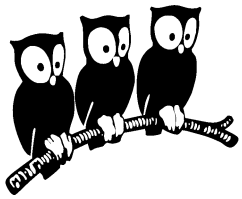
LABORATOIRE DE PHYSIQUE STATISTIQUE
DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI

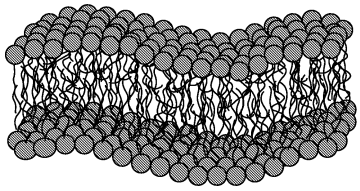
Spécialité : Physique des Solides

présentée par

Nicolas TSAPIS

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris VI

Influence d'inclusions sur les paramètres élastiques de membranes non ioniques.



soutenue le 24 novembre 2000 devant le jury composé de :

Mme Anne-Marie CAZABAT	Examinateur
Mme Dominique LANGEVIN	Rapporteur
M. Christian LIGOURE	Rapporteur
M. Jean-Luc POPOT	Examinateur
M. Jacques PROST	Examinateur
M. Wladimir URBACH	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Physique Statistique de l'Ecole Normale Supérieure sous la direction de Wladimir Urbach. Je souhaite ici le remercier pour les nombreuses discussions scientifiques (parfois virulentes) que nous avons eues lors de notre ingestion quotidienne de café. Je lui dois aussi quelques réparations par "imposition des mains" de la manip de FRAPP. Son optimisme et son enthousiasme ont su tempérer mes angoisses récurrentes. Son sens de l'observation et sa qualité de chercheur lui ont permis de découvrir une de mes drogues : le chocolat noir.

Je remercie Dominique Langevin et Christian Ligoure d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Je leur dois aussi de fructueuses discussions scientifiques, notamment lors des réunions annuelles des GDR 690-692. Jean-Luc Popot s'est prêté au rôle de "biologiste de service" en acceptant de faire partie de mon jury, qu'il en soit ici remercié. Je tiens aussi à remercier Anne-Marie Cazabat et Jacques Prost pour leur participation à mon jury.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de l'indispensable Raymond Ober. Il a su patiemment m'initier aux secrets de son montage de diffusion des rayons X et n'a pas ménagé sa peine pour répondre à mes nombreuses questions. Je lui sais gré de m'avoir laissé réaliser les expériences les plus farfelues aux heures les plus indues et d'avoir été présent lorsque le montage avait des vapeurs, mais aussi lors des quelques soirées passées au LLB. Sa rigueur scientifique et sa compagnie m'ont été des plus profitables.

La collaboration avec Francoise Reiss-Husson s'est révélée des plus fructueuses, malgré la propension du LH2 à passer inopinément du rouge au vert. La pédagogie et la rigueur scientifique de Françoise m'ont été très bénéfiques. Sans sa bonne humeur, son optimisme et sa pêche incroyable, ces trois ans de thèse auraient été un peu plus ternes, les tensioactifs étant moins bigarrés que le LH2.

Je remercie Alain Chaffotte de m'avoir aidé à réaliser les spectres de dichroïsme circulaire de mon peptide dans les phases les plus saugrenues. Les expériences de RMN du deutérium ont été menées à bien grâce à l'aide enthousiaste de Dror Warschawski. Gervaise Mosser et Tadek Gulik ont tenté d'observer mes échantillons en microscopie électronique (et ce sans succès), je les remercie pour leur acharnement. Je n'oublierai par

les fructueuses discussions électronico-épistolaires et téléphoniques avec Pierre Sens, qui prouvent que la concertation entre théoriciens et expérimentateurs est toujours positive. Claude Nicot et Marcel Waks m'ont accueilli avec gentillesse au début de ma thèse. Je les remercie ici pour les nombreuses discussions que nous avons eues, en particulier sur le peptide tribloc. Je suis redevable à Peter Kahn de la modélisation du repliement du peptide et à Yum Keung Yip de sa synthèse. Je remercie Emmanuelle Cogne et Ludovic Jullien de leur aide pour mes premières mesures de fluorescence sur leur spectro. Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à Daniel Bonn pour avoir mis son rhéomètre à ma disposition, ainsi que pour les nombreuses discussions sur la viscoélasticité de mes phases. Un grand merci à Sandrine Lyonnard et Thomas Zemb pour l'utilisation de leur montage de diffusion des rayons X à haute résolution. Je dois à Emanuel Bertrand les mesures de tension de surface et à Jean Yves LeHuerou et Donato Valdez celles de compressibilité ultrasonores sur le peptide tribloc.

Le contact quotidien avec les membres de l'équipe SMO a été des plus agréables et des plus enrichissants. Je ne saurais oublier les leçons de Pokémons de Fred, les cafés-kinders avec David (non ne fais pas le poirier sur le bureau) et le pain d'épice et la mouna de Christine. Le partage de mon bureau avec Eric, Christine et Wlad s'est très bien passé malgré l'exiguïté des 18 m^2 nous étant impartis.

Je tiens à remercier chaleureusement ma seconde famille du Collège de France de m'avoir accueilli fréquemment à son café matinal ou sa pause goûter : Booboo (et son rire sonore), Raymond, Elie, Marie Pierre, Virginie, Anne Marie, David, Hubert, Daniel, Gérard, Damien, Achod, Elise, Valérie et Arnaud, mais aussi mes pourvoyeurs de poudre de lycopode pour les présentations au Palais de la Découverte : José, Denis et Pascalle ainsi que les "hispano-hablantes" François (Pancho), Mauricio, Mario et Françoise.

Je remercie Sébastien Balibar puis Jacques Meunier de m'avoir accueilli au Laboratoire de Physique Statistique de l'Ecole Normale Supérieure. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à tous les membres du LPS, en particulier aux secrétaires Carole, Nora et Angélique qui ont toujours su résoudre mes problèmes administratifs les plus compliqués avec bonne humeur. Je n'oublierai pas José, Jacques, Lucien, Rémi et Denis pour la mécanique, et Christophe, Daniel et Clouqueur pour l'électronique. Quant aux bugs dont ont soufferts nos ordinateurs, ils ont été soignés par Zaïre, Alain, Christophe et Thierry.

De nombreuses discussions ont permis l'avancement de ce travail de thèse, je voudrais remercier Sophie Cribier, Daniel Picot, Francisco Castro-Roman, Lionel Porcar, Pierre Levitz, Thomas Zemb, Monique Dubois, Jean Baptiste Fournier, Daniel Lévy, Jacques Meunier, Amir Maldonado Isabelle Javierre et Nicolas Taulier.

Enfin merci encore à tous les doctorants (ou thésards ou thésitifs), post-doc et autres

qui ont partagé les repas à la cafétéria, les piques-niques dans le jardin, les escapades à la piscine, les délires et les fous rires, et qui ont ont su par leur bonne humeur rendre ces trois années de thèse très agréables : Anke (et les luxemburgerli), Berengère (et ses paillettes), Caroline (turbulologue), Clarisse, Gervaise, Julie, Noushine, Patrizia (un vrai cordon bleu et une voix malheureusement méconnue), Aurélien (le roi de la maïzena du palais de la découverte), Christian, David (vive les girafes !), Donato, Emanuel B. (allez les bleus !), Emmanuel D., Erol, François, Grégory, Jean, Jean-Christophe, Jean-Noël, Mathieu, Nicolas, Sébastien (créateur de pokémons physiciens), Thomas, Yacine et Yann.

Merci à Léa d'avoir supporté mes angoisses, mon attrait pour les gouttes d'eau et les phases lamellaires, mais aussi d'avoir été une des oreilles attentives de mes nombreuses répétitions de soutenance malgré son amour "relatif" de la physique.

Table des matières

Notations utilisées **13**

1 Introduction **15**

1.1 Introduction 15
1.2 Les tensioactifs 16
1.3 Polymorphisme de phases 17
1.4 Paramètres élastiques d'une bicouche 21
1.5 Structure des phases de membranes fluides 23
1.5.1 Structure de la phase lamellaire 23
1.5.2 Structure de la phase éponge 24
1.6 Fluctuations des membranes 24
1.7 Interactions intermembranaires 25
1.7.1 L'interaction de Van der Waals 25
1.7.2 L'interaction d'hydratation 25
1.7.3 L'interaction électrostatique 26
1.7.4 L'interaction d'ondulation 27
1.8 Propriétés élastiques de la phase lamellaire 28
1.8.1 Phase lamellaire à un solvant 28
1.8.2 Phase lamellaire à deux solvants 31
1.9 Fluctuations d'une membrane et loi de dilution 32

2 Techniques expérimentales **37**

2.1 Introduction 37
2.2 Diffusion de rayons X aux petits angles 37
2.2.1 Montage expérimental 38
2.2.2 Diffusion du rayonnement par les phase lamellaires 39
2.2.3 Diffusion du rayonnement par les phases éponges. 49
2.3 Mesures de tension superficielle. 50

2.4 FRAPP 54
2.4.1 Le principe de la technique 54
2.4.2 Le montage expérimental 58
2.4.3 Traitement des données expérimentales 60
2.5 La spectroscopie d'absorption 60
2.6 La spectrofluorimétrie 62
2.7 Le dichroïsme circulaire 63
2.8 RMN du deutérium 65
2.8.1 RMN du deutérium dans les phases lamellaires 65
2.9 Techniques de mesures rhéologiques 68
2.9.1 Rappels 69
2.9.2 Mesure de la viscosité 69

3 Effet de la charge de surface **73**
3.1 Introduction 73
3.2 Position du problème et théories existantes 74
3.2.1 Le modèle de Harden et al. 74
3.2.2 Le Modèle de Fogden et al. 76
3.2.3 Le modèle de de Vries 79
3.2.4 Effet des corrélations de fluctuations : Lukatsky, Pincus et Safran . 80
3.3 Expériences déjà réalisées 82
3.3.1 Systèmes binaires TA-eau dilués 82
3.3.2 Systèmes ternaires concentrés 83
3.4 Système expérimental choisi 83
3.5 La phase lamellaire inverse 84
3.5.1 Observations optiques 84
3.5.2 Diffusion des rayons X aux petits angles : absence de modifications 85
3.5.3 Effet de l'épaisseur d'eau gonflant la membrane 89
3.5.4 Effet de la charge de surface sur le passage de la phase inverse à la phase directe 91
3.5.5 Conclusion 93
3.6 La phase lamellaire directe 93
3.6.1 Observations optiques. 94
3.6.2 Durcissement de l'ordre smectique 95
3.6.3 Diminution de la périodicité 97
3.6.4 L'épaisseur des membranes reste constante 99

3.6.5 Passage d'une stabilisation par répulsions stériques à des interactions électrostatiques dominantes . . . 99
3.6.6 Quantification du durcissment de l'ordre smectique . . . 101
3.6.7 Augmentation de la rigidité de la membrane . . . 102
3.6.8 Comparaison de l'augmentation de la rigidité κ avec le prédictions théoriques . . . 104
3.6.9 Echec des mesures de rigidité par RMN . . . 105
3.6.10 Comparaison avec le DTAB . . . 105
3.6.11 Variation de $\bar{B}$ . . . 107
3.6.12 Effet des interactions électrostatiques sur $\bar{B}(d_w)$ . . . 110
3.6.13 Comparaison avec les prédictions théoriques pour $\bar{B}$ . . . 111
3.6.14 Conclusion . . . 112
3.7 Viscoélasticité de la phase lamellaire directe . . . 113
3.7.1 Echec de la microscopie électronique . . . 113
3.7.2 Origine de la viscoélasticité de la phase lamellaire . . . 114
3.7.3 Quantification de la viscoélasticité . . . 115
3.7.4 Conclusion . . . 119
3.8 Conclusion . . . 121

4 Effet d'un peptide rigide 125
4.1 Introduction . . . 125
4.2 Système hôte pour le peptide . . . 126
4.3 Où la phase éponge vient nous sauver . . . 126
4.4 Le peptide . . . 127
4.4.1 Sa séquence . . . 127
4.4.2 Sa structure . . . 128
4.4.3 Localisation du peptide dans les phases de membranes . . . 131
4.5 Effet du peptide sur la phase lamellaire . . . 133
4.5.1 Conservation de la périodicité . . . 133
4.5.2 Diminution du paramètre de Caillé η . . . 133
4.5.3 Renormalisation de l'épaisseur de la membrane . . . 135
4.5.4 Rigidification de la membrane . . . 138
4.5.5 Mesures de rigidité par RMN du deutérium . . . 141
4.5.6 Affaiblissement des interactions membranaires . . . 144
4.6 Comparaison avec les modèles existants . . . 145
4.6.1 Inclusions flexibles ou semi-flexibles . . . 146

4.6.2 Inclusions rigides 146
4.7 Conclusion 155

5 La protéine LH2 **157**
5.1 Introduction 157
5.2 Structure du LH2 158
5.3 Le LH2 en solution d'octylglucoside. 159
5.3.1 Présentation du système. 159
5.3.2 Taille du complexe LH2-OG. 162
5.4 La phase cubique 164
5.4.1 Modes de préparation de la phase cubique. 167
5.4.2 Résistance de la phase cubique aux additifs 168
5.5 Phase cubique contenant le LH2 naturel 170
5.5.1 Modification des propriétés spectrales 171
5.6 Le LH2 marqué en solution micellaire 176
5.6.1 Marquage de la protéine 176
5.6.2 Mesures de spectroscopie d'absorption. 176
5.6.3 Mesures de fluorescence 178
5.6.4 Mesures de recouvrement de fluorescence. 178
5.7 Le LH2 marqué en phase cubique 180
5.7.1 Mesures spectroscopiques 180
5.7.2 Mesures de recouvrement de fluorescence 181
5.8 LH2 dans les phases de membranes fluides 184
5.8.1 Préparation des phases lamellaire et éponge avec le tampon BisTris 184
5.8.2 Préparation des mêmes phases avec la protéine. 185
5.8.3 Phase éponge alternative 187
5.8.4 Conclusion 189
5.9 Conclusion 190

Conclusion générale **193**

A Acides Aminés. **199**
A.1 Formules chimiques des différents groupes d'acides aminés 199
A.2 Abréviations utilisées pour les acides aminés 201

B Formules chimiques **203**

C Mode de préparation des échantillons **207**
C.1 Densités utilisées pour les différents composants 207
C.2 Système $C_{12}E_4$-eau-décane 207
C.2.1 Phase lamellaire inverse 207
C.2.2 Phase lamellaire directe 208
C.3 Système $C_{12}E_4$-eau-décane + peptide 208
C.4 Système MO-eau/solution de protéine 209
C.5 Système $C_{12}E_2$-eau 209

D Modèle de diffusion par sauts **211**

E Estimation des interactions de Van der Waals **213**
E.1 Phase lamellaire inverse 214
E.2 Phase lamellaire directe 214

F Détermination de la rigidité : deux méthodes comparées **215**

G Spectres de rayons X **217**

Bibliographie **221**

Notations utilisées :

k_B constante de Boltzmann : k_B=1.38 10^{-23} USI.

T température.

L_B Longueur de Bjerrum : $L_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0 k_B T}$ (0.71 nm pour l'eau à 20°C)

L_{GC} Longueur de Gouy-Chapman : $L_{GC} = \frac{1}{2\pi L_B \sigma}$.

λ_D Longueur de Debye : $\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r\epsilon_0 k_B T}{e^2 \sum_i n_\infty z_i^2}}$, où n_∞ est la concentration d'ions et z_i leur valence. Dans le cas des ions monovalents, $\lambda_D = \frac{0.3045}{\sqrt{[c_s]}}$ nm, où c_s est la concentration d'électrolyte en mol.l^{-1}.

ζ_R fonction zeta de Riemann.

d_B périodicité de la phase lamellaire (ou pas smectique, ou distance de Bragg).

d_s épaisseur de solvant.

d_w épaisseur d'eau.

d_m épaisseur de la membrane.

K module de courbure smectique moyenne.

$\bar{K}$ module de courbure smectique gaussienne.

B module de compressibilité smectique.

$\bar{B}$ module de compressibilité smectique à potentiel chimique de tensioactif constant.

$\bar{B_{él}}$ contribution électrostatique au module de compressibilité smectique.

κ module de rigidité de courbure moyenne.

κ_0 module de rigidité de courbure moyenne de la membrane "nue".

κ_{eff} module de rigidité de courbure moyenne effectif de la membrane "décorée" par le peptide.

$\kappa_{él}$ contribution électrostatique au module de rigidité de courbure moyenne. $\kappa_{pair,él}$ et $\kappa_{impair,él}$ correspondent aux contributions des modes de fluctuation pair et impair.

$\bar{\kappa}$ module de rigidité de courbure gaussienne.

ζ longueur de persistence.

χ compressibilité osmotique.

c_1, c_2 courbures locales principales.

c_{0m} courbure spontanée de la monocouche.

c_0 courbure spontanée de la bicouche.

A_H constante de Hamaker.

H_0 constante d'hydratation.

σ densité surfacique de charge (en nombre de charges unités e par unité de surface).

σ_{TP} aire par tête polaire.

Σ aire perturée par l'inclusion membranaire.

S surface par charge unité.

e charge unité (1.6 10^{-19} C).

ϵ_0 permittivité du vide : ϵ_0=8.85 10^{-12} F/m.

$\xi_{||}$ plus grande longueur d'onde permise pour les fluctuations des membranes.

$L_C = \sqrt{\frac{2\epsilon_0\epsilon_r k_B T}{n_0 e^2}}$, longueur pertinente apparaissant dans le modèle de Fogden et al. [1] et de de Vries [2]. L_C correspond à la longueur d'écrantage des interactions électrostatiques en l'absence d'électrolyte ajouté.

ϵ_r permittivité relative du solvant (ou constante diélectrique) (ϵ_w = 80 pour l'eau, ϵ_o = 1.99 pour le décane).

n_0 densité de contre-ions dans le plan x=0, correspondant à la mi-distance entre membranes en regard.

q_0 position du quasi-pic de Bragg de premier ordre (en nm^{-1}).

$\eta = q_0^2 \frac{k_B T}{8\pi\sqrt{K\bar{B}}}$ paramètre de Caillé, caractérisant l'ordre de la phase lamellaire.

$\Delta\nu_Q$ éclatement quadrupolaire.

$\dot{\gamma}$ taux de cisaillement.

τ contrainte appliquée.

η_s viscosité de la phase lamellaire sous cisaillement (en Pa.s, 1 cP=1 mPa.s).

η^* viscosité complexe de la phase lamellaire (en Pa.s, 1 cP=1 mPa.s).

G' module élastique (en Pa).

G" module visqueux (en Pa).

Chapitre 1

Introduction

1.1 Introduction

Ce travail s'inscrit dans la lignée des études des mésophases de tensioactifs en tant que systèmes hôtes pour des particules telles que des colloïdes, des polymères ou des biopolymères. Les problèmes fondamentaux que ce genre de systèmes posent tant aux expérimentateurs qu'aux théoriciens, mais aussi les nombreuses applications industrielles potentielles sont à l'origine des nombreux travaux déjà publiés sur le sujet.

Nous avons abordé ce sujet suivant deux angles. Le premier angle d'approche est l'étude des modifications des paramètres élastiques d'une phase lamellaire non ionique entraînées par différentes "perturbations". La première perturbation a consisté à charger progressivement la surface des monocouches. Par ailleurs, si beaucoup de travaux ont porté sur l'effet de l'incorporation de longs polymères flexibles solubles [3][4][5][6][7][8][9][10], de polymères flexibles greffés par des ancres hydrophobes ou de polysavons [11][12][13][14] dans les phases lamellaires, peu d'études ont été réalisées sur l'effet de polymères rigides [15][16]. Des polymères rigides sont pourtant de meilleurs modèles de biopolymères que les polymères flexibles si l'on s'attache à mieux comprendre les interactions biopolymères-membranes. Ceci nous a conduit à perturber la phase lamellaire en y introduisant un peptide rigide. Enfin, les modifications structurales d'une protéine transmembranaire par son insertion dans différentes phases de membranes de tensioactifs est l'autre angle sous lequel nous avons abordé ce thème.

Dans ce chapitre d'introduction nous présenterons les tensioactifs, les mésophases qu'ils forment, puis nous nous attarderons sur les phases que nous avons étudiées pour présenter les différentes interactions les stabilisant ainsi que les paramètres pertinents qui les caractérisent. Le second chapitre sera quant à lui dédié aux techniques expérimentales que

nous avons utilisées. Les chapitres suivants viendront enfin présenter le travail réalisé : l'effet de la charge surfacique de la membrane sur les constantes élastiques de la phase lamellaire dans le chapitre 3, les modifications entraînées par l'insertion d'un peptide rigide dans des phases de membranes fluides dans le chapitre 4, et enfin, dans le chapitre 5, nous nous intéresserons aux modifications structurales d'une protéine transmembranaire introduite dans une phase cubique de monooléine et dans des phases éponges de tensioactifs.

1.2 Les tensioactifs

La structure moléculaire particulière des tensioactifs en a fait l'objet de nombreuses études [17]. Ces molécules disposent à la fois d'une partie polaire hydrophile - nommée tête polaire- et d'une partie apolaire hydrophobe composée d'une ou plusieurs chaînes aliphatiques, surnommées queues du tensioactif. Leur partie hydrophile est soluble dans l'eau alors que leur partie hydrophobe est soluble dans l'huile. Ce caractère amphiphile leur permet notamment de stabiliser thermodynamiquement les mélanges eau-huile.

