plus concrètement l'interaction CNC/membrane lipidique et de constater que celle-ci est suffisamment intense pour induire de l'agrégation entre objets, et pour que les vésicules se déforment au contact des nanocristaux rigides. Ces expériences ouvrent ainsi la voie à un sujet de recherche à part entière sur les caractéristiques de ces complexes CNC/vésicules : l'influence de la stoechiométrie, du facteur de forme des nanocristaux sur la complexation ou encore la possibilité de réarrangements structuraux à plus long terme restent en effet des questions encore ouvertes, au même titre que la mesure quantitative de l'intensité de l'interaction.

Les images de microscopie confocale de GUV décorées de CNC ont elles fait apparaître quelques défauts de structure comme la formation de protubérances et l'internalisation de particules, qui touchent une partie des objets. Les phénomènes mis en jeu sont finalement les mêmes que dans le cas des liposomes : lors de l'adsorption des CNC à sa surface, la membrane lipidique va là aussi être capable de se déformer à leur contact, cette fois pour les envelopper complètement, ce qui peut ensuite mener à leur internalisation. Malgré ces quelques perturbations, le recouvrement de la membrane lipidique par les CNC semble relativement dense d'après les mesures d'intensité de fluorescence, ce qui devrait permettre de déposer une couche de xyloglucanes par la suite.

Chapitre 4 : Elaboration et caractérisation des capsules multicouches

La première étape consistant à déposer des nanocristaux de cellulose à la surface de vésicules lipidiques ayant été franchie, la construction de capsules multicouches peut dès lors être envisagée. L'étude bibliographique des modèles de paroi primaire a révélé que la structure principalement porteuse de cet assemblage naturel consistait en un réseau de cellulose/hémicellulose, interagissant potentiellement avec les pectines. Notre objectif premier étant de mettre au point des objets biomimétiques de cette paroi pour en étudier les propriétés mécaniques, il nous faut commencer par étudier la faisabilité du dépôt couche par couche de cellulose et de xyloglucane sur les vésicules lipidiques. Nous avons fait le choix de ne pas tenter d'inclure les pectines d'emblée, dont la capacité à former des assemblages multicouches *in vitro* avec les CNC n'est pas encore démontrée. En revanche, l'interaction de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes *in vitro* est connue et décrite, et a déjà été exploitée avec succès pour générer des films [Cerclier et al., 2010, Jean et al., 2009] et des capsules multicouches [Bailly, 2012], ce qui constitue *a priori* un point de départ solide sur lequel nous appuyer.

Ce chapitre se propose donc de décrire le procédé d'élaboration des capsules multicouches CNC/XG ainsi que leur caractérisation. Les diverses difficultés expérimentales rencontrées dans la mise au point d'un protocole seront abordées, ainsi que les moyens qui ont été mis en oeuvre pour les contourner et qui ont permis de construire des capsules comportant jusqu'à une dizaine de bicouches. Le suivi du dépôt des couches successives de cellulose et de xyloglucane a été effectué par microscopie confocale à balayage laser (MCBL). L'effet de ces adsorptions successives de matière sur la taille et la morphologie des objets de départ a également été observé. Enfin, l'épaisseur de la paroi des capsules a été estimée à l'état sec par microscopie à force atomique (AFM).

I Elaboration des capsules

I.1 Objectif

La stratégie que nous avons retenue pour l'élaboration de capsules biomimétiques de la paroi des cellules végétales consiste à construire une paroi multicouche CNC/XG à la surface

de vésicules lipidiques géantes. L'adsorption de la première couche de nanocristaux de cellulose ayant été concluante comme il a été montré au chapitre 3, la phase suivante consiste à déposer une couche de xyloglucane puis à répéter ces deux étapes autant de fois que nécessaire pour atteindre une épaisseur de paroi compatible avec celle de la paroi primaire des cellules végétales, soit une épaisseur comprise entre 0,1 et 1 μm . L'épaisseur d'une bicouche CNC/XG à l'état sec a été mesurée par AFM et par réflectivité des neutrons et vaut environ 9 nm [Jean et al., 2009], ce qui signifie qu'il va nous falloir déposer au moins une dizaine de bicouches pour obtenir une épaisseur d'une centaine de nanomètres, valeur qui constitue la limite basse des parois naturelles. Etant donné que nous allons exclusivement travailler en milieu hydraté, il est très probable que l'épaisseur réelle d'une bicouche CNC/XG soit plus élevée en raison de la présence d'eau. Le processus de dépôt couche par couche de CNC et de XG sur les GUV-CNC est représenté sur la Figure 4.1 ci-dessous.

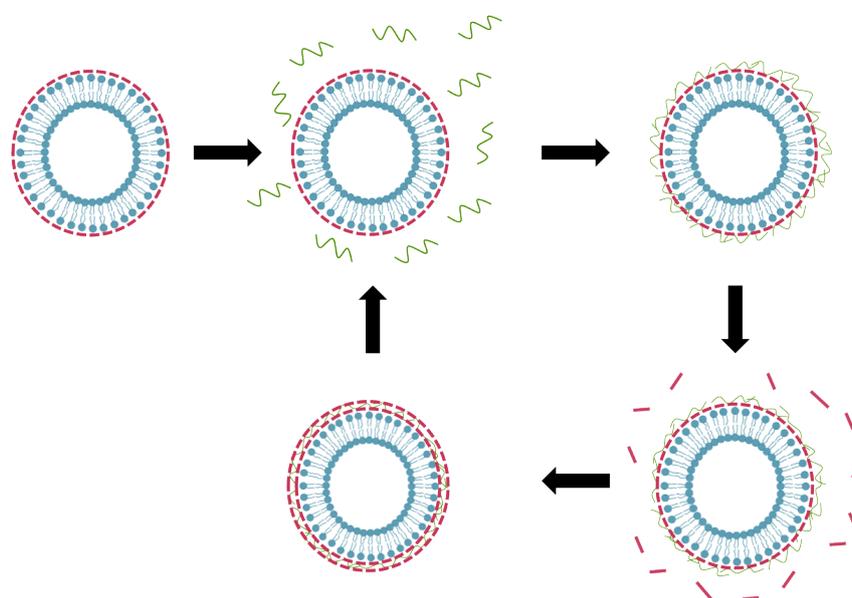


Figure 4.1 : Illustration du dépôt couche par couche de nanocristaux de cellulose et de xyloglucanes sur les GUV recouvertes de CNC

Le suivi du bon déroulement des dépôts successifs sera réalisé par microscopie confocale à balayage laser sur des échantillons préparés avec des CNC ou des XG fluorescents dont le marquage a été effectué comme détaillé au chapitre 2 § I.2.3.

Par la suite, les capsules seront toujours recouvertes d'une dernière couche de CNC, sauf si mentionné. Leur charge négative permettra de limiter l'agrégation entre les capsules par répulsion électrostatique. La composition des capsules étudiées sera indiquée par la nomenclature suivante : $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_n$ où n correspond au nombre de bicouches CNC/XG déposées sur les GUV. Etant donné que la dernière couche déposée sera toujours une couche de

CNC, n sera toujours un demi-entier : $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{2,5}$ correspond donc à une vésicule recouverte de deux bicouches CNC/XG et d'une dernière couche de CNC.

I.2 Mise au point du protocole expérimental

La méthode d'assemblage couche par couche par trempage s'est déjà révélée probante pour l'élaboration de systèmes multicouches CNC/XG, aussi bien sur des substrats plans que sur des gouttes d'huile de géométrie sphérique et c'est pourquoi nous avons choisi d'employer cette stratégie pour construire nos capsules biomimétiques. Cette technique repose sur l'adsorption séquentielle de composés sur un support, ce qui implique de tremper successivement celui-ci (dans notre cas, les vésicules géantes unilamellaires) dans les solutions/suspensions contenant les espèces à déposer. Avant de mettre ce processus en oeuvre, il convient de s'assurer qu'il est effectivement possible d'adsorber une seconde couche de xyloglucanes sur les vésicules décorées de CNC.

I.2.1 Rinçage de la première couche de CNC

L'une des étapes nécessaires au bon déroulement du dépôt couche par couche est celle qui permet de se débarrasser de l'excès de matière : le rinçage. Les vésicules ayant été incubées dans un excès de CNC, il reste donc des CNC libres en suspension qu'il va falloir extraire du milieu. Classiquement, lorsque la méthode couche par couche est employée sur des substrats sphériques telles que des nanoparticules, cette matière non adsorbée est retirée par centrifugation : les objets d'intérêt se retrouvent alors dans le culot et ils peuvent être séparés du surnageant, avant d'être redispersés pour qu'un nouveau dépôt ait lieu.

Notre démarche a consisté à transposer ce protocole aux vésicules. En effet, la possibilité d'introduire une différence de densité entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules en jouant sur le type de sucre du milieu (saccharose à l'intérieur, glucose à l'extérieur) laissait présager la possibilité d'un rinçage par centrifugation : les vésicules remplies de saccharose ($d=1,59 \text{ g/cm}^3$) sédimentent lorsqu'elles sont plongées dans du glucose ($d=1,54 \text{ g/cm}^3$) légèrement moins dense.

Afin de vérifier la viabilité de ce principe de rinçage sur les vésicules décorées, plusieurs essais de centrifugation ont été réalisés: un eppendorf contenant un certain volume de suspension de GUV-CNC dispersés dans du saccharose 300mM est complété par du glucose 300 mM. Cette préparation diluée est introduite dans un capillaire plat en verre ($0,2 \times 2,0 \times 50 \text{ mm}^3$, VITROCOM), qui est lui même placé dans un eppendorf et mis à centrifuger. Le capillaire peut ensuite être observé par microscopie optique, ce qui permet de vérifier que les vésicules ont effectivement sédimenté. Etant donné que notre objectif à terme est de déposer jusqu'à une vingtaine de couches (et donc de procéder à au moins autant de rinçages), il s'agit d'optimiser

la vitesse et la durée de la centrifugation pour que le rinçage soit suffisamment efficace sans être trop long. S'ajoute à cela une contrainte supplémentaire : la fragilité des GUV qui sont des objets sensibles aux forces de cisaillement, et dont la membrane peut rompre sous l'effet de contraintes mécaniques trop importantes.

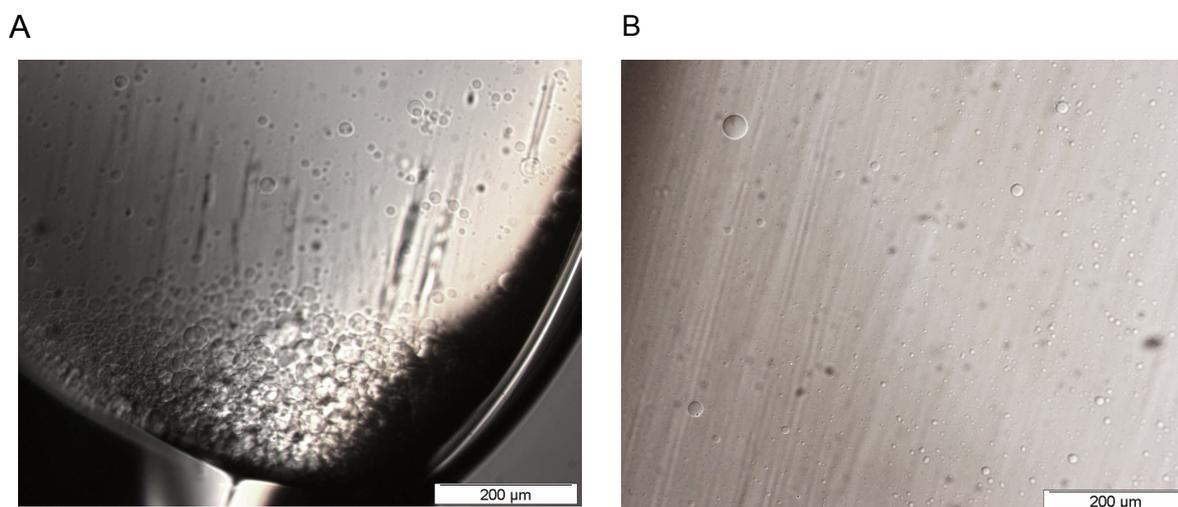


Figure 4.2 : (A) Culot du capillaire après 10 min de centrifugation à 800 rpm (B) Surnageant après 10 min de centrifugation à 800 rpm

Ces essais en capillaire ont confirmé qu'il est effectivement possible de faire sédimenter les vésicules par centrifugation, mais pas complètement : après 10 min de centrifugation à 800 rpm, il reste toujours des vésicules dans le surnageant (essentiellement celles de petite taille, moins sensibles à la différence de densité saccharose/glucose car elles encapsulent une plus faible quantité de saccharose). Même en répétant la centrifugation, ces vésicules de faible diamètre restent en suspension, et seraient éliminées au rinçage ce qui constituerait une perte d'objets que nous estimons à 10%. Nous avons également constaté par la suite que des centrifugations répétées, même à faible vitesse, était un traitement sévère pour les vésicules. Etant donné que nous souhaitons effectuer une vingtaine de dépôts et de rinçages, nous avons finalement opté pour une solution plus douce mais plus lente, qui consiste à laisser sédimenter les vésicules sans centrifugation, sur une nuit ou une journée. Cette méthode n'assure pas non plus une sédimentation totale des vésicules mais permet de ne pas endommager celles qui sont récupérées.

L'autre difficulté pratique de ce rinçage réside dans la séparation entre culot et surnageant. Là encore, lorsque des particules solides sont employées comme support de multicouches, la démarcation est nette car le culot se présente sous la forme d'un dépôt visible à l'oeil nu. Ce n'est pas le cas ici, les vésicules étant des objets à très faible contraste. Cette étape est donc doublement délicate : il s'agit de retirer le maximum de CNC non adsorbés sans perdre trop d'objets parmi ceux qui n'ont pas totalement sédimenter. La quantité de surnageant

à extraire a donc été fixée comme illustré sur la Figure 4.3 : tout le liquide est aspiré jusqu'à ce qu'il ne reste dans l'épendorf que le volume initialement introduit de la suspension de GUV. Les vésicules sont ensuite redispersées dans une solution de saccharose.

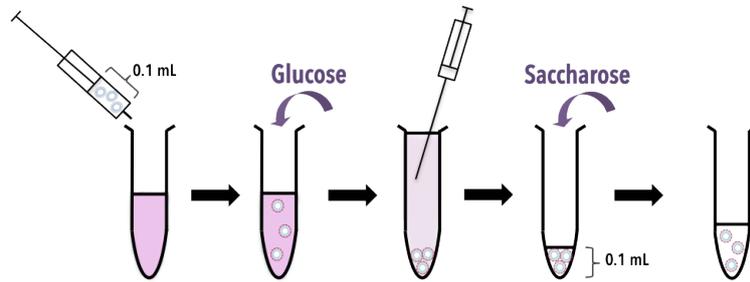


Figure 4.3 : Illustration du procédé de rinçage

I.2.2 Dépôt de la première couche de XG

L'étape de rinçage des CNC libres effectuée, le dépôt de la couche de xyloglucane peut ensuite être envisagée. Dans un premier temps, le comportement des GUV-CNC en présence de xyloglucane non marqué a été observé : rien ne garantit a priori que les vésicules conservent leur intégrité au contact de la solution de XG. Nous nous sommes basés sur les observations de [Cerclier et al., 2010] et [Jean et al., 2009] pour choisir la concentration en xyloglucanes avec laquelle travailler : une concentration trop élevée est synonyme d'enchevêtrement des pelotes de chaînes de XG, cette organisation étant peu propice à des interactions efficaces avec les couches inférieures et supérieures de CNC dans un assemblage multicouche. Ainsi, pour les premiers essais d'incubation de GUV-CNC avec du xyloglucane en excès, nous nous sommes donc placés dans les mêmes conditions que [Jean et al., 2009], c'est à dire à 0.1% (p/p) en XG (soit 1 g/L), ce qui correspond à un régime semi-dilué. Comme pour les CNC, le temps d'incubation a été fixé à une trentaine de minutes.

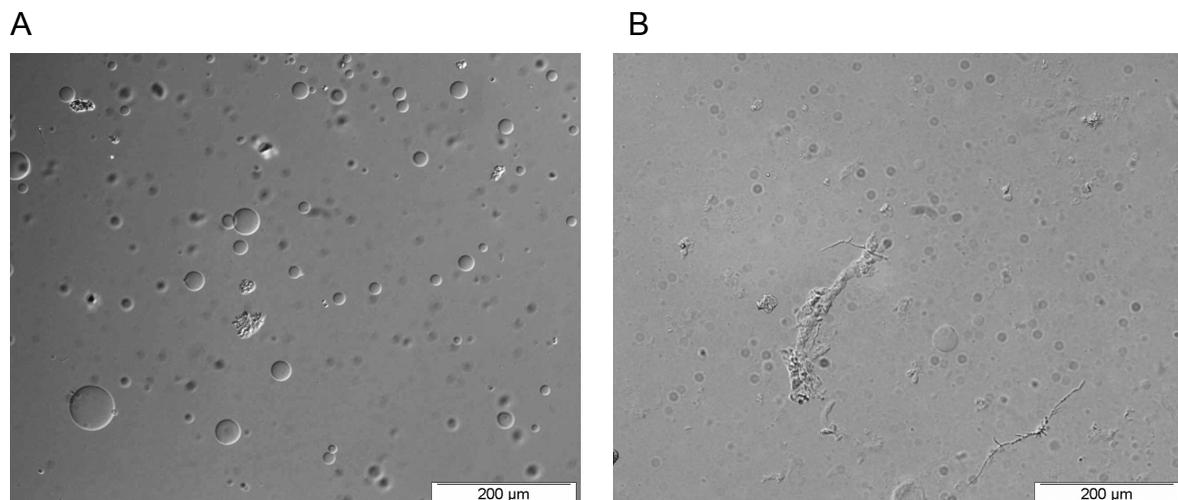


Figure 4.4 : (A) GUV-CNC avant incubation (B) GUV-CNC après 30 minutes d'incubation avec du XG 0.1%

L'observation par microscopie optique de GUV-CNC incubées en présence de XG à 0.1% (p/p) a mis en évidence une diminution importante du nombre de vésicules que nous estimons être de l'ordre de 80% au profit de l'apparition de nombreux agrégats. Même si quelques uns sont déjà présents avant l'incubation comme on peut le voir sur la Figure 4.4-A, leur proportion devient sensiblement plus élevée après introduction de xyloglucanes (Figure 4.4-B).

Plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine de ces observations. Le premier découle directement d'un ringage imparfait (que nous n'effectuons qu'une fois pour éviter de perdre trop d'objets, la sédimentation n'étant pas totale), d'où la présence de CNC libres en suspension avec lesquels les chaînes de XG sont susceptibles d'interagir, et former des agrégats indésirables (Figure 4.5-A)

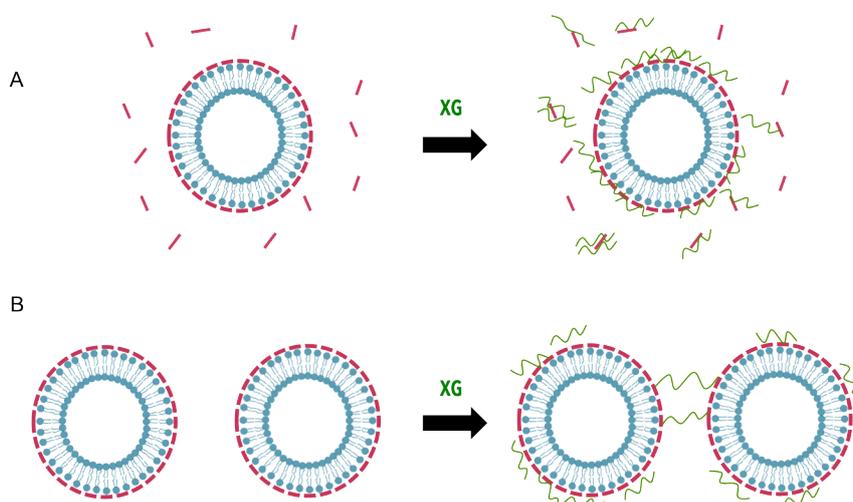


Figure 4.5 : (A) Schéma représentatif de la formation d'agrégats par adsorption du XG sur les CNC libres (B) Schéma représentatif du pontage de GUV-CNC par les chaînes de XG

Le xyloglucane serait aussi à l'origine d'un phénomène de déplétion qui tend à faire flocculer les vésicules dont la membrane finit par rompre, les débris de cette dislocation formant autant d'agrégats supplémentaires. De plus, les chaînes de XG ayant une masse molaire important ($M_w = 470\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$) [Muller et al., 2011], le pontage entre vésicules est possible (fig 4.X-B), ce qui peut également entraîner leur flocculation et leur rupture. Enfin, les chaînes de XG ont tendance à s'auto-associer en solution, et ce phénomène est d'autant plus prononcé dans le temps et à concentration élevée (Figure 4.6). L'enchevêtrement croissant des chaînes se traduit par une augmentation de la viscosité de la solution, ce qui n'est pas sans conséquence pour l'intégrité des GUV qui sont très sensibles aux contraintes de cisaillement.

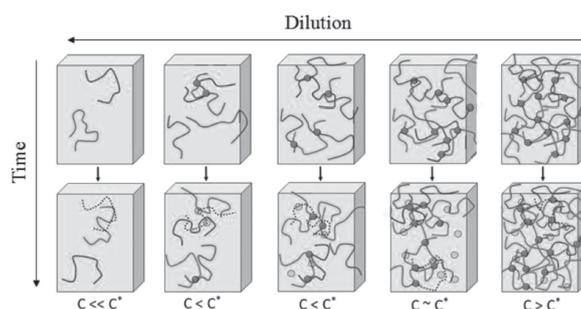


Figure 4.6 : Représentation schématique du comportement des chaînes de xyloglucane en fonction de la concentration et du temps [Muller et al., 2013]

L'incubation de GUV-CNC dans un excès de XG a donc été testée à des concentrations plus faibles : 0.05 et 0.01% (p/p).

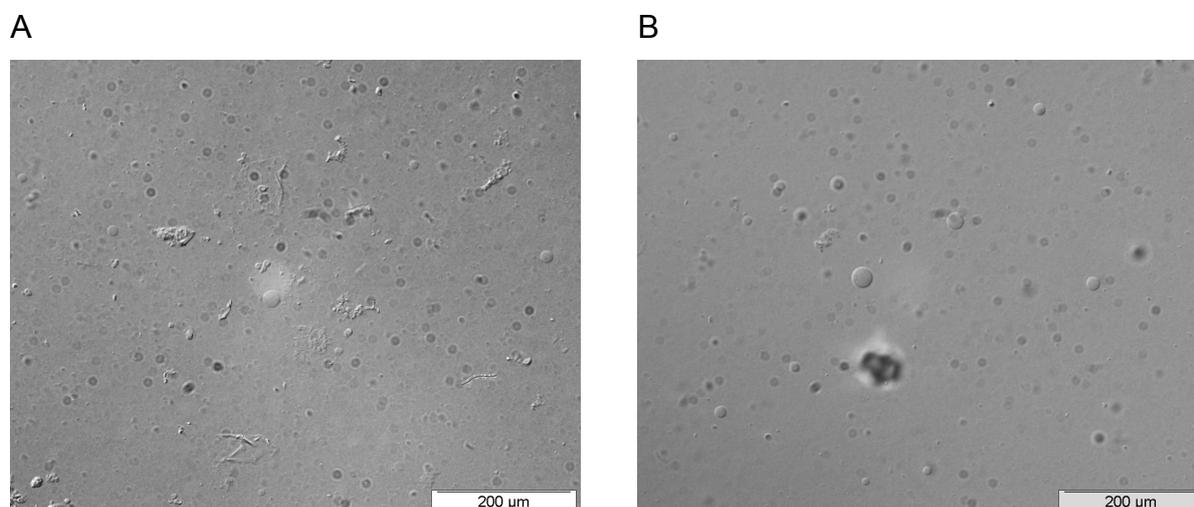


Figure 4.7 : (A) GUV-CNC après 30 min d'incubation dans une solution de XG 0.05% (B) GUV-CNC après 30 min d'incubation dans une solution de XG 0.01%

Visuellement, la quantité d'agrégats semble moins importante lorsque la concentration de XG est la plus faible, soit 0.01%, ce qui correspond à un régime très dilué. La diminution du nombre de vésicules après dépôt est plutôt de l'ordre de 50%. Avant de fixer définitivement cette concentration, il nous faut vérifier qu'il y ait bien adsorption de xyloglucane à la surface des GUV-CNC dans ces conditions. Pour cela, des observations en microscopie à fluorescence ont été réalisées sur des échantillons de vésicules recouvertes d'une première couche de CNC puis incubées dans une solution de XG-FITC (la préparation des solutions de xyloglucanes marqués est détaillée au chapitre 2 § I.2.3) à 0.01% (p/p). Un signal de fluorescence homogène a pu être détecté à la surface des vésicules, confirmant l'adsorption de la couche de xyloglucanes comme l'illustre la Figure 4.8.

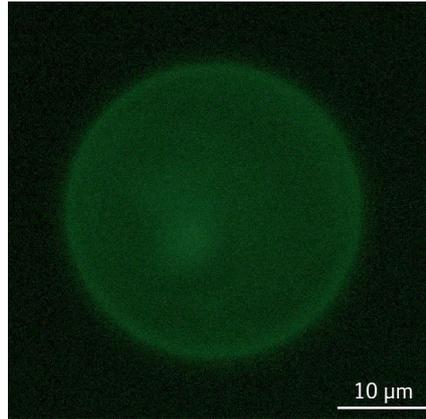


Figure 4.8 : Observation par microscopie à fluorescence d'une GUV-CNC incubée dans une solution de XG-FITC 0.01%

Dès lors, cette seconde étape validée, la construction de capsules multicouches CNC/XG a pu être envisagée.

I.2.3 Généralisation du protocole couche-par-couche

En répétant les étapes de dépôts et de rinçage pour atteindre notre objectif d'une dizaine de bicouches CNC/XG, nous avons été confrontés aux mêmes problèmes d'apparition d'agrégats et de diminution du nombre d'objets, malgré les précautions prises concernant la concentration en XG et le rinçage. Pour surmonter ces obstacles, nous avons essayé de jouer sur plusieurs leviers, le premier étant la formulation des GUV avec pour objectif de les rendre mécaniquement plus résistantes : l'ajout de cholestérol étant connu pour condenser les lipides et rigidifier la membrane [Edholm&Nagle, 2005], nous avons choisi d'en incorporer une fraction de 30% au moment de l'électroformation.

D'autres pistes ont été explorées pour améliorer l'étape critique de séparation des GUV décorées des espèces non adsorbées, dont la dialyse continue qui consiste à effectuer tous les dépôts dans une membrane de dialyse pour éliminer les CNC ou les XG libres au fur et à mesure. Nous avons également été amenés à tester l'utilisation d'un circuit microfluidique pour essayer de combiner dépôt et rinçage comme l'illustre la Figure 4.9.

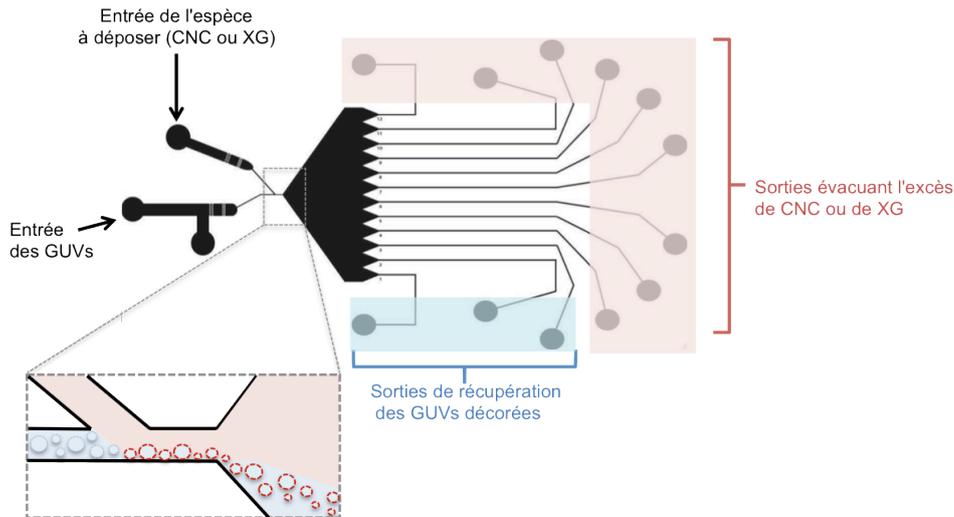


Figure 4.9 : Représentation schématique du circuit microfluidique utilisé avec en insert un zoom sur la zone de dépôt/rinçage. La suspension/solution de l'espèce à déposer est injectée dans le circuit avec un débit 10 fois plus important que celui de la suspension de GUV. Celles-ci se retrouvent plaquées contre la paroi inférieure du circuit, ce qui les pousse à se diriger vers les sorties inférieures. L'objectif des expériences réalisées était de trouver le bon rapport entre les débits d'entrée et de sortie des différentes solutions pour séparer les GUV décorées de la suspension/solution de dépôt.

Aussi, afin d'essayer de séparer les vésicules des agrégats formés dans la suspension, nous avons également encapsulé du glucose pour les faire crémier en les immergeant dans du saccharose lors du rinçage. Ces essais n'ayant néanmoins pas permis d'obtenir d'améliorations notables en termes de rendement d'objets, ils n'ont pas été poursuivis.

Le tableau 4.1 récapitule ainsi les différentes voies précédemment évoquées qui ont été explorées pour optimiser le rendement en capsules du protocole couche-par-couche et aboutir au protocole définitif présenté au chapitre 2 §II.1.3.

Tableau 4.1 : Optimisation du protocole expérimental. Les conditions qui ont été sélectionnées pour le protocole définitif apparaissent en gras.

Etape	Paramètre	Conditions testées	Observations
Electroformation	Formulation des GUV	DOPC	Les vésicules incorporant du cholestérol semblent mieux résister aux dépôts successifs, les objets semblent plus nombreux à l'observation.
		DOPC/Cholestérol 70/30 %mol	
	Type de sucre encapsulé	Saccharose	L'encapsulation de glucose mais ne permet pas un rinçage plus efficace.
		Glucose	
Rinçage	Temps/vitesse de centrifugation	10 min / 800 rpm	Nombreuses vésicules encore présentes dans le surnageant.
		30 min / 800 rpm	
		30 min / 1000 rpm	
		30 min / 2000 rpm	
		1 heure / 2000 rpm	
	Double rinçage	2 x 10 min / 800 rpm	Perte importante d'objets
		2 x 30 min / 800 rpm	
	Sédimentation lente	Sédimentation sur une nuit	Peu de vésicules dans le surnageant.
Dialyse continue	Dépôts effectués dans une membrane de dialyse (seuil de coupure 300 kDa)	Les CNC ne traversent pas la membrane de dialyse et ne sont donc pas séparés des GUV décorées.	
Utilisation d'un circuit microfluidique	Voir le schéma du circuit utilisé en figure 4.9	Il n'a pas été possible de séparer complètement les GUV décorées de la solution/suspension d'espèces à déposer.	
Dépôts	Concentration en xyloglucanes	0,1 % (p/p)	Apparition d'agrégats quelque soit la concentration. Le phénomène est moins marqué en régime dilué.
		0,05 % (p/p)	
		0,01 % (p/p)	

II Suivi des dépôts par microscopie confocale

II.1 Croissance de la paroi

Si l'adsorption des deux premières couches de CNC et XG a été confirmée par microscopie à fluorescence, la microscopie confocale à balayage laser permet d'avoir une visualisation plus précise des dépôts, en s'affranchissant de la lumière émise par les fluorophores hors du plan focal. Grâce à cette technique, il est possible d'obtenir une vue en coupe des vésicules sans ambiguïté sur l'origine du signal de fluorescence, ce qui diffère de la vue en projection de la microscopie classique.

Des images ont été obtenues sur une suspension de GUV-CNC, dont les CNC ont été marqués à la RBITC (Figure 4.10), ainsi que sur une suspension de GUV(CNC/XG), dont seuls les XG ont été marqués à la FITC (Figure 4.11).

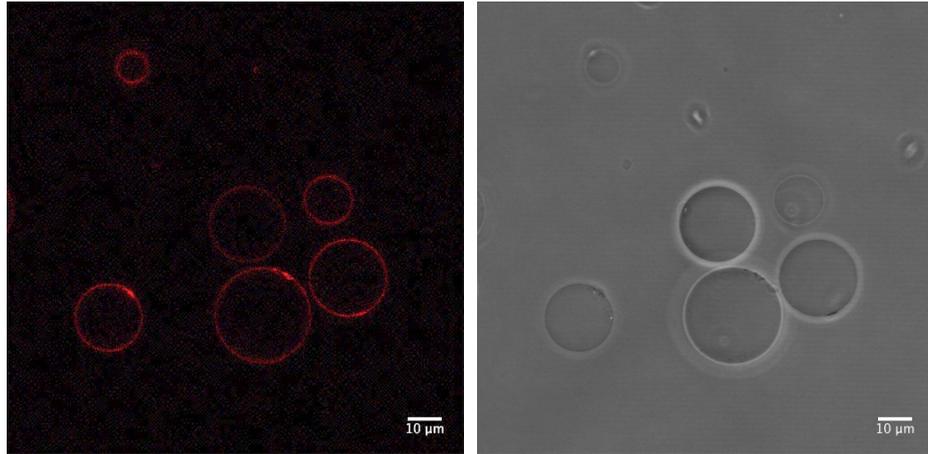


Figure 4.10 : Image de MCBL (gauche) et en contraste de phase (droite) d'une suspension de GUV-CNC préparée avec des CNC fluorescents

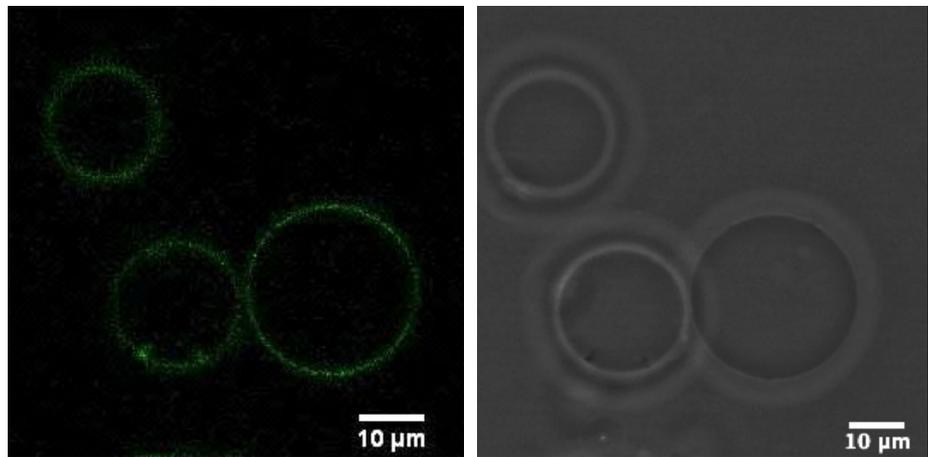


Figure 4.11 : Image en MCBL (gauche) et en contraste de phase (droite) d'une suspension de GUV-(CNC/XG) préparées avec des XG fluorescents

Qu'il s'agisse de GUV(CNC-RBITC) ou de GUV(CNC/XG-FITC), les objets observés présentent un signal de fluorescence se démarquant nettement du bruit de fond, indiquant que le dépôt de matière a bien eu lieu sur la membrane des vésicules géantes. Cette adsorption en surface peut être mise en évidence de façon plus quantitative par l'acquisition des profils d'intensité le long du diamètre des vésicules. La Figure 4.12 présente ainsi les images de microscopie confocale d'une GUV(CNC-RBITC) et d'une GUV(CNC/XG-FITC) accompagnées des profils d'intensité correspondants.

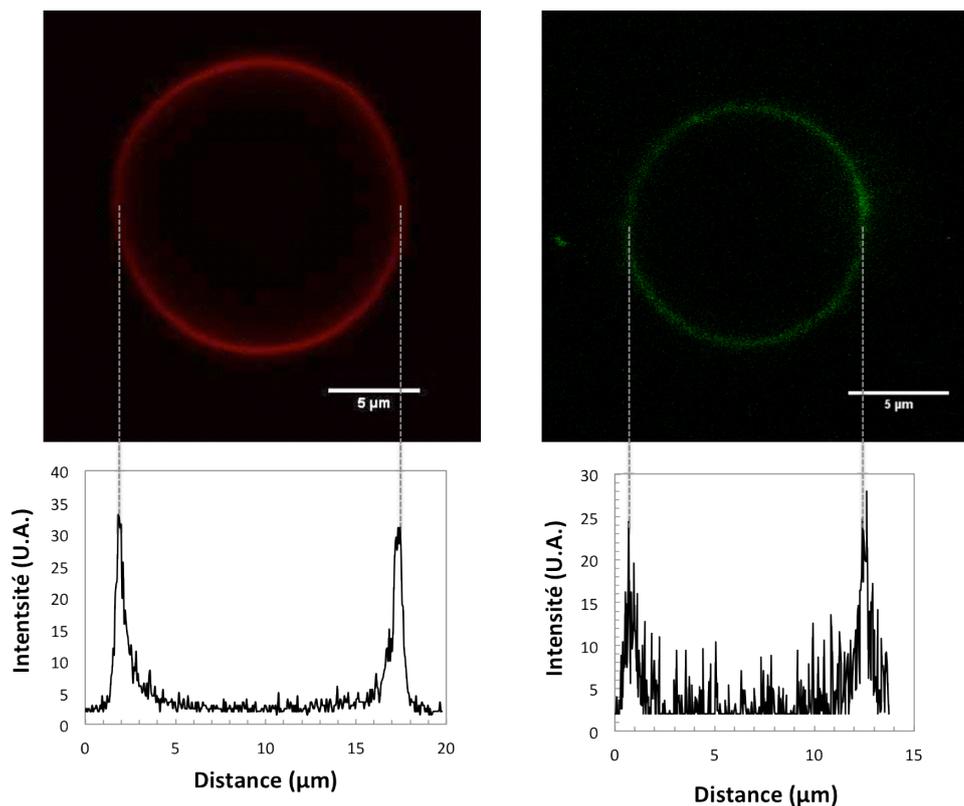


Figure 4.12 : Images de MCBL d'une vésicule couverte d'une couche de CNC-RBITC (gauche) et d'une vésicule couverte d'une couche de CNC et d'une couche de XG-FITC (droite), avec les profils d'intensité correspondants.

Les profils d'intensité confirment que le signal fluorescent provient principalement de la membrane des vésicules plutôt que de son milieu interne. La résolution du microscope confocal ne nous permet pas de dire cependant si les CNC se sont adsorbés à la surface externe de la membrane lipidique ou s'ils se sont insérés dans la partie hydrophobe de la bicouche lipidique, mais l'adsorption de la couche suivante de xyloglucanes nous permet de pencher pour la première hypothèse.

Globalement, le signal de fluorescence émis par une couche de xyloglucanes marqués est plus faible que celui émis par une couche de nanocristaux de cellulose marqués, comme le montre le profil d'intensité de la figure 4.12 qui présente un signal très bruité : la visualisation du signal fluorescent des XG-FITC a nécessité l'emploi d'un photodétecteur plus sensible (photodétecteur hybride, HPD) que le photodétecteur classique (photomultiplicateur, PMT), pour obtenir des images dont le rapport signal sur bruit reste plus faible que dans le cas des CNC-RBITC.

Cette observation peut d'une part être expliquée par la dépendance au pH de l'émission du fluorophore utilisé. En effet, la FITC se présente sous une forme dianionique à pH supérieur

à 6.4 et émet ainsi un maximum de fluorescence à pH basique [Sjoeback et al., 1995]. Etant donné que nous travaillons à pH=3.5 pour optimiser le premier dépôt de CNC et ne pas provoquer de choc osmotique supplémentaire, nous ne nous trouvons pas dans les conditions optimales de fluorescence de la FITC : des mesures par spectrophotométrie UV-visible ont confirmé que l'absorbance de ce fluorophore est 5 fois plus faible à pH=3.5 qu'à pH=9, ce qui peut expliquer en partie la faible intensité du signal observé dans nos conditions par rapport à celui de la RBITC dont la fluorescence ne dépend pas du pH. D'autre part, l'étude de l'architecture interne de films CNC/XG par réflectivité des neutrons a montré que si les CNC ont plutôt tendance à s'adsorber en une monocouche relativement dense, les XG s'adsorbent quant à eux en une fine monocouche dont l'épaisseur n'excéderait pas 2-3 nm [Jean et al., 2009].

II.2 Pérennité de la croissance

Notre objectif étant d'élaborer des capsules comportant 10 bicouches, il est nécessaire de s'assurer que les dépôts ne sont pas limités, c'est à dire que l'adsorption ait toujours lieu même lorsque le nombre de couches est élevé.

Pour mettre en évidence le dépôt croissant de CNC au fur et à mesure des dépôts successifs, l'intensité du signal de fluorescence de capsules comportant cinq couches de CNC marqués est comparée à celle de capsules comprenant une seule couche de CNC fluorescents (Figure 4.13). Ces images peuvent être comparées car elles ont été prises dans les mêmes conditions d'illumination et d'observation (intensité du laser et gain).

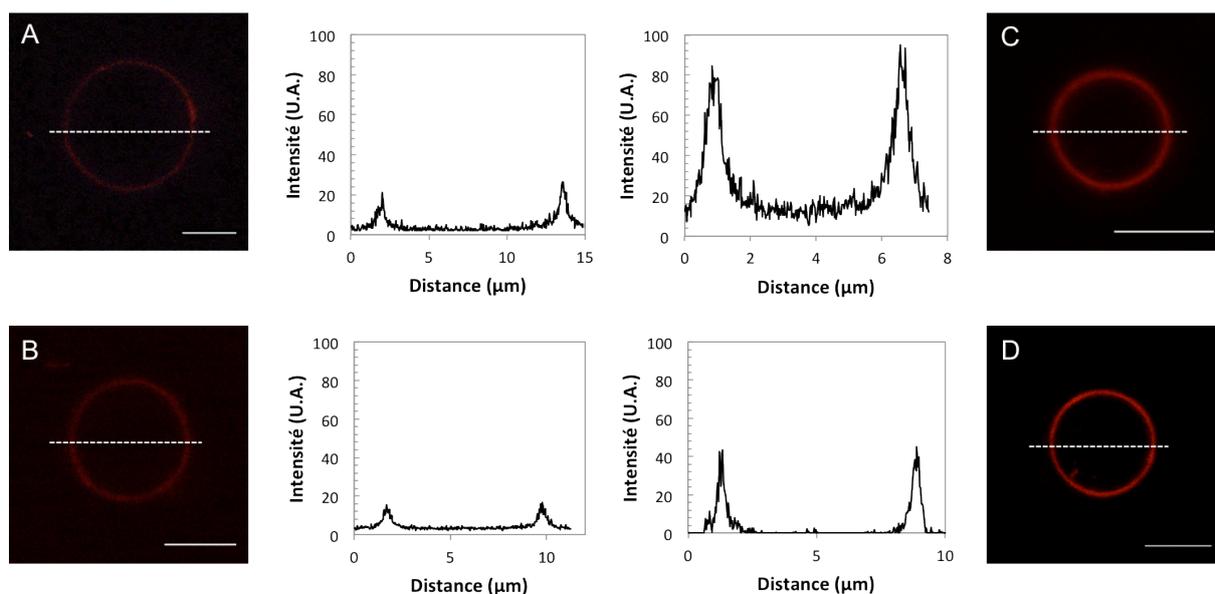


Figure 4.13 : (A) et (B) $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})(\text{CNC-RBITC})$ et profils d'intensité correspondants (C) et (D) $\text{GUV}(\text{CNC-RBITC}/\text{XG})_4(\text{CNC-RBITC})$ et profils d'intensité correspondants. Barres d'échelle : 5 μm

Afin de s'assurer du bon déroulement des dépôts successifs, des capsules dont seule la dernière couche de CNC est fluorescente ont été préparées, pour différents nombres de bicouches. les figures 4.14 à 4.16 présentent respectivement les images de microscopie confocale de capsules à 2,5, 5.5 et 10.5 bicouches.

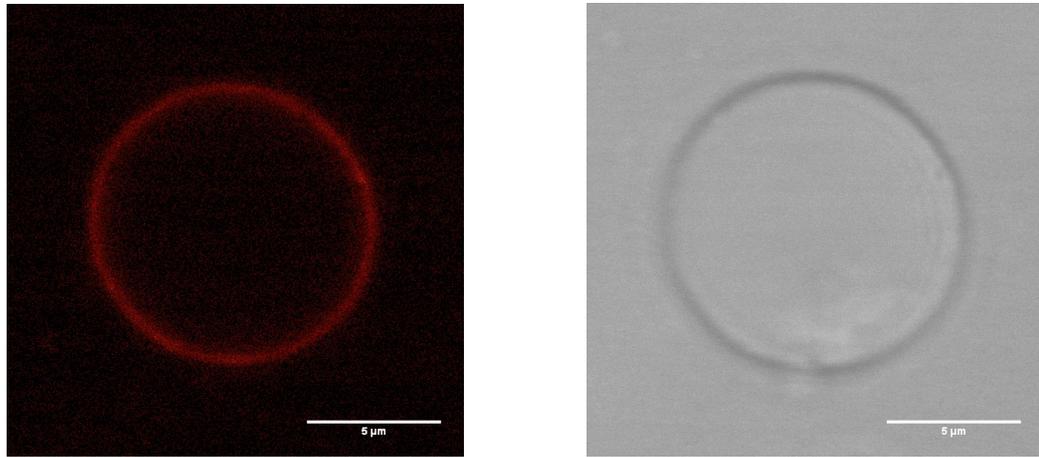


Figure 4.14 : Images de MCBL (gauche) et en lumière transmise (droite) d'une capsule à 2,5 bicouches $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_2(\text{CNC-RBITC})$

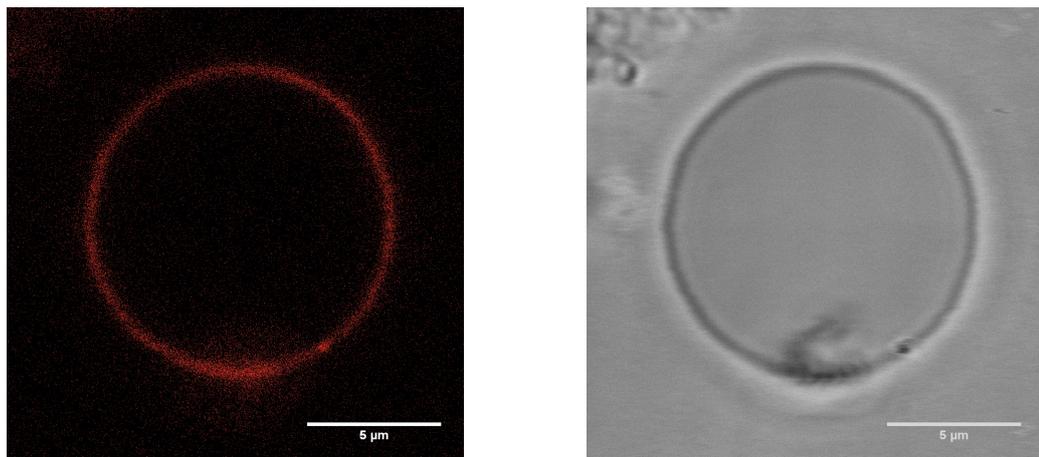


Figure 4.15 : Images de MCBL (gauche) et en lumière transmise (droite) d'une capsule à 5,5 bicouches $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_5(\text{CNC-RBITC})$

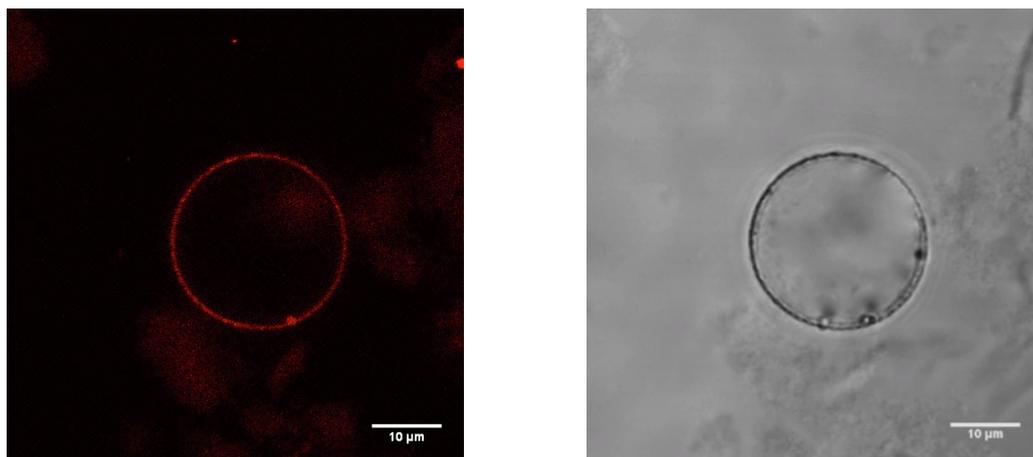


Figure 4.16 :Images de MCBL (gauche) et en lumière transmise (droite) d'une capsule à 10,5 bicouches $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{10}(\text{CNC-RBITC})$

Sur tous ces échantillons, un signal homogène de fluorescence a pu être détecté autour des capsules, confirmant le dépôt des couches successives. Sur la Figure 4.16, la paroi des capsules à 10 bicouches semble visuellement présenter un contraste légèrement plus marqué en lumière transmise que les capsules comprenant moins de bicouches, ce qui va également dans le sens d'une croissance de la paroi. Cette même image montre également la présence de quelques débris en arrière plan, qui résultent d'agrégats ayant pu se former au cours des dépôts.

III Caractérisation morphologique des capsules

III.1 Evolution de la distribution en taille

L'évolution des objets au cours des dépôts est évaluée par la mesure du diamètre des capsules à différents stades du processus couche par couche. Cette mesure a été réalisée à partir d'images de microscopie en fluorescence et de microscopie confocale à l'aide du logiciel ImageJ. La Figure 4.17 présente les histogrammes de taille obtenus pour des séries de capsules à différents nombres de bicouches. Le diamètre moyen et le coefficient de variation calculés pour chacune de ces distributions sont présentés dans le tableau 4.2.

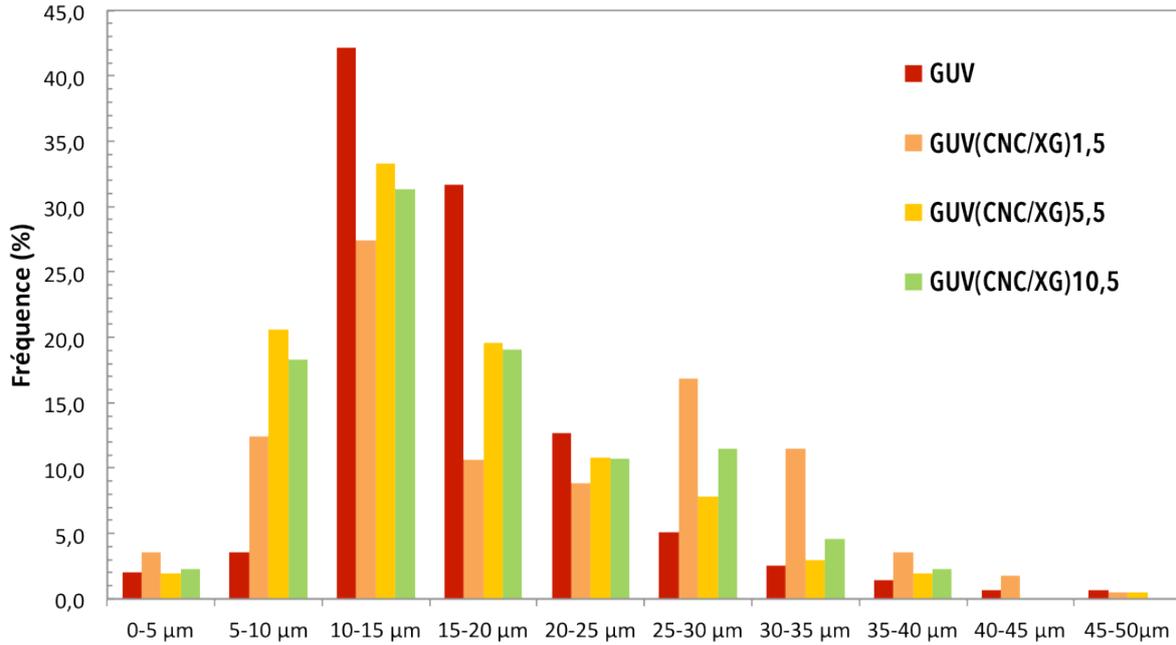


Figure 4.17 : Distribution en taille d’une suspension de GUV et de suspension de capsules à 1,5, 5,5 et 10,5 bicouches.

Tableau 4.2 : Taille caractéristique des capsules en fonction du nombre de bicouches

Echantillon	Diamètre moyen (µm)	Coefficient de variation
GUV	16,9	0,46
GUV(CNC/XG)1,5	20,8	0,55
GUV(CNC/XG)5,5	15,4	0,59
GUV(CNC/XG)10,5	18,3	0,45

Le dépôt de la première bicouche produit une légère augmentation du diamètre moyen (d’environ 20%) que nous expliquons comme le résultat des premières étapes de rinçage. Les plus petites vésicules encapsulent une plus faible quantité de saccharose et sont de ce fait moins sensibles à la différence de densité induite lors de leur dilution dans du glucose. Elles ont ainsi tendance à rester dans le surnageant, et à être éliminées du milieu lors des premiers rinçages. Lors des dépôts suivants, ce phénomène s’accompagne de la disparition des objets de grande taille (diamètre > 40 µm), qui sont thermodynamiquement les moins stables et donc d’autant plus sensibles aux phénomènes de déplétion s’exerçant sur eux au cours des incubations successives avec le xyloglucane. Ces variations de diamètre moyen restent malgré tout modérées, et nous pouvons dire que la distribution en taille est toujours centrée sur la gamme 10-20 µm quel que soit le nombre de couches déposées.

Remarquons tout de même que lors de ces mesures de diamètre, nous avons choisi d’ignorer tous les objets non sphériques, ce qui exclut les divers agrégats présents dans les suspensions. En effet, en dépit des précautions expérimentales prises pour mettre au point le

protocole de fabrication des capsules, nous notons toujours la présence d'agrégats dans les échantillons, qui résultent de la floculation de capsules comme l'illustre la Figure 4.18. Ceci étant, malgré leur caractère peu esthétique, ces agrégats n'empêchent pas le processus couche par couche d'avoir lieu sur le reste des capsules et ne constituent pas un véritable frein à l'élaboration de nos analogues de paroi primaire.

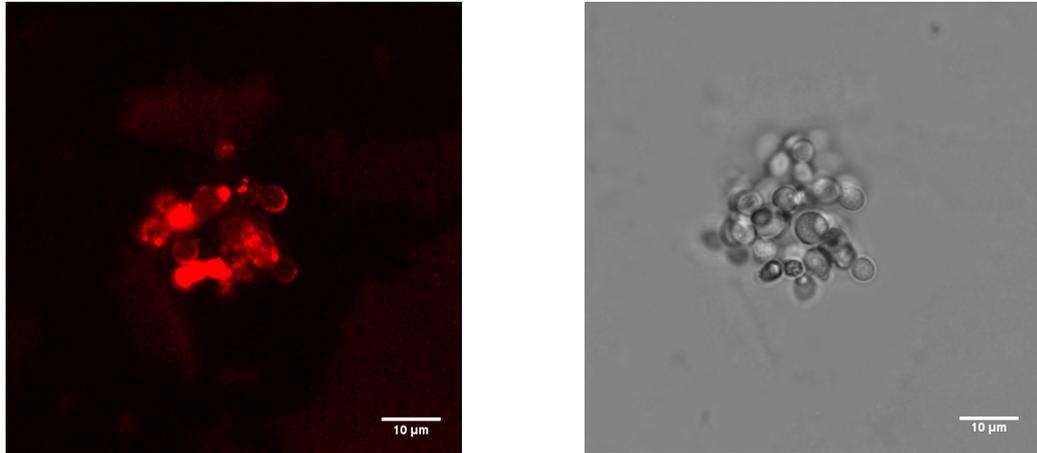


Figure 4.18 : Image de MCBL (gauche) et en lumière transmise (droite) d'agrégats dans une suspension de capsules $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{10,5}$

III.2 Reconstruction 3D par microscopie confocale

La microscopie confocale permet également d'effectuer des reconstructions tridimensionnelles des objets observés. Dans le cas de nos capsules, cela nous donnera la possibilité de visualiser leur morphologie et la répartition des CNC marqués dans l'espace. Les GUV seules étant au départ des structures sphériques mais souples, il sera également intéressant de voir si l'adsorption de couches de bâtonnets rigides comme les nanocristaux de cellulose est susceptible de modifier leur forme.

Pour pouvoir effectuer des reconstructions en 3D des capsules, il est impératif que celles ci soient immobiles pendant l'acquisition des images. C'est pourquoi tous les échantillons sont introduits dans une chambre fermée (voir chapitre 2§III.3.4.1), ce qui permet de supprimer la convection et donc de limiter le mouvement des objets. Le plan d'observation des capsules est défini comme étant le plan (XY). Le balayage par le microscope confocal s'effectue dans la direction Z, et génère ainsi une séquence d'images, chacune d'entre elles constituant une vue en coupe de l'objet (de 1 pixel d'épaisseur) comme illustré sur la Figure 4.19. Ces images sont espacées les unes des autres par un intervalle appelé pas, qui dans notre cas est de l'ordre du dixième de micromètre. A partir de cet empilement d'images, un modèle en 3 dimensions de la capsule peut être construit à l'aide du logiciel ImageJ. Celui ci permet également de générer des vues orthogonales de l'objet en le coupant suivant les plans (XY), (XZ) et (YZ).

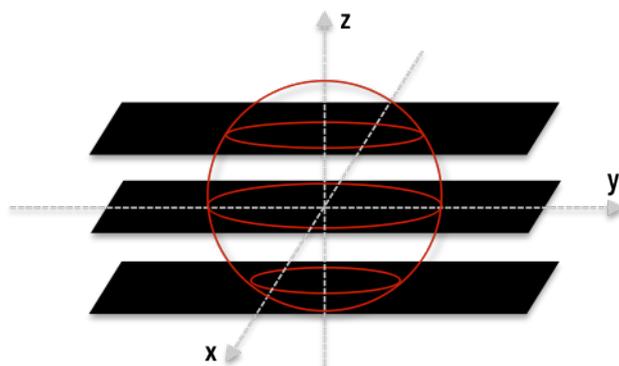


Figure 4.19 : Représentation schématique de la vue en coupe d'une capsule par microscopie confocale et du balayage de celle-ci dans la direction z.

La Figure 4.20 présente la reconstruction 3D d'une vésicule recouverte d'une couche de CNC, accompagnées des vues orthogonales selon les plans (XY), (YZ), (XZ). Pour les GUV-CNC, les reconstructions en 3 dimensions ont abouti à des sphères. La moyenne du diamètre de la capsule présentée en Figure 4.20-A selon les 3 axes X, Y et Z est de $12,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Cette faible variation de diamètre dans les trois directions de l'espace confirme le caractère sphérique des vésicules recouvertes d'une seule couche de CNC. Plus généralement, le même résultat a été obtenu pour les capsules comportant un plus grand nombre de couches comme le montre la Figure 4.21.

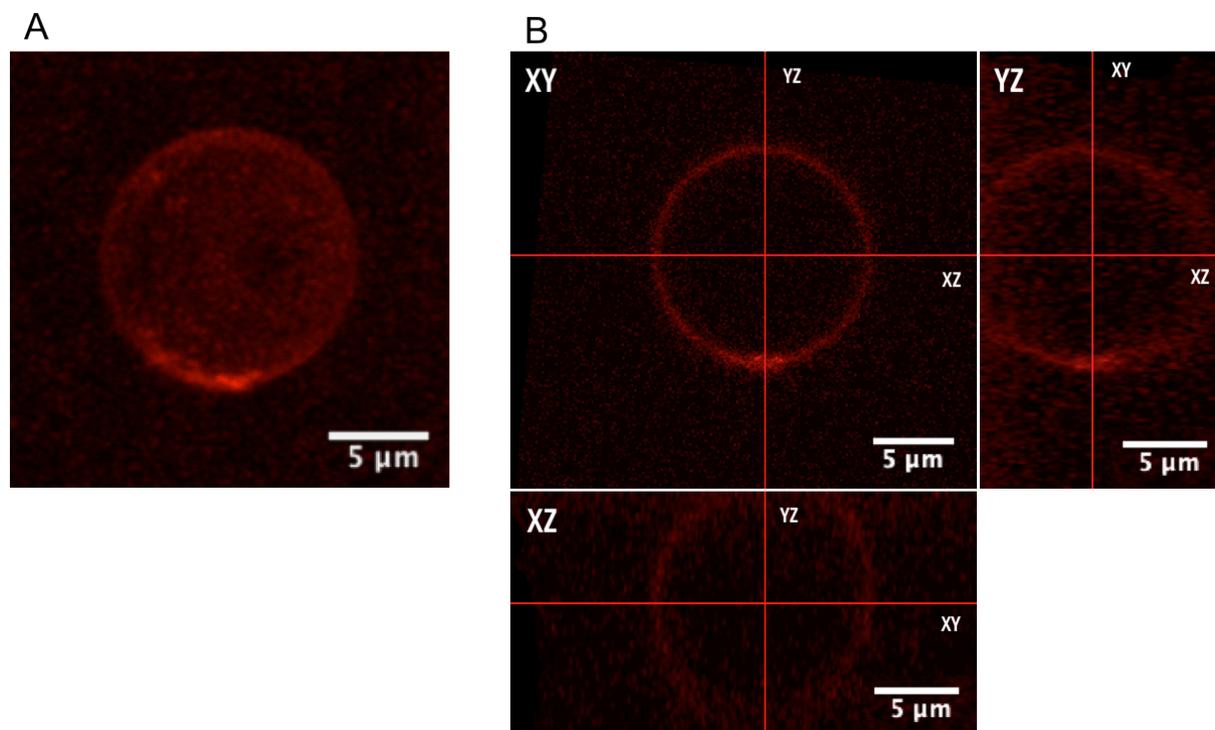


Figure 4.20 : (A) Reconstruction en 3 dimensions d'une GUV(CNC-RBITC) à partir d'une séquence d'images obtenue par microscopie confocale. (B) Vues orthogonales d'une GUV(CNC-RBITC) Les lignes rouges correspondent aux plans de coupe de l'objet.

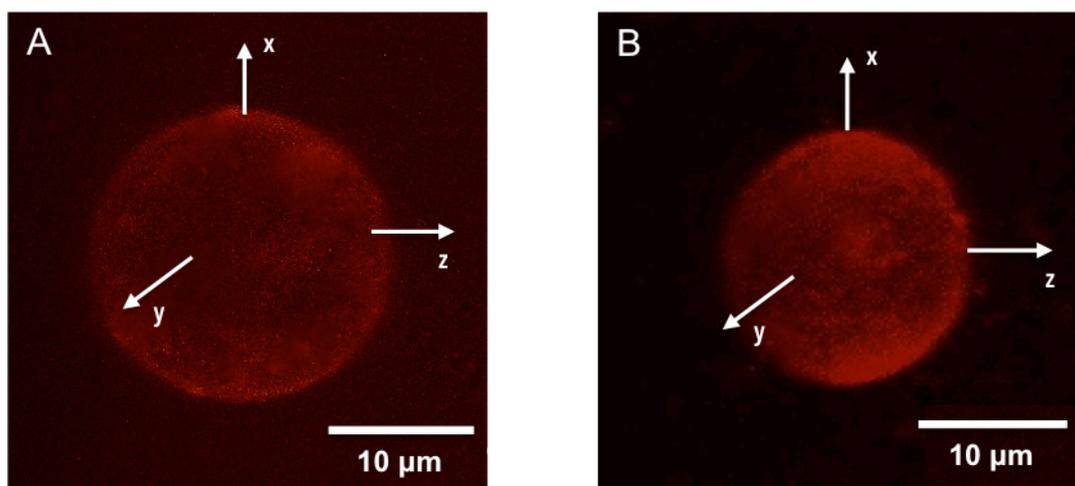


Figure 4.21 : (A) Reconstruction 3D d'une GUV(CNC/XG)_{5,5} (B) Reconstruction 3D d'une GUV(CNC/XG)_{10,5}

Il nous est cependant arrivé d'observer régulièrement des objets à la morphologie légèrement plus aplatie dans les échantillons à 10 bicouches, comme illustré sur la Figure 4.22.