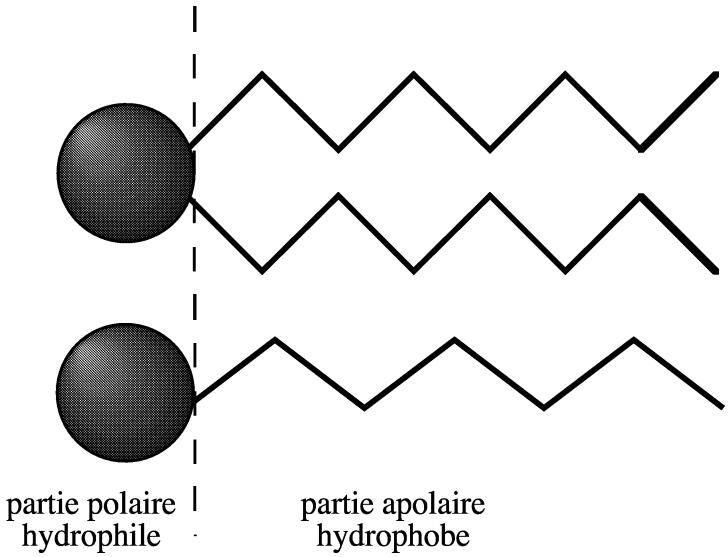


FIG. 1.1: *Représentation schématique d'un tensioactif à une et deux chaînes aliphatiques.*

Selon la nature chimique de la tête polaire on peut distinguer trois familles de tensioactifs :

- Les tensioactifs ioniques (cationiques ou anioniques) dont la solubilisation entraîne l'ionisation de la tête polaire. La tête alors chargée libère un contre-ion dans la solu-

tion. Le SDS (sodium dodécyl sulfate) et l'AOT (sodium bis(éthylhexyl)sulfosuccinate) sont les deux tensioactifs ioniques les plus utilisés, aussi bien dans les gels douches et les shampoings, que dans un nombre important de travaux scientifiques.

- Les tensioactifs non ioniques dont la solubilisation n'entraîne pas de dissociation (ex : C_iE_j (polyoxyéthylène alkyl éthers))
- Enfin les tensioactifs zwitterioniques, molécules globalement neutres parce qu'elles possèdent à la fois un groupement basique sur leur partie hydrophobe et un groupement acide sur leur partie hydrophile (ex : C_{14}DMAO (tétradécyldiméthylamine oxyde)). Leur charge effective dépend alors très fortement du pH de la solution.

1.3 Polymorphisme de phases

C'est le caractère amphipathique ou amphiphile des tensioactifs qui leur confère leur propriétés intéressantes. Afin de satisfaire à la fois l'affinité pour l'eau des parties hydrophiles et l'affinité pour les solvants organiques des parties hydrophobes, les molécules tensioactives s'associent de manière à créer des interfaces entre les milieux de polarité différente. C'est ce phénomène qui est à l'origine du polymorphisme de phases obtenu lors de la dissolution des tensioactifs.

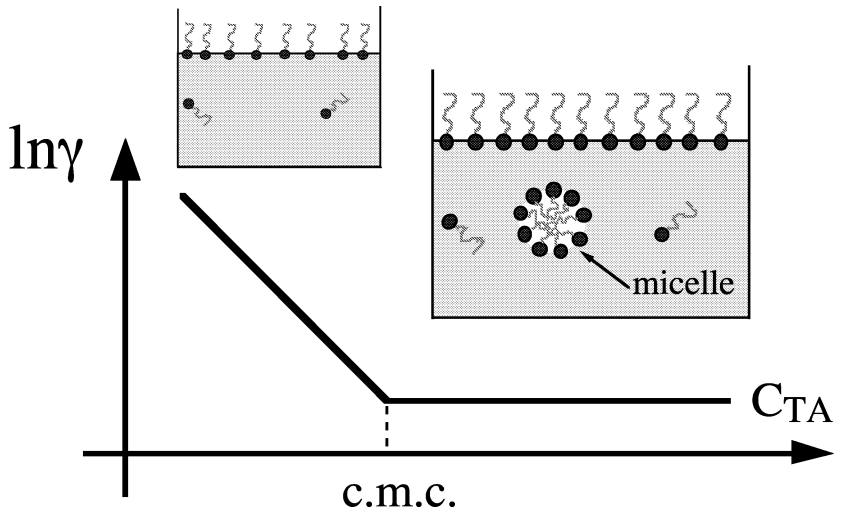


FIG. 1.2: *Evolution de la tension de surface γ avec la concentration de tensioactif, représentation schématique des tensioactifs à l'interface air-eau.*

Nous décrirons d'abord brièvement les mélanges binaires tensioactifs-eau. En faible

concentration, les tensioactifs abaissent la tension superficielle du solvant. C'est d'ailleurs de cette propriété qu'ils tirent leur nom. Ils se placent à l'interface solvant-air en grande majorité, le reste se trouvant sous forme de monomères dans le solvant. Au dessus d'une certaine concentration nommée concentration micellaire critique (notée cmc), la tension superficielle ne varie plus car l'interface est saturé en molécules tensioactives, celles-ci s'associent alors en micelles, agrégats de tensioactifs en suspension dans l'eau (figure 1.2).

Une fois la concentration micellaire critique dépassée, dans les solutions aqueuses diluées de tensioa ctifs, on observe dans la plupart des cas la séquence de phases suivante [18] :

- Une phase optiquement isotrope de micelles soit globulaires, soit cylindriques (figure 1.3). Les têtes polaires en contact avec l'eau protègent de celle-ci les chaînes aliphatiques.

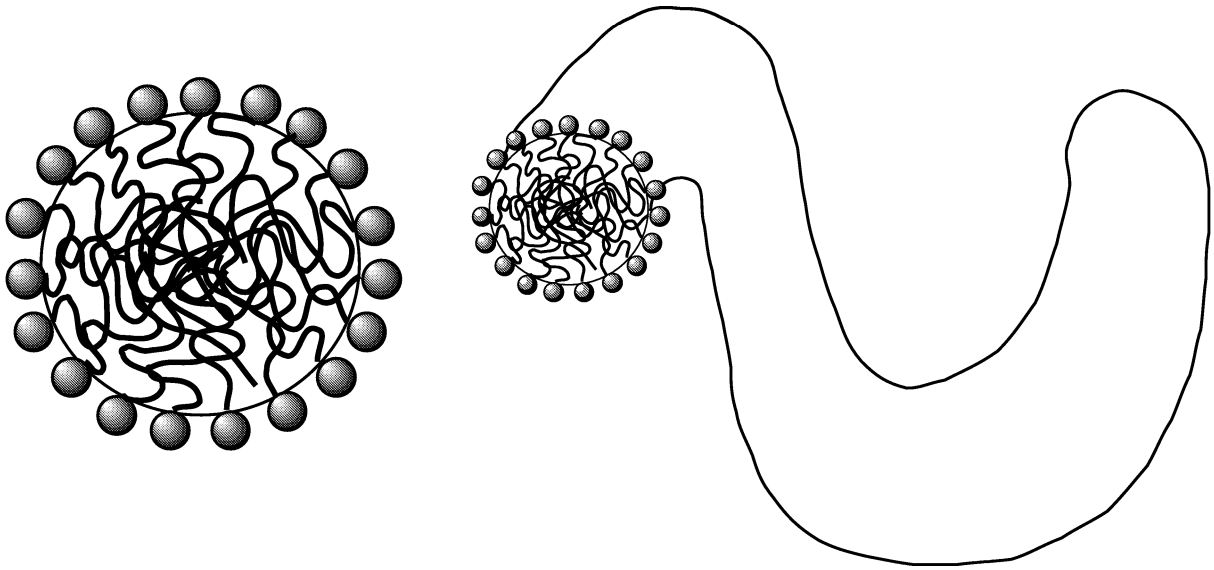


FIG. 1.3: *Schéma de micelles : à gauche globulaire quasi-sphérique, à droite cylindrique.*

- Deux phases de membranes fluides [19][20], l'une biréfringente et l'autre isotrope. Dans ces deux phases, l'agrégat est identique, une double couche infinie de tensioactifs mais l'organisation à grande échelle diffère. La phase biréfringente, nommée phase lamellaire (notée L_α), est constituée de bicouches planes séparées par de l'eau, qui, en s'empilant parallèlement les unes aux autres, forment un ordre smectique (figure 1.4).

  Dans la phase isotrope appelée phase éponge (notée L_3), la bicouche est multiconnectée et subdivise l'espace en deux sous espaces d'eau identiques déconnectés

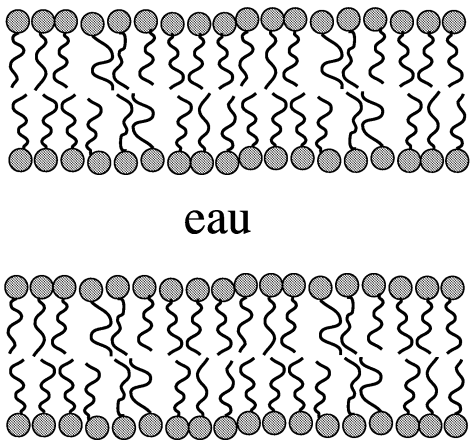


FIG. 1.4: *Phase lamellaire (L_α) à un solvant (ici l'eau).*

(figure 1.5). La structure bicontinue ainsi formée lui vaut son surnom de phase cubique fondue. Cette phase est biréfringente sous cisaillement.

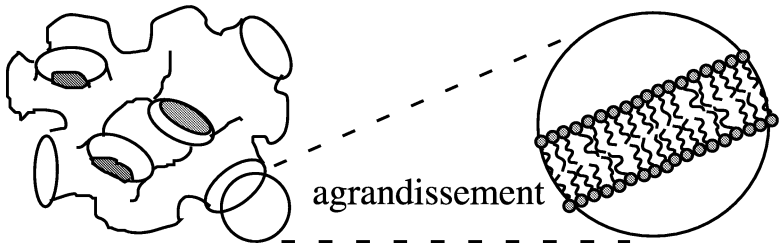


FIG. 1.5: *Représentation de la phase éponge (L_3). Localement la structure est celle d'une bicouche.*

L'existence des structures que nous venons de présenter dépend essentiellement des interactions locales entres molécules voisines dans les agrégats. En changeant la balance des interactions s'exerçant au niveau de la frontière entre les têtes polaires et les chaînes aliphatiques (salinité, température, composition de la monocouche), on modifie la courbure spontanée c_{0m} de la monocouche de tensioactif, la longueur l_0 de la chaîne aliphatique restant par ailleurs fixée.

En effet, les têtes polaires se repoussent en cherchant le contact maximum avec l'eau, tandis que les chaînes aliphatiques cherchent à minimiser ce même contact. Dans le cas d'une monocouche formée uniquement par des tensioactifs, la courbure spontanée de la

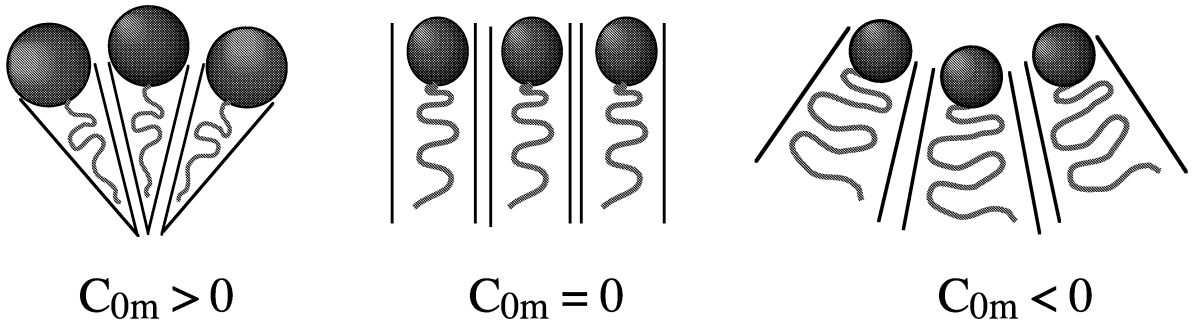


FIG. 1.6: *Exemples de courbures spontanées : la géométrie des molécules situées à gauche les pousse à adopter une structure de type micellaire, celles du milieu adoptent une structure lamellaire et celles de droite une structure de micelles inverses.*

molécule de tensioactif peut être définie à partir de sa structure géométrique. On peut la caractériser quantativement par [17] $c_{0m} = \frac{v/l_0}{\sigma_{TP}}$ (figure 1.7) où σ_{TP} est l'aire par tête polaire, et où le rapport $\frac{v}{l_0}$ du volume v à la longueur maximale l_0 de la chaîne aliphatique représente la section moyenne de la molécule. La coubure spontanée dépend donc à la fois des interactions répulsives entre têtes polaires à l'interface via le paramètre σ_{TP}, et de la structure chimique de la molécule via v et l_0. Dans le cas des systèmes binaires eau-tensioactif, en augmentant la température, on modifie l'hydratation des têtes polaires, donc la courbure spontanée. Ce raisonnement, dû à Jacob Israelachvili [17], permet de

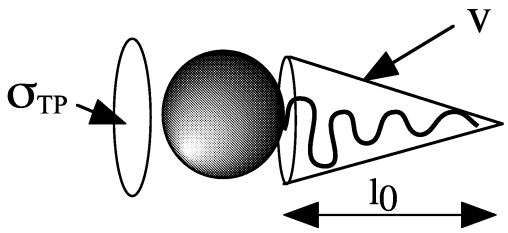


FIG. 1.7: *Molécule tensioactive et les paramètres qui permettent de déterminer sa coubure spontanée c_{0m}. σ_{TP} est l'aire par tête polaire, v le volume de la chaîne aliphatique et l_0 sa longueur maximale.*

prévoir quelle genre de structure est favorisée : si $c_{0m} < 1/3$ il s'agira d'une phase de micelles sphériques, si $1/3 < c_{0m} < 1/2$ ce sera une phase de micelles cylindriques, si $1/2 < c_{0m} < 1$ une phase de vésicules, si $c_{0m} \approx 1$ une phase de bicouches planes et enfin une phase de micelles inverses si $c_{0m} > 1$.

La séquence de phases que nous venons de décrire pour les systèmes binaires de ten-

sioactifs non ioniques et d'eau, peut aussi être observée dans d'autre cas. En effet, en rajoutant à ce genre de système une molécule faiblement tensioactive nommée cotensioactif, qui le plus souvent est un alcool à courte chaîne (C6, C8 etc...), on modifie l'espace disponible à chaque tête polaire et donc la courbure spontanée de la monocouche. Dans ce cas, le paramètre pertinent favorisant l'apparition de telle ou telle phase est le rapport cotensioactif sur tensioactif.

Ce type de raisonnement en courbure spontanée ne permet pas d'expliquer l'existence de certaines phases comme par exemple la phase éponge. La "bonne" démarche consiste à minimiser l'énergie élastique du film de tensioactifs. Nous allons maintenant présenter cette approche énergétique.

1.4 Paramètres élastiques d'une bicouche

Dorénavant, on appelera membrane fluide (ou membrane) une bicouche de tensioactifs. Les propriétés élastiques des membranes fluides sont essentiellement gouvernées par leur élasticité de courbure ainsi que l'a montré Helfrich en 1973 [21]. Si on nomme R_1 et R_2 les rayons principaux de courbure de la surface de la membrane (figure 1.8), et $c_1 = \frac{1}{R_1}$ et $c_2 = \frac{1}{R_2}$ les courbures locales principales, l'énergie élastique de courbure par unité de surface d'une membrane fluide s'écrit alors comme :

$$F_c = \frac{1}{2}\kappa(c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{\kappa}c_1c_2 \tag{1.1}$$

où c_1+c_2, c_1c_2 et c_0 sont respectivement les courbures moyenne, gaussienne et spontanée de la membrane . Pour une membrane symétrique comme celle constituée par une bicouche,

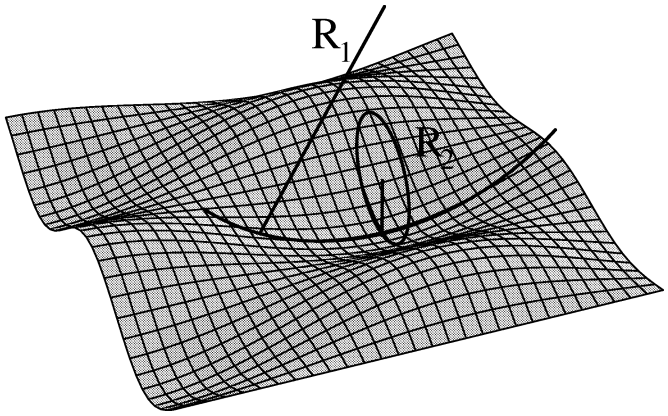


FIG. 1.8: *Schéma d'une surface et de ses rayons de courbure principaux R_1 et R_2.*

la courbure spontanée est nulle, même si les courbures spontanées de chaque monocouche ne sont pas nulles. Les paramètres κ et $\bar{\kappa}$, nommés respectivement modules de rigidité de courbure moyenne et gaussienne, ont la dimension d'une énergie.

Le terme en κ représente le coût énergétique pour passer d'un état où la membrane adopte sa courbure spontanée à un état de courbure différente. Si la topologie de la membrane n'est pas modifiée, le terme en $\bar{\kappa}$ est constant et non pertinent car, comme prouvé par le théorème de Gauss-Bonnet, l'intégrale du terme de coubure gaussienne sur toute la surface A est un invariant topologique :

$$\int_A c_1 c_2 dA = -4\pi(n-1) \tag{1.2}$$

où n est le nombre d'anses de la surface (n=0 pour une sphère, tandis que n=1 pour un tore etc...). Le terme en $\bar{\kappa}$ n'intervient donc absolument pas dans les déformations de la membrane autour de sa position d'équilibre. On peut représenter dans un diagramme (κ, $\bar{\kappa}$) les différentes topologies de membranes : si $2\kappa + \bar{\kappa} < 0$ on aura des vésicules, si $2\kappa < \bar{\kappa} < 0$ des bicouches planes et enfin des membranes multiconnectées si $\bar{\kappa} > 0$ (figure 1.9). Dans nos systèmes, κ est de lordre de $k_B T$ [22] et les membranes sont bien plus flexibles que des membranes lipidiques ($\kappa \approx 10\ k_B T$).

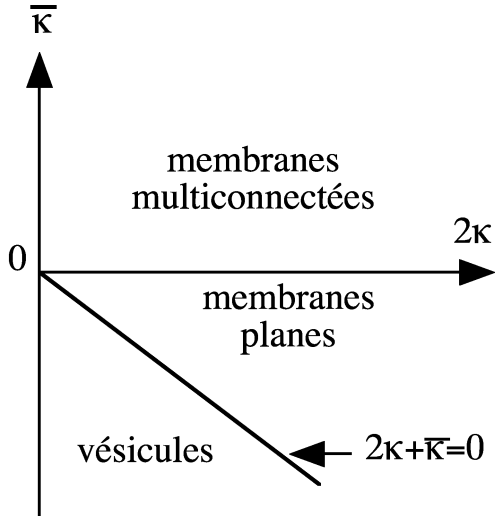


FIG. 1.9: *Domaine de stabilité des différentes phases de membranes en fonction des valeurs relatives de κ et $\bar{\kappa}$.*

1.5 Structure des phases de membranes fluides

Notre travail a principalement consisté dans l'étude des phases lamellaires et des phases éponges, c'est pourquoi nous allons nous attarder plus précisément sur la structure de ces phases et sur les paramètres qui les caractérisent.

1.5.1 Structure de la phase lamellaire

Une phase lamellaire à un seul solvant est constituée d'un empilement de membranes fluides d'épaisseur d_m formée par des bicouches de tensioactifs d'extension infinie, parallèles et périodiquement espacées dans la direction normale à leur plan moyen (figure 1.4). La périodicité de la phase lamellaire d_B est définie par la somme $d_B=d_s+d_m$ où d_s est l'épaisseur de solvant. La stabilité de cet empilement peut être conservée pour de très grandes périodicités (on parle alors de phase lamellaire diluée) mais la plupart du temps d_s et d_B sont du même ordre de grandeur (quelques nanomètres). Si on considère une phase lamellaire à deux solvants, par exemple eau et huile, elle se présente comme un empilement périodique d'une couche d'eau et d'une couche d'huile séparées par une monocouche de tensioactif. Si, en volume, l'eau est majoritaire par rapport à l'huile on parlera de phase lamellaire gonflée à l'eau ou phase lamellaire directe, dans le cas contraire de phase lamellaire gonflée à l'huile ou phase lamellaire inverse (figure 1.10).