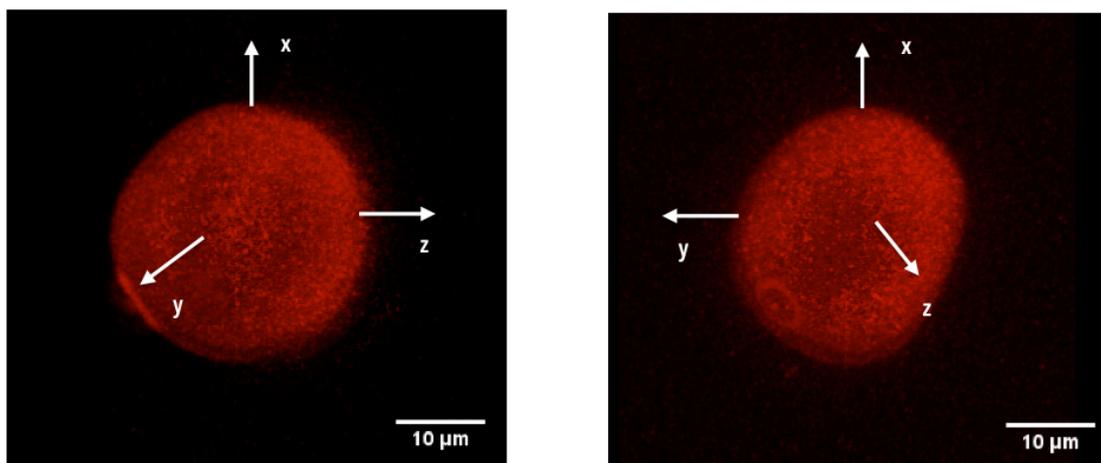


Figure 4.22 : Reconstruction 3D d'une GUV(CNC/XG)_{10,5} à la morphologie ellipsoïdale. Le rapport du petit axe sur le grand axe est de 0,87.

Le seul exemple de morphologie similaire que nous avons recensé dans la littérature provient de travaux s'intéressant à la cristallisation de protéines en surface de GUV [Ratanabanangkoon et al., 2002], dont un exemple de reconstruction 3D est présenté en Figure 4.23. Les auteurs attribuent cette distortion au fait que les cristaux forment une enveloppe rigide et continue à la surface des vésicules, le caractère plus ou moins aplati des GUV résultant également de l'existence ou non d'une orientation préférentielle des cristaux.

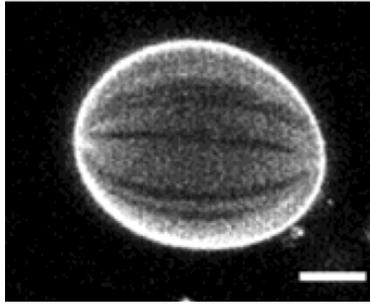


Figure 4.23 : Reconstruction 3D par microscopie confocale de GUV recouvertes de cristaux de streptavidine. D'après [Ratanabangkoon et al., 2002]

En ce qui concerne notre système, il est très probable que les nanocristaux de cellulose se déposent avec une orientation aléatoire à la surface des GUV, comme cela a été observé par AFM sur des films multicouches CNC/XG [Jean et al., 2009]. Ces morphologies plus ellipsoïdales seraient donc plutôt le signe d'une bonne cohésion des couches successives de CNC et de XG qui forment un réseau continu.

III.3 Analyse des défauts structuraux

Les images de microscopie confocale montrent une relative homogénéité des dépôts, qui peut être examinée de façon plus quantitative par des mesures de fluorescence azimuthale. Le principe de ces mesures a été présenté au chapitre 2§III.3.4.2; elles permettent de visualiser la quantité de fluorescence émise le long du contour des capsules, comme nous l'avons déjà montré au chapitre 3§II.4. La Figure 4.24 montre ainsi un exemple de profil azimuthal acquis sur une capsule comportant 5 bicouches. Le patch plus lumineux visible sur l'image de MCBL se retrouve bien sous la forme d'un pic sur le profil d'intensité.

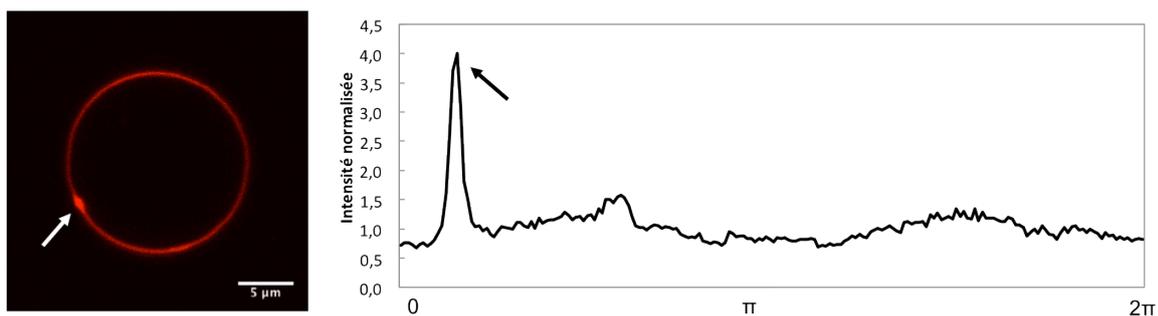


Figure 4.24 : Image de MCBL d'une capsule à 5 bicouches et tracé correspondant du profil d'intensité de fluorescence azimuthale normalisée par sa valeur moyenne

Le rapport de l'écart-type sur la valeur moyenne I_{moyenne} de la quantité de fluorescence émise constitue une mesure quantitative des hétérogénéités du signal fluorescent des CNC-RBITC [Carvalho et al., 2008]. Présentée sur la Figure 4.25, cette quantité a été déterminée

pour des GUV ainsi que pour des capsules de différentes épaisseurs comprenant une dernière couche de CNC marqués. Plus ce rapport est faible, plus la répartition du signal fluorescent sur le contour de la capsule est homogène.

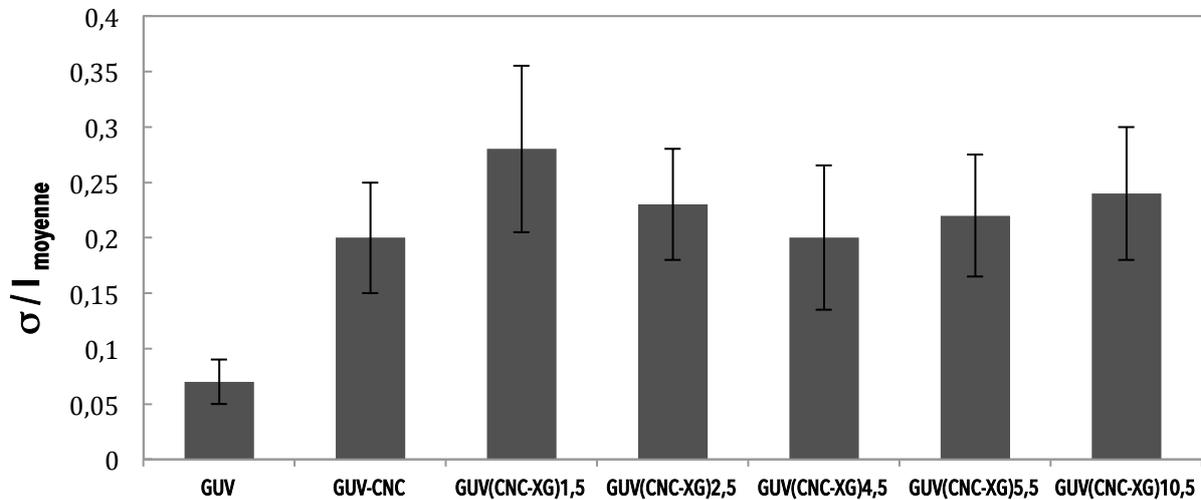


Figure 4.25 Hétérogénéité de la fluorescence pour des GUV et des capsules de différentes épaisseurs

Le signal de fluorescence est plus hétérogène dès le dépôt de la première couche de CNC, comme nous l'avons déjà montré au chapitre 3 §II.4 : il est très vraisemblable que l'hétérogénéité de la toute première couche se répercute lors des dépôts suivants, ce caractère hétérogène restant relativement constant tout au long du processus couche-par-couche. Nous pouvons rapprocher cette observation d'une tendance déjà observée sur les films multicouches CNC/XG, dont la rugosité de surface est globalement constante au fil des dépôts successifs [Jean et al., 2009]

L'autre défaut structural que nous retrouvons de manière récurrente sur certains de nos objets est l'internalisation de matière comme en témoigne la Figure 4.26. Nous avons déjà évoqué ce phénomène au chapitre 3 § II.3, et avons constaté qu'il a lieu lui aussi dès le dépôt de la première couche de CNC.

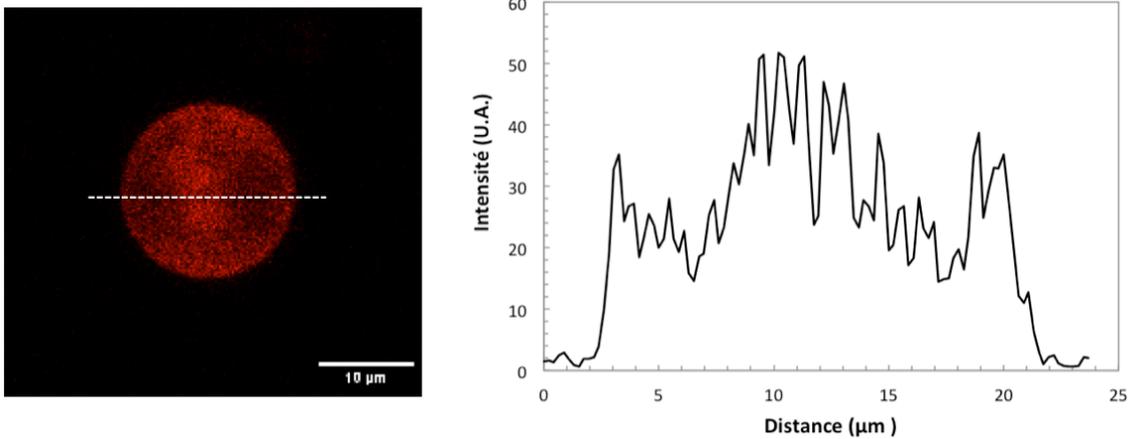


Figure 4.26 : Image MCBL d'une capsule $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{10,5}$ et profil d'intensité correspondant

La fraction que représentent ces capsules remplies est très variable d'un échantillon à un autre (pouvant aller de 10 à 90%) et ne semble pas dépendre non plus du nombre de bicouches déposées.

IV Epaisseur de la paroi des capsules

IV.1 Estimation à l'état sec par AFM

Les mesures d'épaisseur dans le domaine des capsules multicouches sont classiquement effectuées par AFM à partir des objets dégonflés sur une surface plane (wafer de silicium ou mica clivé). Dans notre cas, la présence de saccharose à l'intérieur et à l'extérieur des capsules a posé problème : au lieu de s'évaporer pour ne laisser que les capsules écrasées, la goutte de suspension se solidifie en un gel épais et collant qui rend impossible tout suivi de la surface par une pointe d'AFM. Cependant, il n'aurait pas non plus été possible de travailler avec des capsules sans saccharose, car cette condition est nécessaire pour effectuer les rinçages successifs lors de leur construction couche par couche. C'est pourquoi le protocole présenté au chapitre 2§III.3.6.2 a été mis au point et nous a permis d'obtenir des images de topographie de surface des capsules. La Figure 4.27 en est un exemple, et révèle la présence de plis, caractéristiques d'une paroi solide séchée.

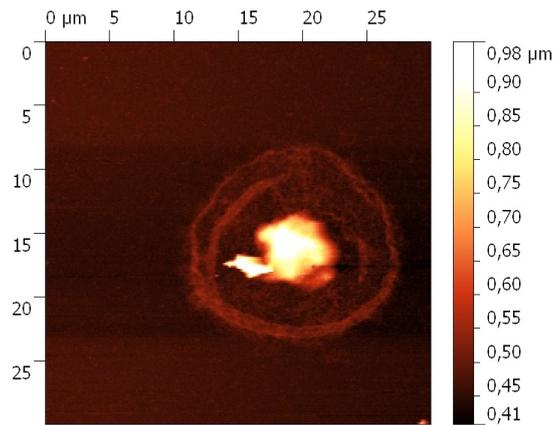


Figure 4.27 : Image ($30 \times 30 \mu\text{m}^2$) de topographie de surface obtenues en AFM (mode tapping) d'une capsule $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{4,5}$

La zone fortement lumineuse et donc plus épaisse au centre de la capsule correspond au saccharose interne cristallisé. Cette configuration permet une mesure plus fiable de l'épaisseur de la capsule. En effet, si le saccharose ne cristallise pas de cette façon, il peut introduire un biais en induisant une surestimation de l'épaisseur, comme illustré sur la Figure 4.28.

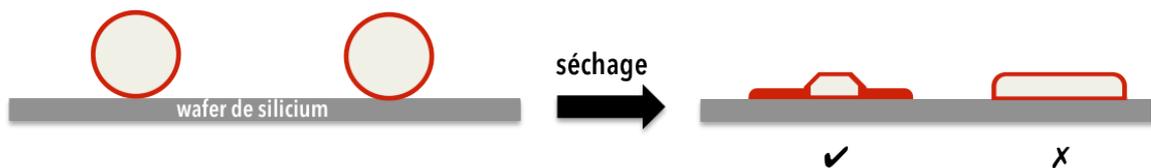


Figure 4.28 Schéma représentatif du séchage des capsules lors de la préparation d'échantillons pour AFM. En rouge : la paroi CNC/XG. En beige : le saccharose encapsulé.

Un autre exemple d'observation de capsule pour laquelle le sucre a cristallisé au centre est présenté en Figure 4.29.

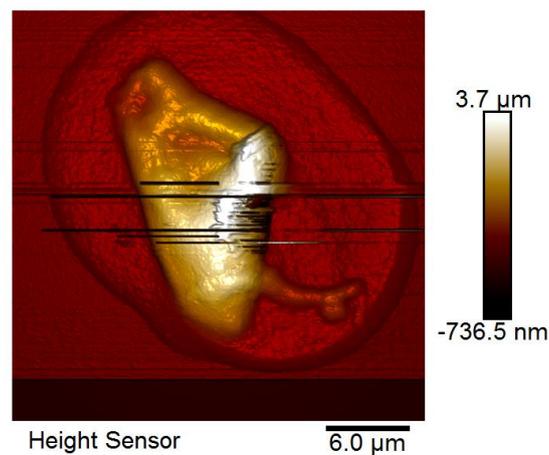


Figure 4.29 Image ($35 \times 35 \mu\text{m}^2$) de topographie de surface obtenues en AFM (mode peak force QNM) d'une capsule $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{10,5}$

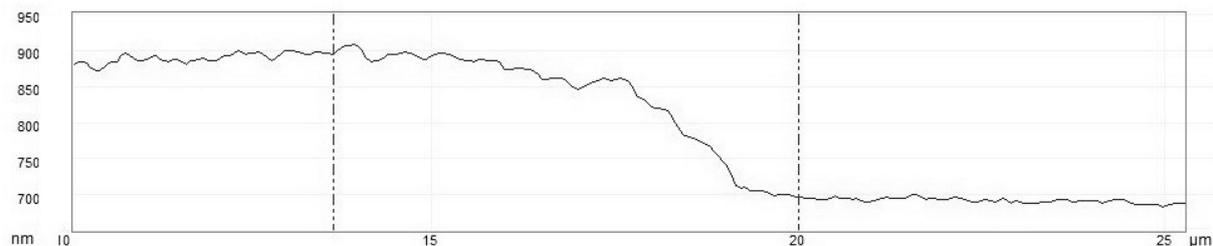


Figure 4.30 : Exemple de profil obtenu pour une capsules à 10 bicouches par analyse d'image de topographie par AFM à l'aide du logiciel Nanoscope Analysis

L'épaisseur théorique à laquelle s'attendre est la suivante : sachant que la bicouche lipidique de DOPC mesure environ 4 nm, qu'une bicouche de CNC/XG est épaisse d'environ 9 nm (soit 90 nm pour dix bicouches), et que la dernière couche de CNC mesure environ 7 nm, alors la paroi d'une capsule $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{10,5}$ à l'état sec devrait faire une centaine de nanomètres. Le suivi du profil sur l'image de topographie par AFM nous permettra d'estimer le double de cette valeur, soit environ 200 nm étant donné que la capsule est aplatie sur le wafer en supposant que celle ci n'est ni pliée ni déchirée.

Nous trouvons pour les capsules à 10 bicouches une valeur de 194 ± 14 nm, ce qui est très proche de la valeur attendue à l'état sec, et compatible avec l'objectif d'une épaisseur minimale de $0,1 \mu\text{m}$ que nous nous étions fixé.

IV.2 Estimation à l'état hydraté par microscopie à fluorescence

La suite de notre démarche va consister à caractériser les propriétés mécaniques des capsules en suspension dans l'eau sans séchage, afin d'être le plus proche possible de la situation de vraies cellules végétales, dont la paroi est très fortement hydratée. Nous avons mesuré une épaisseur d'environ 100 nm pour la paroi séchée des capsules à dix bicouches, mais le processus de séchage d'un matériau est typiquement accompagné d'un retrait de volume important. Aussi, nous avons voulu réaliser une mesure d'épaisseur à l'état hydraté en utilisant des vésicules préparées avec une fraction de lipides fluorescents (NBD-PC) recouverts d'une dizaine de bicouches CNC/XG et d'une dernière couche de CNC-RBITC. L'observation en microscopie à fluorescence de ces échantillons a permis d'observer, et ce de façon systématique, des figures consistant en deux cercles concentriques comme illustré sur la Figure 4.31.

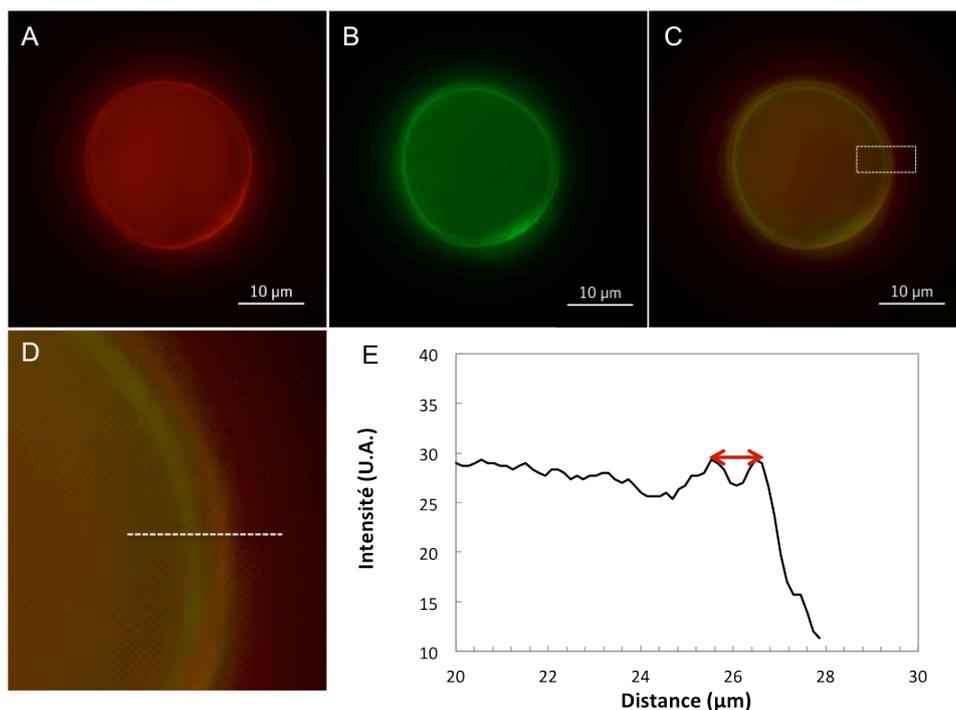


Figure 4.31 Observation par microscopie à fluorescence d'une $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{10}\text{-(CNC-RBITC)}$ préparée avec des lipides fluorescents. (A) Canal RBITC (B) Canal NBD-PC (C) Superposition des canaux. (D) Zoom sur la paroi. (E) Profil d'intensité correspondant.

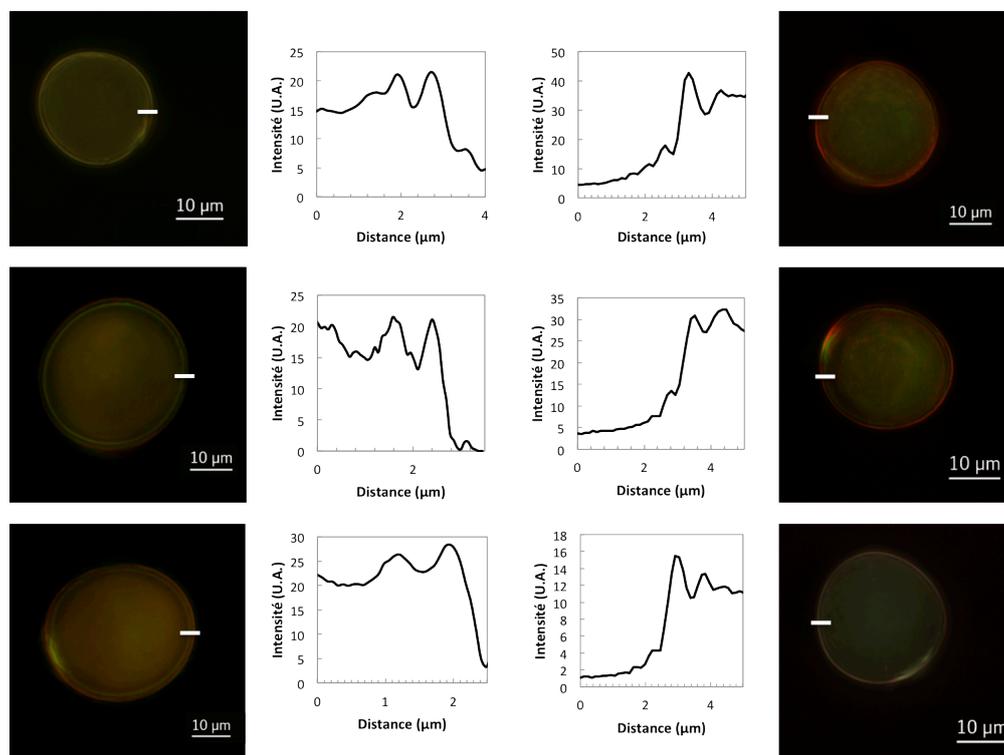


Figure 4.32 Exemples de $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{10}\text{-(CNC-RBITC)}$ préparées avec des lipides fluorescents observées en microscopie à fluorescence et profils d'intensité correspondants

Le tracé du profil d'intensité lumineuse au niveau de la paroi aboutit à deux pics successifs (Figure 4.31-E et 4.32), séparés d'une distance moyenne de l'ordre de 900 nm, ce qui constitue une estimation haute de l'épaisseur d'une dizaine de bicouches hydratées. D'après ces données et en supposant une croissance linéaire des couches (comme c'est le cas à l'état sec [Jean et al., 2009]), une bicouche hydratée n'ayant jamais subi de séchage doit avoir une épaisseur inférieure à 90 nm, ce qui correspondrait à dix fois la valeur à l'état sec et laisse supposer un taux d'hydratation maximal des couches de 90%. D'un point de vue biomimétique, la paroi primaire est également un édifice fortement hydraté dont la teneur en eau est estimée à 70% en volume [Monro et al., 1976] : le retrait d'épaisseur de la paroi végétale au séchage peut atteindre des ordres de grandeur similaires à ce que nous observons, Joardder et al. rapportent par exemple une diminution d'épaisseur pouvant atteindre 80% pour des cellules de pomme [Joardder, 2014].

V Conclusion

La construction de capsules multicouches CNC/XG sur des GUV s'est avérée plus délicate que prévu, principalement en raison de la fragilité de celles-ci en tant que substrat de départ. Si le dépôt de la première couche de CNC a pu se faire sans grande difficulté (pouvant générer parfois des sur-concentrations), l'introduction de xyloglucane s'est révélée être plus compliquée : la forte affinité entre ces deux composants a notamment généré de nombreux agrégats dans les suspensions, les XG venant se lier aux CNC libres résultant de ringages incomplets. De plus, le xyloglucane a généré une pression osmotique sur les vésicules, ce qui nous a contraint à travailler à faible concentration pour limiter les phénomènes de cisaillement et de dépletion, ce à quoi les vésicules géantes sont assez sensibles. Malgré ces difficultés, il a été possible d'obtenir des capsules dont la taille et l'épaisseur sont comparables à celles des cellules végétales, c'est à dire d'une vingtaine de micromètres de diamètre pour une épaisseur de l'ordre de 0,1 à 1 μm . La caractérisation de ces objets biomimétiques par microscopie confocale à balayage laser a confirmé les dépôts successifs de CNC et de XG à la surface des GUV et ce jusqu'à une dizaine de bicouches. L'étude de la morphologie de ces capsules a montré que les dépôts n'avaient que peu d'influence sur leur forme, qui reste globalement sphérique. Les mesures d'épaisseur par AFM sur les capsules séchées sont du même ordre de grandeur que les valeurs obtenues sur les films, à savoir d'une dizaine de nanomètres par bicouche. Les essais de mesure à l'état hydraté suggèrent quant à eux une épaisseur de bicouche dix fois plus importante, ordre de grandeur qui pourrait être confirmé par l'emploi de techniques complémentaires : inclusion en résine pour observation par microscopie électronique en transmission ou encore diffusion des neutrons aux petits angles peuvent être envisagés pour déterminer l'épaisseur de la paroi.

Chapitre 5 : Caractérisation mécanique des capsules

Ce chapitre est consacré à la caractérisation mécanique des capsules multicouches CNC/XG. Pour étudier les propriétés mécaniques de capsules micrométriques, deux grandes catégories de méthodes peuvent être distinguées : celles utilisant la pression osmotique pour appliquer une force sur l'ensemble des objets et celles reposant sur la manipulation de capsules individuelles. Nous avons choisi de tester ces deux approches sur nos analogues de paroi végétale, la première nous permettant plutôt d'étudier les capsules peu épaisses, comportant une couche de CNC ou une bicouche CNC/XG et la seconde étant plus adaptée à la caractérisation d'objets plus rigides (capsules à 5 et 10 bicouches).

Dans un premier temps, le comportement des capsules soumises à une pression osmotique a été observé et comparé à celui de vésicules non décorées. Ces expériences nous permettront notamment d'observer la morphologie de dégonflement des capsules tandis que les essais de gonflement auront pour but de simuler l'effet d'une pression de turgescence et de donner des indications sur le caractère extensible et réversible ou non de la mécanique de notre paroi.

Dans un second temps, les expériences de nanoindentation par microscopie à force atomique seront présentées. Effectuées au laboratoire de Reproduction et de Développement des Plantes (RDP, ENS Lyon) au sein de l'équipe « Biophysique et développement », elles ont tout d'abord été réalisées sur des capsules à 10 bicouches, qui en terme d'épaisseur de coque sont les plus proches de la paroi végétale. Par un traitement approprié des courbes de force obtenues, le module d'Young de ces capsules biomimétiques a pu être estimé. L'influence de l'épaisseur de la paroi sera ensuite discuté, en comparant les résultats obtenus avec ceux de capsules à 5 bicouches. Le modèle que nous utilisons pour exploiter les courbes de force n'étant valide que pour des parois suffisamment épaisses, aucune manipulation analogue n'a été effectuée sur des capsules comportant moins de 5 bicouches, ni sur des vésicules non décorées.

I Etude de la déformation des capsules par dégonflement et gonflement

Contrairement aux capsules multicouches classiques nécessitant la dissolution du coeur solide, l'emploi des vésicules géantes unilamellaires comme substrat donne la possibilité de contrôler la concentration en soluté encapsulé au moment de leur formation. De plus, à la différence des gouttes d'huile qui constituent un support liquide mais incompressible, la membrane lipidique est flexible, ce qui nous permettra d'observer des morphologies de dégonflement imposées par la paroi CNC/XG.

Dans l'ensemble de ce chapitre, les capsules multicouches ont été préparées selon le mode opératoire décrit au chapitre 2 : les GUV de départ sont formées à partir d'un mélange DOPC/cholestérol (70/30 %mol) et encapsulent toutes une solution à 300 mM en saccharose et 1 mM en NaCl. Les capsules sont préparées par la méthode couche par couche, en utilisant une suspension de CNC à 2% (p/p) marquée ou non à la rhodamine B isothiocyanate (RBITC) et une solution de XG à 0,01% (p/p). Les solutions utilisées pour appliquer une pression osmotique seront des solutions de glucose de concentration supérieure ou inférieure à 300 mM, dont la concentration en NaCl est fixée à 1 mM et dont le pH a été ajusté à 3,5. Le choc osmotique est imposé par la différence entre concentration interne et externe en soluté, notée Δc et peut être aussi quantifié par le volume réduit V_R qui peut être assimilé au rapport entre concentration interne et externe en soluté.

I.1 Dégonflement

I.1.1 Capsules à faible nombre de bicouches

I.1.1.1 Dégonflement de vésicules non décorées

Afin d'étudier l'influence des couches de CNC et de XG sur la morphologie des vésicules dégonflées, celles-ci ont été soumises à des chocs osmotiques de glucose, comme décrit au chapitre 2 § II.2. Nous avons d'abord voulu étudier le dégonflement de vésicules géantes non couvertes qui puissent nous servir de point de référence en termes de morphologie.

La figure 5.1 présente ainsi des clichés de microscopie DIC de vésicules encapsulant 300 mM de saccharose et 1 mM de NaCl, la concentration externe en glucose ayant été augmentée à 750 mM par injection d'une goutte de glucose concentré, ce qui correspond à un volume réduit V_R de 0,4. La réponse des GUV non décorées au changement d'osmolarité est rapide, et a généralement lieu dans la minute suivant l'injection. Deux types de comportement ont pu être systématiquement distingués. D'une part, une large majorité de vésicules (environ 80%)

adoptent une variété de morphologies complexes déjà largement décrites dans littérature et prédites par le modèle ADE (Area Difference Elasticity, voir chapitre 1 §II.1.3.2) : ellipsoïdes, poires, haltères, étoiles de mer, comme illustré sur la figure 5.1. D'autre part, le reste des vésicules conserve une forme sphérique et se dégonfle soit par formation d'invaginations multiples formant des vésicules filles internes (morphologie en « framboise » décrite en détail par [Bernard et al., 2002]), soit par éjection de tubes de lipides, qui finissent par se stabiliser en formant une figure en « collier de perles » représentée en Figure 5.2 (phénomène déjà observé sur des vésicules non décorées par [Viallat et al., 2004]).