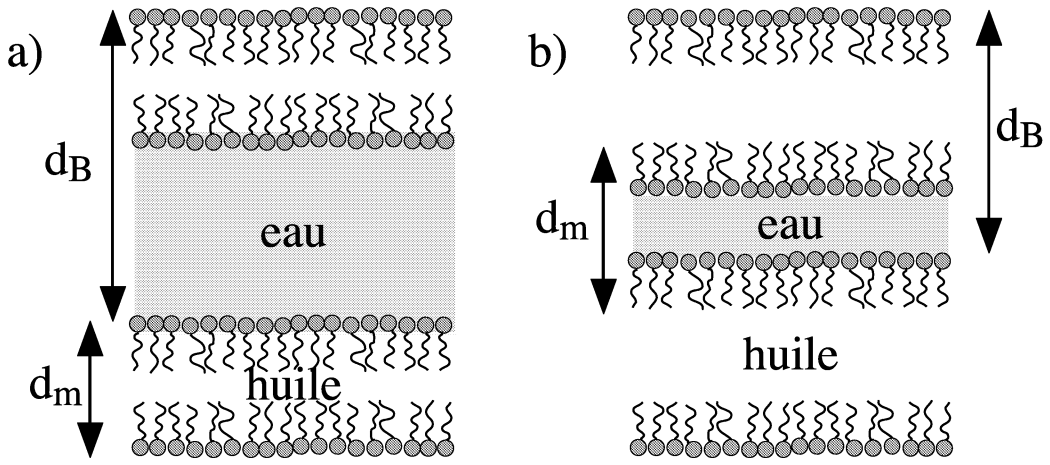


FIG. 1.10: *a) Phase lamellaire directe. b) Phase lamellaire inverse.*

La phase lamellaire peut être décrite par deux paramètres géométriques : sa périodicité d_B et l'épaisseur de la membrane d_m. Dans le cas d'une phase L_α gonflée à l'eau d_m représente l'épaisseur d'une bicouche de tensioactif contenant de l'huile alors que dans

le cas d'une phase L_α gonflée à l'huile d_m est l'épaisseur d'une bicouche de tensioactif contenant de l'eau (figure 1.10). La structure d'une phase lamellaire est semblable à celle des smectiques A rencontrés dans les cristaux liquides thermotropes, la bicouche peut alors être considérée comme une membrane fluide.

Dans le plan des monocouches, les tensioactifs présentent un ordre de type liquide, alors que dans la direction normale au plan des bicouches un quasi-ordre cristallin est conservé. Quasi-ordre seulement, car Landau et Peierls [23][24] ont montré que dans le cas de cristaux à une ou deux dimensions, la divergence du carré des fluctuations de position des couches $< u^2 >$ empêche l'existence d'un ordre de position à très longue portée. Venons en maintenant à la description de la phase éponge.

1.5.2 Structure de la phase éponge

Localement, la structure de la phase éponge est la même que celle de la phase lamellaire : une membrane de tensioactifs diluée dans l'eau (figure 1.5). Cependant, à grande échelle, l'ordre n'est plus smectique mais on a des membranes aléatoirement connectées dans l'espace. L'espace est alors séparé en deux sous-espaces distincts complètement déconnectés l'un de l'autre comme dans le cas des phases cubiques bicontinues [25]. La continuité de la membrane dans les phases éponges a été mise en évidence par diverses techniques expérimentales : mesures de conductivité électrique, diffusion de neutrons aux petits angles, microscopie électronique ou encore recouvrement de fluorescence [26][27][28][29][30]. Nous verrons dans le chapitre 2 comment cette perte d'ordre se répercute au niveau des spectres de diffusion.

1.6 Fluctuations des membranes

De Gennes et Taupin [31], par analogie avec les polymères, ont introduit une longueur de persistence ζ, qui caractérise les fluctuations de la membrane. En dessous de ζ, la membrane peut être considérée comme plane, au delà elle est considérée comme froissée, faite de petites plaquettes de taille ζ, libres de se mouvoir aléatoirement [32]

$$\zeta = \sqrt{\sigma_{TP}} exp\left(\frac{2\pi\kappa}{k_B T}\right) \tag{1.3}$$

où σ_{TP} est l'aire par tête polaire du tensioactif. Les fluctuations de la membrane modifient la rigidité effective de la membrane et renormalisent ses constantes élastiques sur des distances supérieures à ζ. En effet, une membrane qui ondule est plus facile à courber

qu'une membrane plane. De nombreux auteurs se sont attelés au calcul des constantes renormalisées [33][34][35][36]. Pour une longueur ξ supérieure à ζ on obtient :

$$\kappa(\xi) = \kappa_0 - \frac{3k_BT}{4\pi} ln\left(\frac{\xi}{\sqrt{\sigma_{TP}}}\right) \tag{1.4}$$

$$\bar{\kappa}(\xi) = \bar{\kappa}_0 - \frac{5k_BT}{6\pi}\left(\frac{\xi}{\sqrt{\sigma_{TP}}}\right) \tag{1.5}$$

où κ_0 et $\bar{\kappa}_0$ sont les modules de rigidité de courbure d'une membrane plane idéale.

1.7 Interactions intermembranaires dans les phases lamellaires.

La phase lamellaire est un empilement successif d'un grand nombre de membranes qui interagissent. Les interactions entre ces objets sont susceptibles de modifier la stabilité de l'empilement smectique. Il existe quatre interactions intermembranaires qui contribuent à la stabilisation de la phase lamellaire, une attractive et trois répulsives que nous allons détailler ci dessous.

1.7.1 L'interaction de Van der Waals

Cette interaction attractive a pour origine les interactions dipolaires entre les couches hydrophobes de deux membranes premières voisines à travers le milieu aqueux. En tenant compte de l'épaisseur de la membrane, son potentiel d'interaction par unité de surface peut s'écrire [37]

$$V_{VDW} = -\frac{A_H}{12\pi}\left(\frac{1}{d_s^2} + \frac{1}{(d_B + d_m)^2} - \frac{2}{d_B^2}\right) \tag{1.6}$$

où A_H est la constante de Hamaker qui dépend des molécules constituant le milieu [38]. Pour le genre de systèmes que nous considérons A_H est de l'ordre de k_BT [37][39]. Dans le sytème expérimental que nous avons étudié, la constante de Hamaker vaut 1.1 k_BT (calcul en annexe E). L'interaction de Van der Waals est négligeable pour de grandes épaisseurs de solvant ($d_s > d_m$).

1.7.2 L'interaction d'hydratation

Lorsqu'on rapproche deux surfaces dans l'eau, à des distances inférieures au nanomètre, on observe une interaction forte. Il s'agit de l'interaction d'hydratation liée au déplacement

nécessaire de la couche d'eau fortement liée à la surface contenant les groupes hydrophiles, quand on rapproche des membranes en regard. Son potentiel d'interaction par unité de surface est donné par l'expression phénoménologique suivante [40] :

$$V_H = H_0 exp\left(\frac{d_s}{\lambda_H}\right) \tag{1.7}$$

où λ_H est une longueur moléculaire (environ 0.2 à 0.3 nm) et H_0 une énergie par unité de surface de l'ordre de 0.04 $k_BT.\text{nm}^{-2}$ à température ambiante. Cette interaction étant à très courte portée, on pourra la négliger dans le cadre de nos expériences.

1.7.3 L'interaction électrostatique

Les membranes constituées de tensioactifs ioniques sont globalement chargées du fait de l'ionisation des têtes polaires dans l'eau. Deux membranes en regard sont donc soumises à des interactions répulsives d'origine électrostatique. Près de la surface de chaque membrane chargée, les contre ions libérés par dissociation des groupements polaires forment une double couche diffuse dont la charge totale contrebalance celle de la monocouche. Le potentiel électrostatique par unité de surface obéit à l'équation de Poisson-Boltzmann [17] dont la résolution permet le calcul de l'énergie électrostatique d'interaction entre membranes.

$$\nabla^2\psi(x) = -\frac{Zen_0}{\epsilon_r\epsilon_0} exp\left(-\frac{Ze\psi(x)}{k_BT}\right) \tag{1.8}$$

L'origine des abscisses est prise à mi-distance entre les plans moyens des deux bicouches, $\psi(x)$ est le potentiel électrostatique en un point x de la solution. e est la charge unité, $\epsilon_r\epsilon_0$ la permitivité du solvant, n_0 la densité de contre-ions dans la plan x=0 et Z la valence du tensioactif. Cette équation peut être résolue analytiquement dans deux régimes limites asymptotiques

- En l'absence de sel :

  Dans l'approximation des fortes densités surfaciques de charge et des grandes distances et **uniquement dans ce cas** (i.e. $\frac{S}{d_w L_B} = \epsilon_{PB} << 1$), Roux et Safinya [41] ont déterminé l'énergie d'interaction électrostatique par unité de surface :

  $$V_{élec} = \frac{\pi k_BT}{4L_Bd_w}\left(1 - \epsilon_{PB} + (\epsilon_{PB})^2 + \ldots\right) \tag{1.9}$$

  où $L_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0 k_BT}$ est la longueur de Bjerrum du solvant (dans le cas de l'eau à 20°C, L_B=0.71 nm) et S la surface par charge unité. La longueur de Bjerrum correspond à la distance minimum qu'il peut y avoir entre deux charges identiques. Ce potentiel

d'interaction varie en $1/d_w$ ce qui correspond à une interaction répulsive à longue portée.

– En présence de sel, dans l'approximation des faibles recouvrements ($\lambda_D << d_w$) :
En présence d'électrolyte dans le solvant, des co-ions apparaissent provenant de sa dissociation. La présence de ces co-ions écrante l'interaction électrostatique au delà d'une distance définie par la longueur de Debye $\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{e^2 \sum_i n_\infty z_i^2}}$, où n_∞ est la concentration d'ions et z_i leur valence. L'interaction électrostatique diminue rapidement avec la distance, son expression asymptotique étant donnée par la relation suivante [17] :

$$V_{élec} = \frac{4k_B T}{\pi \lambda_D L_B} \gamma^2 exp(-\frac{d_w}{\lambda_D}) \tag{1.10}$$

où $\gamma = \tanh\left(\frac{1}{2} \arg\sinh\left(2\pi \frac{\lambda_D L_B}{S}\right)\right)$, $\lambda_D = \frac{0.3045}{\sqrt{[NaCl]}}\ nm$, et [NaCl] la concentration en mol.l^{-1} (on se limite ici au cas des ions monovalents). Plus la salinité est forte, plus l'interaction est écrantée par les co-ions en solution.

Notre système n'est dans aucun de ces deux régimes asymptotiques. En effet, nous avons travaillé sans sel en solution, à de très faibles densités surfaciques de charge pour lesquelles il n'existe pas de solution exacte de l'équation de Poisson-Boltzmann. Des résolutions numériques de cette équation sont cependant possibles, nous y reviendrons plus tard dans le manuscrit.

1.7.4 L'interaction d'ondulation

Cette interaction répulsive est de type stérique. Elle a pour origine les fluctuations thermiques des membranes. Une membrane, qui ondule entre ses deux plus proches voisines qu'elle ne peut pas traverser, est confinée dans un espace inférieur à celui qui lui serait accessible si elle était isolée. Certaines configurations ne sont donc pas explorables et l'espace accessible à la membrane est restreint. De cette restriction résulte une interaction répulsive entre membranes de nature entropique. En 1978, Helfrich a calculé l'énergie d'interaction par unité de surface résultant de cette répulsion stérique [42] :

$$V_{ond} = \frac{3\pi^2}{128} \frac{(k_B T)^2}{\kappa d_s^2} \tag{1.11}$$

Ce potentiel, qui est à longue portée car il varie en $1/d_s^2$, permet de stabiliser la phase lamellaire pour de très grandes périodicités ($d_B >> d_m$). C'est la répulsion stérique qui stabilise la phase lamellaire lorsque la membrane n'est pas chargée, ou lorsqu'une concentration en sel importante ($[NaCl] \geq 0.2M$) écrante les interactions électrostatiques.

On peut aussi remarquer que plus la membrane est flexible plus la répulsion stérique est importante.

1.8 Propriétés élastiques de la phase lamellaire

1.8.1 Phase lamellaire à un solvant

De la même façon que pour une membrane isolée, on peut définir des constantes élastiques pour la phase lamellaire constituée d'un empilement de membranes séparées par du solvant. Ces constantes élastiques nous informent sur la réponse de la phase L_α aux différentes sollicitations dont elle est l'objet. La densité d'énergie libre d'un smectique A à un composant, incompressible présentant des couches équidistantes et perpendiculaires à l'axe z, a été proposée par De Gennes [43] pour de faibles déplacements u(x,y,z) des couches :

$$f = \frac{1}{2}B\left(\frac{\partial u}{\partial z}\right)^2 + \frac{1}{2}K\left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2}\right)^2 \tag{1.12}$$

où B est le module de compressibilité smectique des couches (en $N.m^{-2}$) et K le module de courbure du smectique directement lié au module de rigidité de courbure des couches κ par la relation $K = \frac{\kappa}{d_B}$, d_B étant le pas smectique (ou périodicité). Afin de décrire l'énergie élastique d'une phase lamellaire à deux composants, une autre variable correspondant aux fluctuations de concentration de la membrane doit être introduite que l'on notera δc. C'est ce qu'ont fait Brochard et De Gennes en 1975 [44], en développant la densité d'énergie libre au deuxième ordre pour les fluctuations, on obtient alors :

$$f = \frac{1}{2}B\left(\frac{\partial u}{\partial z}\right)^2 + \frac{1}{2}K\left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2}\right)^2 + \frac{1}{2\chi}\delta c^2 + C\delta c\frac{\partial u}{\partial z} \tag{1.13}$$

où χ est la compressibilité osmotique de la bicouche (à périodicité constante) et C la constante de couplage entre les fluctuations de concentration et le déplacement des bicouches. En tenant compte de la condition d'équilibre $\frac{\partial f}{\partial \delta c} = 0$, on déduit de l'équation 1.13 une constante notée $\bar{B}$ qui est le module de compressibilité smectique à potentiel chimique de tensioactif constant. Si l'on suppose les membranes incompressibles, χ devient alors nul et $\bar{B} = B$. L'incompressibilité des membranes a été vérifiée expérimentalement par de nombreux auteurs [41][45]. Ils ont montré par ailleurs une invariance de l'épaisseur des membranes le long de ligne de dilution. Pour un smectique à deux composants incompressibles, $\bar{B}$ est une grandeur physique mesurable qui est directement reliée aux interactions

intermembranaires par la relation suivante [41][46] :

$$\bar{B} = d_B \left(\frac{\partial^2 V}{\partial d_B^2} \right) \tag{1.14}$$

où V est potentiel d'interaction entre deux membranes en regard et d_B la périodicité de la phase lamellaire. Pour un système de membranes d'épaisseur d_m séparées par une distance d_s, le potentiel d'interaction total par unité de surface de la membrane peut s'écrire en première approximation comme la somme suivante :

$$V_{tot} = V_{VDW} + V_{élec} + V_H + V_{ond} \tag{1.15}$$

où V_{VDW}, $V_{élec}$, V_H et V_{ond} sont respectivement les potentiels d'interaction de Van der Waals, électrostatique, d'hydratation et d'ondulation définis précédemment. Le module de compressibilité smectique total s'écrit alors comme la somme des modules de compressibilité smectique venant des différentes interactions dont nous avons fait la liste auparavant :

$$\bar{B}_{tot} = \bar{B}_{VDW} + \bar{B}_{élec} + \bar{B}_H + \bar{B}_{ond} \tag{1.16}$$

La contribution de l'interaction de Van der Waals est déduite des relations 1.6 et 1.14 :

$$\bar{B}_{VDW} = -d_B \frac{A_H}{2\pi} \left[\frac{1}{d_s^4} + \frac{1}{(d_B + d_m)^4} - \frac{2}{d_B^4} \right] \tag{1.17}$$

où A_H est la constante de Hamaker qui dépend des molécules constituant le milieu [38] (calcul en annexe E : A_H=1.1 k_BT). Dans notre système expérimental la contribution de l'interaction de Van der Waals est négligeable devant les interactions d'ondulation (annexe E).

La contribution de l'hydratation s'écrit :

$$\bar{B}_H = d_B \frac{H_0}{\lambda_H^2} \exp\left(-\frac{d_s}{\lambda_H} \right) \tag{1.18}$$

où λ_H est une longueur moléculaire (environ 0.2 à 0.3 nm) et H_0 une énergie par unité de surface de l'ordre de 0.04 k_BT.nm^{-2} à température ambiante. Elle sera négligée par la suite étant donné que sa portée est inférieure à 1-2 nm.

Quant à la contribution électrostatique au module de compressibilité smectique, comme déjà expliqué auparavant, il existe deux régimes asymptotiques limites qui correspondent aux cas où l'équation de Poisson-Boltzman a été résolue analytiquement :

- En l'absence de sel :

Roux et Safinya [41] ont déterminé l'expression du module de compressibilité smectique en fonction d'un paramètre sans dimension ϵ_{PB} défini comme suit :

$$\epsilon_{PB} = \frac{S}{d_w L_B} \tag{1.19}$$

où S est la surface par charge unité, d_w l'épaisseur d'eau et L_B la longueur de Bjerrum. Lorsque $\epsilon_{PB} << 1$ on peut écrire le module de compressibilité smectique comme :

$$\bar{B}_{élec} = d_B \frac{\pi k_B T}{2 L_B d_w^3} \left(1 - 3\epsilon_{PB} + 6(\epsilon_{PB})^2 + \ldots\right) \tag{1.20}$$

Souvent, seul le premier terme du développement est considéré, et $\bar{B}_{élec}$ est surestimé.

– En présence de sel, dans l'approximation des faibles recouvrements ($\lambda_D << d_s$) :
Le module de compressibilité smectique s'écrit :

$$\bar{B}_{élec} = \frac{4 k_B T d_B}{\pi L_B \lambda_D^3} \gamma^2 \exp -\frac{d_w}{\lambda_D} \tag{1.21}$$

avec $\gamma = \tanh\left(\frac{1}{2} \arg\sinh\left(2\pi \frac{\lambda_D L_B}{S}\right)\right)$ et $\lambda_D = \frac{0.3045}{\sqrt{[c_s]}}$ nm, et c_s la concentration d'électrolyte en mol.l^{-1} (on se limite ici au cas des ions monovalents).

Bien entendu, il est assez rare expérimentalement de se trouver précisément dans un de ces régimes limites. De plus Dubois et al. [47] ont montré, en réalisant des mesures de pression osmotique dans une phase lamellaire ionique, que les expressions analytiques asymptotiques ne permettaient pas une bonne description des observations expérimentales. Ils ont alors proposé un calcul général de la pression osmotique indépendant des conditions initiales. Le principal résultat qu'ils obtiennent est que si on considère la phase lamellaire en équilibre thermodynamique avec un réservoir fictif de salinité inconnue, la salinité de la phase lamellaire est toujours inférieure à celle du réservoir. Cette expulsion de sel, appelée effet Donnan, est d'autant plus importante que les membranes sont proches et qu'elles sont chargées.

En tenant compte de l'effet Donnan, Porcar et al. [9] ont calculé numériquement la contribution électrostatique au module de compressibilité smectique :

$$\bar{B}_{élec} = d_B k_B T c_s' \sinh \psi(d) \left(\frac{\partial \psi(d)}{\partial d_B}\right) \tag{1.22}$$

où la dérivée première du potentiel électrostatique $\psi(d)$, venant de l'équation de Poisson-Boltzmann, est calculée à épaisseur de membrane constante et c_s' est la concentration en sel du réservoir fictif. L'expression est valable quels que soient les paramètres physiques de la phase lamellaire d_B, S et c_s la concentration en sel. Ils comparent leurs résultats aux cas asymptotiques limites.

- En l'absence de sel :

  Si on ne prend que le premier terme du développement dans l'expression 1.20, dès que $\epsilon_{PB} > 0.05$, l'erreur relative entre les valeurs numériques et analytiques augmente dramatiquement. Si on tient compte des trois premiers termes du développement 1.20, il y a un bon accord entre les valeurs numérique et analytique tant que $\epsilon_{PB} < 0.5$.

- En présence de sel, dans l'approximation des faibles recouvrements ($\lambda_D << d_s$) :

  L'expression 1.21 reste valable mais pour tenir compte de l'effet Donnan, il faut remplacer la salinité du solvant c_s par celle du réservoir fictif c'_s. reliées par : $c_s \simeq c'_s\left(1 - \frac{4\lambda'_D}{d_s}\right)$ où λ'_D est la longueur de Debye dans le réservoir fictif. On a alors un bon accord entre le calcul numérique et l'expression qui tient compte de l'effet Donnan.

Enfin, Safinya et al. [48] ont mis en évidence le rôle prédominant joué par les répulsions stériques dans les phase lamellaires inverses. La contribution des interactions d'ondulation au module de compressibilité smectique est donnée par la formule suivante :

$$\bar{B}_{ond} = d_B \frac{9\pi^2 \left(k_B T\right)^2}{64\kappa d_s^4} \tag{1.23}$$

1.8.2 Phase lamellaire à deux solvants

Dans le cas de phases lamellaires composées d'un tensioactif, d'eau et de solvant organique, Oda et al. [49] et Porcar et al. [50] ont proposé une nouvelle description des interactions. Les interactions entre membranes sont décomposées en interactions entre monocouches de tensioactif à travers chacun des deux solvants et, en supposant la monocouche de tensioactif incompressible. On peut écrire la densité d'énergie libre sous la forme suivante :

$$f(\phi_w, \phi_o) = \frac{1}{d_B}\left[V_w(d_B\phi_w) + V_o(d_B\phi_o)\right] \tag{1.24}$$

où d_B est la périodicité de la phase lamellaire, ϕ_w et ϕ_o les fractions volumiques d'eau et de solvant organique et V_w et V_o les potentiels d'interactions par unité de surface à l'intérieur des couches d'eau et de solvant organique. En développant cette densité d'énergie libre en série de Taylor au second ordre pour les fluctuations de concentration autour de la position d'équilibre on obtient :

$$f = f_{eq} + \frac{1}{2}\left[\frac{\partial^2 f}{\partial \phi_w^2}\delta\phi_w^2 + \frac{\partial^2 f}{\partial \phi_o^2}\delta\phi_o^2 + \frac{2\partial^2 f}{\partial \phi_w \partial \phi_o}\delta\phi_w\delta\phi_o\right] \tag{1.25}$$

Si l'on identifie cette expression avec l'expresssion 1.13, et que l'on définit $\delta c = \delta\phi_o - \delta\phi_w$, en utilisant $\frac{\partial u}{\partial z} = \frac{\delta d_B}{d_B} = \frac{\delta\phi_o + \delta\phi_w}{\phi_{TA}}$, où ϕ_{TA} est la fraction volumique de tensioactif , on finit par obtenir la relation suivante :

$$\bar{B} = d_B \frac{\frac{\partial^2 V_w}{\partial d_w^2}\frac{\partial^2 V_o}{\partial d_o^2}}{\frac{\partial^2 V_w}{\partial d_w^2} + \frac{\partial^2 V_o}{\partial d_o^2}} \tag{1.26}$$

où d_w et d_o sont les épaisseurs d'eau et de solvant organique.

Le module de compressibilité smectique d'une phase lamellaire peut être assimilé à la raideur d'un ressort. Aussi une phase lamellaire à deux solvants sont les monocouches de tensioactifs sont considérées incompressibles peut être imaginée comme deux ressorts en série et le module de compressibilité total $\bar{B}$ peut être écrit par analogie avec la raideur comme :

$$\frac{1}{\bar{B}} = \frac{1}{\bar{B}_w} + \frac{1}{\bar{B}_o} \tag{1.27}$$

où $\bar{B}_w$ et $\bar{B}_o$ sont les modules de compressibilité smectique des parties aqueuses et organiques.

Dans le système $C_{12}E_4$-eau-décane que nous avons étudié, où la phase lamellaire est stabilisée par les interactions d'ondulations, $\bar{B}_w$ et $\bar{B}_o$ s'écrivent respectivement comme :

$$\bar{B}_w = \frac{Ad_B}{\kappa d_w^4} \; et \; \bar{B}_o = \frac{Ad_B}{\kappa d_o^4} \tag{1.28}$$

où $A = \frac{9\pi^2 k_B T}{64}$ et κ est la rigidité de courbure de la membrane.

Dès que l'épaisseur d'un solvant devient plus grande que celle de l'autre solvant, le $\bar{B}$ total provient essentiellement de celui du solvant majoritaire et en première approximation on peut considérer qu'on est ramené au cas d'une phase lamellaire à un seul solvant. Lorsque cette hypothèse ne pourra pas être appliquée, nous le préciserons explicitement dans le manuscrit.

1.9 Fluctuations d'une membrane et loi de dilution

Si on considère que la phase lamellaire est constituée de membranes rigides planes d'épaisseur d_m et de distances de répétition d_B, la dilution de cette phase par un solvant entraîne une augmentation de la périodicité d_B. Connaissant la fraction volumique de membranes ϕ_m, et la périodicité d_B, on peut, par des considérations géométriques simples, en déduire l'épaisseur de la membrane d_m.

En effet, en considérant les membranes comme plates et peu froissées, on peut écrire que le volume V dessiné sur la figure 1.11 est un parallélipipède de volume Ad_B, où A est

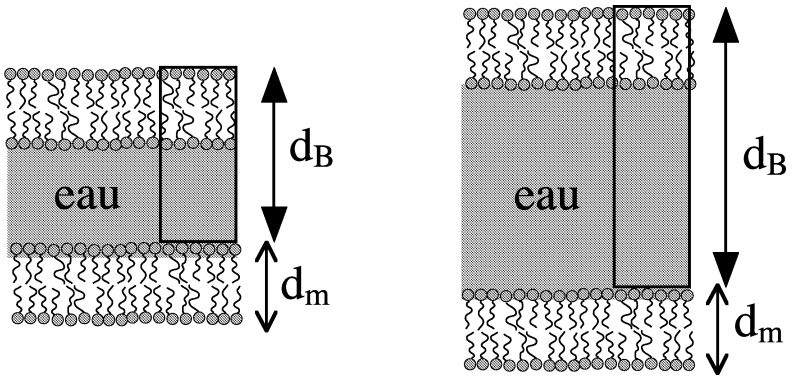


FIG. 1.11: *Schéma de la loi de dilution : la fraction volumique de membrane varie avec la quantité de solvant (ici l'eau).*

l'aire de la membrane V est égal au volume occupé par la membrane V_m=Ad_m auquel s'ajoute celui occupé par le solvant V_s, la fraction volumique de membrane peut alors s'écrire :

$$\phi_m = \frac{V_m}{V} = \frac{Ad_m}{Ad_B} \tag{1.29}$$

ce qui donne la formule connue sous le nom de loi de dilution, qui a été vérifiée expérimentalement par Larché et al. [51] :

$$\phi_m = \frac{d_m}{d_B} \tag{1.30}$$

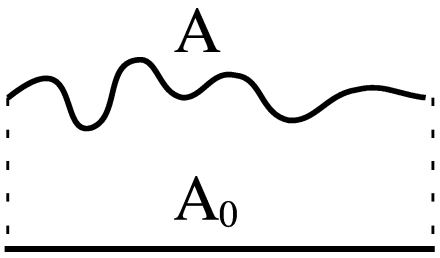


FIG. 1.12: *Aire réelle (A) et aire projetée (A_0) dans le cas d'une membrane fluctuante.*

Dès que les fluctuations de la membrane sont importantes, il faut distinguer la surface réelle de la membrane A, de sa projection A_0 sur sur son plan moyen d'équilibre (figure 1.12). L'élément de volume s'écrit maintenant $V = A_0 d_B$. Par contre la relation géométrique $V_m = Ad_m$ reste valable. L'équation 1.29 s'écrit alors :

$$\phi_m \equiv \frac{V_m}{V} = \frac{Ad_m}{A_0 d_B} \tag{1.31}$$

Le rapport de l'aire réelle A sur l'aire A_0 projetée a été calculé par Helfrich et Servuss [52], on a :

$$\frac{A}{A_0} = 1 + \frac{k_B T}{4\pi\kappa} ln\left(\frac{\xi_{||}}{a}\right) \tag{1.32}$$

où a définit le vecteur d'onde de coupure correspondant aux plus petites fluctuations observables $q = \frac{2\pi}{a}$, c'est une longueur moléculaire que l'on prend en général égale à la racine carrée de l'aire par tête polaire ($a = \sqrt{\sigma_{TP}}$), $\xi_{||}$ est la plus grande longueur d'onde permise pour les fluctuations des membranes. Cette longueur d'onde dépend fortement des distances entre membranes.

Si l'on se réfère à Helfrich et Servuss [52] $\xi_{||}$ vaut :

$$\xi_{||} = \sqrt{\frac{2\pi^3\kappa}{3k_B T}} d_s \tag{1.33}$$

tandis que pour Golubovic et Lubensky on a [53] :

$$\xi_{||} = \sqrt{\frac{32\kappa}{3\pi k_B T}} d_s \tag{1.34}$$

Hormis les préfacteurs ($\sqrt{\frac{2\pi^3}{3}} = 4.546$ .et $\sqrt{\frac{32}{3\pi}} = 1.842$), ces deux expressions sont similaires. L'expression 1.34 étant la plus utilisée dans la littérature, nous l'emploierons par la suite. Cependant l'utilisation de l'une ou l'autre des expressions n'amène pas de différences sensibles.

Comme d_s=d_B-d_m, l'équation 1.31 se réécrit avec une correction logarithmique qui est d'autant plus importante que la phase est diluée [28][54] :

$$\phi_m = \frac{d_m}{d_B}\left(V + W ln(d_B - d_m)\right) \tag{1.35}$$

où

- $V = 1 + \frac{k_B T}{4\pi\kappa} ln\left(\sqrt{\frac{32\kappa}{3\pi k_B T}}\frac{1}{a}\right)$
- $W = \frac{k_B T}{4\pi\kappa}$.

Dans le cas d'une phase lamellaire diluée ($\phi_m << 1$), $d_s = d_B - d_m$, qui peut être réécrit en première approximation comme $d_m(\phi_m^{-1} - 1)$, or dans ce cas $(\phi_m^{-1} - 1) \approx \phi_m^{-1}$ et l'écart à la loi de dilution devient finalement :

$$\phi_m = \frac{d_m}{d_B}\left(V' - W' ln(\phi_m)\right) \tag{1.36}$$

où

- $V' = 1 + \frac{k_B T}{4\pi\kappa} ln\left(\sqrt{\frac{32\kappa}{3\pi k_B T}}\frac{d_m}{a}\right)$

– $W' = \frac{k_B T}{4\pi\kappa}$.

Généralement, il est possible de déterminer expérimentalement la fraction volumique de membrane et la périodicité d_B de la phase L_α, les fluctuations font donc surestimer l'épaisseur de la membrane, et ce d'autant plus que la périodicité est importante. Pour les phase lamellaires stabilisées par répulsions stériques, lorsqu'on trace la loi de dilution (i.e. d_B en fonction de ϕ_m^{-1}), on observe à partir d'une certaine périodicité une déviation (figure 1.13).

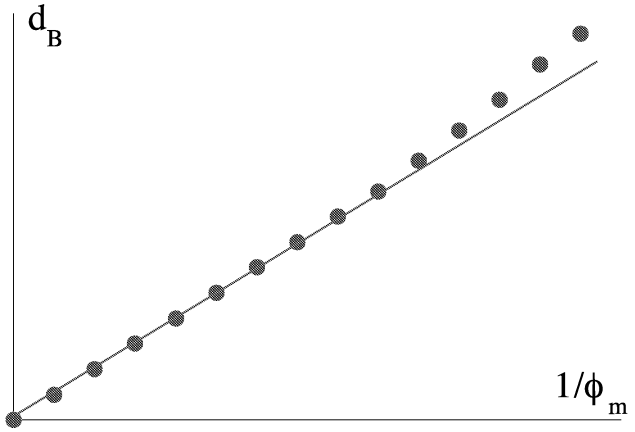


FIG. 1.13: *Exemple d'une déviation typique à la loi de dilution.*

On peut donc, à partir de la pente donnée par l'ajustement des premiers points de la courbe d_B en fonction de ϕ_m^{-1}, déterminer l'épaisseur de la membrane. Ensuite, en traçant l'écart à la loi de dilution (i.e. $d_B\phi_m$ en fonction de $ln(d_B - d_m)$ ou de $ln(\phi_m)$) et en ajustant les points expérimentaux par l'expression 1.35, on peut estimer la rigidité κ de la membrane en utilisant la valeur de d_m déterminée par la loi de dilution clasique dans l'expression de W. Cependant il existe une contrainte à l'utilisation de cette méthode, il faut que la phase lamellaire fluctue suffisamment pour que l'écart à la loi de dilution ne donne pas des droites complètement horizontales. Nous sommes avantagés expérimentalement car l'écart à la loi de dilution classique est d'autant plus important que les membranes sont épaisses [55]. Pour les phases lamellaires fluctuant peu, cette méthode donne une erreur sur la détermination de la rigidité de l'ordre de 10-15%.

Lei et Lei [56] ont proposé une determination alternative du module de rigidité de courbure κ, basée sur la dilution de la phase lamellaire, valable lorsque l'épaisseur de la membrane devient du même ordre de grandeur que la distance intermembranaire. Nous ne détaillerons pas ici cette méthode, cependant en annexe F, nous comparons l'écart à la loi de dilution avec la méthode de Lei et Lei : on retrouve exactement la même rigidité

par les deux méthodes.

D'autres méthodes de détermination de la rigidité des membranes existent comme la RPE [57], la méthode du coin de Cano [58], la diffusion de lumière sur des phases lamellaires orientées [59][46][60] ou encore la RMN [22][61] mais elles sont d'un usage moins aisé. Nous avons principalement utilisé l'écart à la loi de dilution, et réalisé quelques expériences de RMN, dont nous détaillerons le principe dans le chapitre qui suit.

Chapitre 2

Techniques expérimentales

2.1 Introduction

La caractérisation des mésophases que nous avons étudiées, et des inclusions membranaires que nous y avons insérées, ont nécessité l'usage de techniques expérimentales aussi diverses que la diffusion de rayons X aux petits angles, le recouvrement de fluorescence après photoblanchîment, les mesures de tension superficielle, les techniques spectroscopiques : absorption UV, fluorescence et dichroïsme circulaire, la RMN du deutérium et enfin la rhéologie. Ce chapitre présentera les différentes techniques utilisées et les informations qu'elles peuvent nous apporter sur les systèmes que nous avons étudiés.

2.2 La diffusion de rayons X aux petits angles (en anglais Small Angle X-ray Scattering noté SAXS)

Certains systèmes colloïdaux présentent un ordre à grande distance (phases cubiques et hexagonales), d'autres non. Cependant, pour ces derniers, la répartition spatiale des molécules dans ces sytèmes n'est pas totalement aléatoire. Décrire la structure de ces entités revient à déterminer la distribution moléculaire dans le système. Les techniques de diffusion du rayonnement aux petits angles se sont imposées comme l'outil idéal pour étudier les mésophases de tensioactifs car elles permettent de décrire à la fois la structure des objets, mais aussi leurs interactions.

Nous présenterons d'abord le dispositif expérimental que nous avons utilisé puis le genre d'informations auquel la diffusion permet d'accéder dans les phases étudiées.

2.2.1 Montage expérimental

Le dispositif expérimental, dont nous nous sommes servis, se trouve au Collège de France, dans le laboratoire de Physique de la Matière Condensée. Il a été réalisé par Raymond Ober. Ce montage est schématisé dans la figure 2.1. Le générateur de rayons X est un appareil à anode de cuivre tournante (Rigaku). Il fonctionne à une tension de 40 kV et une intensité de 25 mA, et la source a une taille apparente de 0.1×0.1 mm^2; le rayonnement est produit par excitation et désexcitation des niveaux énergétiques de l'anode, dont les longueurs d'onde d'émission sont $\lambda_{K_{\alpha 1}} = 1.5443$ Å, $\lambda_{K_{\alpha 2}} = 1.5405$ Å et $\lambda_{K_\beta} = 1.3921$ Å. L'anode émet aussi un spectre continu de longueurs d'onde courtes, provoqué par le freinage des électrons. Un miroir constitué d'un dépôt d'or sur une surface de quartz, focalise le faisceau de rayons X, et élimine le spectre continu ; ceci parce qu'il est réglé pour agir comme un filtre ne laissant passer que les grandes longueurs d'onde. Finalement, un filtre de nickel enlève la composante λ_{K_β} , et le faisceau peut être considéré comme monochromatique, de longueur d'onde moyenne $\lambda_{K_\alpha} = 1.54$ Å et focalisé dans le plan horizontal.

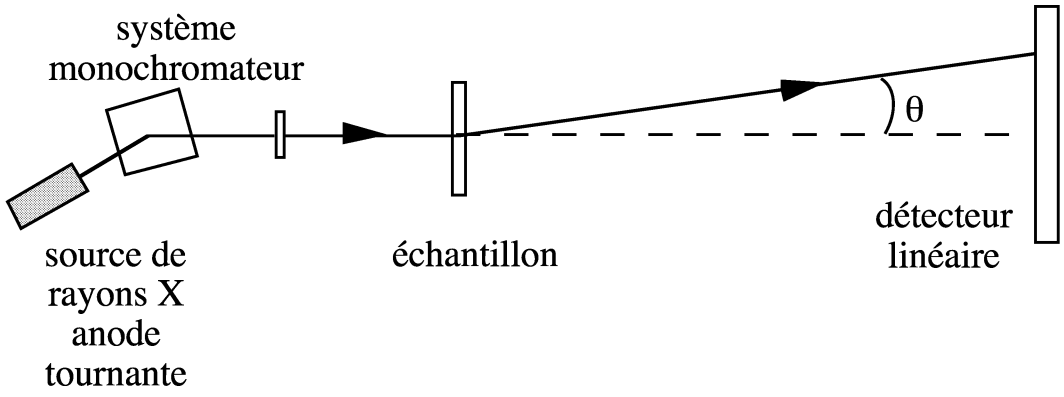


FIG. 2.1: *Dispositif expérimental de la diffusion des rayons X aux petits angles.*

Lorsque l'on éclaire l'échantillon, le faisceau diffusé est envoyé vers un détecteur linéaire de 50 mm (Elphyse) divisé en 512 canaux, séparés par 115 μm. Les distances échantillon-détecteur sont 0.80 m ou 0.37 m, afin d'explorer une gamme de vecteurs d'onde q entre 0.1 et 3.5 nm^{-1} , avec une résolution $\Delta q \leq 0.017\ nm^{-1}$. La résolution a été déterminée en mesurant la largeur à mi-hauteur du faisceau direct sans échantillon. Le module du vecteur d'onde, q, est lié à l'angle de diffusion par $q = \frac{4\pi}{\lambda} sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$.

Les spectres de diffusion sont constitués par l'ensemble des photons reçus en différents points du détecteur, pendant le temps de mesure t. Ils représentent la variation de l'inten-

sité I(q) du faisceau diffusé en fonction du module du vecteur d'onde q. Chaque spectre doit être normalisé en temps, et corrigé du facteur de transmission des échantillons en mesurant le rapport intensité transmise/intensité directe par le liquide. D'autre part, nous devons soustraire la contribution au spectre qui vient du solvant. On réalise donc l'expérience avec le solvant pur, puis on soustrait son spectre de celui de l'échantillon, réalisé dans les mêmes conditions. Il est enfin possible de travailler en unités absolues en tenant compte du nombre de photons incidents par unité de temps. Ceci permet de comparer des expériences réalisées sur différents montages expérimentaux, mais n'est pas crucial pour des phases lamellaires ou éponges.

Les échantillons sont introduits dans des capillaires en verre de 1 mm de diamètre, dont les parois font 10 μm d'épaisseur, au moyen de pipettes Pasteur étirées à la flamme du bec Bunsen. Ces capillaires sont ensuite scellés à la flamme et placés dans un porte-échantillons thermostaté par circulation d'eau. La température est précise à 0.1°C près. Dans le cas des phase cubiques, qui sont très visqueuses, les échantillon ont été tartinés au moyen d'une spatule sur des cales en Téflon^{TM} puis pressés entre deux feuilles de mica. Ce sandwich est ensuite placé dans une monture, elle-même introduite dans un porte échantillon thermostaté.

Nous allons maintenant décrire les caractéristiques principales des spectres des phases étudiées, ainsi que les différents modèles permettant d'en tirer des informations structurales.

2.2.2 Diffusion du rayonnement par les phase lamellaires

L'ordre smectique que possédent les phases lamellaires de tensioactifs pourrait inciter à penser que leurs spectres de diffusion ne présentent que des pics de Bragg correspondant aux périodes. La réalité est un peu différente. En effet, comme expliqué dans le premier chapitre, les fluctuations thermiques empêchent d'obtenir un vrai ordre à longue distance (instabilité de Landau-Peierls [24][23]), et seuls des quasi-pics sont observables aux positions q_n=nq_0 où $q_0 = \frac{2\pi}{d_B}$. La forme des spectres dépend très fortement des fluctations de concentration des membranes. Ces fluctuations ont pour origine d'une part les fluctuations intrinsèques de concentration de chaque composant de la phase lamellaire, d'autre part les fluctuations thermodynamiques de position des couches formant la phase smectique. La fonction de corrélation des fluctuations peut donc être décomposée en trois termes : un terme de fluctuation de concentration noté $\langle \delta c(q) \delta c^{\star}(q) \rangle$, un terme de fluctuation de position des couches noté $\langle u(q) u^{\star}(q) \rangle$ auquels s'ajoute un terme de couplage de ces deux types de fluctuations noté $\langle \delta c(q) u^{\star}(q) \rangle$. Le schéma d'un spectre typique de l'intensité dif-

fusée dans la direction q_z normale au plan moyen des membranes est présenté figure 2.2.

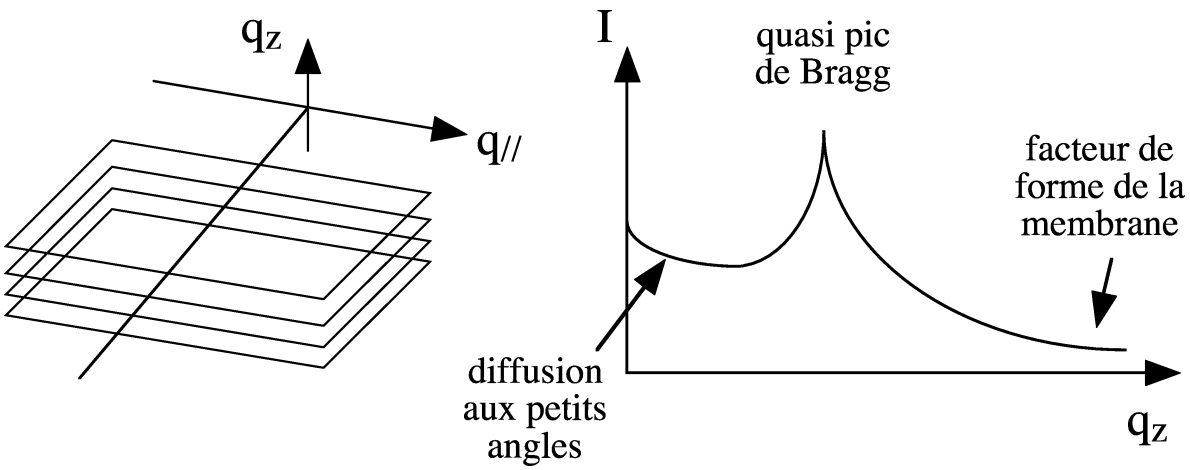


FIG. 2.2: *A gauche géométrie de diffusion d'une phase smectique orientée. A droite, profil de diffusion typique dans la direction q_z.*

L'intensité diffusée comporte :

- Un pic de Bragg au vecteur d'onde $q_0 = \frac{2\pi}{d_B}$, correspondant à la périodicité de la phase lamellaire. Il est possible, pour des phases très ordonnées, d'observer des pics correspondant aux ordres suivants, aux positions $q_n = nq_0$
- De la diffusion autour du pic de Bragg, venant de la divergence logarithmique des fluctuations thermiques de position, qui est la preuve expérimentale de l'instabilité de Landau-Peierls [24][23]. La mesure de la diffusion en dehors de la position q_0 permet de déterminer le paramètre de Landau-Peierls η, plus souvent appelé paramètre de Caillé, comme on le montrera plus loin.
- De la diffusion aux petits vecteurs d'onde ayant pour origine les couplages anisotropes entre les fluctuations de concentration et le déplacement des couches [62][63].
- Enfin, de la diffusion aux "grands" vecteurs d'onde, correspondant au facteur de forme d'une membrane isolée, qui permet de déterminer l'épaisseur de la membrane [64].