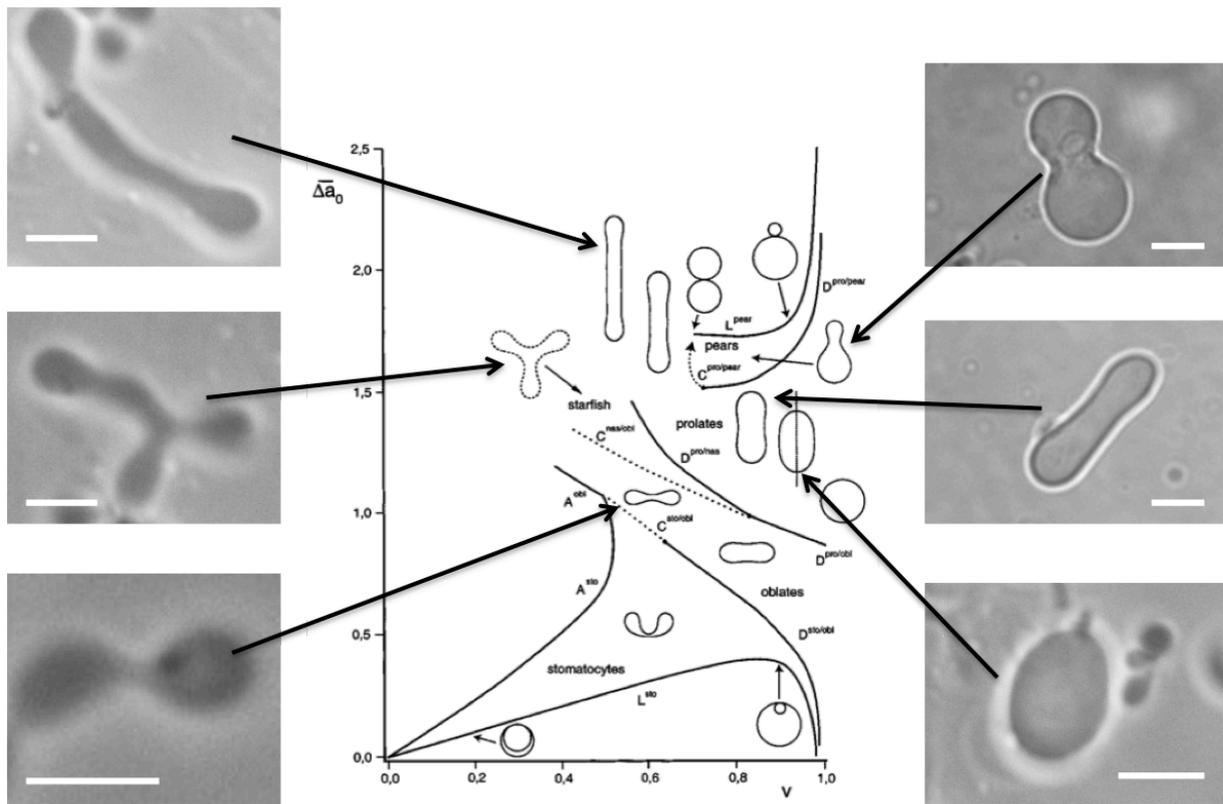


Figure 5.1 : Images de GUV déformées par un choc osmotique $V_R = 0,4$ observées en microscopie DIC. Barres d'échelle : 10 μm .

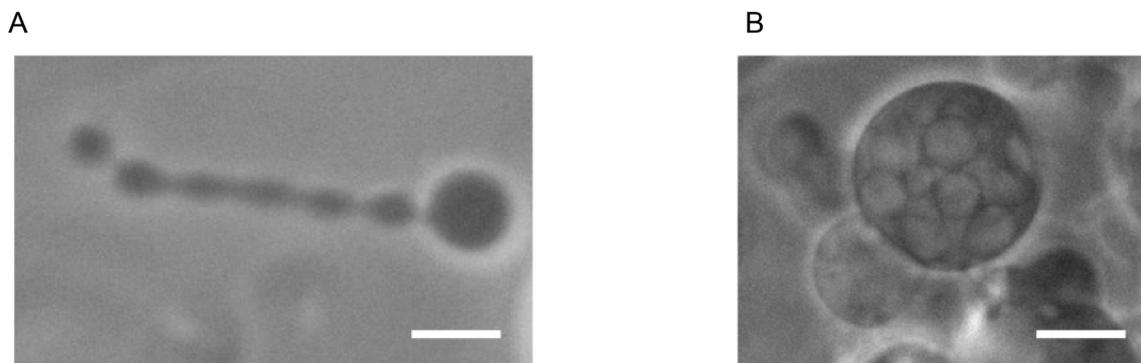


Figure 5.2 : (A) GUV déformée en « collier de perles » (B) GUV déformée en « framboise ». Barres d'échelle : 10 μm

Nous notons qu'au sein d'un même échantillon, des morphologies correspondant théoriquement à différents volumes réduits sont observées simultanément, alors que les vésicules sont toutes censées être soumises au même gradient de concentration en glucose. Cette variabilité peut être attribuée à de possibles scissions de membranes, et au fait que la différence d'aire entre les deux feuillettes de lipides d'une bicouche (différence d'aire sur laquelle s'appuie le modèle ADE) n'est pas uniforme au sein d'une population de vésicules [Viallat et al., 2004].

I.1.1.2 Dégonflement de vésicules décorées d'une couche de CNC

Les expériences de choc osmotique ont été poursuivies sur des vésicules décorées d'une couche de CNC marqués. La Figure 5.3 présente donc des images de $GUV(CNC-RBITC)$ soumises à une pression osmotique correspondant à un volume réduit $V_R = 0,4$.

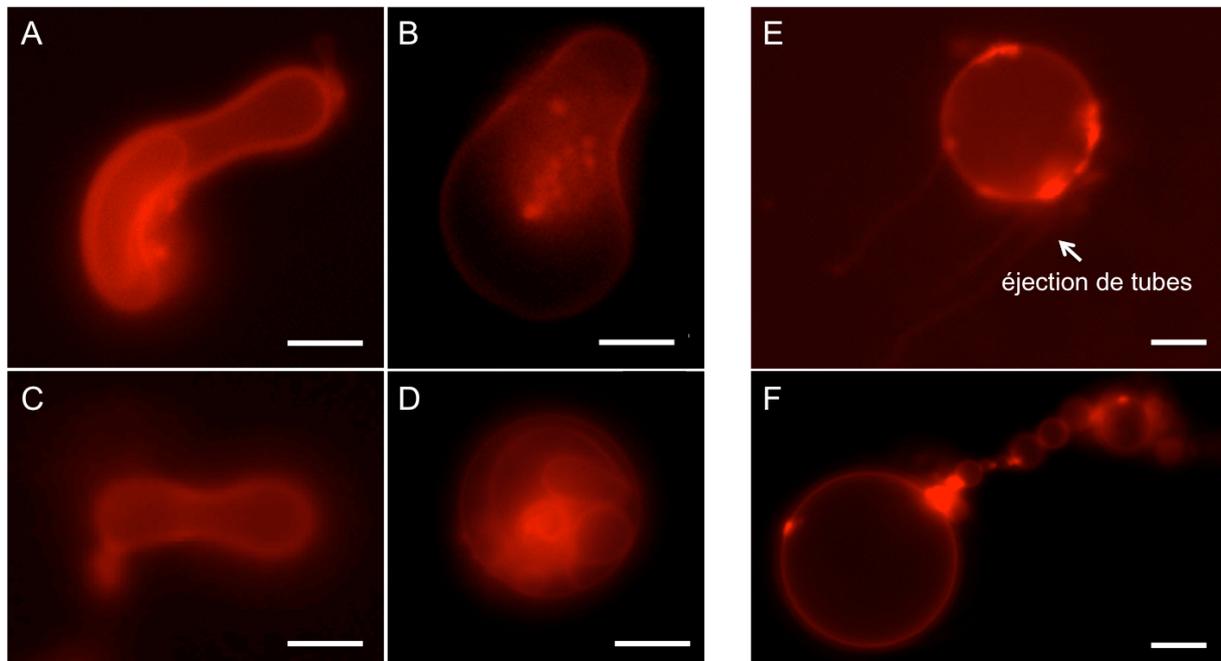


Figure 5.3 : $GUV(CNC-RBITC)$ dégonflées à $V_R = 0,4$. Barres d'échelle : 5 μm

Sur certaines images de la Figure 5.3, nous retrouvons encore une fois la présence des “patches” plus lumineuses résultant de l'hétérogénéité de l'adsorption des CNC, déjà discutée au chapitre 3 § II.3. Pour l'ensemble des $GUV-CNC$ observées dans ces conditions hypertoniques, le dégonflement a lieu dans les deux à trois minutes suivant l'ajout de glucose concentré à travers le filtre. De même que pour les vésicules non décorées, plusieurs comportements de dégonflement sont à distinguer dans le cas des $GUV-CNC$: une variété de morphologies complexes est observée ainsi que des objets conservant leur forme de sphère. Une proportion plus importante (plus de la moitié) d'objets semble cependant se dégonfler par éjection de tubes (Figure 5.3-E) donnant lieu aux figures en « collier de perles » (figure 5.3-F).

[Quemeneur, 2010] font la même observation sur les *GUV* décorées de chitosane, et expliquent ce phénomène par le fait que la décoration par le polyélectrolyte se fasse uniquement à l'extérieur de la membrane : la courbure locale induite par cette décoration asymétrique favoriserait la formation de protubérances et donc l'éjection de structures tubulaires.

Malgré tout il semble que le dépôt d'une seule couche de CNC n'ait pas d'influence notable sur la morphologie de dégonflement. En revanche, si les déformations ont bien lieu, elles apparaissent au bout de quelques minutes plutôt qu'après quelques secondes comme c'est le cas pour les *GUV* non décorées. Il est possible de quantifier plus précisément cette observation : dans le cas des vésicules se dégonflant en conservant leur forme sphérique, la mesure de l'évolution du diamètre en fonction du temps peut permettre d'évaluer la perméabilité à l'eau de la membrane recouverte de CNC, comme cela a déjà été fait pour des vésicules lipidiques de diverses compositions [Bernard et al., 2002, Boroske et al., 1981, Mathai et al., 2008] mais aussi pour des vésicules décorées de chitosane [Quemeneur, 2010], ou encore pour des vésicules formées par auto-assemblage de copolymères à blocs [Carlsen et al., 2011].

La figure 5.4 présente ainsi une série d'images acquises sur une *GUV-CNC* en conditions hypertoniques. Comme le montre cet exemple, nous n'avons pas toujours pu visualiser d'éjection de tube lors du dégonflement : leur diamètre n'excédant pas $0,5 \mu\text{m}$ lorsqu'ils sont visibles, il se peut que les tubes soient de dimensions inférieures à la résolution du microscope.

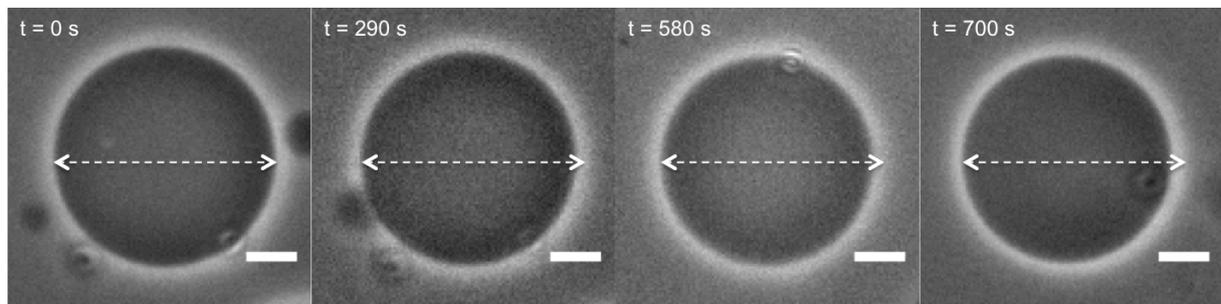


Figure 5.4 : La flèche en pointillés représente le diamètre initial de la *GUV-CNC* avant choc osmotique et a été reportée telle quelle sur les clichés suivants pour visualiser le dégonflement. Barres d'échelle : $5 \mu\text{m}$.

La taille des *GUV-CNC* a été suivie pendant une heure mais se stabilise généralement au bout d'une dizaine de minutes à un diamètre compris entre 95 et 98 % du diamètre initial. La cinétique de dégonflement de plusieurs *GUV-CNC* soumises à un choc osmotique de glucose $\Delta c = 100 \text{mM}$ est présentée en figure 5.5, et met en évidence une diminution linéaire du rayon des vésicules avec le temps.

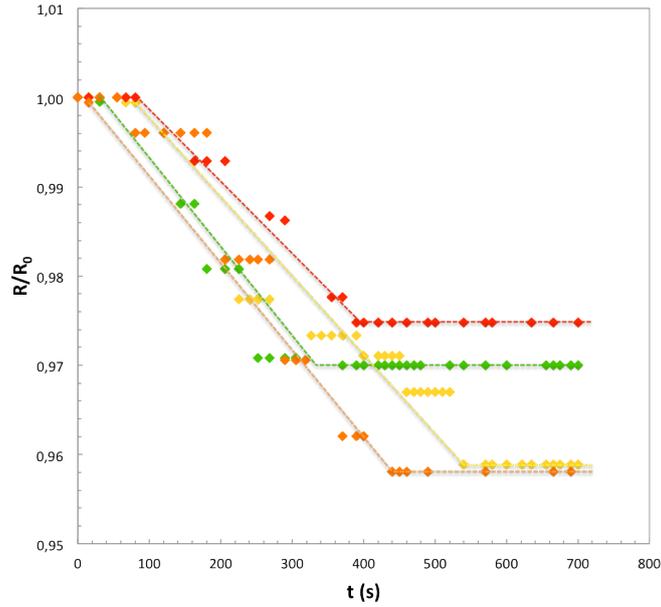


Figure 5.5 : Evolution du rayon de GUV-CNC avec le temps pour un choc osmotique $\Delta c=100\text{mM}$.

Nous reprenons le calcul de [Boroske et al., 1981] pour déterminer la perméabilité des GUV-CNC. Le flux d'eau à travers la membrane est décrit par la relation suivante :

$$J = -P\Delta c \quad (5.1)$$

avec J la densité de flux molaire d'eau, Δc la différence de concentration molaire en solutés entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule et P la perméabilité de la membrane, dont la dimension est celle d'une vitesse.

On considère que l'échange d'eau a lieu essentiellement à travers la surface de la vésicule d'aire $4\pi R^2$. Sur l'ensemble de cette surface, ce flux s'exprime comme :

$$J = -\frac{1}{4\pi R^2} \frac{d(V(t)/v_w)}{dt} \quad (5.2)$$

où $V(t)$ est le volume d'eau encapsulé par la vésicule (le rayon des tubes ejectés est largement inférieur au rayon des vésicules, leur volume est donc négligeable) et v_w le volume molaire de l'eau ($18 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$). La relation suivante est obtenue :

$$\frac{R}{R_0} = 1 - \frac{v_w P \Delta c}{R_0} t \quad (5.3)$$

Nous avons ainsi calculé pour les GUV-CNC une perméabilité moyenne de $0,9 \pm 0,1 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, estimée sur une dizaine d'objets pour $\Delta c=100\text{mM}$. Cette valeur est significativement plus faible que celles rapportées pour les membranes lipidiques seules dont les ordres de

grandeur habituels sont compris entre 60 et 160 m.s^{-1} pour des vésicules de DOPC (les valeurs les plus faibles correspondent à des vésicules formulées avec une fraction de cholestérol, comme c'est le cas pour notre système) [Mathai et al., 2008], et plus faible que la perméabilité de 68 m.s^{-1} mesurée sur des GUV décorées de chitosane [Quemeneur, 2010]. La perméabilité que nous trouvons est plus proche de celles qui ont été mesurées sur des polymersomes (vésicules formées de copolymères amphiphiles à bloc) [Carlsen et al., 2011].

La perméabilité indiquant la vitesse à laquelle un type de molécules peut traverser une membrane, celle-ci dépend donc logiquement de l'épaisseur du matériau à traverser : l'épaisseur de la membrane décorée de chitosane a été estimée à environ 5 nm [Rinaudo et al., 2013] (la membrane de DOPC seule mesurant 4,5 nm [Nagle et al., 2000]). L'épaisseur de la couche de CNC est a priori de l'ordre de 7 à 16 nm [Jean et al., 2008], d'où une épaisseur totale comprise entre 11,5 et 20,5 nm pour la membrane décorée de CNC. A cette différence d'épaisseur s'ajoute la nature rigide des nanocristaux, qui doit également contribuer à rendre la membrane moins perméable.

1.1.1.3 Dégonflement de vésicules décorées d'une bicouche CNC/XG

Si nous n'avons pas pu observer de différence marquante entre la morphologie des GUV et des GUV-CNC en dégonflement, le dépôt d'une couche de XG a donné lieu à un changement notable de comportement. La figure 5.6 présente ainsi une série d'images d'une GUV(CNC/XG) suite à un choc osmotique correspondant à un volume réduit $V_R = 0,4$. Les images ont été prises en mode DIC, qui permet une visualisation plus précise du contour de la paroi sans le halo lumineux typique des observations en fluorescence.

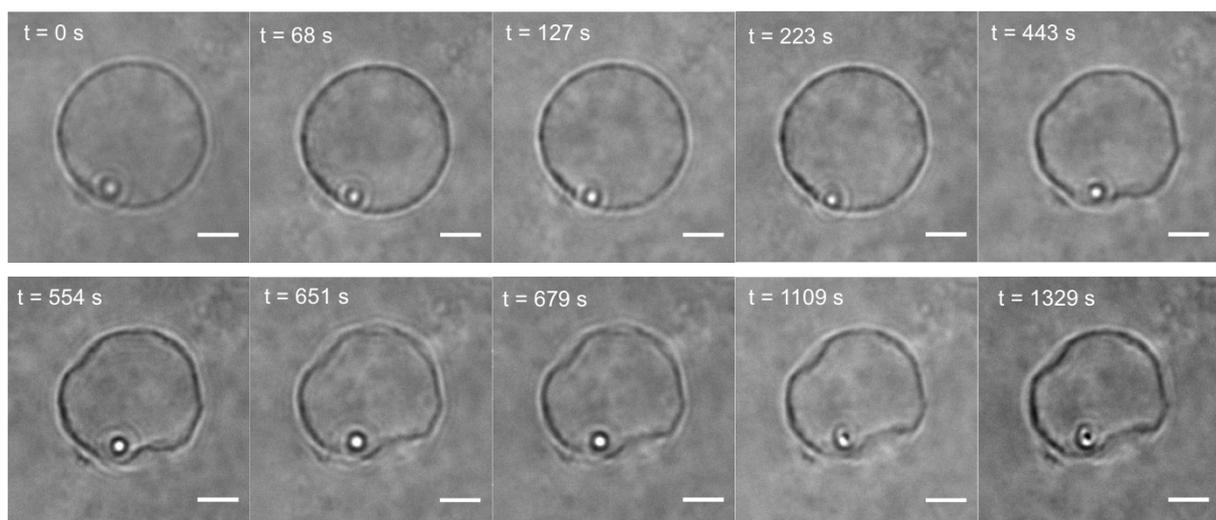


Figure 5.6 : Séquence temporelle du dégonflement osmotique d'une GUV(CNC/XG) à $V_R = 0,4$. Barres d'échelle : 5 μm .

Le processus de dégonflement a lieu deux à trois minutes après l'ajout de glucose, l'état final étant atteint au bout d'une vingtaine de minutes. Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 5.6, les GUV(CNC/XG) se dégonflent par formation de dépressions, en adoptant une morphologie concave à facettes au contour irrégulier, qui diffère très nettement de l'aspect fluide des déformations observées pour les GUV et les GUV-CNC. En plus de ces morphologies irrégulières, quelques GUV(CNC-XG) adoptant des formes de bol ont pu être observées comme le montre la Figure 5.7.

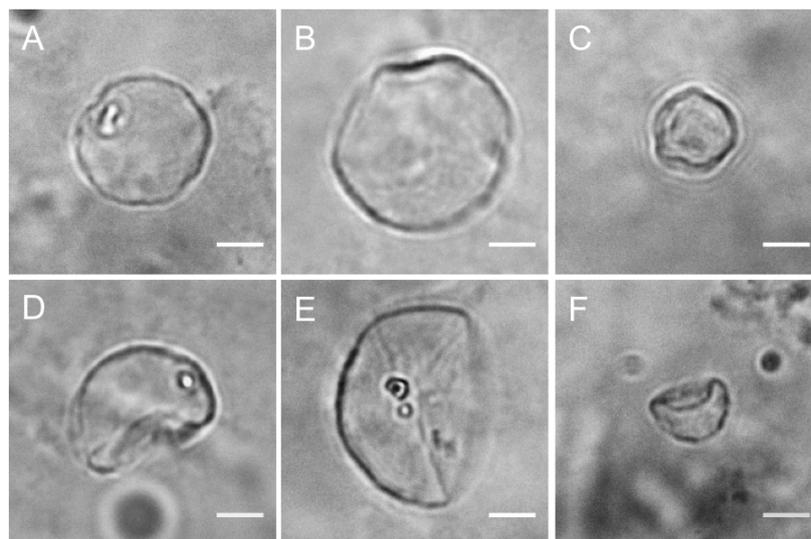


Figure 5.7 : GUV(CNC/XG) sous choc osmotique $V_R = 0,4$. Barres d'échelle : 5 μm

Nous retrouvons ici un comportement plus proche de ce qui a été observé sur des GUV en phase gel, plus rigides que les GUV et formant aussi des objets à facettes sous choc osmotique comme le montre la Figure 5.8-A [Quemeneur et al., 2012].

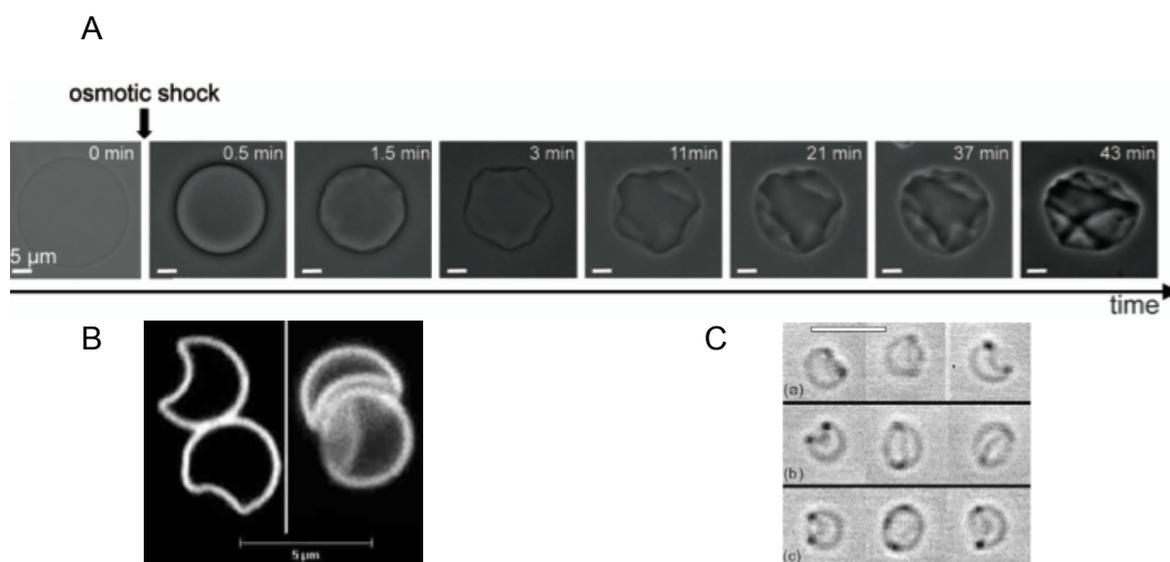


Figure 5.8 : (A) Séquences d'images d'une GUV en phase gel subissant un choc osmotique. D'après [Quemeneur, 2010] (B) Capsules PSS/PAH déformées par pression osmotique. D'après [Gao et al., 2001a] (C) Coques de silice déformées en solution par ajout d'éthanol. D'après [Quilliet et al., 2008]

Les formes de bol sont elles identiques à ce qui est observé expérimentalement lors du dégonflement en solution de capsules à coques minces (Figure 5.8-B,C). Nous n'avons pas cherché à établir de corrélation entre le type de déformation et la taille des objets, les formes de bol ayant aussi bien été observées pour des capsules de rayons allant du simple au double.

A défaut d'être quantitatives quant à l'élasticité de nos capsules, ces expériences de dégonflement par pression osmotique confirment le bon déroulement des premières étapes de dépôt : une seule bicouche de CNC/XG suffit à induire un changement de comportement des vésicules, dont la paroi se comporte dès lors comme une coque solide et élastique plutôt que comme une membrane fluide.

I.1.2 Dégonflement de capsules à 5 et 10 bicouches

Il n'a pas été possible d'observer de déformation sur les capsules à 5 et 10 bicouches dans les mêmes conditions de dégonflement que pour les capsules à faible nombre de bicouches. Aussi, nous avons utilisé une solution de glucose plus concentrée permettant de descendre à un volume réduit plus important, de $V_R = 0,18$ (soit $\Delta c = 1,3$ M), et attendu deux jours avant de finalement constater la présence de quelques capsules déformées comme l'illustrent les figures 5.9 et 5.10.

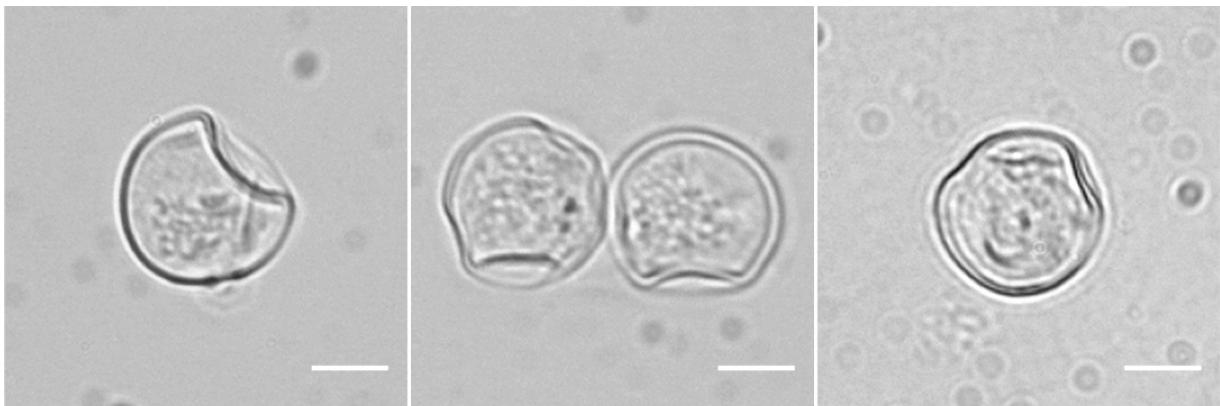


Figure 5.9 : Capsules à 5 bicouches dégonflées à $V_R = 0,18$. Barres d'échelles : 10 μm

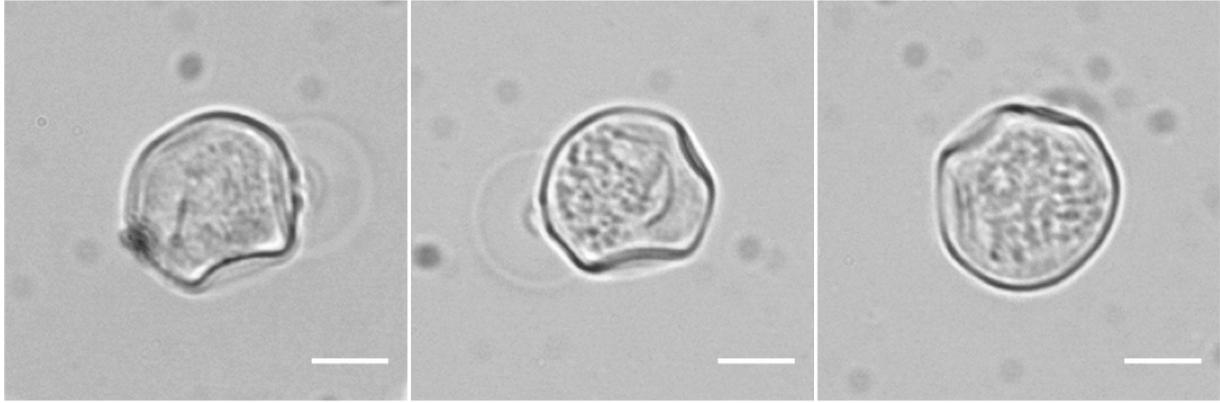


Figure 5.10 : Capsules à 10 bicouches dégonflées à $V_R = 0,18$. Barres d'échelles : à $10 \mu\text{m}$

Le nombre de capsules dégonflées par formation de dépressions ayant pu être observées par échantillon étant très faible (inférieur à une dizaine), il ne paraît pas envisageable de faire une étude statistique reliant le nombre de dépressions au rayon des capsules, ce qui peut être fait lors des expériences de flambage pour extraire des grandeurs caractéristiques de l'élasticité du système.

I.2 Gonflement

I.2.1 Capsules à faible nombre de bicouches

En mettant les GUV en conditions hypotoniques, celles-ci sont amenées à gonfler sous l'effet du gradient de concentration : cette fois-ci, l'eau va pénétrer à l'intérieur de la membrane et forcer celle-ci à s'étendre, comme lors du processus de croissance des cellules végétales sous l'effet de la pression de turgescence. N'ayant pas trouvé de données sur le gonflement de vésicules de DOPC incorporant du cholestérol dans la littérature, nous avons tout d'abord vérifié la faisabilité de ce gonflement sur nos GUV non décorées. La Figure 5.11 présente ainsi la séquence d'images d'une GUV gonflant sous l'effet d'un gradient de concentration $\Delta c = 200 \text{ mM}$ ainsi que le suivi de son rayon dans le temps.

Pour l'ensemble des GUV observées, nous avons effectivement pu obtenir un gonflement suivi ou non d'une explosion, l'augmentation de taille des vésicules pour $\Delta c = 200 \text{ mM}$ étant comprise entre 5 et 30% du diamètre initial, se stabilisant au bout d'une dizaine de minutes.

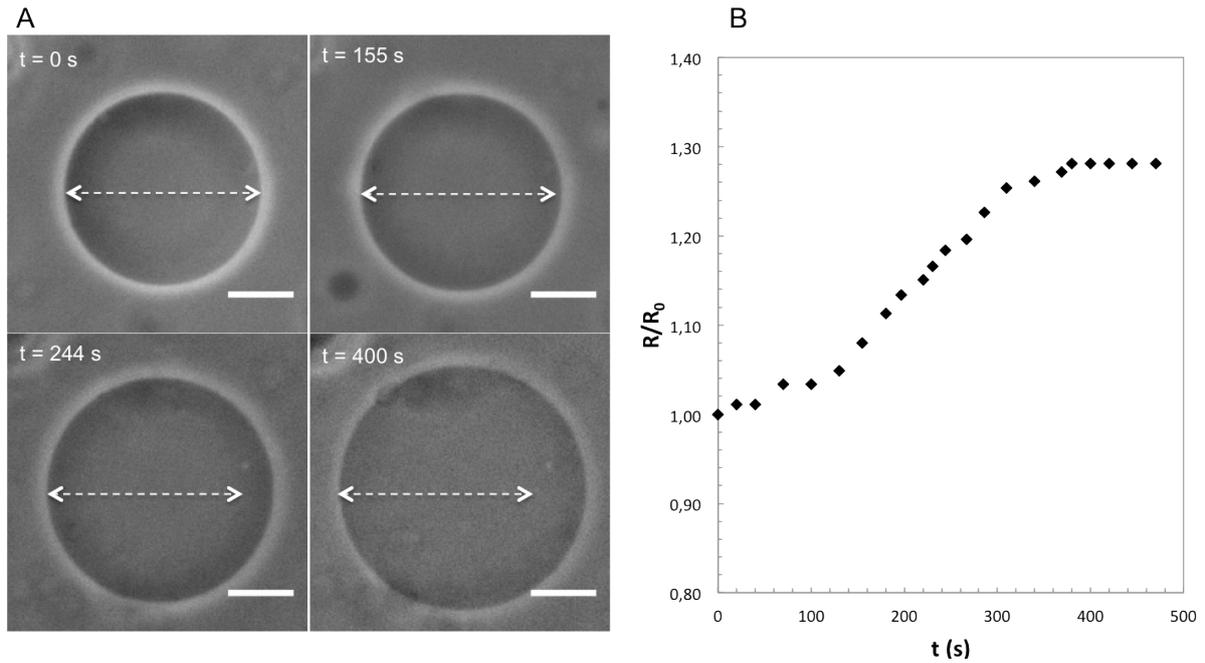


Figure 5.11 : (A) GUV soumise à un choc osmotique $\Delta c = 200$ mM. Barres d'échelle : $10 \mu\text{m}$ (B) Evolution du diamètre en fonction du temps

Des expériences dans des conditions de gonflement identiques ont ensuite été menées sur des GUV-CNC et des GUV(CNC/XG). Une très nette différence de comportement peut être constatée cette fois-ci dès le dépôt de la première couche de CNC : sous l'effet du choc osmotique, les GUV CNC ont systématiquement fini par exploser au bout d'une dizaine de minutes, sans subir le moindre gonflement (Figure 5.12). Le caractère rigide des nanocristaux de cellulose semble limiter la capacité d'extension de la membrane : la tension imposée par la pression osmotique sur la membrane augmente jusqu'à la rupture de celle-ci, ce que l'on peut qualifier d'un point de vue mécanique comme un comportement fragile.