Les paramètres élastiques de la phase lamellaire sont reliés aux fonctions de corrélation associées aux fluctuations du système. Nallet et al. [59][46] ont effectué le calcul de ces fonctions de corrélation à partir de l'expression de la densité d'énergie libre de la phase lamellaire déterminée par Brochard et De Gennes [44], le théorème d'équipartition donne alors :

- $\langle \delta c(q) \delta c^{\star}(q) \rangle = \frac{k_B T \chi \left(B q_z^2 + K q_{//}^4 \right)}{\bar{B} q_z^2 + K q_{//}^4}$
- $\langle u(q) u^{\star}(q) \rangle = \frac{k_B T}{\bar{B} q_z^2 + K q_{//}^4}$
- $\langle \delta c(q) u^{\star}(q) \rangle = i \frac{k_B T C \chi q_z}{\bar{B} q_z^2 + K q_{//}^4}$

où χ est la compressibilité osmotique à distance intermembranaire constante, C une constante de couplage entre le déplacement des couches et les fluctuations de concentration, B le module de compressibilité smectique, $\bar{B}$ le module de compressibilité smectique à potentiel chimique de membrane constant et K le module de rigidité de courbure moyenne. Plusieurs modèles théoriques existent, rendant compte du profil de diffusion de la phase lamellaire en fonction de sa structure. Nous allons les présenter, en nous attardant plus longuement sur celui que nous avons utilisé.

Modèle géométrique (Position des quasi-pics de Bragg).

Dans ce modèle, la phase lamellaire est considérée comme un empilement de N plaquettes rigides, d'épaisseur d_m et d'extension latérale L. Le profil de concentration est un profil de type créneau. L'intensité diffusée permet de rendre compte de la périodicité via un facteur de structure S(q), et de la géométrie des plaquettes via un facteur de forme P(q) : I(q)$\propto$S(q)P(q). Le profil de concentration est défini de la façon suivante :

$$\rho(x) = \sum_{n=0}^{N-1} \rho_0(z - n d_B) \; pour \;\; \mid x \mid < L \tag{2.1}$$

et

$$\rho(x) = 0 \; ailleurs \tag{2.2}$$

Cependant, ce modèle ne tenant pas du tout compte des fluctuations ne permet d'expliquer ni l'élargissement des pics de Bragg, ni la diffusion aux petits angles.

Modèles thermodynamiques (diffusion aux petits angles et autour des quasi-pics de Bragg).

Ces modèles ont été proposés pour prendre en compte les fluctuations thermiques. Les membranes sont considérées comme des objets d'épaisseur quasi-nulle fluctuant sous l'effet de l'agitation thermique. Caillé [65] a proposé un profil de concentration en peigne de Dirac fluctuant. L'intensité est alors proportionnelle au facteur de structure S(q) qui permet d'expliquer l'élargissement des pics ainsi que la diffusion aux petits angles. Le profil de concentration s'écrit alors :

$$\rho(\vec{x}) = \sum_{n=0} \delta(z - n d_B + u_n(\vec{x_{\perp}})) \tag{2.3}$$

où $u_n(\vec{x_\perp})$ est le déplacement le long de l'axe z de la n^{ième} couche à la position $\vec{x_\perp}$ qui représente le couple de coordonnées (x, y) sur la membrane. On observe alors une succession de pics de Bragg. L'écart par rapport à la position du pic suit une loi de puissance différente selon la direction z normale au plan des couches et selon la direction parallèle aux couches :

$$I_{diff}(\vec{q_{//}}= 0, \vec{q_z}) \propto |\vec{q_z} - \vec{q_n}|^{-(2-\eta_n)} \tag{2.4}$$

$$I_{diff}(\vec{q_{//}}, \vec{q_n}) \propto |\vec{q_n} - \vec{q_{//}}|^{-(4-2\eta_n)} \tag{2.5}$$

où $q_n = nq_0$ est la position du quasi-pic de Bragg d'ordre n, η_n est l'exposant appelé exposant de Caillé d'ordre n, relié au paramètre de Caillé η par la relation suivante :

$$\eta_n = n^2\eta = n^2 q_0^2 \frac{k_B T}{8\pi\sqrt{\bar{B}K}} \tag{2.6}$$

Seuls les premiers ordres du quasi-pic de Bragg sont visibles dans les systèmes lyotropes que nous avons étudiés. L'élargissement des pics est donc lié au produit des constantes élastiques via l'équation 2.6.

En ce qui concerne l'intensité difusée aux très petits angles, plusieurs auteurs [26] [66] [63] ont montré qu'elle était anisotrope, et qu'en particulier l'intensité en q_z était inversement proportionnelle au module de compressibilité smectique :

$$lim_{\vec{q_z}\to 0} I_{diff}(\vec{q_{//}}= 0, \vec{q_z}) \propto k_B T \chi \frac{B}{\bar{B}} \tag{2.7}$$

$$lim_{\vec{q_{//}}\to 0} I_{diff}(\vec{q_{//}}, \vec{q_z}= 0) \propto k_B T \chi \tag{2.8}$$

où χ est la compressibilité osmotique de la membrane. L'anisotropie prévue ne peut être observée que sur des échantillons parfaitement orientés. Dans le cas d'une poudre, l'intensité du signal aux très petits angles a été calculée par Castro-roman et al. [67] qui ont montré qu'elle était inversement proportionnelle au module de compressibilité smectique :

$$lim_{q\to 0} I_{diff} \cong \frac{k_B T}{\bar{B}} \left[1 - \frac{\pi}{2}\sqrt{\frac{K}{\bar{B}}} q + \frac{8}{3}\frac{K}{\bar{B}} q^2 - \frac{3\pi}{2}\left(\frac{K}{\bar{B}}\right)^{3/2} q^3 + \frac{128}{15}\left(\frac{K}{\bar{B}}\right)^2 q^4 + \ldots \right] \tag{2.9}$$

Expérimentalement, il faut prendre de nombreuses précautions afin d'estimer la variation de $\bar{B}$ à partir du signal au très petits angles : tous les capillaires (échantillons et témoin) doivent avoir le même diamètre et être bien centrés par rapport au faisceau de rayons X.

L'effet orientationnel n'est pas uniquement limité à l'intensité aux très petits angles mais se retrouve sur tout le spectre de diffusion, et les lois de puissances rappelées dans les expressions 2.4 et 2.5 ne sont valables que pour des échantillons parfaitement orientés.

Si les échantillons sont orientés suivant une symétrie cylindrique, on obtient la loi de puissance suivante [68] :

$$I_{diff}(\vec{q_z}, 0) \propto |\vec{q_z} - \vec{q_n}|^{-(1.5-\eta_n)} \tag{2.10}$$

Dans le cas d'échantillons de poudre, Roux et al. [41] et Zhang et al. [69] ont démontré que la loi de puissance devenait :

$$I_{diff}(\vec{q_z}, 0) \propto |\vec{q_z} - \vec{q_n}|^{-(1-\eta_n)} \tag{2.11}$$

L'intensité diffusée autour des quasi-pics de Bragg dépend donc très fortement de l'orientation des échantillons. C'est pourquoi on définit la mosaïcité qui décrit l'écart à l'orientation parfaite des échantillons. On peut la caractériser par l'angle α qui délimite les taches de diffusion présentées sur la figure 2.3. Kaganer et al. [70] ont étudié théoriquement

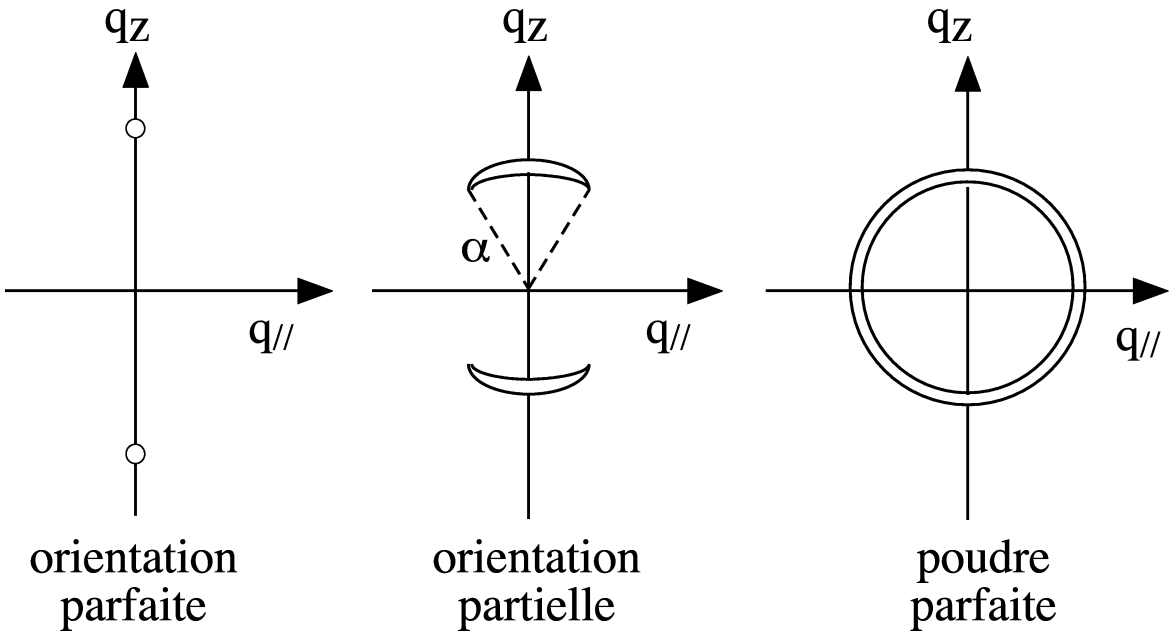


FIG. 2.3: *Effet de l'orientation de l'échantillon sur l'intensité diffusée.*

les conséquences de la mosaïcité sur l'intensité diffusée. Ils démontrent que, même pour un échantillon assez bien orienté, le profil d'intensité autour du quasi-pic de Bragg se décompose en deux régions : une région où la loi de puissance est celle d'une poudre parfaite, pour les vecteurs d'onde très proches de q_n ; et une loi de puissance d'échantillon parfaitement orienté sur les bords du pic. La limite q_c entre les deux régions dépend de la mosaïcité via l'angle α comme suit :

$$\mid q_c - q_n \mid = \frac{\lambda q_n^2 \alpha^2}{4} \tag{2.12}$$

où λ est la longueur de pénétration smectique ($\lambda = \sqrt{K/\bar{B}}$). On a alors :

$$I_{diff}(\vec{q_z}, 0) \propto |\vec{q_z} - \vec{q_n}|^{-(1-\eta_n)} \tag{2.13}$$

pour la zone centrale du quasi-pic, et

$$I_{diff}(\vec{q}, 0) \propto |\vec{q} - \vec{q_n}|^{-(2-\eta_n)} \tag{2.14}$$

sur les bords du quasi-pic. Cependant, dans la pratique, dès que la mosaïcité α dépasse 5°, la zone orientée devient négligeable, et on a un spectre de poudre.

Modèle géométrique tenant compte des fluctuations thermodynamiques, aussi nommé "Modèle de Nallet" (Spectre total, sauf pour q→0).

Expérimentalement, les spectres de diffusion sont caractérisés par une modulation des quasi-pics de Bragg, par le facteur de forme de la membrane et les fluctuations thermiques. En combinant les deux modèles présentés précédemment, on peut rendre compte de cette modulation. Il faut donc combiner un facteur de forme de la membrane non constant, et un empilement smectique perturbé par les fluctuations thermiques. Nallet et al. ont proposé en 1993 [64] un modèle analytique simple et facile d'utilisation permettant de décrire les spectres de poudre d'échantillons lamellaires. Leurs hypothèses sont les suivantes : les membranes ont une épaisseur finie, et les seules fluctuations thermiques autorisées sont les déplacement u_n uniformes de chaque membrane perpendiculairement à leur position d'équilibre nd_B. Ce déplacement est indépendant des coordonnées transverses de la membrane, c'est à dire que les bicouches ne sont pas autorisées à onduler et que l'on se restreint à un mode de fluctuation unique de compression de la structure smectique [1]. Dans ces hypothèses, le profil de concentration peut s'écrire :

$$\rho(\vec{x}, 0) = \sum_n \delta[z - nd_B + u_n(\vec{x_\perp})] \tag{2.15}$$

en supposant que u_n est une variable gaussienne dont les fonctions de corrélations sont définies comme suit [64] :

$$< (u_n - u_0)^2 >= \frac{\eta n^2 d_B^2}{8} \; si \; n \; est \; petit \tag{2.16}$$

et

$$< (u_n - u_0)^2 >= \frac{\eta d_B^2}{2\pi^2}[ln(\pi n) + \gamma] \; si \; n >> 1 \tag{2.17}$$

[1] En fait, le modèle de Nallet tient compte des ondulations des membranes mais manière non autocohérente (non self-consistente), car les fluctuations des membranes sont décorrélées les unes des autres [71].

où γ est la constante d'Euler (γ=0.5772), et η le paramètre de Caillé. L'intensité diffusée par un cristal smectique isolé de dimension finie prend alors la forme suivante :

$$I_{diff}(\vec{q}) = NP_{//}(\vec{q_{//}})P(q_z)S(q_z) \tag{2.18}$$

où N est le nombre de lamelles contenu dans le volume dans lequel passe le faisceau, et $P_{//}(\vec{q_{//}})$ l'expression transverse du facteur de forme de la membrane qui permet d'expliciter sa dimension finie.

Afin de tenir compte de la résolution finie du montage expérimental, l'intensité détectée pour un vecteur d'onde q donné est prise comme le produit de convolution de l'intensité diffusée par l'échantillon, par la fonction d'appareil $R(\vec{q})$:

$$I_{dét}(\vec{q}) = \int I_{diff}(\vec{q})R(\vec{q} - \vec{q}')d\ \vec{q}' \tag{2.19}$$

où R est une gaussienne de largeur Δq :

$$R(\vec{q}) = \frac{exp\left(-\frac{q^2}{\Delta q^2}\right)}{(2\pi(\Delta q)^2)^{3/2}} \tag{2.20}$$

Dans le cas d'échantillons de poudre, les microdomaines orientés de taille finie sont aléatoirement distribués, on doit alors moyenner l'intensité sur toutes les orientations de même poids statistique. Si on considère alors un volume V contenant N lamelles ($V = N\pi L_{//}^2 d_B$), en tenant compte de la fonction d'appareil, l'intensité détectée s'écrit alors comme :

$$I_{dét}(q) = \frac{2\pi V P(q)S(q)}{d_B q^2} \tag{2.21}$$

où le facteur de structure S(q) prend la forme :

$$S(q) = 1 + 2\sum_{n=1}^{N-1}(1 - \frac{n}{N})cos\left(\frac{q_z d_B n}{1 + 2(\Delta q)^2 d_B^2 \beta(n)}\right)\frac{exp\left(-\frac{2q_z^2 d_B^2 \beta(n) + (\Delta q)^2 d_B^2 n^2}{2(1+2(\Delta q)^2 d_B^2 \beta(n))}\right)}{\sqrt{1 + 2(\Delta q)^2 d_B^2 \beta(n)}} \tag{2.22}$$

avec

$$\beta(n) = \frac{< (u_n - u_0)^2 >}{2d_B^2} \tag{2.23}$$

En ce qui concerne le facteur de forme P(q), son expression dépend de la nature du rayonnement utilisé via le profil de concentration. En prenant une phase lamellaire de SDS dans l'eau : si on utilise un faisceau de neutrons, le profil est tout simplement un créneau correspondant par exemple au contraste entre la membrane, dont les chaînes aliphatiques sont deutériées, et l'eau ; si on utilise un faisceau de rayons X, il faut tenir compte de plusieurs densités électroniques, correspondant respectivement aux chaînes aliphatiques,

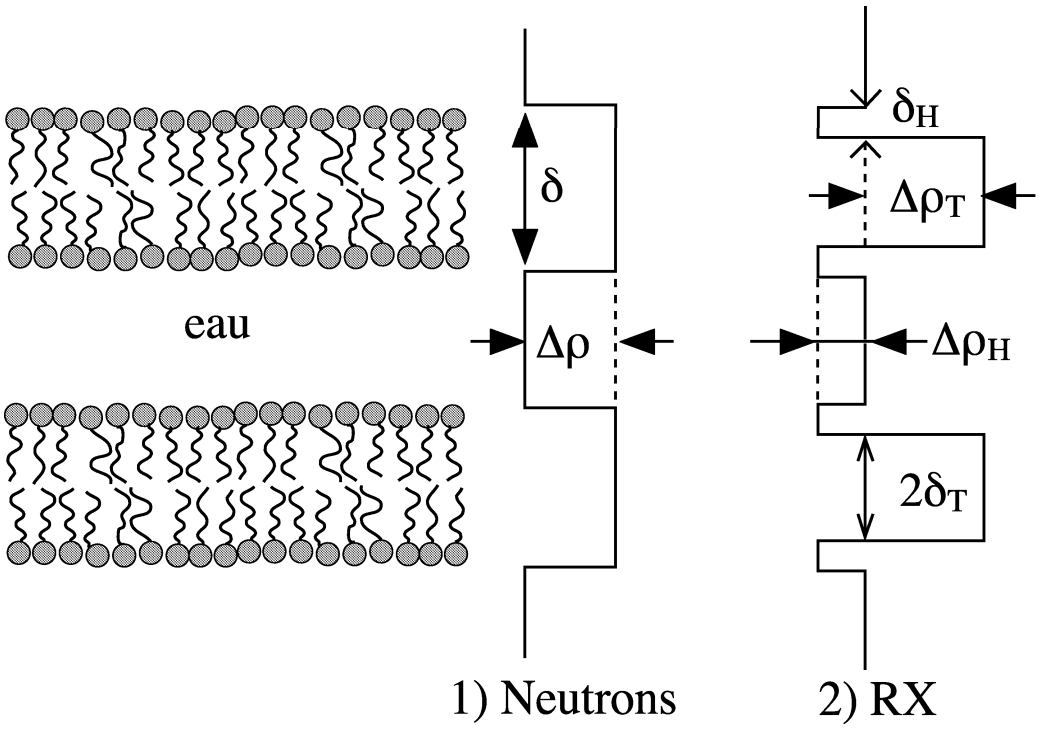


FIG. 2.4: *Représentation schématique des profils de concentration pour1) les neutrons, 2) les rayons X.*

aux têtes polaires et à l'eau, et connaître les épaisseurs associées aux différentes densités. La figure 2.4 représente les profils de concentration associés à une membrane de tensioactifs dans l'eau pour les deux types de rayonnements. Les expressions des facteurs de forme associés aux profils de la figure 2.4 sont alors :

$$P_{neutrons}(q) = \frac{2\Delta\rho^2}{q^2}\left[1 - cos(q\delta)exp\left(-\frac{q^2\delta^2}{32}\right)\right] \tag{2.24}$$

et

$$P_{RX}(q) = \frac{4}{q^2}\left(\Delta\rho_H[sin\left(q(\delta_H + \delta_T)\right) - sin(q\delta_H)] - \delta\rho_T sin(q\delta_T)\right)^2 \tag{2.25}$$

Dans le système que nous avons étudié, les chaînes aliphatiques et le solvant organique ont la même densité électronique ($\approx$ 260 e.nm^{-3}), de même que l'eau et les têtes éthylène-glycol ($\approx$ 330 e.nm^{-3}), aussi nous avons pu nous cantonner à un profil de densité en créneau simple.

C'est ce modèle, nommé familièrement modèle de Nallet, que nous avons retenu pour ajuster nos spectres à cause de sa simplicité d'utilisation et de la rapidité avec laquelle les spectres sont ajustés. Les ajustement sont réalisés grâce au programme écrit par Raymond Ober (Laboratoire de Physique de la Matière Condensée, Collège de France).