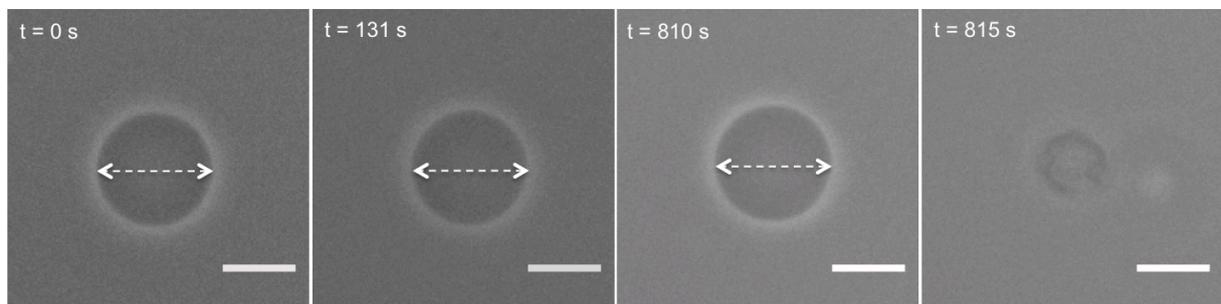


Figure 5.12 : GUV-CNC soumise à un choc osmotique $\Delta c = 200$ mM. Barres d'échelle : $10 \mu\text{m}$

Lorsque la même manipulation est effectuée sur les GUV(CNC/XG), nous observons à nouveau du gonflement, sans rupture de la paroi. Sur l'ensemble des objets suivis, l'augmentation de diamètre est comprise entre 10 et 15% et se stabilise au bout d'une heure.

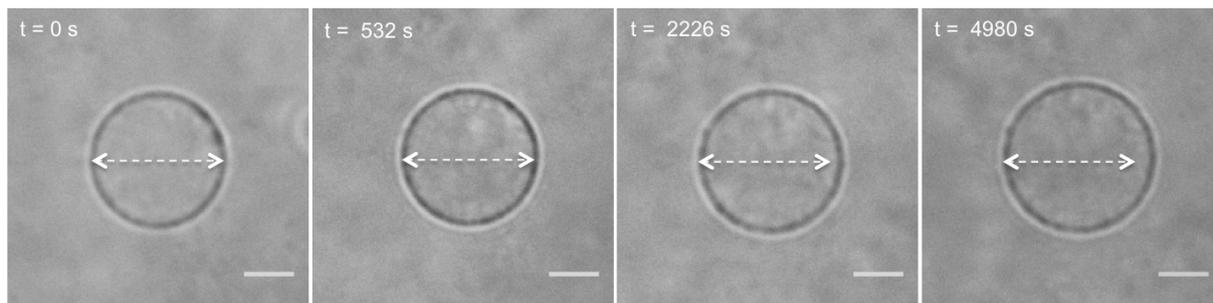


Figure 5.13 : GUV(CNC/XG) soumise à un choc osmotique $\Delta c = 200$ mM. Barres d'échelle : 5 μ m.

Etant donné que les GUV(CNC/XG) n'explodent pas suite au gonflement, nous avons effectué une séquence de gonflement/dégonflement, pour tester la réversibilité de la réponse du système à l'application puis au relâchement d'une contrainte mécanique. La Figure 5.14-A présente l'évolution du rayon d'une GUV(CNC/XG) lors d'un gonflement à $\Delta c = 200$ mM, la figure 5.14-B le rayon pendant le dégonflement subséquent effectué aussi à $\Delta c = 200$ mM, le protocole de cette expérience étant détaillé au chapitre 2 § II.2.

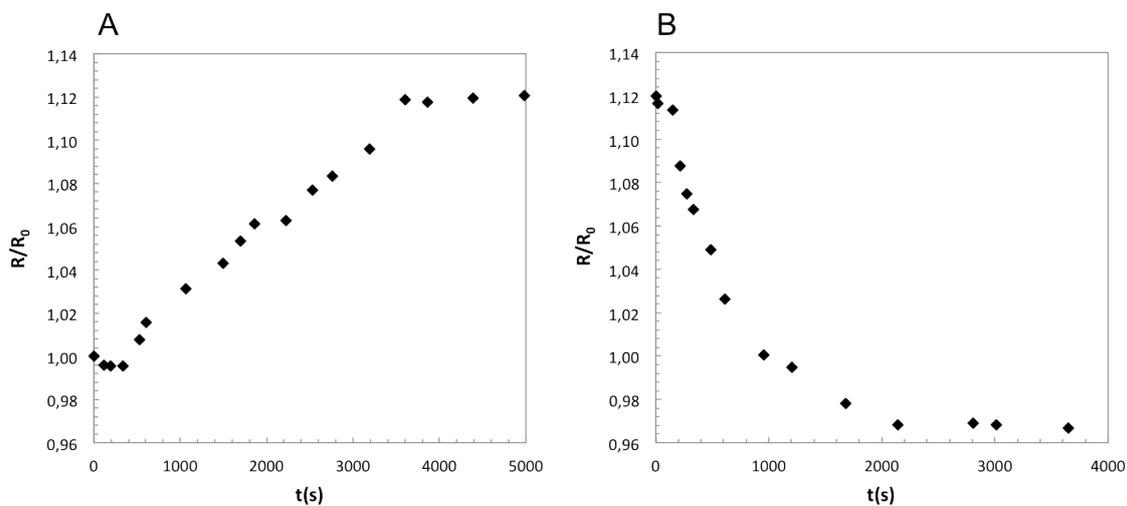


Figure 5.14 : Gonflement puis dégonflement d'une GUV(CNC/XG) à $\Delta c = 200$ mM

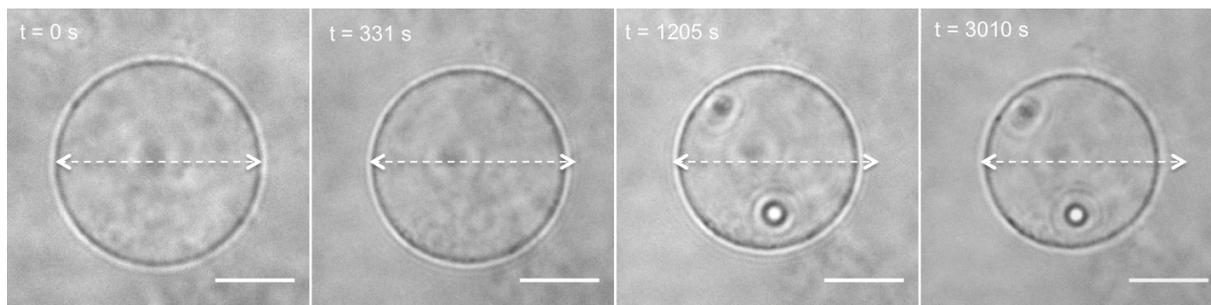


Figure 5.15 : Dégonflement d'une $GUV(CNC/XG)$ après gonflement. Barres d'échelle : $5 \mu m$.

Nous constatons que le processus est réversible : le rayon augmente d'environ 12% et diminue de 15%, ce dégonflement plus prononcé pouvant être dû à l'incertitude quant à la concentration réelle en glucose au voisinage des capsules. Lors du dégonflement, les $GUV(CNC/XG)$ conservent leur forme sphérique (Figure 5.15) et nous n'observons pas de formation de dépressions comme nous avons pu le voir précédemment, ce qui va également dans le sens d'une extension réversible.

Le processus de gonflement est analogue à un essai de fluage : il consiste à imposer une contrainte et à observer la déformation du matériau dans le temps. Le dégonflement peut lui être assimilé à une séquence de relaxation, lors de laquelle la contrainte en extension est stoppée. Les courbes obtenues sur les $GUV(CNC/XG)$ sont caractéristiques de la réponse d'un matériau viscoélastique. Ce type de matériau peut être décrit simplement par le modèle de Kelvin-Voigt, qui les modélise comme l'association en parallèle d'un ressort et d'un amortisseur, comme illustré sur la Figure 5.16-A : le ressort représente un solide élastique linéaire tandis que l'amortisseur représente un fluide visqueux.

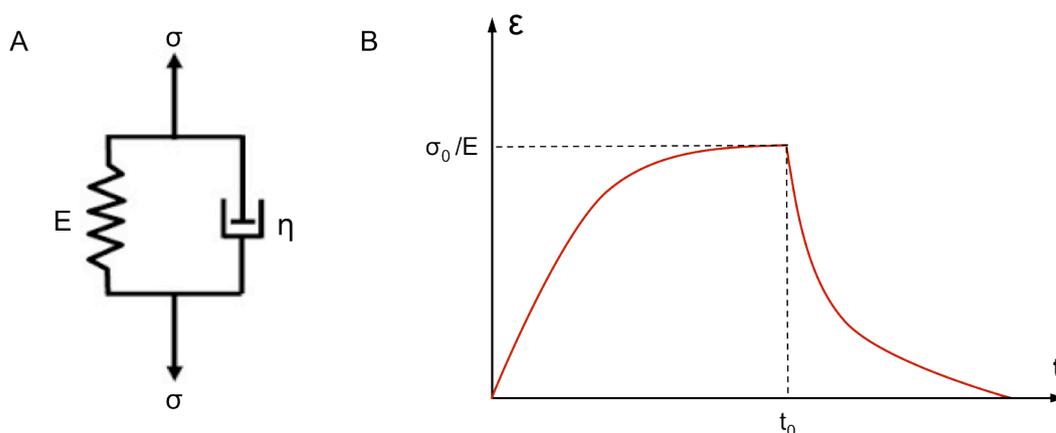


Figure 5.16 : (A) Représentation schématique du modèle de Kelvin-Voigt : association en parallèle d'un ressort de module élastique E et d'un amortisseur de coefficient de viscosité η (B) Fluage ($t < t_0$) puis relaxation ($t > t_0$) d'un matériau viscoélastique

Dans ce modèle, lorsqu'une contrainte constante σ_0 est imposée à l'instant t , la déformation relative $\varepsilon(t)$ du matériau s'obtient par l'équation différentielle :

$$\sigma_0 = E\varepsilon + \eta \frac{d\varepsilon}{dt} \quad (5.4)$$

En prenant pour condition initiale $\varepsilon(0)=0$ (déformation nulle à l'instant initial), cette équation s'intègre pour aboutir à une expression de la déformation en fonction du temps:

$$\begin{cases} \varepsilon = \frac{\sigma_0}{E} (1 - e^{-t/\tau}) \text{ pour } t < t_0 \\ \varepsilon = \frac{\sigma_0}{E} e^{-\frac{t-t_0}{\tau}} \text{ pour } t > t_0 \end{cases} \quad (5.5)$$

où la constante $\tau = \frac{\eta}{E}$, homogène à un temps, est appelée temps « de fluage » ou « de retard » et rend compte du temps caractéristique dû à la composante visqueuse avec lequel le matériau se déforme par rapport à un matériau purement élastique.

Nous pouvons ainsi estimer le temps de fluage de notre système à l'aide de l'équation 5.5, en traçant le logarithme de l'élongation relative (définie comme le rapport R_0-R/R_0) en fonction du temps (Figure 5.17)

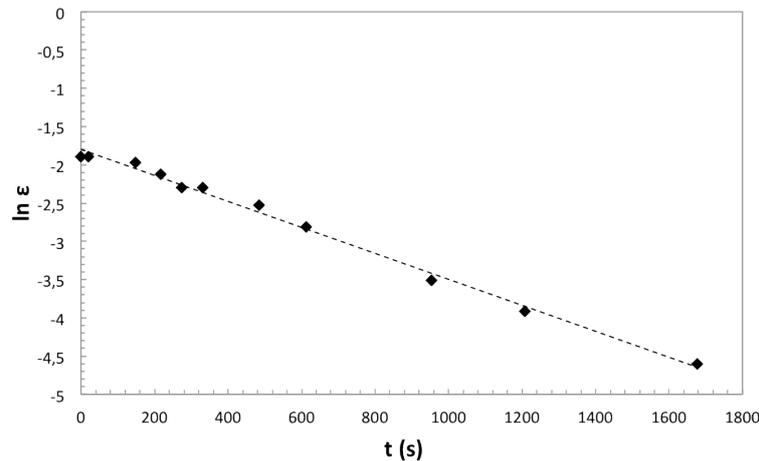


Figure 5.17 : Tracé du logarithme de l'élongation de la paroi CNC/XG en fonction du temps

La pente de la droite obtenue sur la Figure 5.17 correspond à l'inverse du temps de fluage τ que nous pouvons donc calculer, et que nous trouvons égal à 588 secondes.

Ce temps de retard à la déformation est néanmoins difficile à interpréter étant donné qu'il peut aussi bien résulter de la viscosité intrinsèque de la paroi que de la vitesse

d'écoulement de l'eau à travers celle-ci, ce qui suppose de pouvoir dissocier ces deux contributions. C'est pourquoi nous allons plutôt nous intéresser au régime élastique, qui correspond à la situation d'équilibre atteinte lorsque le rayon de la capsule n'évolue plus.

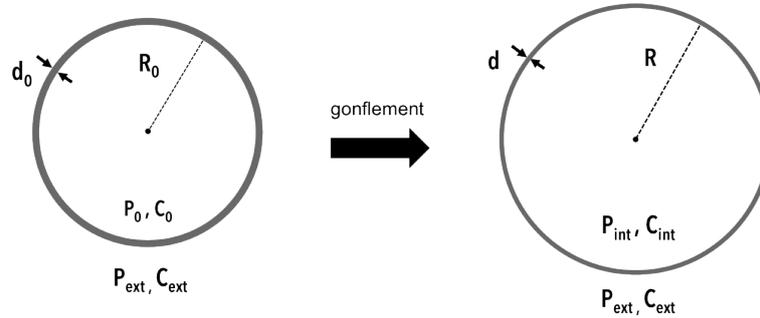


Figure 5.18 :Représentation schématique du gonflement d'une capsule par pression osmotique

Pendant le processus de gonflement représenté schématiquement sur la Figure 5.18, la solution de saccharose interne se verra diluée par l'entrée d'eau à l'intérieur de la capsule, passant d'une concentration C_0 à C_{int} . La conservation de la matière permet d'écrire la relation suivante :

$$C_{int} = C_0 \left(\frac{R_0}{R} \right)^3 \quad (5.6)$$

Cette dilution de la solution interne aura pour effet de diminuer la pression osmotique P_{int} exercée par la solution interne de saccharose, qui peut être exprimée en fonction de la pression osmotique initiale P_0 :

$$P_{int} = P_0 \left(\frac{R_0}{R} \right)^3 \quad (5.7)$$

avec $P_0 = R_m T C_0$ et $P_{int} = R_m T C_{int}$

R_m étant la constante des gaz parfaits (égale à $8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et T la température en degrés Kelvin.

Nous considérons en revanche que la concentration C_{ext} de la solution externe est constante, la pression P_{ext} correspondante s'écrivant :

$$P_{ext} = R_m T C_{ext} \quad (5.8)$$

L'épaisseur d de la paroi va quant à elle diminuer pendant le gonflement, ce qui se traduit par la relation suivante :

$$d = d_0 \left(\frac{R_0}{R} \right)^2 \quad (5.9)$$

A l'équilibre, la contrainte imposée par la différence de pression $\Delta P = P_{\text{ext}} - P_{\text{int}}$ est compensée par l'élasticité de la paroi selon la relation :

$$\Delta P = \frac{2}{R} \chi_{2D} \frac{(R - R_0)}{R} \quad (5.10)$$

χ_{2D} est un paramètre décrivant l'élasticité de la paroi qui s'écrit :

$$\chi_{2D} = \frac{E d}{2(1 - \nu)} \quad (5.11)$$

avec E le module d'Young (Pa) et ν le coefficient de Poisson pris égal à 0,5 dans notre cas.

La relation 5.10 permet d'obtenir une expression du module d'Young E en fonction du rayon R atteint à l'équilibre :

$$E = \Delta P \frac{R^4(1 - \nu)}{(R - R_0)R_0^2 d_0} \quad (5.12)$$

En prenant l'épaisseur initiale d_0 égale à 90 nm (épaisseur d'une bicouche CNC/XG estimée au chapitre 4 §IV.2) et sachant que les concentrations interne et externe initiales en espèce osmotiquement active (saccharose ou glucose) valent respectivement 300 et 100 mM, nous avons calculé une valeur de module d'Young E de 121 Pa.

Cette valeur est relativement éloignée des ordres de grandeur de module de parois végétales plutôt de l'ordre du MPa, ce qui n'est cependant pas étonnant étant donné que seule une bicouche de nanocristaux de cellulose et de xyloglucane a été déposée. En revanche, nous sommes plus proches de ce qui a été mesuré sur des vésicules décorées d'une couche de polymères, comme [Helfer et al., 2000] qui rapportent un module compris entre 5 et 50 Pa pour des vésicules recouvertes d'une couche de filaments d'actine. La présence de CNC ainsi que la nature semi-rigide du XG peuvent expliquer le fait que le module que nous trouvons soit plus élevé.

I.2.2 Capsules à 5 et 10 bicouches

Nous avons voulu réaliser les mêmes expériences de gonflement/dégonflement sur les capsules à 5 et 10 bicouches, afin de mettre en évidence la présence ou non d'un comportement viscoélastique de la paroi, et de voir si le module d'Young augmente avec l'épaisseur. Qu'il s'agisse des capsules à 5 ou 10 bicouches, nous n'avons pas pu observer de gonflement même en

imposant un choc osmotique avec des solutions externes de concentration nulle en glucose (Δc 300 mM).

La pression osmotique que nous imposons doit être insuffisante pour générer un étirement observable de la paroi. Cette observation paraît cohérente à la lumière de la bibliographie que nous avons examinée au chapitre 1 : les expériences de gonflement par pression osmotique réalisées sur des capsules multicouches soulignent la nécessité d'incorporer des chaînes de polymères (accompagnés d'un nombre important de contre ions) à l'intérieur des capsules pour pouvoir exercer une force suffisante sur la paroi multicouche. Il faudrait donc à l'avenir encapsuler des chaînes de polymères à l'intérieur des vésicules de départ afin de pouvoir appliquer un gradient de concentration plus important. Il se peut qu'il s'agisse aussi d'une question de cinétique, la diffusion de l'eau à travers la paroi devenant le facteur limitant : [Vinogradova et al., 2004] n'observent les capsules gonflées que deux semaines après le choc osmotique, en comparant le diamètre moyen des objets avant et après gonflement. Etant donné que nos capsules présentent une polydispersité en taille, cette méthode n'est pas vraiment adaptée dans notre cas.

II Nano-indentation par AFM

II.1 Protocole de mesure

II.1.1 Cadre théorique

Comme il a été annoncé dans la partie bibliographique de ce travail, les expériences d'AFM que nous avons réalisé s'appuient sur les travaux de [Vella et al., 2012], qui ont déterminé des expressions analytiques permettant de décrire l'indentation de coques minces sous pression. Ce modèle est valide si l'objet étudié est comparable à une coque mince, autrement dit si l'épaisseur de la paroi est faible devant le diamètre de l'objet : c'est effectivement le cas pour notre système, les capsules ayant un diamètre moyen de 20 μm pour une épaisseur que nous avons estimée être inférieure à 1 μm . D'après ce modèle, si la profondeur d'indentation est inférieure ou comparable à l'épaisseur de la paroi, alors les courbes de force-déformation seront sensibles aux propriétés mécaniques de la paroi et non pas à la pression interne. Pour l'ensemble des mesures, les capsules seront ainsi indentées avec une profondeur maximale de 200 nm. L'avantage des capsules CNC/XG que nous avons élaborées réside dans le contrôle de la concentration interne en soluté qu'offre leur mode de préparation. Aussi, pour l'ensemble des manipulations effectuées, les capsules sont plongées dans un milieu iso-osmolaire, d'où une pression osmotique nulle. En supprimant ainsi la contribution de la pression interne, les mesures que nous allons effectuer nous donneront accès avec plus de certitude à la rigidité de la paroi CNC/XG.

II.1.2 Conditions expérimentales

L'équipe de l'ENS Lyon au sein de laquelle ont été effectuées les expériences d'AFM est spécialisée dans l'étude par indentation de parois végétales naturelles [Beauzamy et al., 2015, Milani et al., 2011]. Aussi, notre objectif visait à se placer dans des conditions identiques à celles utilisées sur les véritables cellules pour étudier le comportement des capsules biomimétiques, et ainsi faciliter la comparaison des données. Le dispositif habituellement utilisé par l'équipe est représenté sur la Figure 5.19.

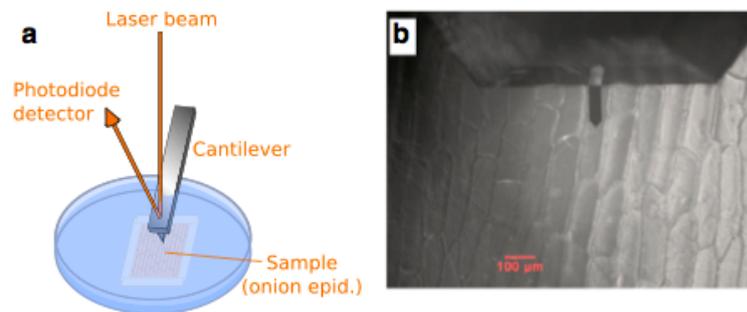


Figure 5.19 : (A) Schéma représentatif du dispositif expérimental utilisé pour l'indentation de parois d'oignons (B) Visualisation du levier et de l'échantillon par microscopie optique. D'après [Beauzamy et al., 2015]

Dans ce montage, les parois étudiées sont issues de cellules d'épiderme d'oignons. Des monocouches de cellules sont prélevées et fixées au fond d'une boîte de Petri, avant d'être immergées en solution aqueuse. Toutes ces expériences ont eu lieu en milieu liquide en mode contact, à l'aide d'un levier de constante de raideur 42 N.m^{-1} . Les capsules étant toujours recouvertes d'une dernière couche de CNC chargés négativement, les boîtes de Petri ont été traitées avec une solution de polycation, la poly(éthylèneimine) (PEI) à 2 g.L^{-1} pour promouvoir une légère adhésion des objets. Une goutte de capsules suspendues dans du glucose 300 mM est déposée et laissée à sédimenter, à la suite de quoi la boîte de Petri est complétée jusqu'à mi-hauteur par une solution de glucose 300 mM .

Nous avons souhaité utiliser un levier de constante de raideur 42 N.m^{-1} sur nos objets pour nous placer dans les mêmes conditions que dans l'étude des parois d'oignons, mais ce type de levier s'est révélé être trop rigide. Les capsules que nous avons tenté d'indenter ainsi s'échappaient systématiquement sur le côté du levier, ce qu'illustre la Figure 5.20-A.

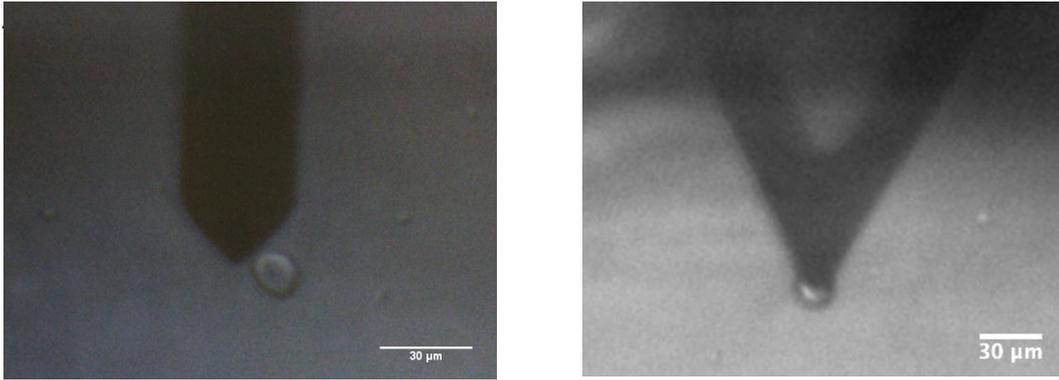


Figure 5.20 (A) Image de microscopie optique d'une capsule s'échappant après un essai d'indentation avec un levier de constante de raideur 42 N.m^{-1} (B) Image de microscopie optique du positionnement du levier de constante de raideur $0,4 \text{ N.m}^{-1}$ à l'apex d'une capsule.

Des leviers de constante de raideur $0,4 \text{ N/m}$ se sont finalement montrés plus appropriés. Leur géométrie en triangle, visible sur la Figure 5.20-B, a de plus facilité l'étape de positionnement du levier à l'apex des capsules, indispensable pour limiter de potentiels biais dans la mesure lorsque celle-ci n'est pas réalisée perpendiculairement à la surface [Routier-Kierzkowska et al., 2012]. Une fois le levier positionné, un balayage de la surface est systématiquement effectué ce qui permet ensuite de sélectionner plusieurs points à indenter dans cette zone. Un exemple d'image générée par ces scans de surface est présenté en Figure 5.21. Chaque capsule a été indentée sur 9 points, chaque point faisant l'objet de 3 acquisitions de courbe de force successives.

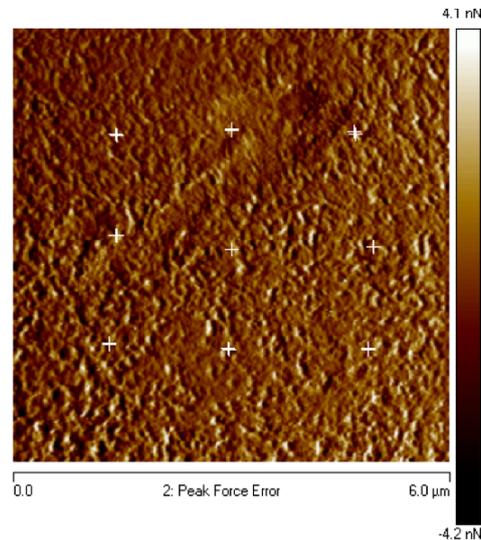


Figure 5.21 :Exemple de scan ($6 \times 6 \mu\text{m}^2$) de la surface d'une capsule $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{10,5}$. Les croix blanches correspondent aux points qui ont été indentés.

II.1.3 Traitement des courbes de force

Afin d'extraire les informations pertinentes de notre système à partir des courbes expérimentales de force-déformation, celles-ci ont été ajustées à des courbes théoriques. Deux méthodes d'ajustement ont été utilisées : la première repose sur le modèle de Sneddon et nous permettra d'estimer le module d'Young E , la seconde consiste à extraire la pente des parties linéaires des courbes de force-déformation, et donne accès à la rigidité apparente k_e de la vésicule, comparable à une constante de raideur.

Le modèle de Sneddon permet de décrire l'indentation d'une sphère par une pointe conique [Sneddon, 1965], comme c'est le cas ici. Dérivé du modèle de Hertz lui adapté au cas des pointes sphériques, il s'appuie également sur l'hypothèse que le matériau indenté est isotrope, et nous considérons que c'est le cas ici.

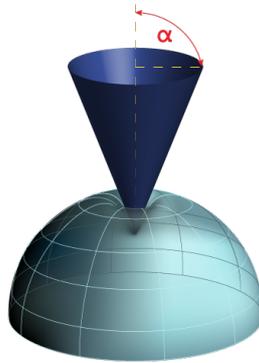


Figure 5.22 : Schéma représentatif de l'indentation d'une sphère par un cône.

Ce modèle permet d'exprimer le module d'Young en fonction de la force appliquée F selon la relation suivante :

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{(1 - \nu^2)} \tan(\alpha) \delta^2 \quad (5.13)$$

avec le coefficient de Poisson (pris égal à 0.5 ici) ; α le demi-angle de l'indenteur et δ la profondeur d'indentation.

Dans la pratique, l'ajustement ne fonctionne pas sur l'ensemble de la courbe, aussi dans notre cas a-t-il été appliqué en début et en fin de courbe pour permettre d'estimer des valeurs limites du module d'Young, les plages d'ajustement étant à chaque fois sélectionnées pour être les plus fidèles possible aux données expérimentales.

La seconde approche qui a été utilisée pour extraire des données quantitatives des courbes de force est plus simple et consiste en un ajustement linéaire. Pour l'ensemble des

courbes présentées dans la suite de ce document, l'ajustement a été effectué sur la plage de 50 à 100% d'indentation uniquement sur les courbes d'approche. Le coefficient directeur de cet ajustement linéaire, noté k , représente la rigidité apparente de la vésicule en $N.m^{-1}$, et est comparable à une constante de raideur.

II.2 Mesure des propriétés mécaniques des capsules

II.2.1 Influence de l'épaisseur de la paroi

Nous avons souhaité étudier l'influence de l'épaisseur de la paroi sur les caractéristiques mécaniques des capsules. Des lots de capsules à 10 bicouches ont donc été comparés à des lots de capsules à 5 bicouches. Les figures 5.23-A et 5.23-B présentent des exemples de courbe de force-déformation acquises sur des capsules comportant respectivement 5 et 10 bicouches.

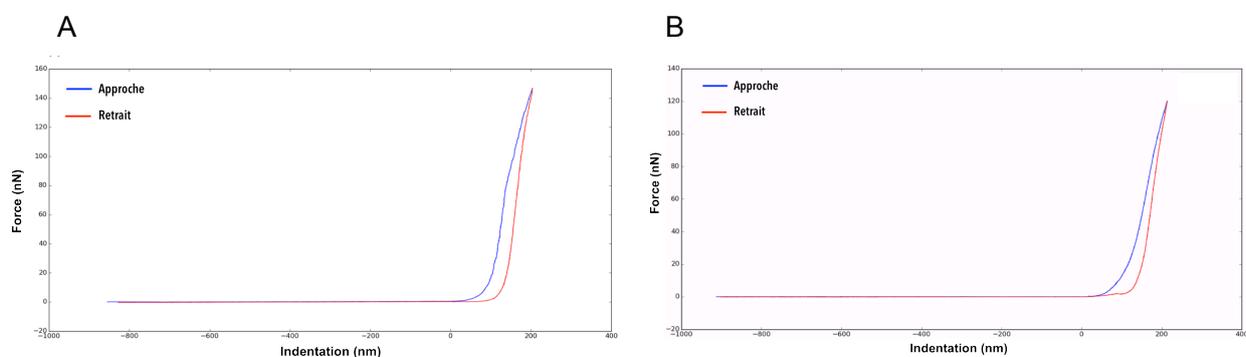


Figure 5.23 : (A) Courbe de force déformation d'une capsule à 5 bicouches (B) Courbe de force déformation d'une capsule à 10 bicouches

Lors de cette série d'expériences, nous avons été confronté à une grande variabilité du comportement des capsules, entre les capsules de différentes épaisseurs mais également au sein des mêmes lots. De plus, en traçant le logarithme de l'indentation en fonction du logarithme de la force appliquée, nous n'obtenons pas systématiquement un comportement linéaire comme le montre la Figure 5.24 : cela signifie que la force n'évolue pas avec l'indentation selon une loi de puissance, comme c'est censé être le cas pour pouvoir utiliser le modèle de Sneddon ou tout autre modèle élastique permettant d'estimer le module d'Young.

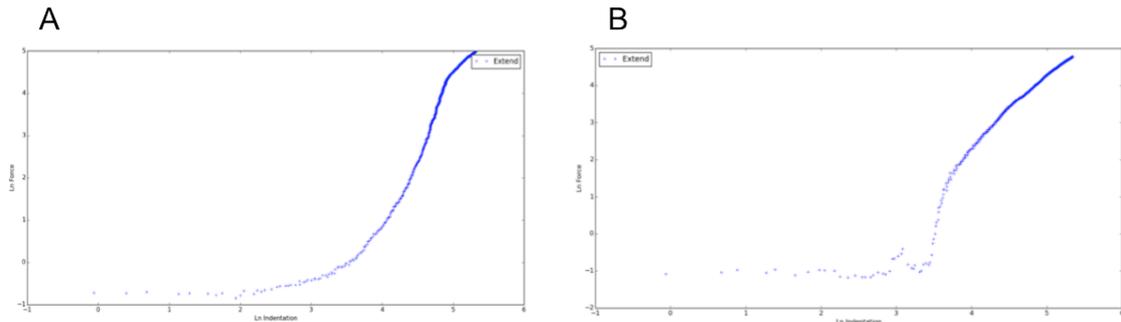


Figure 5.24 : Tracé du logarithme de l'indentation en fonction du logarithme de la force appliquée (A) Capsule à 5 bicouches (B) Capsule à 10 bicouches

Il n'a donc pas été possible de comparer les capsules de différentes épaisseurs en termes de module d'Young. L'ajustement linéaire a néanmoins pu être appliqué sur l'ensemble des courbes et nous a donc permis de comparer les valeurs de rigidité apparente entre les capsules à 5 et 10 bicouches.