Il est important de noter que dans les représentations logarithmique et linéaire l'ajustement ne peut pas s'effectuer pour toutes les valeurs du vecteur d'onde q. En effet, les spectres présentent une forte remontée pour les faibles valeurs de q, que le modèle est incapable de prendre en compte. On imposera donc une limite inférieure pour l'ajustement, dont la valeur est environ la moitié de la position du pic de Bragg (i.e. $\frac{q_0}{2} = \frac{\pi}{d_B}$).

La démarche suivie afin d'ajuster les spectres de rayons X comporte trois étapes. On fixe d'abord dans le programme d'ajustement la résolution expérimentale de l'appareil Δq à 0.017 nm^{-1} ainsi que le nombre de lamelles à 60. Ce nombre a été fixé assez grand, dans ce cas la largeur du pic est essentiellement due à la résolution du montage et au paramètre η. En revanche, si N est petit, on risque d'observer des oscillations secondaires génantes et un élargissement du pic (équivalent à une moins bonne résolution).

- Dans un premier temps, on ajuste le spectre dans la représentation $q^4I(q)$. Cet ajustement retourne des valeurs pour les différents paramètres laissés libres, c'est-à-dire d_B, δ_{RX} l'épaisseur hydrophobe et η. Dans la représentation $q^4I(q)$, l'épaisseur de la lamelle est mise en valeur. Elle correspond en gros à la position du minimum situé après le premier pic. Pour certains de nos échantillons ce minimum est difficile à situer, cependant l'ajustement a plus de chance de déterminer une valeur correcte pour l'épaisseur δ_{RX} dans cette représentation. A ce stade, seule la valeur de δ_{RX} est conservée et restera constante par la suite.

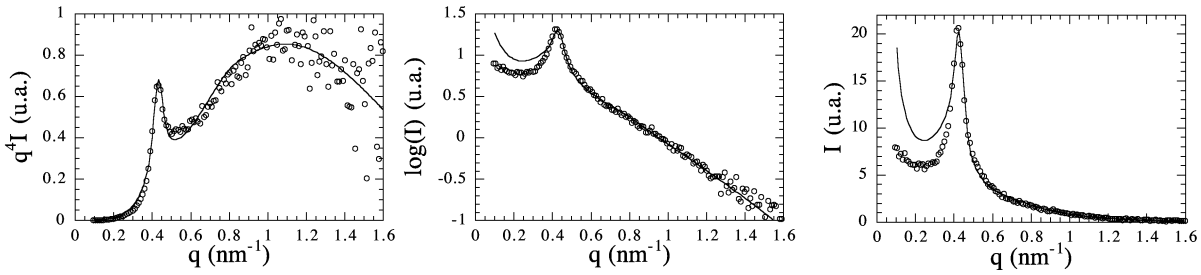


FIG. 2.5: *Exemples d'ajustements après chacune des trois étapes. Les données expérimentales sont représentées par les points (∘) tandis que l'ajustement est le trait. Les valeurs obtenues sont δ_{RX}=2.8± 0.1 nm, η=0.76± 0.02 et d_B=14.8 ± 0.2 nm.*

- Ensuite, le spectre est ajusté dans la représentation logarithmique (i.e. $\log[I(q)]$), où les paramètres libres sont maintenant d_B, et η. Cette représentation met en valeur la pente autour du pic et permet de mieux ajuster la valeur du paramètre de Caillé η. La valeur trouvée pour η, avec une erreur de l'ordre de 10% , est alors fixée.
- Enfin, on ajuste le spectre dans la représentation linéaire (i.e. $I(q)$). On obtient alors une valeur pour d_B (c'est en effet dans cette représentation que la position du pic est la plus facile à déterminer).

Dans la suite seule les valeurs de l'épaisseur de la membrane δ_{RX} et du paramètre de Caillé η trouvées par l'ajustement seront utilisées. Pour la distance de Bragg, d_B, il est préférable de mesurer directement la position du maximum du pic. Les valeurs ainsi obtenues sont en effet beaucoup plus précises.

Autres modèles.

D'autres modèles existent encore notamment celui écrit par Ning Lei et al. [72], ou encore celui proposé tout récemment par Castro Roman et al. [67].

Ning Lei et al. [72] ont proposé un modèle harmonique discret pour décrire le facteur de forme statique d'un empilement de membranes. Ce modèle est valable pour des phases lamellaires orientées. Il permet d'ajuster le spectre dans toute la gamme des vecteurs d'onde, même pour les très petits vecteurs d'onde. Ceci permet d'ajuster séparément les paramètres élastiques de la phase lamellaire κ et $\bar{B}$, contrairement aux autres modèles présentés. De plus, ce modèle rend très bien compte du signal aux très petits angles. Cependant, ce modèle nécessitant la résolution d'intégrales, il est assez lourd à mettre en oeuvre. Par ailleurs, l'orientation des échantillons est souvent très difficile à réaliser. Ces différents arguments expliquent que nous n'ayons par retenu ce modèle pour ajuster nos spectres expérimentaux.

Castro-Roman et al. [67] ont développé un modèle tenant compte de la flexibilité des membranes afin de pouvoir déterminer séparément les constantes élastiques κ et $\bar{B}$ de la phase lamellaire . Leur modèle s'inspire des travaux de Porte et al. [66], eux mêmes s'appuyant sur ceux de Gunther et al. [73] qui calculent les fluctuations de position des membranes. Ils ont développé une procédure numérique pour déterminer la fonction de corrélation de paires pour des échantillons de poudres. La transformée de Fourier de cette fonction représente le facteur de structure de la phase lamellaire [74].

Dans le cas de systèmes smectiques durs ($\eta < 0.3$, pics fins), le modèle de Nallet et al. [64] et celui de Castro-Roman et al. [67] donnent sensiblement les mêmes résultats. Toutefois, le procédé numérique de Castro-Roman donne des valeurs de la rigidité de membrane qui divergent. Etant donnée la différence de temps de calcul, quelques minutes pour le modèle de Nallet et al. [64], contre plusieurs heures pour celui de Castro-Roman et al., il nous a semblé préférable d'utiliser le premier modèle pour ajuster les spectres.

Dans le cas des sytèmes smectiques mous ($\eta > 0.3$, pics larges), le modèle de Castro-Roman et al. [67] ajuste les spectres beaucoup mieux que celui de Nallet et al. [64], notamment le signal aux très petits angles. Cependant le temps de calcul est tellement important que nous avons préféré nous contenter du modèle de Nallet [64].

2.2.3 Diffusion du rayonnement par les phases éponges.

De la même façon que pour une phase lamellaire, la diffusion du rayonnement par une phase éponge peut apporter beaucoup d'informations sur sa structure et sa thermodynamique. Le profil typique de l'intensité diffusée par une phase éponge est présenté sur la figure 2.6.

Ce profil comporte :

- Un bosse de corrélation assez large, centrée sur un vecteur d'onde q_0. Cette bosse indique l'existence, dans la phase éponge, d'une taille caractéristique $\xi = \frac{2\pi}{q_0}$ qui est une distance moyenne entre membranes, cependant il n'y a pas d'ordre à grande distance. La taille caractéristique ξ varie linéairement avec l'inverse de la fraction volumique de membrane.
- De la diffusion aux petits angles, dont l'importance augmente avec la dilution au point d'occulter parfois la bosse de corrélation. Ce signal est dominé par les corrélations entres membranes. En fait, on observe ici les fluctuations de concentrations de grande longueur d'onde, liées aux fluctuations de structure de la phase éponge [75].
- Enfin un signal diffus aux grands angles. En analysant ce signal, Porte et al. [66]

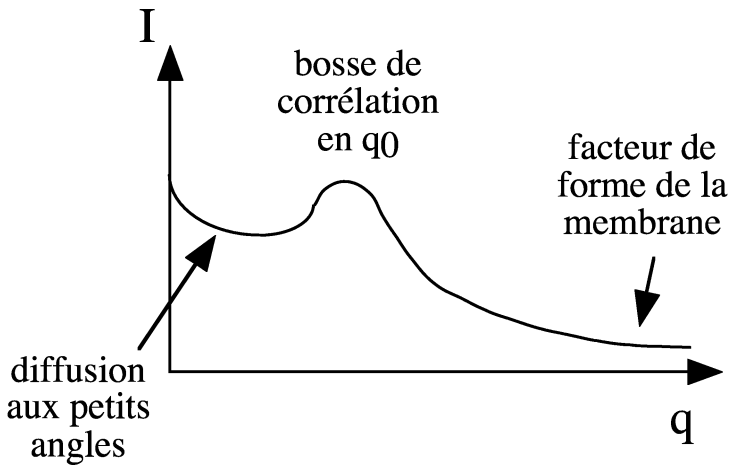


FIG. 2.6: *Représentation typique du profil de diffusion d'une phase éponge.*

et Gazeau et al. [27] ont montré que la phase éponge était composée de membranes d'épaisseur d_m, orientées aléatoirement dans l'espace. Pour $q>q_0$, l'intensité diffusée a les propriétés suivantes : loin de q_0, l'intensité est proportionnelle à la fraction volumique de membranes ϕ_m, elle varie en q^{-2} puis en q^{-4}, et est parfaitement décrite par le facteur de forme d'une membrane

$$I(q) \propto \frac{1}{q^2}\left[\frac{sin(qd_m/2)}{qd_m/2}\right]^2 \tag{2.26}$$

Nous n'avons pas ajusté les spectres de nos phase éponges avec ce modèle. En effet, la phase éponge n'a été utilisée que pour réaliser des mesures spectroscopiques dans un environnement membranaire. Nous ne nous sommes pas intéressés aux positions des bosses de corrélation.

2.3 Mesures de tension superficielle. (Méthode du poids de la goutte).

Cette technique de mesure de la tension superficielle est une des plus simples à réaliser en laboratoire : elle nécessite une balance, une seringue ainsi qu'un pousse-seringue et le tour est joué ! Son principe, présenté sur la figure 2.7, est simple : il s'agit de déterminer le poids d'une goutte. Connaissant le rayon extérieur de l'aiguille de la seringue ainsi que la densité du liquide, en renouvellant la mesure du poids de la goutte un nombre suffisant de fois (environ 10), on peut déterminer la tension superficielle entre le liquide et l'air comme expliqué peu après.

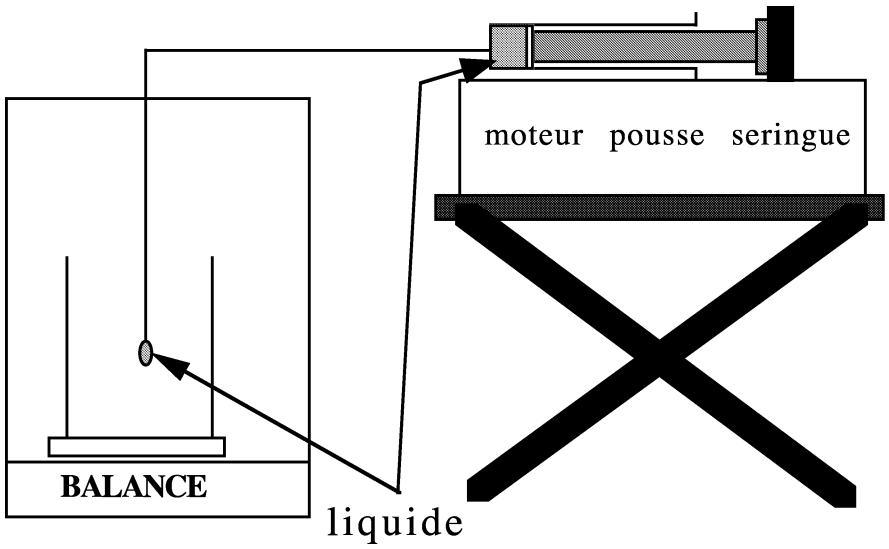


FIG. 2.7: *Montage expérimental de mesure de la tension de surface entre l'air et un liquide par la méthode du poids de la goutte.*

Dès 1864, Tate proposait la méthode du poids de la goutte pour mesurer la tension de surface entre un liquide et l'air. L'expression la plus simple donnant le poids P de la goutte, est donc connue sous le nom de loi de Tate [76] :

$$P = mg = gV\rho = 2\pi r\gamma \tag{2.27}$$

où m est la masse de la goutte, $\rho = \frac{m}{V}$ sa densité, g l'accélération de la pesanteur, r le rayon extérieur de l'aiguille, γ la tension superficielle et V son volume déterminé par $V = \frac{m}{\rho}$. Cette formule vient de l'écriture du bilan des forces s'exerçant sur la goutte juste au moment où elle se détache : P-T=0, avec T reliée à la tension de surface par $T = 2\pi r\gamma$, on a donc : $P = 2\pi r\gamma$.. La force maximale pouvant supporter le poids de la goutte est donc donnée par la tension de surface multipliée par la circonférence de l'aiguille.

Cependant, dans la pratique on mesure un poids P' inférieur à la valeur idéale P, fait vérifié expérimentalement par Lord Rayleigh en 1899 [77]. On peut s'en persuader, et en comprendre les raisons, en observant attentivement la formation de la goutte. Comme on peut le voir sur la figure 2.9 représentant les différentes étapes de la formation d'une goutte prises à la caméra rapide, une instabilité se développe et un cylindre de liquide apparaît entre l'aiguille et la goutte elle-même. Du coup, seule une partie de la goutte se détache et jusqu'à 40% du liquide peut rester attaché à l'aiguille.

En 1919, Harkins et Brown [78] ont repris les résultats de Rayleigh, et ont réalisé des mesures plus systématiques. Ils ont alors proposé un tableau de facteurs correctifs

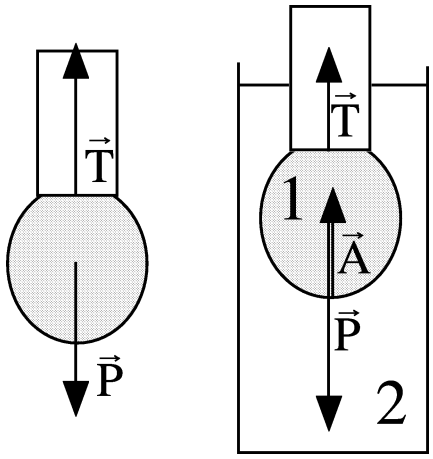


FIG. 2.8: *Bilan des forces s'exerçant sur la goutte a) à l'interface air-liquide (à gauche), b) à l'interface liquide-liquide (à droite). P est le poids de la goutte, T la force de tension et A la poussée d'Archimède exercée par le liquide 2 sur le liquide 1.*

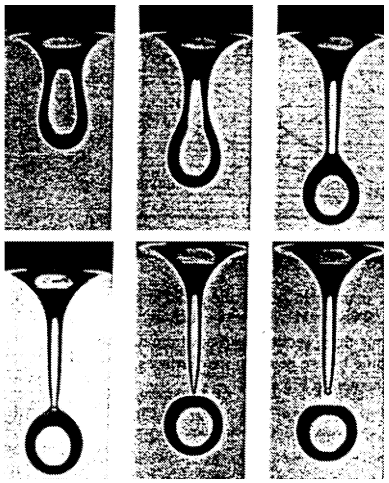


FIG. 2.9: *Profil d'une goutte tombant d'une aiguille, pris à la caméra rapide. Du fait de l'instabilité de Rayleigh-Taylor qui se développe, une portion importante de la goutte reste accrochée à l'aiguille.*

empiriques f qui dépendent du rapport entre le rayon de l'aiguille et la racine cubique du volume V de la goutte :

$$f = \theta(\frac{r}{V^{\frac{1}{3}}}) \tag{2.28}$$

Au moment où la goutte se détache le poids P' que l'on mesure vaut :

$$P' = 2\pi r\gamma f \tag{2.29}$$

Ils ont tout d'abord déterminé les valeurs de la tension de surface par des mesures de montée capillaire. Cette mesure consiste à plonger un tube capillaire de rayon r dans un liquide de tension superficielle air/liquide γ et de densité ρ, la hauteur h de la colonne de liquide montant dans le tube par capillarité est reliée à la tension de surface par [79] : $\rho gh = 2\gamma r$. Harkins et Brown ont ainsi proposé un tableau de facteurs correctifs en fonction du rapport $\frac{r}{V^{\frac{1}{3}}}$ présenté dans le tableau 2.1.

$\frac{r}{V^{\frac{1}{3}}}$	f	$\frac{r}{V^{\frac{1}{3}}}$	f	$\frac{r}{V^{\frac{1}{3}}}$	f
0.00	(1.0000)	0.75	0.6032	1.225	0.656
0.30	0.7256	0.80	0.6000	1.25	0.652
0.35	0.7011	0.85	0.5992	1.30	0.640
0.40	0.6828	0.90	0.5998	1.35	0.623
0.45	0.6669	0.95	0.6034	1.40	0.603
0.50	0.6515	1.00	0.6098	1.45	0.583
0.55	0.6362	1.05	0.6179	1.50	0.567
0.60	0.6250	1.10	0.6280	1.55	0.551
0.65	0.6171	1.15	0.6407	1.60	0.535
0.70	0.6093	1.20	0.6535		

TAB. 2.1: *Facteurs correctifs de Harkins et Brown (les valeurs de f dans la dernière colonne sont moins précises que dans les autres).*

En tenant compte de la poussée d'Archimède, la méthode du poids de la goutte peut bien entendu être appliquée à la mesure de la tension superficielle entre deux liquides. Dans ce cas, des gouttes d'un premier liquide (liquide 1 sur la figure 2.8) sont formées dans un second moins dense (liquide 2 sur la figure 2.8). Le bilan des forces doit alors tenir compte de la poussée d'Archimède A. P_{bis}, le poids mesuré est alors le poids de la goutte diminué de celui du liquide déplacé :

$$P_{bis} = (P - A) = gV\Delta\rho = 2\pi r\gamma_{1-2}f \tag{2.30}$$

où g est l'accélération de la pesanteur, V le volume de la goutte, $\Delta\rho = \rho_1 - \rho_2$ la différence de densité entre les deux liquides, r le rayon extérieur de l'aiguille et γ_{1-2} la tension de surface entre les deux liquides. On remarquera que la formule 2.30 est identique à la formule 2.29 s'il l'on remplace ρ par $\Delta\rho$. Cette fois encore il faut tenir compte du facteur correctif f présenté dans le tableau 2.1.

Cette méthode peut aussi être utilisée pour des solutions, mais il faut que la tension de surface "d'équilibre" soit atteinte. Pour s'en assurer on fait gonfler la goutte à différentes vitesses, et l'on s'assure que le changement de vitesse ne perturbe pas le poids. Si on travaille avec des liquides volatiles, il est indispensable de tenir compte de l'évaporation au cours du temps même en travaillant en sytème le plus fermé possible.

Ce type de mesure nous a servi à déterminer la tension de surface décane-eau avec et sans peptide dont les résultats seront présentés dans le chapitre 4.

2.4 Recouvrement de fluorescence après photoblanchîment (FRAPP)

Cette technique, connue aussi sous le nom de FRAPP (de l'anglais Fluorescence Recovery After fringe Pattern Photobleaching), est l'une des plus utilisées pour mesurer le coefficient d'autodiffusion de molécules dans les liquides complexes. Elle a été appliquée à de nombreux systèmes de molécules amphiphiles [80][30] (diffusion de micelles, de particules sur des bicouches/monocouches de lipides ou de tensioactifs etc.). Nous présenterons d'abord le principe du recouvrement de fluorescence après photoblanchîment, puis le montage expérimental lui-même.

2.4.1 Le principe de la technique

Le principe de cette méthode expérimentale est assez simple. Une fraction des molécules dont on désire suivre le mouvement est marquée par un groupement fluorescent. Ensuite, on crée un gradient de concentration des marqueurs sans perturber l'échantillon. Pour cela on utilise une propriété des marqueurs fluorescents : lorsqu'on les éclaire avec une puissance lumineuse très forte ils perdent leur fluorescence de manière irréversible, c'est ce qu'on appelle le photoblanchîment. On crée donc une distribution inégale de molécules marquées, en éclairant l'échantillon avec une faisceau de forte intensité lumineuse, et l'on peut suivre l'évolution de cette distribution en éclairant l'échantillon avec un faisceau de faible intensité lumineuse, au fur et à mesure que les molécules non blanchies rentrent

dans la zone blanchie.

Expérimentalement, on éclaire l'échantillon avec deux faisceaux de manière à créer un réseau de franges (figure 2.10). Cette géométrie présente l'avantage de conduire à une

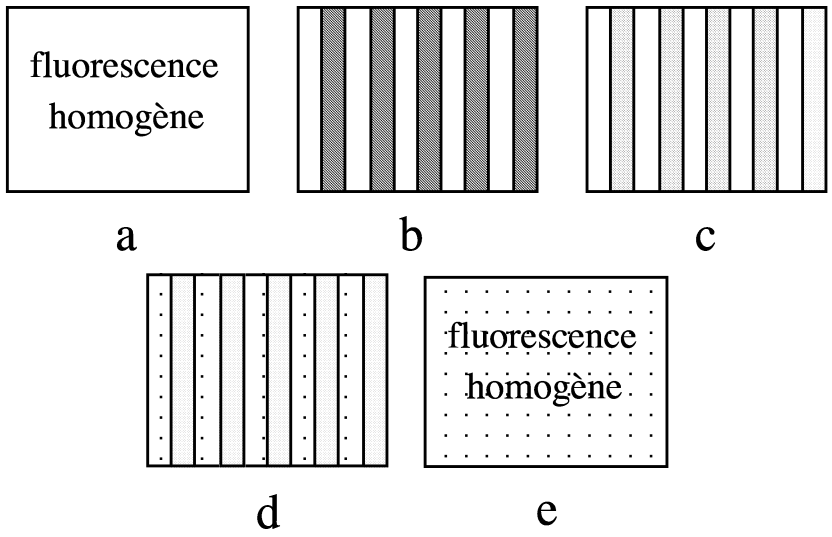


FIG. 2.10: *Evolution du réseau de fluorescence après photoblanchîment qui correspond à ce qu'on appelle aussi le recouvrement de fluorescence. En b, la fluorescence est détruite irréversiblement par un faisceau de forte intensité lumineuse. Puis on observe la relaxation de ce réseau avec un faisceau de faible intensité lumineuse (c,d), jusqu'à ce que la fluorescence redevienne homogène dans tout l'échantillon (e).*

solution simple de l'équation de diffusion, et surtout de mesurer D selon la direction perpendiculaire aux franges. C'est en suivant la relaxation de ce réseau que nous pouvons déterminer le coefficient d'autodiffusion. Pour observer cette relaxation, l'échantillon est éclairé avec les mêmes faisceaux lumineux (on a donc la même géométrie), dont l'intensité a été réduite d'un facteur 10^3 : c'est ce qu'on nomme la phase de lecture. Enfin , afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, la figure d'interférence est modulée à une pulsation ω. L'évolution du signal modulé est ensuite mesurée en fonction du temps (figure 2.11).

Calcul du coefficient d'autodiffusion à partir de l'intensité de fluorescence

Si on suppose le milieu éclairé par un profil sinusoïdal d'intensité et d'extension infinie, pendant la phase de photoblanchîment on a :

$$I(\vec{r},t) = \frac{I_B}{2}\left[1 + cos(\vec{q_0}\ .\ \vec{r})\right] \tag{2.31}$$

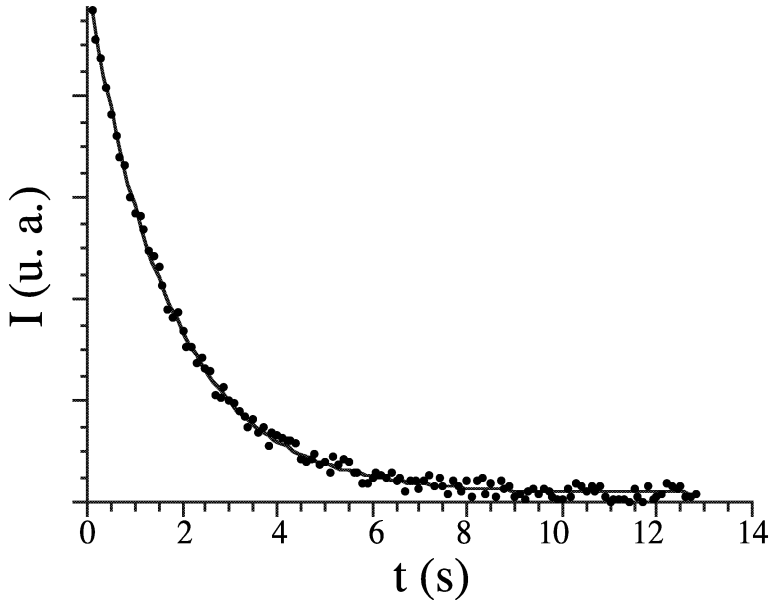


FIG. 2.11: *Données expérimentales typiques obtenues avec la technique de FRAPP. La courbe continue est un ajustement théorique à une fonction exponentielle décroissante.*

tandis que pendant la phase de recouvrement de fluorescence l'intensité vaut :

$$I(\vec{r},t) = \frac{\lambda I_B}{2}\left[1 + cos(\vec{q_0}\ .\ \vec{r}\ +\ \phi(t))\right] \tag{2.32}$$

où $q_0 = \frac{2\pi}{i}$ est le vecteur d'onde de la figure d'interférences, i l'interfrange, ϕ la modulation de phase et I_B et λI_B les intensités maximales pendant et après le photoblanchîment ($\lambda << 1$).

Si, à l'instant t=0, on a une concentration $c(\vec{r}, t = 0)$ de marqueurs fluorescents, elle évolue selon la loi de diffusion suivante :

$$\frac{\partial c(\vec{r},t)}{\partial t} = D\nabla^2 c(\vec{r},t) \tag{2.33}$$

où D est le coefficient d'autodiffusion d'une particule, et $c(\vec{r},t)$ la concentration en marqueurs fluorescents. Comme on travaille sur des échantillons de faible épaisseur et à faible concentration de marqueurs fluorescents, on suppose l'intensité lumineuse uniforme dans tout l'échantillon.

A un facteur multiplicatif près, l'intensité de fluorescence F(t>0) peut s'écrire pour t>0 :

$$F(t>0) = \int d\ \vec{r}^{\,3}\ c(\vec{r},t)I(\vec{r},t) \tag{2.34}$$

Si on prend alors la transformée de Fourier spatiale de l'équation de diffusion, on obtient :

$$c^*(\vec{q},t) = c^*(\vec{q},0)e^{-Dq^2t} \tag{2.35}$$

On peut alors remplacer la concentration $c(\vec{r},t)$ et l'intensité $I(\vec{r},t)$ par :

$$c(\vec{r},t) = \int d\ \vec{q}^{3}\ c^{*}(\vec{q},t)e^{-2\pi i\vec{q}.\vec{r}} \tag{2.36}$$

et

$$I(\vec{r},t) = \int d\ \vec{q}^{3}\ I^{*}(\vec{q},t)e^{-2\pi i\vec{q}.\vec{r}} \tag{2.37}$$

ce qui donne pour l'expression de l'intensité de fluorescence :

$$F(t>0) = \int d\ \vec{q}^{3} \int d\ \vec{q'}^{3} \int d\ \vec{r}^{3}\ c^{*}(\vec{q},t)I^{*}(\vec{q},t)e^{-2\pi i(\vec{q}+\vec{q'}).\vec{r}} \tag{2.38}$$

Comme $\int d\ \vec{r}^{3}\ e^{-2\pi i(\vec{q}+\vec{q'}).\vec{r}} = \delta(\vec{q}-\vec{q'})$, où δ est la fonction de Dirac, après intégration sur $\vec{r}$ on obtient :

$$F(t>0) = \int d\ \vec{q}^{3}\ c^{*}(\vec{q},t)I^{*}(-\vec{q},t) \tag{2.39}$$

Pendant la phase de recouvrement, l'intensité est modulée et s'écrit donc comme :

$$I^{*}(\vec{q},t) = \frac{\lambda I_B}{2}\left[\delta(\vec{q}) + \frac{1}{2}\left(\delta(\vec{q}-\vec{q_0})e^{i\phi(t)} + \delta(\vec{q}+\vec{q_0})e^{-i\phi(t)}\right)\right] \tag{2.40}$$

Ce qui donne pour F(t) :

$$F(t>0) = \frac{\lambda I_B}{2}\left[c^{*}(\vec{0},0) + \frac{1}{2}\left(c^{*}(\vec{q_0},0) + c^{*}(-\vec{q_0},0)\right)e^{-Dq_0^2 t}cos(\phi(t))\right] \tag{2.41}$$

Comme la figure d'interférence est symétrique, $c(\vec{q},t) = c(-\vec{q},t)$ et on a :

$$F(t>0) = \frac{\lambda I_B}{2}\left[c^{*}(\vec{0},0) + c^{*}(\vec{q_0},0)e^{-Dq_0^2 t}cos(\phi(t))\right] \tag{2.42}$$

Comme $\phi(t) = usin\omega t$, $cos(\phi(t))$ peut être décomposée en série de Fourier :

$$F(t>0) = \sum_{n=0}^{\infty} f_{2n(t)cos(2n\omega t)} \tag{2.43}$$

$$f_0(t) = \frac{\lambda I_B}{2}\left[c^{*}(\vec{0},0) + J_0(u)c^{*}(\vec{q_0},0)e^{-Dq_O^2 t}\right] \tag{2.44}$$

$$f_{2n}(t) = \frac{\lambda I_B}{2}J_{2n}(u)c^{*}(\vec{q_0},0)e^{-Dq_O^2 t} \tag{2.45}$$

où les $J_k(u)$ sont les fonctions de Bessel d'ordre k. Ces fonctions sont rapidement décroissantes avec k, aussi on choisit de mesurer l'harmonique du signal de fluorescence. u est alors fixé de manière à maximiser $J_2(u)$ (i.e. u=3.05 et $J_2(u)$=0.48). Aucune harmonique impaire n'apparait dans le signal de fluorescence, la présence de telles harmoniques signalerait des mouvements convectifs dans l'échantillon. La présence d'un réseau de concentration fixe dans le temps se traduit quant à elle par un signal à 2ω constant dans le temps.

Pour plus de précisions sur les calculs, on pourra se reporter à l'article séminal de Davoust et al. [81].

2.4.2 Le montage expérimental

Le dispositif expérimental, présenté sur la figure 2.12, se décompose en quatre parties que nous allons décrire en détail.

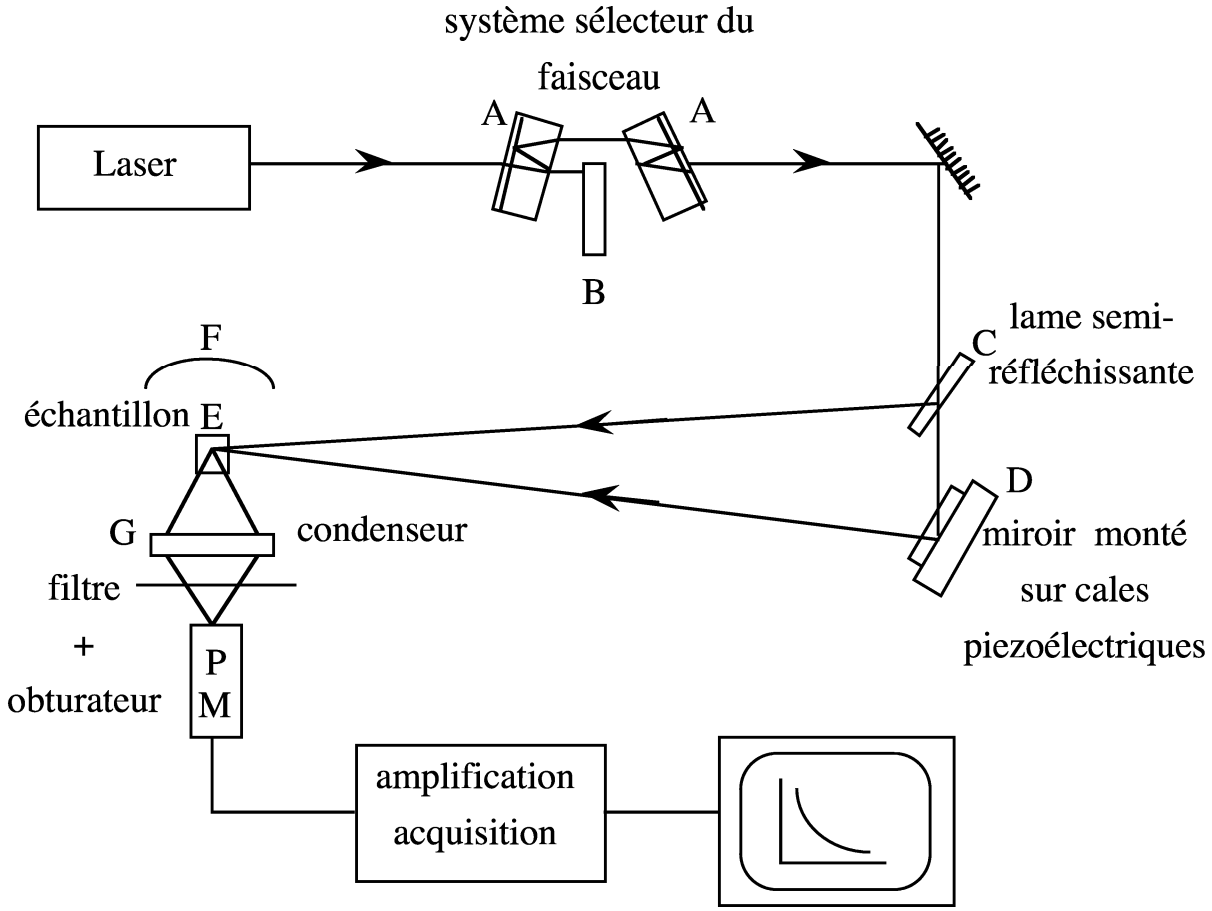


FIG. 2.12: *Montage de l'expérience de FRAPP.*

Système source

Un laser à Argon (488 nm) passe dans le bloc optique A constitué de deux lames à faces parallèles en partie métallisées, disposées en dièdre. En utilisant les réflexions, on obtient des faisceaux dont le rapport des intensités est R^4, R^3 ou R^2, R étant le coefficient de réflexion verre-air à l'incidence choisie. Leur superposition est contrôlée. On obtient ainsi deux faisceaux d'intensités différentes ($\frac{I_{forte}}{I_{faible}} = 10^3$), mais exactement superposés. La barrière mécanique B contrôle le passage du faisceau de forte intensité (i.e. les impulsions de photoblanchîment) : elle se lève pendant les premières millisecondes de l'expérience (50

ms dans nos expériences), le laissant passer, et lui bloque le passage pendant le reste du temps.

Système interférométrique et modulation

La partie suivante du montage est un interféromètre formé par une lame semi-réfléchissante C, et un miroir D monté sur des cales piézoélectriques. Quoique non symétrique, ce dispositif permet, grâce à un interféromètre Fabry-Pérot situé dans la cavité laser, de faire varier l'interfrange dans une gamme comprise entre 5 et 100 μm. Il suffit pour cela de déplacer le miroir D. L'interfrange est mesuré en projetant, au moyen d'un objectf de microscope, l'image d'un millimètre et des franges sur un mur distant d'environ trois mètres. Les cales piézoélectriques réalisent la modulation de phase par un léger déplacement du miroir D. L'amplitude de modulation donnant un signal optimal vaut environ π : le déplacement du miroir correspondant vaut alors $\frac{\lambda}{2}$ tandis que la fréquence de modulation est de 2kHz.

Optique de détection

Une cellule de fluorescence Hellma en quartz contenant l'échantillon est placée horizontalement dans un bloc thermostaté E dont la température est précise à $\pm 0.1°C$. Cette disposition permet d'éviter un mouvement de convection. Le miroir sphérique F et le condenseur G, recueillent la lumière de fluorescence et la focalisent sur le photomultiplicateur (PM). Devant le photomultiplicateur sont placés un filtre permettant de ne laisser passer que la lumière de fluorescence, ainsi qu'un obturateur qui évite la saturation du photomultiplicateur pendant la phase de photoblanchîment.

Système électronique

Il comporte un boîtier de synchronisation du photoblanchîment, de la modulation, de l'obturation du PM et de l'acquisition du signal. Le signal issu du PM passe par un amplificateur de gain, puis par un amplificateur sélectif et enfin par un détection synchrone. Celle-ci élimine le bruit résiduel en amplifiant le signal qui arrive avec la fréquence du cristal piezoélectrique (signal de référence). Le signal est ensuite enregistré dans un moyenneur, plusieurs expériences étant généralement nécessaires pour obtenir un rapport signal/bruit correct.

2.4.3 Traitement des données expérimentales

Le signal mesuré expérimentalement (figure 2.11) est une exponentielle décroissante qui, du fait du décalage continu de l'électronique et de l'absorption de sondes sur les parois (ce qui crée un réseau permanent de fluorescence), s'écrit : $Ae^{-t/\tau} + B$. A l'aide un programme réalisé au laboratoire, les courbes sont ajustées par la méthode des moindres carrés, et les trois paramètres A, B et τ sont déterminés. Le temps caractéristique τ de cette exponentielle est une estimation de la durée du processus de la figure 2.10, et s'écrit comme :

$$\frac{1}{\tau} = Dq_0^2 \tag{2.46}$$

où q_0 est le vecteur d'onde correspondant à l'interfrange i : $q_0 = \frac{2\pi}{i}$

Afin d'améliorer l'estimation du coefficient d'autodiffusion D, on mesure le temps τ pour plusieurs interfranges i. On trace ensuite $\frac{1}{\tau}$ en fonction de q^2 , un ajustement linéaire permettra d'obtenir la pente dans l'équation 2.46 qui est le coefficient d'autodiffusion.

Nous avons utilisé cette technique expérimentale pour étudier la diffusion de la protéine LH2 en solution aqueuse et dans une phase cubique de monooléine.

2.5 La spectroscopie d'absorption

La mesure de l'absorption lumineuse est un moyen important d'étude de nombreuses molécules biologiques. Nous avons utilisé cette technique afin de déterminer la concentration du peptide sur lequel nous avons travaillé (chapitre 4), dans l'eau et dans la phase éponge, mais aussi afin de vérifier les propriétés de la protéine LH2 (chapitre 5).

La fraction de lumière incidente absorbée par une solution à une longueur d'onde donnée est reliée à l'épaisseur de la phase absorbante (trajet optique) et à la concentration des espèces absorbantes. Sous sa forme intégrée la loi de Beer-Lambert combine ces deux relations :

$$log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon cl \tag{2.47}$$

où I_0 est l'intensité de la lumière incidente, I celle de la lumière transmise, ϵ le coefficient d'extinction molaire (en $l.mol^{-1}.cm^{-1}$), c la concentration des espèces absorbantes (en $mol.l^{-1}$) et l le trajet optique de la lumière dans l'échantillon (en cm). La loi de Beer-Lambert suppose que la lumière incidente est parralèle et monochromatique, et que les molécules de solvant et de soluté sont disposées au hasard. La quantité $log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$ est appelée absorbance A ou densité optique DO. A une épaisseur absorbante donnée, la densité optique est directement proportionnelle à la concentration du soluté absorbant.

Le coefficient d'absorption molaire varie avec la longueur d'onde, la nature du composé absorbant, le solvant ou l'environnement direct du composé [82].

Dans la pratique, nous avons mesuré l'absorption de la lumière dans deux cellules identiques, une témoin ne contenant que le solvant et l'autre contenant le soluté. Ces mesures nous ont servi, surtout à déterminer la concentration de notre peptide/protéine, connaissant sa masse molaire. La figure 2.13 présente le spectre typique du tryptophane en solution aqueuse, l'un des trois acides aminés qui absorbe la lumière avec la tyrosine et la phénylalanine. Son maximum d'absorption se produit à 282 nm. Le coefficient d'extinction molaire du tryptophane à 282 nm vaut $\epsilon_W = 5500\ l.mol^{-1}.cm^{-1}$ [83]. Connaissant la densité optique DO de l'échantillon, la masse molaire M du produit ($g.mol^{-1}$), le chemin optique l de la cellule (en cm) et le coefficient d'extinction molaire du composé absorbant ϵ, on trouve que la concentration du composé en g/l est :

$$c = \frac{DO\ M}{\epsilon l} \tag{2.48}$$

Pour notre peptide (de masse molaire 3508.7), qui comporte deux tryptophanes, une

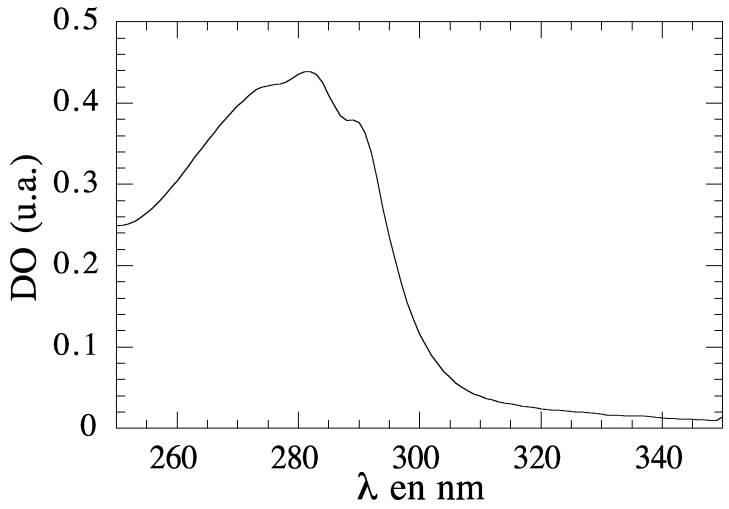


FIG. 2.13: *Spectre d'absorption du tryptophane dans l'eau.*

DO de 0.5 à 282 nm dans une cellule de 1 cm de chemin optique correspond donc à une concentration en g/l de :

$$c = \frac{0.5 \times 3508.7}{5500 \times 2} = 0.16 \tag{2.49}$$

2.6 La spectrofluorimétrie

La fluorescence est le résultat d'un processus en trois étapes qui intervient dans des molécules de type hydrocarbones polyaromatiques. Ce processus peut être illustré par la figure 2.14.