Une valeur moyenne de $0,8 \pm 0,40 \text{ N.m}^{-1}$ a été déterminée pour la rigidité des capsules à 5 bicouches contre $1,5 \pm 0,94 \text{ N.m}^{-1}$ pour les capsules à 10 bicouches. Il apparaît donc que la rigidité est quasiment doublée lorsque le nombre de couches est multiplié par deux, même si cette conclusion doit être formulée avec prudence si l'on considère les écarts-types très importants des valeurs de k : celles-ci s'étalent en effet de 0,2 à 1,7 N.m^{-1} dans le cas des capsules à 5 bicouches, et vont de 0,4 à 3,4 N.m^{-1} pour celles à 10 bicouches, il y a donc un recouvrement entre ces deux séries de données.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette dispersion importante. Tout d'abord, il pourrait être avancé que la taille des capsules joue un rôle dans cette dispersion des valeurs de rigidité : en réalité, bien que nos objets soient effectivement polydisperses en taille comme nous l'avons vu au chapitre 4 § III.1, les expériences d'indentation ont toujours été réalisées sur des capsules de diamètre 20-30 μm pour des raisons d'ordre pratique (il est beaucoup plus difficile de positionner le levier sur les capsules de diamètre inférieur à 20 μm , et un mauvais positionnement aboutit systématiquement à un échec de la mesure, la capsule s'échappant sur le côté du levier au lieu de rester en place). Le seul effet de la taille des capsules ne semble donc pas être une explication suffisante.

Une autre explication réside dans le traitement des courbes de force, qui dépend significativement de la détermination du point de contact entre la pointe d'AFM et la surface de la capsule (point où l'indentation est égale à 0 nm) : deux capsules aux propriétés identiques peuvent apparaître différentes après analyse des courbes de force si ces dernières ne sont pas bien résolues pour diverses raisons expérimentales au niveau du point de contact.

Une troisième raison découle des observations par microscopie confocale présentées au chapitre 4 : celles-ci ont en effet mis en évidence de l'hétérogénéité dans le recouvrement des vésicules, se traduisant par des sur-concentrations de matière en certains points de la surface des objets. Etant donné que la mesure des propriétés mécaniques par nano-indentation que nous avons effectuée consiste à sonder localement la paroi, il semble logique qu'elle soit sensible à ces variations locales d'épaisseur.

II.2.2 Influence de la vitesse d'indentation

Nous avons également cherché à mettre en évidence une éventuelle influence de la vitesse d'indentation sur les courbes de force. Trois vitesses ont été testées sur plusieurs capsules comportant 10 bicouches : 0.5, 10.5 et 24 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. La Figure 5.26 présente un exemple de superposition de courbes acquises en un même point aux trois vitesses différentes.

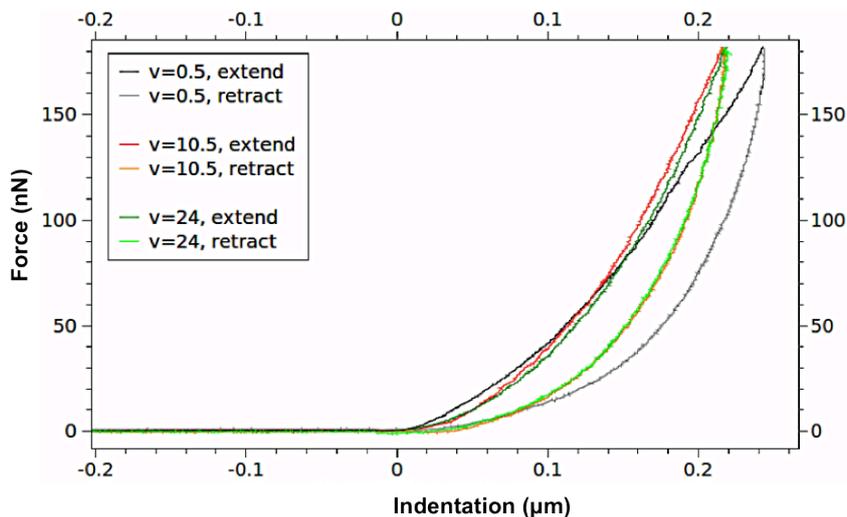


Figure 5.25 : Courbes de force acquises sur une capsule $\text{GUV}(\text{CNC}/\text{XG})_{10,5}$ à trois vitesses d'indentation différentes : 0.5, 10.5 et 24 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Sur l'exemple présenté en Figure 5.25, les courbes de force enregistrées à $v=10,5$ et 24 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ semblent très similaires tandis que celle correspondant à $v=0,5$ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ présente une pente plus faible. Contrairement à la série d'expériences précédente, l'ajustement des courbes d'approche par le modèle de Sneddon a cette fois ci permis d'extraire des valeurs de module d'Young de capsules à 10 bicouches pour les trois vitesses d'indentation différentes, ce qu'illustre la Figure 5.26-A. L'ajustement linéaire a lui permis d'extraire les valeurs de rigidité apparente (Figure 5.26-B).

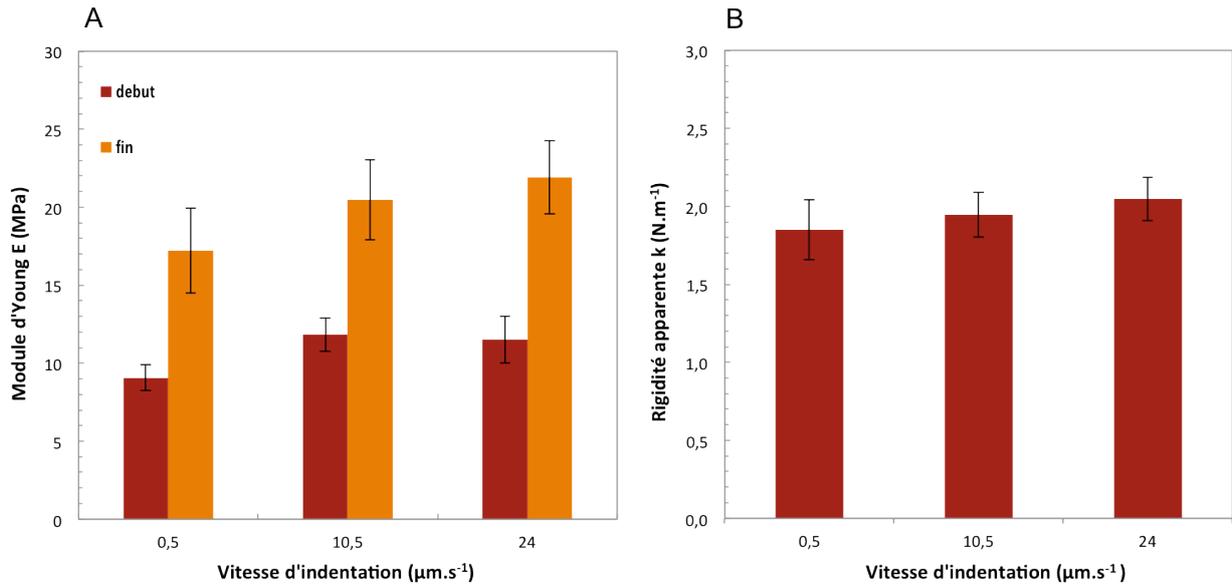


Figure 5.26 : (A) Module d'Young d'une capsule à 10 bicouches extrait en début et en fin de courbe d'approche, en fonction de la vitesse d'indentation (B) Rigidité apparente d'une capsule à 10 bicouches en fonction de la vitesse d'indentation.

Ces données suggèrent une légère augmentation apparente des propriétés mécaniques avec la vitesse d'indentation, augmentation qui reste néanmoins modérée étant donnée qu'elle reste de l'ordre de grandeur de l'incertitude des mesures. La suite des expériences a donc été réalisée à la vitesse d'indentation intermédiaire de $10,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. La figure 5.27 présente les valeurs de module d'Young obtenues par ajustement de Sneddon en début et en fin des courbes de force acquises ainsi que les valeurs de rigidité apparente.

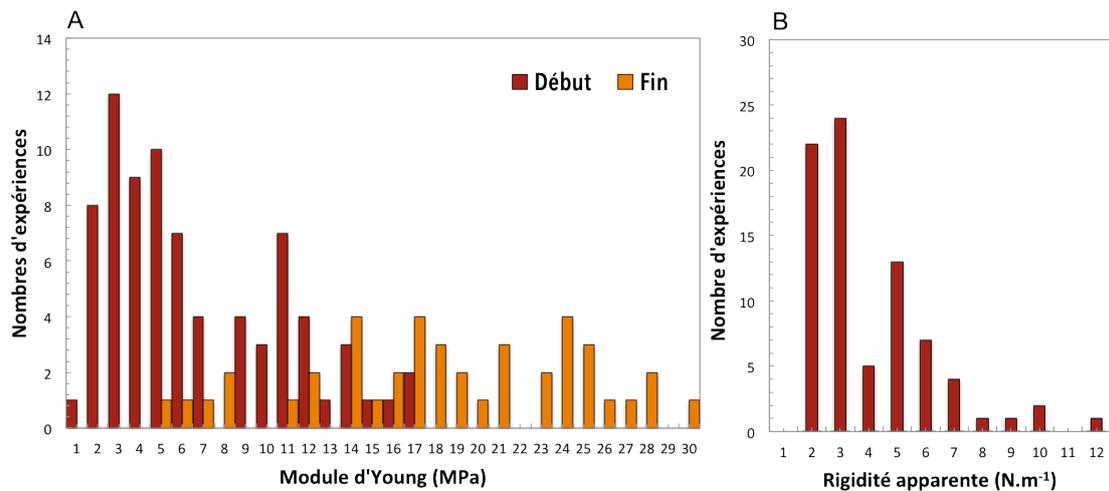


Figure 5.27 : (A) Histogramme des modules d'Young mesurés sur des capsules à 10 bicouches (B) Histogramme des rigidités apparentes mesurées sur des capsules à 10 bicouches

Sur ce lot de capsules à 10 bicouches, le module d'Young moyen en début de courbe est de $6 \pm 4,2$ MPa et de $18 \pm 6,4$ MPa en fin de courbe. Cette plage de valeurs de 6 à 18 MPa est cohérente avec ce qui a pu être mesuré sur des parois primaires, et en particulier avec les mesures de [Beauzamy et al., 2015] effectuées par nano-indentation sur des cellules d'épiderme d'oignon (7-14 MPa). La rigidité apparente que nous mesurons vaut en moyenne $4 \pm 2,2$ N.m⁻¹, ce qui est là aussi du même ordre de grandeur que ce qui a été obtenu sur des cellules végétales (2-22 N.m⁻¹ par [Routier-Kierzkowska et al., 2012]).

Nous avons systématiquement observé de l'hystérèse entre les courbes d'approche et de retrait. Comme il a déjà été mentionné dans la partie bibliographique, l'hystérèse peut avoir plusieurs origines : elle peut résulter d'une éventuelle adhésion entre la sonde et la capsule, du caractère viscoélastique de la paroi ou de la perméabilité de celle-ci. Etant donné que nous ne comprimons pas l'ensemble de la capsule mais nous contentons de l'indenter sur une profondeur qui n'excède pas 200 nm, l'hypothèse de l'éjection d'eau en dehors des capsules lors de l'acquisition des courbes nous semble peu probable à l'échelle de temps de l'expérience.

L'observation des capsules avant et après indentation nous permet de pencher pour l'hypothèse de la viscoélasticité plutôt que pour celle de l'adhésion. Les capsules sont en effet visiblement déformées après avoir été indentées par la pointe, et ne retrouvent pas immédiatement leur forme sphérique après retrait du levier, comme l'illustre la Figure 5.28.

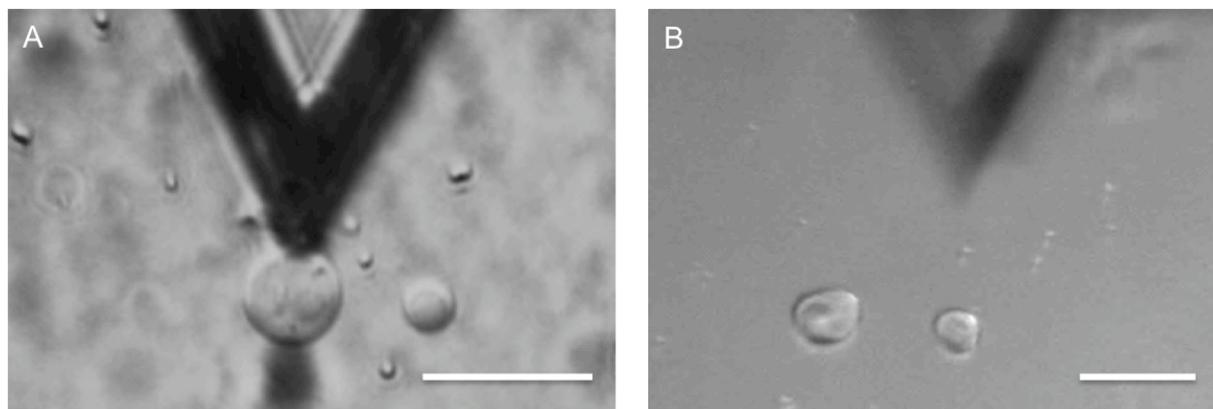


Figure 5.28 : (A) Levier à l'approche d'une capsule avant indentation (B) Retrait du levier après indentation. Barres d'échelle : 50 μ m.

De plus, l'expérience de gonflement/dégonflement présentée précédemment sur les GUV(CNC/XG) mettait en évidence une réponse viscoélastique de la paroi à l'application puis au relâchement d'une contrainte. Ce comportement partiellement visqueux est d'ailleurs également observé lors de l'indentation de parois végétales [Beauzamy et al., 2015].

III Conclusion

L'étude du comportement mécanique des capsules multicouches a permis de mettre en évidence un changement de comportement de la paroi après dépôt de nanocristaux de cellulose et de xyloglucane : les expériences de pression osmotique montrent en effet un changement notable de morphologie de dégonflement des GUV(CNC/XG), qui présentent des formes à facettes au contour irrégulier ainsi que des formes de bol, caractéristiques de ce qui est observé lors du dégonflement de coques minces élastiques isotropes. Des morphologies similaires sont observées pour les capsules à 5 et 10 bicouches et nécessiteraient d'être caractérisées quantitativement avec un plus grand nombre d'expériences. La séquence de gonflement/dégonflement par pression osmotique suggère un caractère visco-élastique de la paroi CNC/XG, mais n'a pas pu être reproduite sur les capsules à 5 et 10 bicouches faute de pouvoir exercer une pression osmotique suffisante pour observer une augmentation du diamètre.

D'autre part, les expériences de nano-indentation par AFM ont permis d'obtenir une première estimation du module d'Young des capsules CNC/XG à 10 bicouches, qui se trouve être de l'ordre de la dizaine de MPa. Ces valeurs de module, de même que celles de rigidité apparente, sont néanmoins proches de ce qui a été mesuré sur des parois primaires : Beauzamy et al. mesurent en effet un module d'Young compris entre 7 et 14 MPa sur la paroi de cellules d'épiderme d'oignon [Beauzamy et al., 2015]. Cet ordre de grandeur est cohérent avec des données obtenues par d'autres méthodes : Wei et al. mesurent par exemple un module compris entre 3,5 et 8 MPa par extensiométrie sur des parois d'oignon [Wei et al., 2001]. Cette concordance tend à conforter la pertinence des capsules multicouches CNC/XG en tant que modèle mécanique de cellules végétales.

Conclusion et perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons élaboré un système modèle de la paroi végétale à partir de vésicules lipidiques géantes décorées de couches successives de nanocristaux de cellulose et de xyloglucane. Après une caractérisation de la morphologie de ces capsules micrométriques, leurs propriétés mécaniques ont été étudiées. Nous présentons ici une vue d'ensemble du travail accompli et proposons à la suite de chaque bilan quelques perspectives d'approfondissement.

Le premier pas à effectuer dans la construction des capsules a été de recouvrir les vésicules géantes d'une première couche de nanocristaux de cellulose. L'existence d'une interaction entre ces deux objets n'ayant pas encore été décrite à ce jour, cette étape n'était a priori pas acquise. Nous avons pu montrer par microscopie à fluorescence et microscopie électronique que cette interaction a bel et bien lieu et que sa nature ne serait pas uniquement électrostatique, comme en témoigne le fait que les CNC soient capables de s'adsorber sur la membrane lipidique même lorsque celle-ci possède une charge de surface de même signe. Il a également été observé qu'à l'échelle macroscopique, les nanoparticules de cellulose n'induisent pas de déformation dramatique des vésicules, qui conservent leur forme sphérique. En revanche, nous avons pu constater que l'adsorption, et ce quelle que soit la concentration en CNC utilisée, provoquait une agrégation des nanoparticules à la surface de la membrane, d'où une décoration parfois hétérogène de celle-ci. Nous avons également pu relever un phénomène récurrent d'internalisation des nanoparticules. L'axe principal de recherche qui peut être envisagé à la suite de ce travail est une caractérisation plus quantitative de l'interaction CNC/membrane lipidique. La titration calorimétrique isotherme ou encore la microbalance à quartz sont notamment des techniques donnant accès aux données thermodynamiques d'une interaction entre deux espèces moléculaires (enthalpie, entropie, stoechiométrie). Ces techniques expérimentales pourraient également être complétées par des simulations numériques, afin d'obtenir une description plus fine des différents mécanismes d'internalisation et d'agrégation constatés en microscopie.

La construction des capsules par la méthode couche par couche sur ces vésicules décorées de CNC a été possible au prix de quelques efforts d'optimisation : nous avons constaté que la concentration en xyloglucanes était un paramètre critique, celle-ci devant impérativement correspondre à un régime dilué (0,01% p/p), sans quoi la déplétion exercée par les chaînes de polymères sur les vésicules était trop importante pour garantir l'intégrité de ces dernières. L'étape de rinçage habituellement effectuée par centrifugation s'est elle aussi avérée trop violente pour nos objets et a été remplacée par une sédimentation lente, ce qui a inévitablement allongé le processus de production des capsules. Les dépôts successifs ont

toutefois été observés par microscopie confocale, et l'épaisseur à l'état sec des capsules s'est révélée être en accord avec les données issues des films multicouches CNC/XG, à savoir d'une centaine de nanomètres pour les capsules à 10 bicouches. L'épaisseur de la paroi à l'état hydraté reste toutefois une question ouverte, les mesures tentées en microscopie à fluorescence suggérant que les capsules à 10 bicouches possédaient une épaisseur plutôt de l'ordre du micromètre, en raison du gonflement des couches. Quoi qu'il en soit, cette gamme de 0,1 à 1 μm d'épaisseur correspond à l'objectif que nous nous étions fixés, aussi pouvons nous dire que la géométrie des capsules que nous avons produites est cohérente avec celles des cellules végétales. Afin d'approfondir la caractérisation structurale de ces capsules, il serait intéressant de se tourner vers des techniques de diffusion des neutrons, qui viendraient confirmer ou non la valeur d'épaisseur à l'état hydraté de la paroi CNC/XG. L'observation des capsules par cryo-MEB serait également très utile pour visualiser l'arrangement et la porosité des couches déposées. Une perspective à plus long terme serait par ailleurs d'essayer de transposer l'ordre chiral nématique des CNC à la surface des capsules, transposition qui a effectivement été observée sur des substrats plans incubés dans des suspensions organisées dans le cas de films multicouches composés de CNC et de poly(hydrochlorure d'allilamine) [Jean et al., 2008]. Introduire une orientation des nanocristaux et donc de l'anisotropie laissent en effet imaginer un comportement original des capsules ainsi formées en termes de morphologies de déformation.

La caractérisation mécanique des capsules a ensuite été réalisée par des essais de dégonflement par pression osmotique, en prenant soin de comparer la morphologie de vésicules nues à celle de capsules de différentes épaisseurs. Nous n'avons pas observé de différence flagrante de morphologie entre les vésicules seules et celles décorées d'une seule couche de CNC mais avons pu constater une cinétique de dégonflement plus lente de ces dernières. Le dépôt d'une couche supplémentaire de XG a suffi à opérer un changement radical de morphologie de dégonflement : les GUV(CNC/XG) se dégonflent par formation de dépressions et non plus de manière fluide, et présentent des morphologies en "bol" identiques à ce qui habituellement observé lors du flambage de coques minces de matériau isotrope [Quilliet et al., 2008]. Une étude plus systématique de ces déformations serait nécessaire pour extraire des grandeurs caractéristiques de l'élasticité des capsules, mais devrait être réalisé sur un plus grand nombre d'objets.

En exposant les capsules à une solution hypotonique, nous avons pu simuler l'effet d'une pression de turgescence et observer du gonflement sur les vésicules nues ainsi que sur les GUV(CNC/XG), les vésicules recouvertes d'une simple couche de CNC éclatant systématiquement sans que leur diamètre n'augmente. Le comportement en gonflement des GUV(CNC/XG) s'est avéré très proche de celui d'un matériau viscoélastique. En ne considérant que la situation à l'équilibre, nous avons pu estimer une valeur du module élastique

de la paroi, qui reste cependant à confirmer par des expériences complémentaires. Quantifier la composante visqueuse nécessiterait de pouvoir dissocier la viscosité intrinsèque de la paroi de sa perméabilité à l'eau. La contribution de cette dernière est probablement importante, étant donné qu'il ne nous a pas été possible d'observer du gonflement sur des capsules à 5 ou 10 bicouches.

Des données quantitatives ont pu être extraites des courbes de force acquises par nano-indentation des capsules à 5 et 10 bicouches. Le module d'Young des capsules les plus épaisses est compris entre 6 et 18 MPa, ordre de grandeur similaire à celui des données issues d'expériences d'indentation similaires sur des parois d'oignon [Beauzamy et al., 2015]. Là encore, ces valeurs ne constituent qu'une estimation relativement préliminaire qu'il conviendrait de confirmer en répétant l'expérience sur un plus grand nombre d'objets. Cet axe de travail pourrait également être complété par des expériences d'indentation dans lesquelles nous pourrions faire varier la pression osmotique du milieu environnant des capsules.

D'un point de vue plus global, le modèle de paroi végétale que nous avons proposé ne demande qu'à être sophistiqué et nous pouvons imaginer de nombreuses façons d'en décliner la composition et la structure : il peut par exemple être envisagé de faire varier le facteur de forme des CNC, d'introduire du xyloglucane chimiquement modifié capable de former des liens covalents avec la cellulose ou encore à plus long terme de trouver le moyen d'introduire des pectines dans le système afin de se rapprocher encore un peu plus des assemblages naturels.

Annexe

I Des lipides aux vésicules

I.1 Structure chimique des lipides

Initialement utilisé pour désigner les composés organiques insolubles dans l'eau mais solubles en solvant, le terme de lipides renvoie à l'ensemble des « corps gras », ces petites molécules organiques, hydrophobes ou amphiphiles, impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques. Il existe une très grande variété de lipides, que l'on peut classer en quelques grandes familles : phospholipides, sphingolipides, glycolipides, stérols...

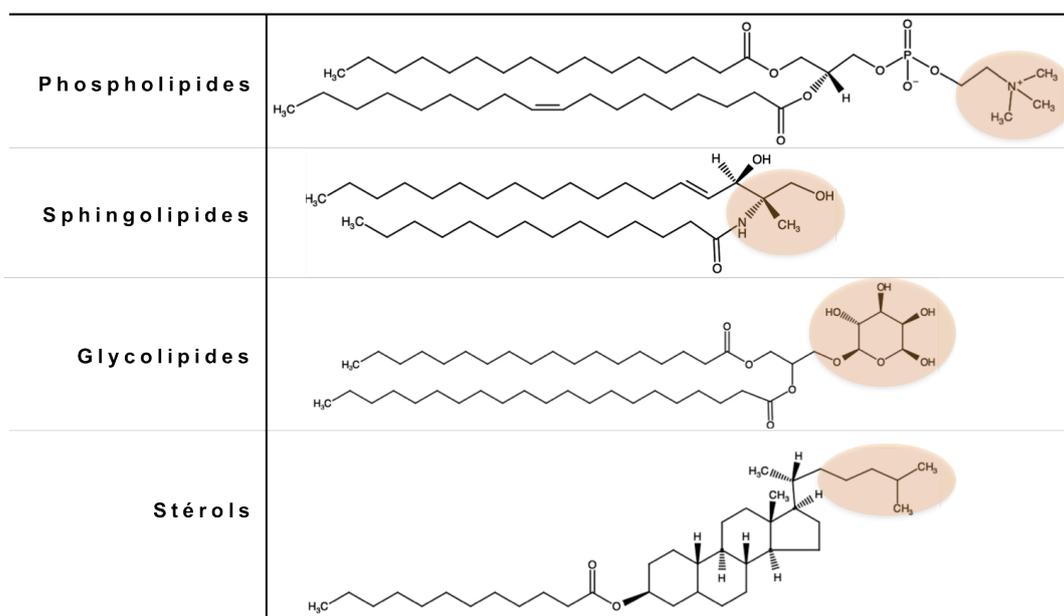


Figure A.1 : Exemples de structure chimique des principales familles de lipides (en orange : groupements pouvant être déclinés)

En particulier, les glycérophospholipides ou phospholipides, font partie des principaux constituants des membranes cellulaires. Issus de l'estérification du glycérol par un dérivé d'acide phosphorique et de deux acides gras, les phospholipides ont une structure commune (Figure A.2) qui peut être déclinée en fonction du radical porté par la tête hydrophile, de la longueur des chaînes carbonées et du nombre d'insaturations qu'elles comportent.

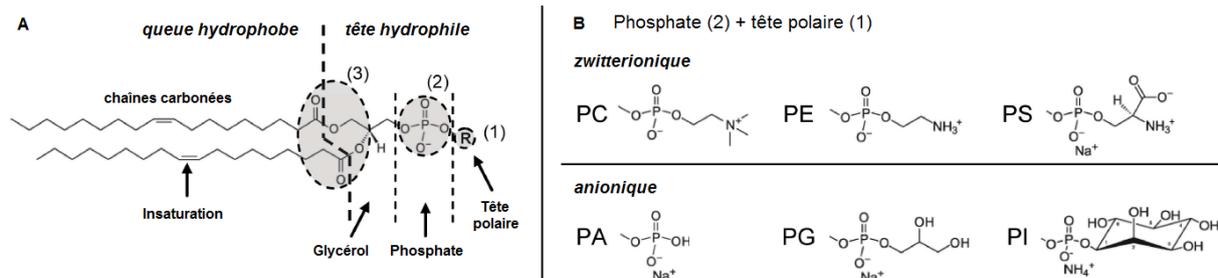


Figure A.2 : (A) Structure chimique d'un phospholipide. (B) Formules chimiques des différentes têtes polaires : phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), acide phosphatidique (PA), phosphatidylglycérol (PG) et phosphatidylinositol (PI). D'après [Quemeneur, 2010]

Il existe une convention de nomenclature des chaînes carbonées, notées C n : m , où n correspond au nombre de carbones et m au nombre d'insaturations. Les noms et notations des chaînes les plus fréquemment rencontrées sont listées dans le tableau A.1.

Tableau A.1 : Noms et nomenclature de chaînes carbonées pour différents nombres d'atomes de carbone et d'insaturations.

lauréoyl	C 12 : 0
myristoyl	C 14 : 0
palmitoyl	C 16 : 0
stéaroyl	C 18 : 0
oléoyl	C 18 : 1

I.2 Auto-assemblage dans l'eau

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles, contenant à la fois une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Ces molécules au caractère ambivalent ont tendance à se placer aux interfaces (comme par exemple à l'interface eau-air dans laquelle la partie hydrophile se placera du côté de l'eau et la partie hydrophobe du côté de l'air). Si la concentration augmente jusqu'à saturation de l'interface en molécules amphiphiles, certaines n'auront d'autre choix que de rester individuellement en solution. Afin de minimiser leur énergie libre, ces molécules vont s'auto-organiser pour limiter le contact de leur partie hydrophobe avec l'eau, la structure de cet assemblage étant dépendante de la géométrie des molécules amphiphiles.

Puisqu'il existe une variété de lipides de structure chimique et donc de topologie différentes, les auto-assemblages résultant peuvent eux aussi prendre diverses formes. Le type d'assemblage formé dépend directement des volumes relatifs des parties hydrophobes et

hydrophiles du lipide : la longueur (L_c) et le volume (V) de la chaîne carbonée ainsi que l'aire de la tête polaire (s) définissent le paramètre critique d'empilement (ou facteur de forme) de la structure [Israelachvili, 1992].

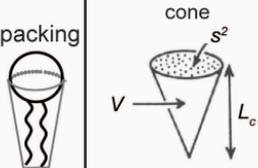
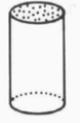
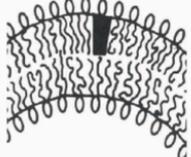
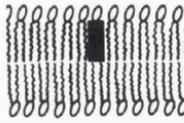
Lipid	Single-chained lipids (surfactants) with large head-group areas: SDS in low salt, ...	Single-chained lipids with small head-group areas: SDS and CTAB in high salt, nonionic lipids, ...	Double-chained lipids with large head-group areas, fluid chains: phospholipids (PC, PE, PS, PA, PG and PI), ...	Double-chained lipids with small head-group areas, anionic lipids in high salt, saturated frozen chains	Double-chained lipids with small head-group areas, nonionic lipids, poly(cis) unsaturated chains, high temperature
Critical packing parameter (V/s^2L_c)	$< 1/3$	$1/3 - 1/2$	$1/2 - 1$	~ 1	> 1
Critical packing shape	cone 	truncated cone 	truncated cone 	cylinder 	inverted truncated cone or wedge 
Structures formed	spherical micelles 	cylindrical micelles 	flexible bilayers, vesicles 	planar bilayers 	inverted micelles 

Figure A.3 : Exemples de structure formées par l'auto-assemblage des lipides dans l'eau. D'après [Israelachvili, 1992]

Dans le cas des phospholipides, leur forme en « cône tronqué » induit un assemblage tridimensionnel en une bicouche sphérique se refermant sur elle-même : les vésicules.

II Propriétés de la membrane lipidique

II.1 Structure de la membrane

La structure de la membrane lipidique varie en fonction des paramètres physico-chimiques extérieurs, et notamment de la température. En-dessous d'une température critique T_m , une transition de phase va s'opérer, d'une phase liquide désordonnée à une phase solide ordonnée. Cette transition dépend de la nature chimique des lipides: la longueur des chaînes carbonées, le nombre et la position des insaturations qu'elles contiennent vont avoir un impact sur les interactions entre lipides adjacents, sur leur capacité à cristalliser et donc sur la fluidité globale de la bicouche. Le tableau A.2 présente ainsi les températures de transitions de plusieurs phospholipides, de têtes polaires identiques (phosphatidylcholine) mais de parties hydrophobes différentes.

Tableau A.2 : Températures de transition T_m pour différents phospholipides.

Acides gras saturés		Acide gras insaturés	
Lipide	T_m (°C)	Lipide	T_m (°C)
C12:0 (DLPC)	- 1.9	C16:0/C18:1c9 (POPC)	-2.5
diC14:0 (DMPC)	23.6	C18:0/C18:1c9 (SOPC)	6.9
diC16:0 (DPPC)	41.3	diC18:1c9 (DOPC)	-18.3

Plusieurs phases sont donc à distinguer : la phase fluide, la phase gel et la phase cristalline. L'épaisseur d'une bicouche est fonction du diamètre des têtes polaires de lipides, de l'inclinaison des chaînes carbonées et de l'épaisseur de l'interface entre les deux monocouches. Ainsi, lors d'une transition de phase fluide à gel puis cristalline, la membrane s'ordonne et devient de ce fait plus compacte : l'aire de sa surface diminue (l'aire par lipide passe d'une moyenne de 0.5 nm^2 à plus de 0.75 nm^2) tandis que son épaisseur augmente.

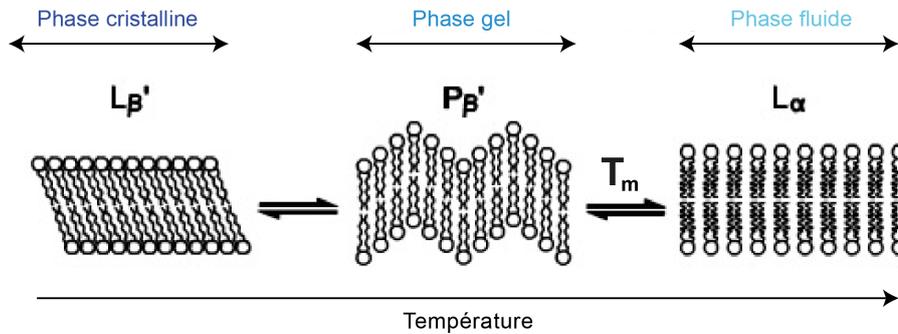


Figure A.4 : Représentation schématique de la structure des lipides au sein des différentes phases

II.2 Mobilité des lipides

En phase fluide, les lipides sont mobiles : les chaînes grasses sont sujettes à des mouvements de flexion, les lipides tournent librement sur eux mêmes (temps caractéristique d'environ 10^{-8} s), peuvent se déplacer latéralement au sein de leur couche (coefficient de diffusion de quelques m^2/s) mais aussi passer d'un feuillet à l'autre (mécanisme de « flip-flop ») [Lipowski&Sackmann, 1995]. Cette diffusion transverse est cependant très lente (temps caractéristique de 10^5 s), et peut de ce fait être considérée comme négligeable.

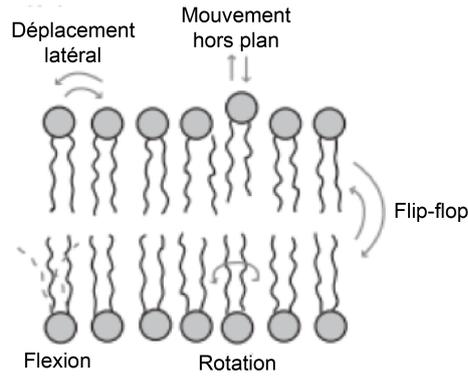


Figure A.5 : Schéma représentatif des mouvements de lipides au sein d'une membrane.

II.3 Modes de déformation de la membrane

La forme d'une membrane lipidique au repos dépend de sa composition : si les deux feuillets de lipides composant la bicouche sont rigoureusement symétriques, la membrane est plane. En revanche, toute asymétrie entre les deux feuillets génèrera une courbure spontanée et donc une forme non plane. Soumise à des forces extérieures, la membrane peut se déformer, et cette déformation peut être décomposée en trois modes indépendants : l'extension, le courbure et le cisaillement.

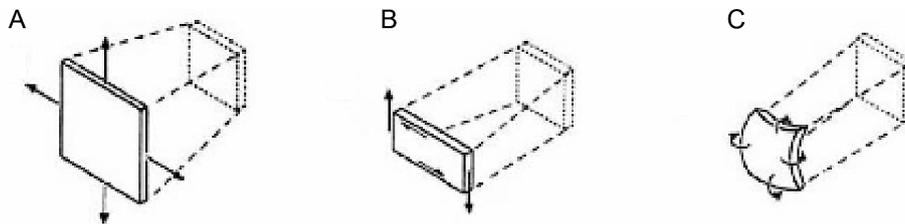


Figure A.6 : Modes de déformation d'une membrane plane. (A) Extension (B) Cisaillement (C) Courbure. [Evans et al., 1987]

Pour une bicouche en phase fluide, seuls les deux premiers modes sont à prendre en compte, la résistance au cisaillement de la membrane étant négligeable dans ce cas, étant donné que les lipides se déplacent librement au sein de leur feuillet.

Une extension (ou une compression) de la membrane va modifier l'aire par lipide. Lorsqu'une membrane d'aire A est étirée d'une aire $A + \delta A$, la densité d'énergie associée à cette déformation s'écrit :

$$g_{ext} = \frac{1}{2}K \left(\frac{\delta A}{A} \right)^2 \quad (\text{A.1})$$

où K est le module de compressibilité de la membrane. L'extension des bicouches lipidiques se limite à de faibles déformations, étant donné qu'augmenter leur aire de plus de 1% provoque leur rupture [Evans&Needham, 1987].

Contrairement au mode précédent, la déformation par courbure a lieu à aire constante. La densité d'énergie correspondante s'exprime sous la forme suivante, appelée équation d'Helfrich :

$$g_{bend} = \frac{1}{2}\kappa(c_1 + c_2 - c_0)^2 + \frac{1}{2}\kappa_G c_1 c_2 \quad (\text{A.2})$$

où c_1 et c_2 sont respectivement les courbures principales de la surface (inverse des rayons de courbure, comme illustré sur la Figure A.7), c_0 la courbure spontanée, κ le module de courbure principal et κ_G le module de courbure gaussien.

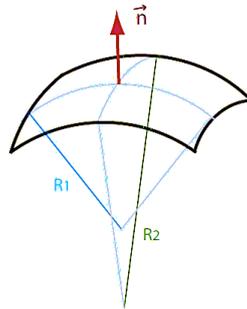


Figure A.7 : Exemple de surface courbe décrite par ses deux courbures principales $c_1=1/R_1$ et $c_2=1/R_2$.

Il est à noter que dans la théorie classique des coques minces, le module de courbure κ est appelé « rigidité flexurale ». Il est lié au module d'Young E , au coefficient de Poisson ν et à l'épaisseur h de la membrane par la relation suivante [Landau&Lifshitz, 1959]:

$$\kappa = \frac{Eh^3}{12(1 - \nu^2)} \quad (\text{A.3})$$

Le tableau A.3 donne un aperçu de l'ordre de grandeur du module de compressibilité K et du module de courbure κ pour différents lipides.

Tableau A.3 : Module de compressibilité et module de courbure de différentes membranes lipidiques en phase fluide [Rawicz et al., 2000]

Lipide	K (mN/m)	κ (10^{-19} J)
diC13:0	239 \pm 15	0.56 \pm 0.07
diC14:0 (DMPC)	234 \pm 23	0.56 \pm 0.06
diC18:1c9 (DOPC)	265 \pm 18	0.85 \pm 0.10
diC20:4	250 \pm 10	0.44 \pm 0.05
diC22:1	263 \pm 10	1.2 \pm 0.15

Le module de courbure de la membrane en phase fluide est relativement faible, de l'ordre de 10 fois $k_B T$, l'énergie caractéristique de l'agitation des molécules. Les membranes fluides sont donc des objets extrêmement mous qui sont sujets à des fluctuations d'origine thermique [Helfrich, 1973].

II.4 Propriétés électrostatiques : rappels sur la double couche électrique

Comme pour tout objet chargé en solution, la surface de la membrane va modifier la distribution des ions du milieu environnant et se retrouver entourée d'une double couche électrique de contreions, dont la structure est représentée sur la Figure A.8.

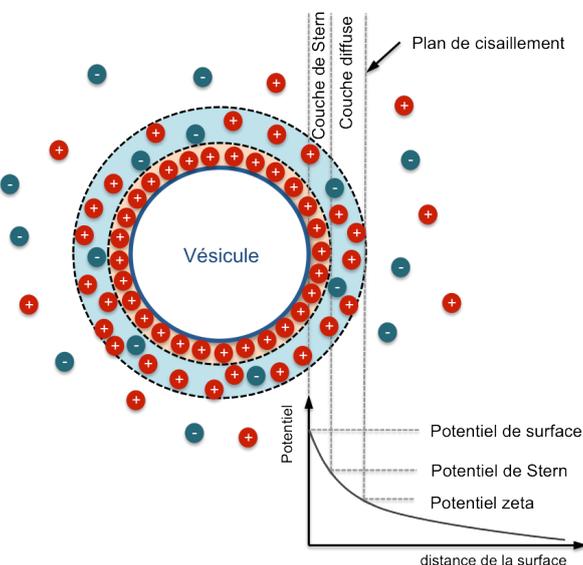


Figure A.8 : Représentation schématique de la double couche électrique autour d'une vésicule chargée en solution.

En prenant l'exemple d'une vésicule dont la membrane est chargée négativement, des cations vont venir s'adsorber sur la surface et former ce que l'on appelle la couche de Stern, elle-même entourée d'une couche de cations moins dense, la couche diffuse. La limite extérieure de

cette dernière définit le plan de cisaillement, c'est à dire la limite au delà de laquelle les ions de la solution environnante ne sont pas affectés par la charge de la vésicule. Lorsque celle-ci va se déplacer, seuls les ions compris entre sa surface et le plan de cisaillement se déplaceront avec elle.

Le potentiel électrostatique ψ de cette double couche peut être décrit par l'équation de Poisson-Boltzmann :

$$\frac{d\psi^2}{dx^2} = -\frac{ze\rho}{\varepsilon_D} = -\left(\frac{ze\rho_0}{\varepsilon_D}\right)e^{-ze\psi/kT} \quad (\text{A.4})$$

où e est la charge élémentaire, ρ correspond à la densité de charges d'ions de valence z , à une distance x de la surface chargée, ε_D étant la permittivité diélectrique du solvant. La résolution de cette équation aboutit à une longueur caractéristique définissant la distance d'écrantage de la charge de surface par le « halo » de contre-ions. Cette grandeur est appelée longueur de Debye (λ_D) et s'exprime :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_D k_B T}{2e^2 c_0 z^2}} \quad (\text{A.5})$$

où k_B est la constante de Boltzmann et c_0 la concentration en ions dans la solution. La longueur de Debye correspond à l'épaisseur de la couche diffuse, et diminue quand la force ionique de la solution augmente.

Références bibliographiques

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th edition.

Allen, T. M. & Chonn, A. (1987). Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.*, 223(1): 42-46.

Anderson, C. T., Carroll, A., Akhmetova, L. & Somerville, C. (2010). Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.*, 152: 787-796.

Andresen, M. & Stenius, P. (2007). Water-in-oil Emulsions Stabilized by Hydrophobized Microfibrillated Cellulose. *J. Dispersion Sci. Technol.*, 28(6): 837-844.

Antipov, A. A., Sukhorukov, G. B., Donath, E. & Moehwald, H. (2001). Sustained Release Properties of Polyelectrolyte Multilayer Capsules. *J. Phys. Chem. B*, 105(12): 2281-2284.

Antipov, A. A., Sukhorukov, G. B., Leporatti, S., Radtchenko, I. L., Donath, E. & Mohwald, H. (2002). Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control. *Colloids Surf., A*, 198-200: 535-541.

Antipov, A. A., Sukhorukov, G. B. & Moehwald, H. (2003). Influence of the Ionic Strength on the Polyelectrolyte Multilayers' Permeability. *Langmuir*, 19(6): 2444-2448.

Ariga, K., Ji, Q., McShane, M. J., Lvov, Y. M., Vinu, A. & Hill, J. P. (2012). Inorganic Nanoarchitectonics for Biological Applications. *Chem. Mater.*, 24(5): 728-737.

Bailly, A. (2012). Elaboration and deformability of biomimetic systems, Université Grenoble Alpes.

Bangham, A. D., Hill, M. W. & Miller, N. G. A. (1974). Preparation and Use of Liposomes as Models of Biological Membranes. Methods in Membrane Biology: Volume 1. E. D. Korn. Boston, MA, Springer US: 1-68.

Baumler, H., Artmann, G., Voigt, A., Mitlohner, R., Neu, B. & Kiewewetter, H. (2000). Plastic behaviour of polyelectrolyte microcapsules derived from colloid templates. *J Microencapsul*, 17(5): 651-655.

Beauzamy, L., Boudaoud, A. & Nakayama, N. (2014). Flowers under pressure: ins and outs of turgor regulation in development. *Ann Bot*, 114: 1517-1533.

Beauzamy, L., Derr, J. & Boudaoud, A. (2015). Quantifying Hydrostatic Pressure in Plant Cells by Using Indentation with an Atomic Force Microscope. *Biophys. J.*, 108: 2448-2456.

Benkert, R., Obermeyer, G. & Bentrup, F.-W. (1997). The turgor pressure of growing lily pollen tubes. *Protoplasma*, 198(1): 1-8.

Bernard, A.-L., Guedeau-Boudeville, M.-A., Jullien, L. & di Meglio, J.-M. (2002). Raspberry vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1567: 1-5.

Binder, W. H., Sachsenhofer, R., Farnik, D. & Blaas, D. (2007). Guiding the location of nanoparticles into vesicular structures: a morphological study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9(48): 6435-6441.

Blaker, J. J., Lee, K.-Y., Li, X., Menner, A. & Bismarck, A. (2009). Renewable nanocomposite polymer foams synthesized from Pickering emulsion templates. *Green Chem.*, 11(9): 1321-1326.

- Blewett, J., Burrows, K. & Thomas, C. (2000). A micromanipulation method to measure the mechanical properties of single tomato suspension cells. *Biotechnol. Lett.*, 22(23): 1877-1883.
- Böckmann, R. A., Hac, A., Heimburg, T. & Grubmüller, H. (2003). Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer. *Biophysical Journal*, 85(3): 1647-1655.
- Boroske, E., Elwenspoek, M. & Helfrich, W. (1981). Osmotic shrinkage of giant egg-lecithin vesicles. *Biophys. J.*, 34: 95-109.
- Bowen, W. R., Lovitt, R. W. & Wright, C. J. (2000). Application of atomic force microscopy to the study of micromechanical properties of biological materials. *Biotechnol. Lett.*, 22: 893-903.
- Boyer, J. S. (2009). Evans Review: Cell wall biosynthesis and the molecular mechanism of plant enlargement. *Funct. Plant Biol.*, 36(5): 383-394.
- Burgert, I. & Keplinger, T. (2013). Plant micro- and nanomechanics: experimental techniques for plant cell-wall analysis. *J. Exp. Bot.*, 64: 4635-4649.
- Burton, R. A., Gidley, M. J. & Fincher, G. B. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 6: 724-732.
- Campillo, C. C., Schroder, A. P., Marques, C. M. & Pepin-Donat, B. (2009). Composite gel-filled giant vesicles: Membrane homogeneity and mechanical properties. *Mater. Sci. Eng., C*, 29: 393-397.
- Cannon, M. C., Terneus, K., Hall, Q., Wang, Y., Wegenhart, B. L., Chen, L., Lamport, D. T. A., Chen, Y. & Kieliszewski, M. J. (2008). Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(6): 2226-2231.
- Caridade, S. G., Monge, C., Gilde, F., Boudou, T., Mano, J. F. & Picart, C. (2013). Free-Standing Polyelectrolyte Membranes Made of Chitosan and Alginate. *Biomacromolecules*, 14: 1653-1660.
- Carlsen, A., Glaser, N., Le Meins, J.-F. & Lecommandoux, S. (2011). Block Copolymer Vesicle Permeability Measured by Osmotic Swelling and Shrinking. *Langmuir*, 27(8): 4884-4890.
- Caruso, F., Trau, D., Moehwald, H. & Renneberg, R. (2000). Enzyme Encapsulation in Layer-by-Layer Engineered Polymer Multilayer Capsules. *Langmuir*, 16(4): 1485-1488.
- Carvalho, K., Ramos, L., Roy, C. & Picart, C. (2008). Giant unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate: characterization and functionality. *Biophys. J.*, 95: 4348-4360.
- Casals, E., Galan, A. M., Escolar, G., Gallardo, M. & Estelrich, J. (2003). Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. *Chem. Phys. Lipids*, 125(2): 139-146.
- Cerclier, C., Cousin, F., Bizot, H., Moreau, C. I. & Cathala, B. (2010). Elaboration of Spin-Coated Cellulose-Xyloglucan Multilayered Thin Films. *Langmuir*, 26(22): 17248-17255.
- Cerclier, C., Guyomard-Lack, A., Moreau, C., Cousin, F., Beury, N., Bonnin, E., Jean, B. & Cathala, B. (2011). Coloured Semi-reflective Thin Films for Biomass-hydrolyzing Enzyme Detection. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)*, 23(33): 3791-3795.
- Chambat, G., Karmous, M., Costes, M., Picard, M. & Joseleau, J.-P. (2005). Variation of xyloglucan substitution pattern affects the sorption on celluloses with different degrees of crystallinity. *Cellulose (Dordrecht, Neth.)*, 12(2): 117-125.
- Chanliaud, E., Burrows, K., Jeronimidis, G. & Gidley, M. (2002). Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta*, 215(6): 989-996.

- Chanliaud, E. & Gidley, M. J. (1999). In vitro synthesis and properties of pectin/*Acetobacter xylinus* cellulose composites. *Plant J.*, 20: 25-35.
- Cho, J., Char, K., Hong, J.-D. & Lee, K.-B. (2001). Fabrication of highly ordered multilayer films using a spin self-assembly method. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)*, 13(14): 1076-1078.
- Chun, J.-Y., Choi, M.-J., Min, S.-G. & Weiss, J. (2013). Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers. *Food Hydrocolloids*, 30(1): 249-257.
- Ciobanu, M., Heurtault, B., Schultz, P., Ruhlmann, C., Muller, C. D. & Frisch, B. (2007). Layersome: Development and optimization of stable liposomes as drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 344(1-2): 154-157.
- Clipson, N. J. W., Tomos, A. D., Flowers, T. J. & Jones, R. G. W. (1985). Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima* L. Dum. *Planta*, 165(3): 392-396.
- Cosgrove, D. J. (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13: 171-201.
- Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407.
- Cosgrove, D. J. (2003). Expansion of the plant cell wall. Annual Plant Reviews, The Plant Cell Wall. J. K. C. Rose, Blackwell Publishing. **8**: 237-263.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11): 850-861.
- Cybulska, J., Vanstreels, E., Ho, Q. T., Courtin, C. M., Van Craeyveld, V., Nicolai, B., Zdunek, A. & Konstankiewicz, K. (2009). Mechanical characteristics of artificial cell walls. *J. Food Eng.*, 96(2): 287-294.
- Dammak, A., Moreau, C., Beury, N., Schwikal, K., Winter, H. T., Bonnin, E., Saake, B. & Cathala, B. (2013). Elaboration of multilayered thin films based on cellulose nanocrystals and cationic xylans: application to xylanase activity detection. *Holzforchung*, 67(5): 579-586.
- Dammak, A., Quemener, B., Bonnin, E., Alvarado, C., Bouchet, B., Villares, A., Moreau, C. & Cathala, B. (2015). Exploring Architecture of Xyloglucan Cellulose Nanocrystal Complexes through Enzyme Susceptibility at Different Adsorption Regimes. *Biomacromolecules*, 16: 589-596.
- Dammström, S., Salmén, L. & Gatenholm, P. (2005). The effect of moisture on the dynamical mechanical properties of bacterial cellulose/glucuronoxylan nanocomposites. *Polymer*, 46(23): 10364-10371.
- de Lima, D. U. & Buckeridge, M. S. (2001). Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. *Carbohydrate Polymers*, 46(2): 157-163.
- de Souza, C. F., Lucyszyn, N., Woehl, M. A., Riegel-Vidotti, I. C., Borsali, R. & Sierakowski, M. R. (2013). Property evaluations of dry-cast reconstituted bacterial cellulose/tamarind xyloglucan biocomposites. *Carbohydr. Polym.*, 93(1): 144-153.
- Decher, G. (1997). Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science (Washington, D. C.)*, 277: 1232-1237.
- Decher, G., Hong, J. D. & Schmitt, J. (1992). Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process:III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 210-211(Part 2): 831-835.
- Decher, G. & Schlenoff, J. B. (2012). Multilayer thin films : sequential assembly of nanocomposite materials, second edition. Germany.

- Dick-Perez, M., Wang, T., Salazar, A., Zobotina, O. A. & Hong, M. (2012). Multidimensional solid-state NMR studies of the structure and dynamics of pectic polysaccharides in uniformly ^{13}C -labeled Arabidopsis primary cell walls. *Magn. Reson. Chem.*, 50: 539-550.
- Dick-Perez, M., Zhang, Y., Hayes, J., Salazar, A., Zobotina, O. A. & Hong, M. (2011). Structure and Interactions of Plant Cell-Wall Polysaccharides by Two- and Three-Dimensional Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR. *Biochemistry*, 50: 989-1000.
- Dieluweit, S., Csiszár, A., Rubner, W., Fleischhauer, J., Houben, S. & Merkel, R. (2010). Mechanical Properties of Bare and Protein-Coated Giant Unilamellar Phospholipid Vesicles. A Comparative Study of Micropipet Aspiration and Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, 26(13): 11041-11049.
- Dobereiner, H.-G. (2000). Properties of giant vesicles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 5(3,4): 256-263.
- Donath, E., Sukhorukov, G. B., Caruso, F., Davis, S. & Möhwald, H. (1998). Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes. *Angew. Chem.*, 37(16): 2202.
- Dong, C. & Rogers, J. A. (1991). Polymer-coated liposomes: stability and release of ASA from carboxymethyl chitin-coated liposomes. *J. Controlled Release*, 17(3): 217-224.
- Dubreuil, F., Elsner, N. & Fery, A. (2003). Elastic properties of polyelectrolyte capsules studied by atomic-force microscopy and RICM. *The European Physical Journal E - Soft Matter*, 12(2): 215-221.
- Durrieu, P. J.-L., Passas R., Gandini A. (2004). Cryo-TEM and Image Analysis of Polymer Nanoparticle Dispersions. *Microscopy and Analysis*, 18: 19-21.
- Edholm, O. & Nagle, J. F. (2005). Areas of molecules in membranes consisting of mixtures. *Biophys. J.*, 89(3): 1827-1832.
- Elazzouzi-Hafraoui, S., Nishiyama, Y., Putaux, J.-L., Heux, L., Dubreuil, F. & Rochas, C. (2008). The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. *Biomacromolecules*, 9(1): 57-65.
- Emons, A. M. & Mulder, B. M. (2000). How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. *Trends Plant Sci*, 5(1): 35-40.
- Emons, A. M. C., Hoefte, H. & Mulder, B. M. (2007). Microtubules and cellulose microfibrils: how intimate is their relationship? *Trends Plant Sci.*, 12: 279-281.
- Evans, E. & Needham, D. (1987). Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.*, 91(16): 4219-4228.
- Fakhrullin, R. F. & Lvov, Y. M. (2012). "Face-Lifting" and "Make-Up" for Microorganisms: Layer-by-Layer Polyelectrolyte Nanocoating. *ACS Nano*, 6(6): 4557-4564.
- Feng, S.-S., Ruan, G. & Li, Q.-T. (2004). Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes-in-microsphere (LIM). *Biomaterials*, 25(21): 5181-5189.
- Fery, A., Dubreuil, F. & Moehwald, H. (2004). Mechanics of artificial microcapsules. *New J. Phys.*, 6: No pp. given, Paper No. 18.
- Finkelstein, M. C. & Weissmann, G. (1979). Enzyme replacement via liposomes. Variations in lipid composition determine liposomal integrity in biological fluids. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 587(2): 202-216.
- Fleming, A. J., McQueen-Mason, S., Mandel, T. & Kuhlemeier, C. (1997). Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin. *Science (Washington, D. C.)*, 276(5317): 1415-1418.

- Forouzes, E., Goel, A., Mackenzie, S.A. and Turner J.A. (2013). In vivo extraction of Arabidopsis thaliana cell turgor pressure using nanoindentation in conjunction with finite elements modeling. *The Plant Journal*, 73: 509-520.
- Franks, P. J., Buckley, T. N., Shope, J. C. & Mott, K. A. (2001). Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe. *Plant Physiol.*, 125(4): 1577-1584.
- Fry, S. C. (1995). Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 497-520.
- Fry, S. C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem. J.*, 332(2): 507-515.
- Fukui, Y. & Fujimoto, K. (2009). The Preparation of Sugar Polymer-Coated Nanocapsules by the Layer-by-Layer Deposition on the Liposome. *Langmuir*, 25(17): 10020-10025.
- Gad, A. E., Silver, B. L. & Eytan, G. D. (1982). Polycation-induced fusion of negatively-charged vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 690(1): 124-132.
- Gao, C., Donath, E., Moya, S., Dudnik, V. & Mohwald, H. (2001a). Elasticity of hollow polyelectrolyte capsules prepared by the layer-by-layer technique. *Eur. Phys. J. E*, 5: 21-27.
- Gao, C., Leporatti, S., Moya, S., Donath, E. & Moehwald, 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: 3491-3495.
- Ge, L., Möhwald, H. & Li, J. (2003). Phospholipid liposomes stabilized by the coverage of polyelectrolyte. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 221(1-3): 49-53.
- Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoche, P. & Maurel, C. (2002). The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J.*, 30(1): 71-81.
- Germain, M., Grube, S., Carriere, V., Richard-Foy, H., Winterhalter, M. & Fournier, D. (2006). Composite Nanocapsules: Lipid Vesicles Covered with Several Layers of Crosslinked Polyelectrolytes. *Advanced Materials*, 18(21): 2868-2871.
- Gorter, E. & Grendel, F. (1927). Bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.*, 29: 314-317.
- Griffiths, A., Parry, A. D., Jones, H. G. & Tomos, A. D. (1996). Abscisic acid and turgor pressure regulation in tomato roots. *J. Plant Physiol.*, 149(3/4): 372-376.
- Gu, J. & Catchmark, J. M. (2014). Roles of xyloglucan and pectin on the mechanical properties of bacterial cellulose composite films. *Cellulose (Dordrecht, Neth.)*, 21: 275-289.
- Guo, J., Ping, Q., Jiang, G., Huang, L. & Tong, Y. (2003). Chitosan-coated liposomes: characterization and interaction with leuprolide. *Int. J. Pharm.*, 260(2): 167-173.
- Habibi, Y., Lucia, L. A. & Rojas, O. J. (2010). Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)*, 110: 3479-3500.
- Hamant, O., Heisler, M. G., Joensson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Bokov, P., Corson, F., Sahlin, P., Boudaoud, A., Meyerowitz, E. M., Couder, Y. & Traas, J. (2008). Developmental patterning by mechanical signals in Arabidopsis. *Science (Washington, DC, U. S.)*, 322(Copyright (C) 2016 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1650-1655.
- Hanus, J. & Mazeau, K. (2006). The xyloglucan–cellulose assembly at the atomic scale. *Biopolymers*, 82(1): 59-73.

- Hardham, A. R., Takemoto, D. & White, R. G. (2008). Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of Arabidopsis epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC Plant Biol*, 8: 63.
- Hayashi, T., Marsden, M. P. F. & Delmer, D. P. (1987). Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiol.*, 83: 384-389.
- Hayashi, T., Takeda, T., Ogawa, K. & Mitsuishi, Y. (1994). Effects of the Degree of Polymerization on the Binding of Xyloglucans to Cellulose. *Plant and Cell Physiology*, 35(6): 893-899.
- Hayot, C. M., Forouzesh, E., Goel, A., Avramova, Z. & Turner, J. A. (2012). Viscoelastic properties of cell walls of single living plant cells determined by dynamic nanoindentation. *J. Exp. Bot.*, 63(7): 2525-2540.
- Held, M. A., Tan, L., Kamyab, A., Hare, M., Shpak, E. & Kieliszewski, M. J. (2004). Di-isodityrosine Is the Intermolecular Cross-link of Isodityrosine-rich Extensin Analogs Cross-linked in Vitro. *J. Biol. Chem.*, 279(53): 55474-55482.
- Helfer, E., Harlepp, S., Bourdieu, L., Robert, J., MacKintosh, F. C. & Chatenay, D. (2000). Microrheology of Biopolymer-Membrane Complexes. *Physical Review Letters*, 85(2): 457-460.
- Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers. Theory and possible experiments. *Z. Naturforsch., Teil C*, 28(11-12): 693-703.
- Heuvingh, J., Zappa, M. & Fery, A. (2005). Salt Softening of Polyelectrolyte Multilayer Capsules. *Langmuir*, 21(7): 3165-3171.
- Husken, D., Steudle, E. & Zimmermann, U. (1978). Pressure probe technique for measuring water relations of cells in higher plants. *Plant Physiol*, 61(2): 158-163.
- Ibarz, G., Dahne, L., Donath, E. & Mohwald, H. (2001). Smart micro- and nanocontainers for storage, transport, and release. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)*, 13(17): 1324-1327.
- Ibarz, G., Dahne, L., Donath, E. & Mohwald, H. (2002). Resealing of polyelectrolyte capsules after core removal. *Macromol. Rapid Commun.*, 23(8): 474-478.
- Iler, R. K. (1966). Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 21(6): 569-594.
- Israelachvili, J. (1992). Intermolecular & surface forces, Academic Press Inc.
- Iwamoto, S., Kai, W., Isogai, A. & Iwata, T. (2009). Elastic Modulus of Single Cellulose Microfibrils from Tunicate Measured by Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules*, 10(9): 2571-2576.
- Jain, P., Jain, S., Prasad, K. N., Jain, S. K. & Vyas, S. P. (2009). Polyelectrolyte Coated Multilayered Liposomes (Nanocapsules) for the Treatment of Helicobacter pylori Infection. *Molecular Pharmaceutics*, 6(2): 593-603.
- Jamshaid, M., Farr, S. J., Kearney, P. & Kellaway, I. W. (1988). Poloxamer sorption on liposomes: comparison with polystyrene latex and influence on solute efflux. *International Journal of Pharmaceutics*, 48: 125-131.
- Javot, H., Lauvergeat, V., Santoni, V., Martin-Laurent, F., Guclu, J., Vinh, J., Heyes, J., Franck, K. I., Schaffner, A. R., Bouchez, D. & Maurel, C. (2003). Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell*, 15(2): 509-522.
- Jean, B., Dubreuil, F., Heux, L. & Cousin, F. (2008). Structural Details of Cellulose Nanocrystals/Polyelectrolytes Multilayers Probed by Neutron Reflectivity and AFM. *Langmuir*, 24: 3452-3458.

- Jean, B., Heux, L., Dubreuil, F. d. r., Chambat, G. r. & Cousin, F. (2009). Non-Electrostatic Building of Biomimetic Cellulose–Xyloglucan Multilayers. *Langmuir*, 25(7): 3920-3923.
- Joardder, M. U. H. K., Azharul; Kumar, Chandan; Brown, Richard J. (2014). Effect of cell wall properties of plant tissue on porosity and shrinkage of dried apple. *Proceedings of the 2014 International Conference on Food Properties*.
- Johal, M. S. & Chiarelli, P. A. (2007). Polymer-surfactant complexation in polyelectrolyte multilayer assemblies. *Soft Matter*, 3(1): 34-46.
- Kaku, T., Tabuchi, A., Wakabayashi, K., Kamisaka, S. & Hoson, T. (2002). Action of Xyloglucan Hydrolase within the Native Cell Wall Architecture and Its Effect on Cell Wall Extensibility in Azuki Bean Epicotyls. *Plant and Cell Physiology*, 43(1): 21-26.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Bertoncini, P., Cathala, B. & Capron, I. (2013). Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. *Soft Matter*, 9(3): 952-959.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B. & Capron, I. (2011). New Pickering Emulsions Stabilized by Bacterial Cellulose Nanocrystals. *Langmuir*, 27: 7471-7479.
- Kennedy, M. T., Pozharski, E. V., Rakhmanova, V. A. & MacDonald, R. C. (2000). Factors governing the assembly of cationic phospholipid-DNA complexes. *Biophys. J.*, 78(3): 1620-1633.
- Kharlampieva, E., Kozlovskaya, V., Tyutina, J. & Sukhishvili, S. A. (2005). Hydrogen-Bonded Multilayers of Thermoresponsive Polymers. *Macromolecules*, 38(25): 10523-10531.
- Kim, B.-S., Fan, T.-H., Lebedeva, O. V. & Vinogradova, O. I. (2005a). Superswollen Ultrasoft Polyelectrolyte Microcapsules. *Macromolecules*, 38(19): 8066-8070.
- Kim, B.-S., Lebedeva, O. V., Kim, D. H., Caminade, A.-M., Majoral, J.-P., Knoll, W. & Vinogradova, O. I. (2005b). Assembly and Mechanical Properties of Phosphorus Dendrimer/Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules. *Langmuir*, 21(16): 7200-7206.
- Kohler, L., Speck, T. & Spatz, H.-C. (2000). Micromechanics and anatomical changes during early ontogeny of two lianescent *Aristolochia* species. *Planta*, 210(5): 691-700.
- Kostarelos, K., Emfietzoglou, D. & Tadros, T. F. (2005). Light-sensitive fusion between polymer-coated liposomes following physical anchoring of polymerisable polymers onto lipid bilayers by self-assembly. *Faraday Discussions*, 128: 379.
- Kozlovskaya, V., Ok, S., Sousa, A., Libera, M. & Sukhishvili, S. A. (2003). Hydrogen-Bonded Polymer Capsules Formed by Layer-by-Layer Self-Assembly. *Macromolecules*, 36(23): 8590-8592.
- Landau, L. D. & Lifshitz, E. M. (1959). *Theory of Elasticity*, Addison-Wesley Pub. Co.
- Larkin, A. L., Davis, R. M. & Rajagopalan, P. (2010). Biocompatible, Detachable, and Free-Standing Polyelectrolyte Multilayer Films. *Biomacromolecules*, 11: 2788-2796.
- Lasic, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.*, 16(7): 307-321.
- Laurencin, M., Georgelin, T., Malezieux, B., Siaugue, J.-M. & Ménager, C. (2010). Interactions Between Giant Unilamellar Vesicles and Charged Core–Shell Magnetic Nanoparticles. *Langmuir*, 26(20): 16025-16030.
- Levy, I., Shani, Z. & Shoseyov, O. (2002). Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- β -glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular Engineering*, 19(1): 17-30.

- Li, S. & Malmstadt, N. (2013). Deformation and poration of lipid bilayer membranes by cationic nanoparticles. *Soft Matter*, 9: 4969-4976.
- Li, Y., Wang, X. & Sun, J. (2012). Layer-by-layer assembly for rapid fabrication of thick polymeric films. *Chem. Soc. Rev.*, 41(18): 5998-6009.
- Lima, D. U., Loh, W. & Buckeridge, M. S. (2004). Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. *Plant Physiol. Biochem. (Amsterdam, Neth.)*, 42(5): 389-394.
- Limozin, L., Roth, A. & Sackmann, E. (2005). Microviscoelastic Moduli of Biomimetic Cell Envelopes. *Physical Review Letters*, 95(17): 178101.
- Lintilhac, P. M., Wei, C., Tanguay, J. J. & Outwater, J. O. (2000). Ball tonometry: a rapid, nondestructive method for measuring cell turgor pressure in thin-walled plant cells. *J. Plant Growth Regul.*, 19: 90-97.
- Lipowski, R. & Sackmann, E. (1995). Structure and Dynamics of Membranes. Amsterdam, Elsevier Science.
- Liu, J., Lu, N., Li, J., Weng, Y., Yuan, B., Yang, K. & Ma, Y. (2013a). Influence of Surface Chemistry on Particle Internalization into Giant Unilamellar Vesicles. *Langmuir*, 29: 8039-8045.
- Liu, W., Liu, J., Liu, W., Li, T. & Liu, C. (2013b). Improved Physical and in Vitro Digestion Stability of a Polyelectrolyte Delivery System Based on Layer-by-Layer Self-Assembly Alginate-Chitosan-Coated Nanoliposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17): 4133-4144.
- Lockhart, J. A. (1965). An analysis of irreversible plant cell elongation. *J Theor Biol*, 8: 264-275.
- Lopez, M., Bizot, H., Chambat, G., Marais, M.-F., Zykwinska, A., Ralet, M.-C., Driguez, H. & Buléon, A. (2010). Enthalpic Studies of Xyloglucan-Cellulose Interactions. *Biomacromolecules*, 11: 1417-1428.
- Lulevich, V. V., Andrienko, D. & Vinogradova, O. I. (2003a). Elasticity of polyelectrolyte multilayer microcapsules. *Los Alamos Natl. Lab., Prepr. Arch., Condens. Matter*: 1-4, arXiv:cond-mat/0306737.
- Lulevich, V. V., Radtchenko, I. L., Sukhorukov, G. B. & Vinogradova, O. I. (2003b). Mechanical Properties of Polyelectrolyte Microcapsules Filled with a Neutral Polymer. *Macromolecules*, 36: 2832-2837.
- Mahmoudi, M., Meng, J., Xue, X., Liang, X. J., Rahman, M., Pfeiffer, C., Hartmann, R., Gil, P. R., Pelaz, B., Parak, W. J., del Pino, P., Carregal-Romero, S., Kanaras, A. G. & Tamil Selvan, S. (2014). Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes. *Biotechnol. Adv.*, (Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): Ahead of Print.
- Malcolm Brown Jr, R., Saxena, I. M. & Kudlicka, K. (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science*, 1(5): 149-156.
- Martin, C. (2015). Films multicouches à base de nanocristaux de cellulose : relation entre structure et propriétés mécanique et/ou optique Université Grenoble-Alpes.
- Martin, C. & Jean, B. (2014). Nanocellulose/polymer multilayered thin films: tunable architectures towards tailored physical properties. *Nord. Pulp Pap. Res. J.*, 29(1): 19-30.
- Martinez-Sanz, M., Lopez-Sanchez, P., Gidley, M. J. & Gilbert, E. P. (2015). Evidence for differential interaction mechanism of plant cell wall matrix polysaccharides in hierarchically-structured bacterial cellulose. *Cellulose (Dordrecht, Neth.)*, 22: 1541-1563.
- Mathai, J. C., Tristram-Nagle, S., Nagle, J. F. & Zeidel, M. L. (2008). Structural determinants of water permeability through the lipid membrane. *J. Gen. Physiol.*, 131: 69-76.

- Matsusaki, M., Sakaguchi, H., Serizawa, T. & Akashi, M. (2007). Controlled release of vascular endothelial growth factor from alginate hydrogels nano-coated with polyelectrolyte multilayer films. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 18(6): 775-783.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M. & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell*, 4(11): 1425-1433.
- McQueen-Mason, S. J. (1995). Expansins and cell wall expansion. *J. Exp. Bot.*, 46(11): 1639-1650.
- McQueen-Mason, S. J. & Cosgrove, D. J. (1995). Expansin Mode of Action on Cell Walls (Analysis of Wall Hydrolysis, Stress Relaxation, and Binding). *Plant Physiology*, 107(1): 87-100.
- Menger, F. M. (1998). Giant vesicles: Imitating the cytological processes of cell membranes. *Accounts of Chemical Research*, 31(12): 789-797.
- Menger, F. M. & Keiper, J. S. (1998). Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2: 726-732.
- Merkel, R., Simson, R., Simson, D. A., Hohenadl, M., Boulbitch, A., Wallraff, E. & Sackmann, E. (2000). A micromechanic study of cell polarity and plasma membrane cell body coupling in Dictyostelium. *Biophys. J.*, 79(2): 707-719.
- Mertins, O., da Silveira, N. P., Pohlmann, A. R., Schröder, A. P. & Marques, C. M. (2009). Electroformation of Giant Vesicles from an Inverse Phase Precursor. *Biophysical Journal*, 96(7): 2719-2726.
- Mertins, O. & Dimova, R. (2013). Insights on the Interactions of Chitosan with Phospholipid Vesicles. Part II: Membrane Stiffening and Pore Formation. *Langmuir*, 29: 14552-14559.
- Miao, L., Seifert, U., Wortis, M. & Doebereiner, H. G. (1994). Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: the effect of area-difference elasticity. *Phys. Rev. E: Stat. Phys., Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, 49(6-A): 5389-5407.
- Milani, P., Braybrook, S. A. & Boudaoud, A. (2013). Shrinking the hammer: micromechanical approaches to morphogenesis. *J Exp Bot*, 64(Copyright (C) 2016 U.S. National Library of Medicine.): 4651-4662.
- Milani, P., Gholamirad, M., Traas, J., Arneodo, A., Boudaoud, A., Argoul, F. & Hamant, O. (2011). In vivo analysis of local wall stiffness at the shoot apical meristem in Arabidopsis using atomic force microscopy. *Plant J.*, 67: 1116-1123.
- Mobed, M. & Chang, T. M. S. (1998). Comparison of polymerically stabilized PEG-grafted liposomes and physically adsorbed carboxymethylchitin and carboxymethyl/glycolchitin liposomes for biological applications. *Biomaterials*, 19: 1167-1177.
- Monro, J. A., Penny, D. & Bailey, R. W. (1976). The organization and growth of primary cell walls of lupine hypocotyl. *Phytochemistry*, 15: 1193-1198.
- Monteiro, N., Martins, A., Reis, R. L. & Neves, N. M. (2014). Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(101).
- Montis, C., Maiolo, D., Alessandri, I., Bergese, P. & Berti, D. (2014). Interaction of nanoparticles with lipid membranes: a multiscale perspective. *Nanoscale*, 6(12): 6452-6457.
- Mui, B. L. S., Doebereiner, H. G., Madden, T. D. & Cullis, P. R. (1995). Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles. *Biophys. J.*, 69(3): 930-941.
- Mulder, B. M. & Emons, A. M. (2001). A dynamical model for plant cell wall architecture formation. *J Math Biol*, 42(3): 261-289.

- Muller, F. o., Manet, S., Jean, B., Chambat, G. r., Boué, F. o., Heux, L. & Cousin, F. (2011). SANS Measurements of Semiflexible Xyloglucan Polysaccharide Chains in Water Reveal Their Self-Avoiding Statistics. *Biomacromolecules*, 12(9): 3330-3336.
- Nagle, J. F. & Tristram-Nagle, S. (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 1469(3): 159-195.
- Neu, B., Voigt, A., Mitlohner, R., Leporatti, S., Gao, C. Y., Donath, E., Kiesewetter, H., Mohwald, H., Meiselman, H. J. & Baumler, H. (2001). Biological cells as templates for hollow microcapsules. *J. Microencapsulation*, 18(3): 385-395.
- Nielsen, L. J., Eyley, S., Thielemans, W. & Aylott, J. W. (2010). Dual fluorescent labelling of cellulose nanocrystals for pH sensing. *Chemical Communications*, 46(47): 8929.
- Noguchi, H. & Takasu, M. (2002). Adhesion of nanoparticles to vesicles: a Brownian dynamics simulation. *Biophys. J.*, 83(1): 299-308.
- Nolte, A. J., Rubner, M. F. & Cohen, R. E. (2005). Determining the Young's modulus of polyelectrolyte multilayer films via stress-induced mechanical buckling instabilities. *Macromolecules*, 38(13): 5367-5370.
- Nonami, H., Boyer, J. S. & Steudle, E. (1987). Pressure probe and isopiestic psychrometer measure similar turgor. *Plant Physiol*, 83(3): 592-595.
- O'Neill, M. A. & York, W. S. (2003). The composition and structure of plant primary cell walls. *Annu. Plant Rev.*, 8(Plant Cell Wall): 1-54.
- Ono, S. S. & Decher, G. (2006). Preparation of Ultrathin Self-Standing Polyelectrolyte Multilayer Membranes at Physiological Conditions Using pH-Responsive Film Segments as Sacrificial Layers. *Nano Lett.*, 6(4): 592-598.
- Oparka, K. J. & Prior, D. A. M. (1992). Direct evidence for pressure-generated closure of plasmodesmata. *The Plant Journal*, 2(5): 741-750.
- Ougiya, H., Watanabe, K., Morinaga, Y. & Yoshinaga, F. (1997). Emulsion-stabilizing effect of bacterial cellulose. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 61(9): 1541-1545.
- Oza, K. P. & Frank, S. G. (1986). Microcrystalline cellulose stabilized emulsions. *J. Dispersion Sci. Technol.*, 7(5): 543-561.
- Pabst, G., Hodzic, A., Strancar, J., Danner, S., Rappolt, M. & Laggner, P. (2007). Rigidification of neutral lipid bilayers in the presence of salts. *Biophys. J.*, 93(8): 2688-2696.
- Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D. & et, a. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88(24): 11460-11464.
- Park, Y. B. & Cosgrove, D. J. (2011). Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient xxt1/xxt2 mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 158: 465-475.
- Park, Y. W., Baba, K. i., Furuta, Y., Iida, I., Sameshima, K., Arai, M. & Hayashi, T. (2004). Enhancement of growth and cellulose accumulation by overexpression of xyloglucanase in poplar. *FEBS Lett.*, 564(1-2): 183-187.
- Parre, E. & Geitmann, A. (2005a). More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes. *Plant Physiol.*, 137(1): 274-286.
- Parre, E. & Geitmann, A. (2005b). Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta*, 220(4): 582-592.

- Pauthe, E. & Van Tassel, P. R. (2014). Layer-by-layer films as biomaterials: bioactivity and mechanics. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 25(14-15): 1489-1501.
- Peaucelle, A., Braybrook, S. A., Le Guillou, L., Bron, E., Kuhlemeier, C. & Hoeffte, H. (2011). Pectin-Induced Changes in Cell Wall Mechanics Underlie Organ Initiation in Arabidopsis. *Curr. Biol.*, 21: 1720-1726.
- Petelska, A. D. & Figaszewski, Z. A. (2000). Effect of pH on the interfacial tension of lipid bilayer membrane. *Biophys. J.*, 78(2): 812-817.
- Peyratout, C. S. & Dähne, L. (2004). Tailor-Made Polyelectrolyte Microcapsules: From Multilayers to Smart Containers. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(29): 3762-3783.
- Podsiadlo, P., Sui, L., Elkasabi, Y., Burgardt, P., Lee, J., Miryala, A., Kusumaatmaja, W., Carman, M. R., Shtein, M., Kieffer, J., Lahann, J. & Kotov, N. A. (2007). Layer-by-Layer Assembled Films of Cellulose Nanowires with Antireflective Properties. *Langmuir*, 23(15): 7901-7906.
- Probine, M. C. & Preston, R. D. (1962). Cell growth and the structure and mechanical properties of the wall in internodal cells of *Nitella opaca*. II. Mechanical properties of the walls. *J. Exp. Bot.*, 13: 111-127.
- Proseus, T. E. & Boyer, J. S. (2006). Calcium pectate chemistry controls growth rate of *Chara corallina*. *J. Exp. Bot.*, 57: 3989-4002.
- Proseus, T. E. & Boyer, J. S. (2007). Tension required for pectate chemistry to control growth in *Chara corallina*. *J. Exp. Bot.*, 58: 4283-4292.
- Proseus, T. E. & Boyer, J. S. (2012). Pectate chemistry links cell expansion to wall deposition in *Chara corallina*. *Plant Signaling Behav.*, 7: 1490-1492.
- Qiu, X., Donath, E. & Mohwald, H. (2001). Permeability of ibuprofen in various polyelectrolyte multilayers. *Macromol. Mater. Eng.*, 286(10): 591-597.
- Quemeneur, F. (2010). Relationship between mechanical parameters and behaviour under external stresses in lipid vesicles with modified membranes., Grenoble Alpes University.
- Quemeneur, F., Quilliet, C., Faivre, M., Viallat, A. & Pépin-Donat, B. (2012). Gel Phase Vesicles Buckle into Specific Shapes. *Physical Review Letters*, 108(10).
- Quemeneur, F., Rammal, A., Rinaudo, M. & Pépin-Donat, B. (2007). Large and Giant Vesicles “Decorated” with Chitosan: Effects of pH, Salt or Glucose Stress, and Surface Adhesion. *Biomacromolecules*, 8: 2512-2519.
- Quemeneur, F., Rinaudo, M., Maret, G. & Pépin-Donat, B. (2010). Decoration of lipid vesicles by polyelectrolytes: mechanism and structure. *Soft Matter*, 6(18): 4471.
- Quilliet, C., Zoldesi, C., Riera, C., van Blaaderen, A. & Imhof, A. (2008). Anisotropic colloids through non-trivial buckling. *Eur. Phys. J. E*, 27(1): 13-20.
- Quinn, J. F., Johnston, A. P. R., Such, G. K., Zelikin, A. N. & Caruso, F. (2007). Next generation, sequentially assembled ultrathin films: beyond electrostatics. *Chem. Soc. Rev.*, 36(5): 707-718.
- Radotic, K., Roduit, C., Simonovic, J., Hornitschek, P., Fankhauser, C., Mutavdzic, D., Steinbach, G., Dietler, G. & Kasas, S. (2012). Atomic Force Microscopy Stiffness Tomography on Living Arabidopsis thaliana Cells Reveals the Mechanical Properties of Surface and Deep Cell-Wall Layers during Growth. *Biophys. J.*, 103(3): 386-394.
- Ranby, B. G. (1949). Aqueous colloidal solutions of cellulose micelles. *Acta Chem. Scand. (1947-1973)*, 3: 649-650.

- Ratanabanangkoon, P., Gropper, M., Merkel, R., Sackmann, E. & P. Gast, A. (2002). Two Dimensional Streptavidin Crystals on Giant Lipid Bilayer Vesicles. *Langmuir*, 18: 4270-4276.
- Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D. & Evans, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.*, 79(1): 328-339.
- Rayle, D. L. (1973). Auxin-induced hydrogen-ion secretion in *Avena* coleoptiles and its implications. *Planta*, 114(1): 63-73.
- Revol, J. F., Bradford, H., Giasson, J., Marchessault, R. H. & Gray, D. G. (1992). Helicoidal self-ordering of cellulose microfibrils in aqueous suspension. *Int. J. Biol. Macromol.*, 14(3): 170-172.
- Rinaudo, M., Quemeneur, F., Dubreuil, F., Fery, A. & Pépin-Donat, B. (2013). Mechanical Characterization of Micrometric Chitosan-Coated Vesicle by Atomic Force Microscopy. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 18(8): 617-626.
- Robert, D. & Roland, J.-C. (1998). Organisation cellulaire.
- Roiter, Y., Ornatska, M., Rammohan, A. R., Balakrishnan, J., Heine, D. R. & Minko, S. (2008). Interaction of Nanoparticles with Lipid Membrane. *Nano Letters*, 8(3): 941-944.
- Rose, J. K. C., Braam, J., Fry, S. C. & Nishitani, K. (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.*, 43(12): 1421-1435.
- Routier-Kierzkowska, A.-L., Weber, A., Kochova, P., Felekis, D., Nelson, B. J., Kuhlemeier, C. & Smith, R. S. (2012). Cellular force microscopy for in vivo measurements of plant tissue mechanics. *Plant Physiol.*, 158(4): 1514-1522.
- Ruysschaert, T., Germain, M., Gomes, J. F. P. d. S., Fournier, D., Sukhorukov, G. B., Meier, W. & Winterhalter, M. (2004). Liposome based nanocapsules. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 3(1).
- Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A. C., Findlay, K., Reiter, W.-D. & McCann, M. C. (2003). Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiol.*, 132(2): 1033-1040.
- Sachs, J. N., Nanda, H., Petrache, H. I. & Woolf, T. B. (2004). Changes in phosphatidylcholine headgroup tilt and water order induced by monovalent salts: Molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, 86(6): 3772-3782.
- Sakaguchi, H., Serizawa, T. & Akashi, M. (2003). Layer-by-layer assembly on hydrogel surfaces and control of human whole blood coagulation. *Chem. Lett.*, 32(2): 174-175.
- Schlenoff, J. B., Dubas, S. T. & Farhat, T. (2000). Sprayed Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*, 16(26): 9968-9969.
- Schopfer, P. (2006). Biomechanics of plant growth. *Am J Bot*, 93: 1415-1425.
- Schopfer, P., Lapierre, C. & Nolte, T. (2001). Light-controlled growth of the maize seedling mesocotyl: Mechanical cell-wall changes in the elongation zone and related changes in lignification. *Physiol. Plant.*, 111(1): 83-92.
- Schulz, M., Olubummo, A. & Binder, W. H. (2012). Beyond the lipid-bilayer: interaction of polymers and nanoparticles with membranes. *Soft Matter*, 8: 4849-4864.
- Seifert, U., Berndl, K. & Lipowsky, R. (1991). Shape transformations of vesicles: phase diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models. *Phys. Rev. A*, 44(2): 1182-1202.

- Seki, K. & Tirrell, D. A. (1984). pH-Dependent complexation of poly(acrylic acid) derivatives with phospholipid vesicle membranes. *Macromolecules*, 17(9): 1692-1698.
- Shamsai, B. M. & Monbouquette, H. G. (1997). A23187-mediated Cd²⁺ uptake by highly stable, polymerized metal-sorbing vesicles. *J. Membr. Sci.*, 130(1-2): 173-181.
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5: 9-23.
- Sjoeback, R., Nygren, J. & Kubista, M. (1995). Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim. Acta, Part A*, 51A(6): L7-L21.
- Sneddon, I. (1965). The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch arbitrary profile. *Int. J. Eng. Sci.*, 3: 47-57.
- Soerensen, I., Pettolino, F. A., Bacic, A., Ralph, J., Lu, F., O'Neill, M. A., Fei, Z., Rose, J. K. C., Domozych, D. S. & Willats, W. G. T. (2011). The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *Plant J.*, 68(2): 201-211.
- Somerville, C. (2004). Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science*, 306(5705): 2206-2211.
- Stafford, C. M., Harrison, C., Beers, K. L., Karim, A., Amis, E. J., VanLandingham, M. R., Kim, H.-C., Volksen, W., Miller, R. D. & Simonyi, E. E. (2004). A buckling-based metrology for measuring the elastic moduli of polymeric thin films. *Nat. Mater.*, 3(8): 545-550.
- Stanish, I. & Singh, A. (2001). Highly stable vesicles composed of a new chain-terminus acetylenic photopolymeric phospholipid. *Chem. Phys. Lipids*, 112(2): 99-108.
- Stiernstedt, J., Brumer, H., Zhou, Q., Teeri, T. T. & Rutland, M. W. (2006). Friction between Cellulose Surfaces and Effect of Xyloglucan Adsorption. *Biomacromolecules*, 7(7): 2147-2153.
- Such, G. K., Johnston, A. P. R. & Caruso, F. (2011). Engineered hydrogen-bonded polymer multilayers: from assembly to biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.*, 40(1): 19-29.
- Sukhorukov, G. B., Donath, E., Lichtenfeld, H., Knippel, E., Knippel, M., Budde, A. & Mohwald, H. (1998). Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids Surf., A*, 137: 253-266.
- Sunamoto, J., Iwamoto, K., Takada, M., Yuzuriha, T. & Katayama, K. (1983). Improved Drug Delivery to Target Specific Organs Using Liposomes as Coated with Polysaccharides. Polymers in Medicine: Biomedical and Pharmacological Applications. E. Chiellini and P. Giusti. Boston, MA, Springer US: 157-168.
- Svagan, A. J., Musyanovych, A., Kappl, M., Bernhardt, M., Glasser, G., Wohnhaas, C., Berglund, L. A., Risbo, J. & Landfester, K. (2014). Cellulose Nanofiber/Nanocrystal Reinforced Capsules: A Fast and Facile Approach Toward Assembly of Liquid-Core Capsules with High Mechanical Stability. *Biomacromolecules*, 15(5): 1852-1859.
- Tahara, K., Tadokoro, S., Kawashima, Y. & Hirashima, N. (2012). Endocytosis-like Uptake of Surface-Modified Drug Nanocarriers into Giant Unilamellar Vesicles. *Langmuir*, 28: 7114-7118.
- Thongborisute, J., Tsuruta, A., Kawabata, Y. & Takeuchi, H. (2006). The effect of particle structure of chitosan-coated liposomes and type of chitosan on oral delivery of calcitonin. *J. Drug Targeting*, 14(3): 147-154.
- Tomos, A. D. (1988). Cellular water relations of plants. Water Science Reviews. F. Franks. Cambridge, UK, Cambridge University Press: 187-277.
- Tomos, A. D. & Leigh, R. A. (1999). The pressure probe: a versatile tool in plant cell physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 447-472.

- Tong, W., Song, X. & Gao, C. (2012). Layer-by-layer assembly of microcapsules and their biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 41(18): 6103.
- Tribet, C. & Vial, F. (2008). Flexible macromolecules attached to lipid bilayers: Impact on fluidity, curvature, permeability and stability of the membranes. *Soft Matter*, 4(1): 68-81.
- Triboulot, M. B., Pritchard, J. & Tomos, D. (1995). Stimulation and inhibition of pine root growth by osmotic stress. *New Phytol*, 130: 169-175.
- Tsogas, I., Tsiourvas, D., Nounesis, G. & Paleos, C. M. (2005). Interaction of Poly-L-arginine with Dihexadecyl Phosphate/Phosphatidylcholine Liposomes. *Langmuir*, 21(13): 5997-6001.
- Valentin, R., Cerclier, C., Geneix, N., Aguié-Béghin, V. r., Gaillard, C. d., Ralet, M.-C. & Cathala, B. (2010). Elaboration of Extensin–Pectin Thin Film Model of Primary Plant Cell Wall. *Langmuir*, 26(12): 9891-9898.
- Vella, D., Ajdari, A., Vaziri, A. & Boudaoud, A. (2012). The indentation of pressurized elastic shells: from polymeric capsules to yeast cells. *J. R. Soc. Interface*, 9(68): 448-455.
- Viallat, A., Dalous, J. & Abkarian, M. (2004). Giant lipid vesicles filled with a gel: shape instability induced by osmotic shrinkage. *Biophys. J.*, 86: 2179-2187.
- Villares, A., Moreau, C., Dammak, A., Capron, I. & Cathala, B. (2015). Kinetic aspects of the adsorption of xyloglucan onto cellulose nanocrystals. *Soft Matter*: Ahead of Print.
- Vincken, J. P., de Keizer, A., Beldman, G. & Voragen, A. G. J. (1995). Fractionation of Xyloglucan Fragments and Their Interaction with Cellulose. *Plant Physiology*, 108(4): 1579-1585.
- Vinogradova, O. I. (2004). Mechanical properties of polyelectrolyte multilayer microcapsules. *J. Phys.: Condens. Matter*, 16(32): R1105-R1134.
- Vinogradova, O. I., Andrienko, D., Lulevich, V. V., Nordschild, S. & Sukhorukov, G. B. (2004). Young's Modulus of Polyelectrolyte Multilayers from Microcapsule Swelling. *Macromolecules*, 37: 1113-1117.
- Vinogradova, O. I., Lebedeva, O. V. & Kim, B.-S. (2006). Mechanical behavior and characterization of microcapsules. *Annu. Rev. Mater. Res.*, 36: 143-178.
- Vinogradova, O. I., Lebedeva, O. V., Vasilev, K., Gong, H., Garcia-Turiel, J. & Kim, B.-S. (2005). Multilayer DNA/Poly(allylamine hydrochloride) Microcapsules: Assembly and Mechanical Properties. *Biomacromolecules*, 6(3): 1495-1502.
- Vogler, H., Draeger, C., Weber, A., Felekis, D., Eichenberger, C., Routier-Kierzkowska, A.-L., Boisson-Dernier, A., Ringli, C., Nelson, B. J., Smith, R. S. & Grossniklaus, U. (2013). The pollen tube: a soft shell with a hard core. *Plant J.*, 73(4): 617-627.
- Volodkin, D., Ball, V., Schaaf, P., Voegel, J.-C. & Mohwald, H. (2007a). Complexation of phosphocholine liposomes with polylysine. Stabilization by surface coverage versus aggregation. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1768(2): 280-290.
- Volodkin, D., Mohwald, H., Voegel, J.-C. & Ball, V. (2007b). Coating of negatively charged liposomes by polylysine: Drug release study. *Journal of Controlled Release*, 117(1): 111-120.
- Volodkin, D. V., Ball, V., Voegel, J.-C., Möhwald, H., Dimova, R. & Marchi-Artzner, V. (2007c). Control of the interaction between membranes or vesicles: Adhesion, fusion and release of dyes. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 303(1-2): 89-96.

- Walde, P., Cosentino, K., Engel, H. & Stano, P. (2010). Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem*, 11(7): 848-865.
- Wang, C. X., Wang, L. & Thomas, C. R. (2004). Modelling the mechanical properties of single suspension-cultured tomato cells. *Ann Bot*, 93(4): 443-453.
- Wang, L., Hukin, D., Pritchard, J. & Thomas, C. (2006). Comparison of plant cell turgor pressure measurement by pressure probe and micromanipulation. *Biotechnol. Lett.*, 28(15): 1147-1150.
- Wege, H. A., Kim, S., Paunov, V. N., Zhong, Q. & Velev, O. D. (2008). Long-Term Stabilization of Foams and Emulsions with In-Situ Formed Microparticles from Hydrophobic Cellulose. *Langmuir*, 24(17): 9245-9253.
- Wei, C. & Lintilhac, P. M. (2007). Loss of stability: A new look at the physics of cell wall behavior during plant cell growth. *Plant Physiol.*, 145(3): 763-772.
- Wei, C., Lintilhac, P. M. & Tanguay, J. J. (2001). An insight into cell elasticity and load-bearing ability. Measurement and theory. *Plant Physiol*, 126: 1129-1138.
- Whitney, S. E. C., Brigham, J. E., Darke, A. H., Reid, J. S. G. & Gidley, M. J. (1998). Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose. *Carbohydrate Research*, 307: 299-309.
- Whitney, S. E. C., Gothard, M. G. E., Mitchell, J. T. & Gidley, M. J. (1999). Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant Physiology* 121: 657-663.
- Wightman, R. & Turner, S. (2010). Trafficking of the cellulose synthase complex in developing xylem vessels. *Biochemical Society Transactions*, 38(3): 755-760.
- Wintz, W., Döbereiner, H. G. & Seifert, U. (1996). Starfish vesicles. *EPL (Europhysics Letters)*, 33(5): 403.
- Woodle, M. C. & Lasic, D. D. (1992). Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.*, 1113(2): 171-199.
- Yaroslavov, A. (2008). Polyelectrolyte-coated liposomes: Stabilization of the interfacial complexes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 142(1-2): 43-52.
- Zerzour, R., Kroeger, J. & Geitmann, A. (2009). Polar growth in pollen tubes is associated with spatially confined dynamic changes in cell mechanical properties. *Dev. Biol. (Amsterdam, Neth.)*, 334(2): 437-446.
- Zhang, Y., Guan, Y., Yang, S., Xu, J. & Han, C. C. (2003). Fabrication of hollow capsules based on hydrogen bonding. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)*, 15(10): 832-835.
- Zimmermann, U. (1978). Physics of turgor and osmoregulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29: 121-148.
- Zimmermann, U., Rygol, J., Balling, A., Kloeck, G., Metzler, A. & Haase, A. (1992). Radial turgor and osmotic pressure profiles in intact and excised roots of *Aster tripolium*. Pressure probe measurements and nuclear magnetic resonance-imaging analysis. *Plant Physiol.*, 99: 186-196.

Résumé

Contrairement à leurs homologues animales, les cellules végétales sont entourées d'une fine enveloppe de polysaccharides appelée paroi primaire, dont la principale structure portante est un réseau de microfibrilles de cellulose reliées entre elles par des hémicelluloses. L'objectif de ce travail est de mettre au point des capsules biomimétiques de la paroi végétale qui puissent servir de système modèle dans l'étude des propriétés mécaniques de ce matériau naturel. Pour ce faire, des vésicules géantes unilamellaires d'un diamètre moyen de 20 μm ont été utilisées comme support de dépôts couche-par-couche de nanocristaux de cellulose (les sous-éléments des microfibrilles) et de xyloglucane (l'hémicellulose la plus répandue) jusqu'à une dizaine de bicouches, les capsules ainsi obtenues ayant été caractérisées par microscopie confocale. Leur comportement en déformation en réponse à une pression osmotique a pu être observé : leur dégonflement a donné lieu à l'apparition de diverses morphologies dont certaines sont similaires aux formes de coques minces de matériau isotrope dégonflées, tandis que leur comportement en gonflement est comparable à la réponse d'un matériau viscoélastique. Enfin, des expériences de nano-indentation par microscopie à force atomique ont été effectuées pour mesurer la rigidité de la paroi des capsules. Leur module d'Young a pu être déduit des courbes de force-déformation et s'avère être compris entre 6 et 18 MPa, ce qui est du même ordre de grandeur que les valeurs obtenues par des mesures similaires effectuées sur des parois végétales naturelles.

Abstract

Unlike their animal counterparts, plant cells are surrounded by a thin polysaccharide-rich envelop called the primary wall, in which the main load-bearing structure is a network of cellulose microfibrils tethered by hemicellulose. This work aims at designing plant cell wall mimicking capsules that could be used as a model system in the mechanical characterization of this natural material. To do so, we used giant unilamellar vesicles with an average diameter of 20 μm as a template for the layer-by-layer deposition of cellulose nanocrystals (the microfibrils sub-elements) and xyloglucan (the most common hemicellulose) up to ten bilayers, the resulting capsules being characterized by confocal microscopy. Their deformation behaviour under osmotic stress could be observed : deflation of the capsules led to various morphologies, some of them similar to what is observed for thin deflated shells of isotropic material, while their response to swelling resembled that of a viscoelastic material. Nano-indentation experiments were eventually performed using an atomic force microscope to probe the stiffness of the capsules wall. Their Young's modulus could be deduced from the force-depth curves and found to be in the 6-18 MPa range, which is in the same order of magnitude of values obtained with similar measurements done on natural plant cell walls.