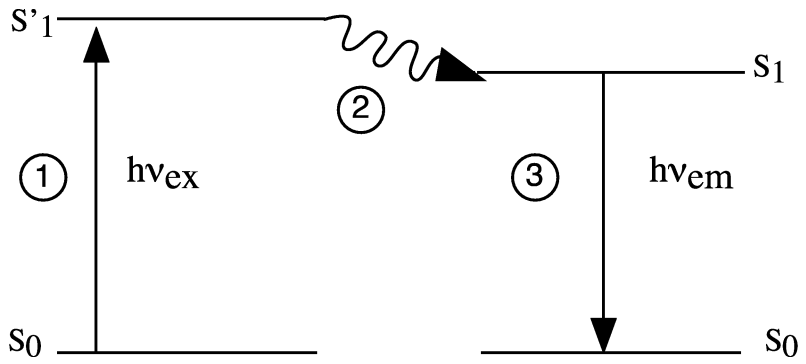


FIG. 2.14: *Diagramme schématisant le processus de fluorescence.*

- Un photon est absorbé par la molécule fluorescente, elle se trouve alors dans un état électronique excité S_1' (étape 1).
- Cet état excité existe pendant un temps fini (environ 10^{-9} à 10^{-8} s), durant lequel le fluophore subit des changements de conformation, et peut être sujet à interactions avec son environnement moléculaire. Ces changements entraînent une dissipation partielle de l'énergie, l'état excité S_1' relaxe vers un état excité état S_1 (étape 2).
- Enfin, un photon est émis permettant au fluophore de revenir à son état fondamental S_0. A cause de la dissipation décrite précédemment, l'énergie réémise est plus faible que celle absorbée. Du coup la longueur d'onde de réémission est plus grande (étape 3).

La spectroscopie de fluorescence peut être réalisée de deux façons différentes, soit en émission, soit en excitation.

- Pour obtenir un spectre d'émission, on éclaire l'échantillon à un longueur d'onde λ_{ex} donnée pour laquelle il absorbe, et l'on mesure l'intensité de fluorescence réémise aux longueur d'ondes supérieures à λ_{ex}.
- Un spectre d'excitation consiste à faire varier la longueur d'onde d'excitation et à regarder l'intensité réémise à une longueur d'onde fixée (supérieure à la longueur d'onde d'excitation).

Nous avons utilisé la spectroscopie de fluorescence en émission, pour étudier l'insertion d'un peptide tribloc dans une phase de membranes fluides (chapitre 4), et les propriétés de la protéine LH2 (chapitre 5).

2.7 Le dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire dans l'ultraviolet lointain (190-260 nm) est une méthode de caractérisation de la structure secondaire des protéines et des peptides extrêmement courante en biologie. On appelle structure primaire d'une protéine (respectivement d'un peptide) la séquence des acides aminés qui la compose, alors que la structure secondaire correspond à l'organisation de ces acides aminés selon des structures connues (hélices α, feuillets β). Quant à la structure tertiaire, c'est l'organisation dansl'espace des hélices, des feuillets et des zones non structurées. Nous avons utilisé le dichroïsme circulaire afin de caractériser la structure secondaire du peptide de synthèse étudié dans le chapitre 4. Nous présenterons rapidement cette méthode sans entrer dans les détails.

Depuis les travaux d'Arago, Biot, Fresnel et Pasteur au XIX^{ième} siècle, on dit qu'un milieu est optiquement actif lorsque la vitesse de propagation d'une onde polarisée droite est différente de celle d'une onde polarisée gauche à travers le dit milieu. Ceci est dû à une différence d'indices de réfraction pour les deux polarisations. Ce phénomène est aussi appelé biréfringence. Lorsqu'une onde plane polarisée traverse ce milieu, la rotation de son plan de polarisation d'un angle θ (en radians par unité de longueur) est lié à la différence d'indice par la relation suivante :

$$\theta = \frac{\pi}{\lambda}(n_G - n_D) \tag{2.50}$$

où λ est la longueur d'onde de la lumière incidente et n_G et n_D les indices de réfraction des deux composantes de la lumière polarisée. Ce pouvoir rotatoire est observé lorsque des molécules chirales sont en solution.

Dans les domaines de longueur d'onde où sont présentes des bandes d'absorption, les deux composantes de la lumière sont aussi absorbées différemment. Lorsqu'un mileu optiquement actif est traversé par une onde plane, dans le domaine des longueurs d'onde pour lesquelles le milieu absorbe, non seulement le plan de polarisation change, mais la lumière transmise est polarisée elliptiquement. On passe d'une onde polarisée linéairement à une onde polarisée elliptiquement si les deux composantes de la lumière sont absorbées différemment, et si en même temps, il y a un déphasage entre ces deux composantes. On dit alors que le milieu présente du dichroïsme.

Expérimentalement, on mesure la différence d'absorption notée ΔA correspond à la différence des absorbances du milieu pour la polarisation gauche et droite ($\Delta A = A_G - A_D$) [84]. Par convention, le plus souvent, on préfère travailler en ellipticité molaire par résidu (résidu=acide aminé) $[\theta]$

$$[\theta](\lambda) = \frac{M}{n_{AA}} \frac{3300\Delta A}{lc} \tag{2.51}$$

où $[\theta]$ s'exprime en deg.cm^2.dmol^{-1}, l est le chemin optique en cm, c la concentration en g.l^{-1} (ou mg.ml^{-1}), M la masse molaire de la protéine ou du peptide, et n_{AA} le nombre d'acides aminés qui la/le composent (n_{AA}=nbre de résidus).

Les nombreuses études sur les peptides et les protéines entreprises ces dernières décennies ont permis de dégager les caractéristiques des spectres de dichroïsme circulaire des protéines non structurées, structurées en feuillets β ou en hélice α [85].

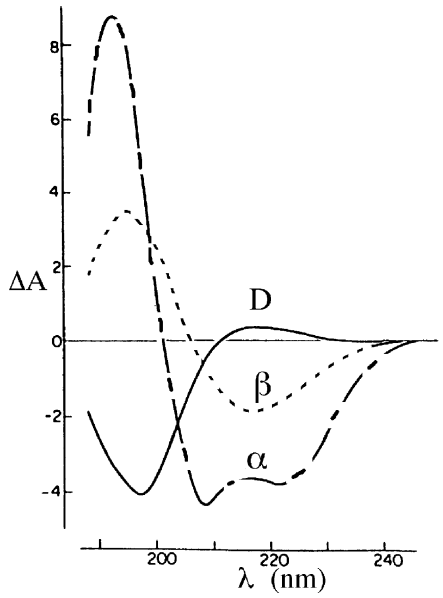


FIG. 2.15: *Spectres de dichroïsme circulaire d'un peptide désordonné (ligne pleine, D), d'un feuillet β (pointillés) et d'une hélice α (trait discontinu).*

- Les peptides désordonnés ont un spectre qui présente une forte bande négative vers 200 nm et une faible bande autour de 220 nm qui peut être soit positive, soit sous forme d'épaulement négatif (figure 2.15, trait plein (D)).
- Les spectres des feuillets β présentent deux bandes : l'une positive vers 195 nm, et l'autre négative vers 215 nm (figure 2.15, pointillés).
- Quant au spectre d'une hélice α, il est caractérisé par un double minimum typique

à 222 nm et 208-210 nm et un maximum à 191-193 nm (figure 2.15, trait discontinu) [86]. Le spectre dépend très peu de la longueur de l'hélice.

2.8 RMN du deutérium

Récemment, Auguste et al. [22] ont proposé une nouvelle technique de mesure du module de rigidité de courbure moyenne κ dans les phases lamellaires, utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN) du deutérium. Elle repose sur la mesure de la variation de l'éclatement quadrupolaire d'une molécule spécifiquement marquée au deutérium et insérée dans la membrane, au cours d'une dilution à l'eau de la phase L_α. Il faut pour cela soit avoir un tensioactif (ou un cotensioactif) α-deutérié, soit deutérier le solvant minoritaire qui gonfle la membrane (généralement un alcane). L'utilisation d'un modèle champ moyen des fluctuations de la membrane permet de déterminer la rigidité κ par ajustement de l'éclatement quadrupolaire en fonction de la périodicité de la phase lamellaire. Cette partie présentera uniquement les éléments essentiels à la compréhension de la mesure de κ. Nous avons utilisé cette technique pour les phases lamellaires dopées avec du SDS (chapitre 3), mais surtout pour confirmer l'augmentation de rigidité de la phase lamellaire dopée par un peptide rigide tribloc (chapitre 4).

2.8.1 RMN du deutérium dans les phases lamellaires

La RMN du deutérium de de molécules deutériées présente un spectre dans lequel les niveaux Zeeman sont modifiés par les effets quadrupolaires [87]. Ces effets correspondent à l'interaction du moment quadrupolaire électrique du noyau du deutérium avec les gradients de champ électrique existant dans tout échantillon anisotrope. Dans une phase lamellaire, la différence en fréquence des deux résonances principales, appelée éclatement quadrupolaire, vaut en absence de tout mouvement, dans le cas d'un système isolé de spin :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q \frac{3cos^2\beta - 1}{2} \tag{2.52}$$

où β est l'angle de passage de l'axe z du référentiel attaché à la liaison C-D, à l'axe du référentiel attaché au champ magnétique H_0. Quant à A_Q, il s'agit de la constante de couplage quadrupolaire définie par :

$$A_Q = \frac{e^2 qQ}{h} \tag{2.53}$$

où eq et eQ définissent respectivement le gradient de champ électrique et le moment électrique quadrupolaire du noyau. Pour une liaison C-D, A_Q vaut 168 kHz.

Dans un échantillon, une grande quantité de spins sont orientés différemment. Si l'échantillon est polycristallin, l'angle β prend toutes les valeurs sur sa période et la distribution angulaire sphérique conduit à un spectre dit de poudre, marqué par les positions $\beta = 0°$ (A) et $\beta = 90°$ (B), représentées sur la figure 2.16

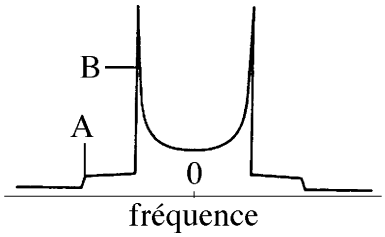


FIG. 2.16: *Forme caractéristique du spectre de résonance RMN d'un échantillon lamellaire de poudre. Les positions $\beta = 0°$ et $\beta = 90°$ sont respectivement marquées par A et B.*

Les spectres de RMN dépendent énormément des mouvements locaux et dans le cas de la phase L_α, l'éclatement quadrupolaire est modifié par trois principaux mouvements ansiotropes supposés à symétrie axiale. En utilisant la notion de paramètre d'ordre pour décrire l'odre orientationnel moyen des systèmes organisés proposée par Seelig [88], Dufourc et Smith ont montré que la modification de l'éclatement par de tels mouvements était le produit des paramètres d'ordre correspondants aux transformations successives pour passer du référentiel du gradient de champ électrique au référentiel du laboratoire [89]. Les trois mouvements sont les suivants :

- Un mouvement intramoléculaire, de temps caractéristique compris entre 10^{-12} et 10^{-10} s, correspondant aux isomérisations trans/gauche et aux rotations autour des liaisons.
- Un mouvement moléculaire de l'ensemble de la molécule, de temps caractéristique compris entre 10^{-9} et 10^{-8} s, correspondant aux rotations de la molécule et aux effets de "tumbling" (i.e. rotation de la molécule sur elle-même).
- Enfin, un mouvement collectif de la phase lamellaire, de temps caractéristique compris entre 10^{-6} et 10^{-1} s, correspondant aux fluctuations des membranes et aux déformations de la phase lamellaire.

L'éclatement quadrupolaire est alors modulé par trois paramètres d'ordre et s'écrit :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q \frac{3cos^2\beta - 1}{2} \langle \frac{3cos^2\xi - 1}{2} \rangle \langle \frac{3cos^2\gamma - 1}{2} \rangle \langle \frac{3cos^2\theta - 1}{2} \rangle \qquad (2.54)$$

où les angles ξ, γ et θ, présentés sur la figure 2.17 correspondent aux différents mouvements à symétrie axiale de la phase lamellaire.

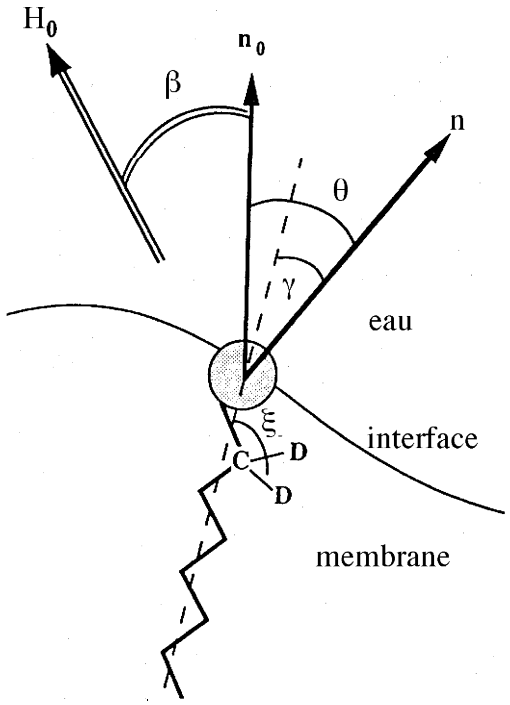


FIG. 2.17: *Décomposition des mouvements à symétrie axiale de la phase lamellaire et les angles correspondants ξ, γ et θ, d'après Auguste et al. [22].*

- β est la distribution d'orientation de l'axe optique de la phase lamellaire n_0 par rapport au référentiel du champ magnétique.
- ξ représente le passge du référentiel associé à la liaison C-D à l'axe long de la molécule.
- γ représente la réorientation de la molécule par rapport à la normale locale n.
- Enfin, θ est la désorientation de la normale locale par rapport à l'axe optique de la phase lamellaire n_0

Lors de la dilution de la phase lamellaire, la surface par tête polaire devient constante lorsqu'on se trouve au seuil d'hydratation de la membrane. La dynamique interne de la membrane, composée des mouvements intramoléculaires et moléculaires, n'est alors plus modifiée par la dilution et l'expression de l'éclatement quadrupolaire devient :

$$\Delta\nu_Q = Cte(3\langle cos^2\theta\rangle - 1) \tag{2.55}$$

En prenant la valeur moyenne des fluctuations de la membrane, De Gennes a démontré [31] que θ est relié à l'amplitude des fluctuations de la membrane au point $\vec{r}$ par :

$$\langle cos^2\theta\rangle = \frac{1}{1 + \langle(\Delta_\perp u(\vec{r}))^2\rangle} \tag{2.56}$$

Dans le cas de faibles courbures, le développement en champ moyen du hamiltonien d'interaction d'une membrane avec ses plus proches voisins s'écrit [22] :

$$H(u) = \int \frac{1}{2}\left(\kappa(\Delta_u)^2 + r_0 u(\vec{r})\right) d\,\vec{r}^{\,2} \tag{2.57}$$

où le premier terme de l'intégrale correspond à l'énergie de courbure et $r_0 u^2(\vec{r})$ est le potentiel effectif créé par les autres membranes.

La désorientation locale du film, reliée à l'amplitude des variations du déplacement s'écrit alors :

$$(\Delta_\perp u(\vec{r}))^2 = \frac{k_B T}{8\pi\kappa} ln\left(1 + \frac{\kappa(\pi/a)^4}{r_0}\right) \tag{2.58}$$

où r_0 est la dérivée par rapport à r du potentiel d'interaction intermembranaire (i.e. $\bar{B} = r_0 d_B$), et a une longueur moléculaire que l'on prendra égale à la racine carrée de l'aire par tête polaire $a = \sqrt{\sigma_{TP}}$.

Dans le cas de répulsions stériques, on a [21] :

$$r_0 = \frac{9\pi^2 (k_B T)^2}{64\kappa d_w^4} \tag{2.59}$$

Finalement, lors de la dilution d'une phase lamellaire stabilisée par les répulsions stériques, la variation de l'éclatement quadrupolaire est reliée à l'épaisseur d'eau d_w par :

$$\Delta\nu_Q = Cte\left[\frac{3}{1 + \frac{k_B T}{8\pi\kappa} ln\left(1 + \frac{64\kappa^2(\pi/a)^4 d_w^4}{9\pi^2(k_B T)^2}\right)} - 1\right] \tag{2.60}$$

C'est par cette dernière formule que nous ajusterons la variation de l'éclatement quadrupolaire dans le chapitre 4. On peut aussi la réécrire de manière à faire apparaître le module de compressibilité smectique :

$$\Delta\nu_Q = Cte\left[\frac{3}{1 + \frac{k_B T}{8\pi\kappa} ln\left(1 + \frac{\kappa d_B(\pi/a)^4}{\bar{B}}\right)} - 1\right] \tag{2.61}$$

2.9 Techniques de mesures rhéologiques

Des présentations exhaustives des principales techniques rhéologiques sont disponibles dans les livres de Barnes [90], Macosko [91] et Coussot [92]. Ici, nous allons nous contenter d'introduire les méthodes utilisées par la suite pour caractériser nos échantillons lamellaires chargés et non chargés (chapitre 3). Après avoir présenté les méthodes rhéologiques utilisées pour déterminer la viscosité non-newtonienne, nous décrirons le rhéomètre utilisé pour nos mesures.

2.9.1 Rappels

La première étude de viscosité a été réalisée par Isaac Newton en 1687 (publiée dans les Principia). Il considère un écoulement de cisaillement simple, présenté sur la figure 2.18.

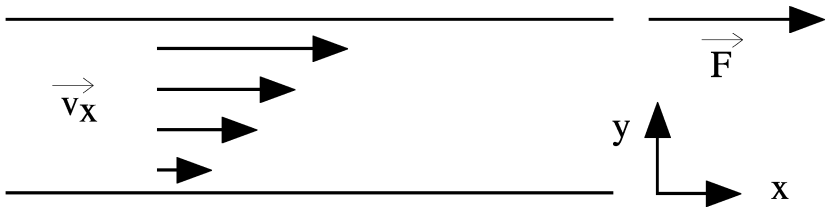


FIG. 2.18: *Ecoulement de cisaillement simple : un fluide est confiné entre deux plaques parallèles situées à une distance b l'une de l'autre. la plaque supérieure est en mouvement à une vitesse constante* $\vec{v}$. *Le cisaillement* $\dot{\gamma}$ *auquel est soumis le fluide correspond à* $\dot{\gamma} = \frac{\partial v_x}{\partial y} = \frac{|\vec{v}|}{b}$.

Le fluide est confiné entre deux plaques de surface A, parallèles séparées d'une distance b. Le fluide est mis en mouvement par une force $\vec{F}$ appliquée sur la plaque supérieure. On appelle contrainte $\vec{\tau}$ la force par unité de surface nécessaire pour tirer la plaque à une vitesse $\vec{v}$: $\vec{\tau} = \frac{\vec{F}}{A}$. La contrainte est proportionnelle au gradient de vitesse dans la direction normale aux plaques : $\dot{\gamma} = \frac{\partial v_x}{\partial y} = \frac{|\vec{v}|}{b}$, qu'on appelle aussi cisaillement. Si on double la force $\vec{F}$, on double la vistesse $\vec{v}$. Le coefficient de proportionnalité reliant le cisaillement $\dot{\gamma}$ à la contrainte τ est appelé viscosité η. On obtient alors la loi de Newton qui s'écrit :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \tag{2.62}$$

2.9.2 Mesure de la viscosité

Beaucoup de rhéomètres utilisent un mouvement de rotation pour engendrer des écoulements de cisaillement simple. Pour déterminer la contrainte τ en fonction du cisaillement $\dot{\gamma}$, et en déduire la viscosité $\eta_s(\dot{\gamma}) = \tau/\dot{\gamma}$, il y a deux méthodes possibles. On peut soit faire tourner une partie de la géométrie à une vitesse de rotation donnée, imposant ainsi le cisaillement et ensuite mesurer le couple qui en résulte, soit appliquer un couple bien défini, imposant ainsi la contrainte, et mesurer la vitesse de rotation qui en découle. Les mesures de viscosité présentées par la suite ont toujours été effectuées soit à cisaillement imposé, soit à contrainte imposée, mais toujours en utilisant la géométrie cône-plan.

La géométrie cône-plan

La géométrie cône-plan est constituée d'un disque et d'un cône tronqué de même rayon a. Le sommet fictif du cône est situé sur le disque. Le cône et le disque sont coaxiaux et, dans la suite, nous considérerons le cas où le cône tourne avec une vitesse Ω et le disque est fixe. Le fluide étudié remplit l'espace entre les deux parties du système de mesure (figure 2.19).

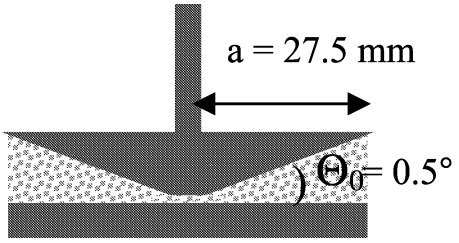


FIG. 2.19: *La géométrie cône-plan C55 du rhéomètre Reologica Stress Tech. Elle consiste en un cône tronqué et un disque, coaxiaux, de même rayon a. L'angle d'ouverture du cône est Θ_0. Le fluide étudié remplit l'espace entre ces deux parties du rhéomètre. Ω désigne la vitesse de rotation du cône.*

La vitesse locale d'un point du cône situé à une distance r de l'axe vaut Ωr. En supposant un profil de vitesse du fluide variant linéairement entre le disque et le cône, le gradient de vitesse vaut :

$$\dot{\gamma} = \frac{\Omega r}{h(r)} = \frac{\Omega}{\tan \Theta_0}. \tag{2.63}$$

où $h(r)$ est l'épaisseur locale de fluide. Cette approximation est valable dans le cas où Θ_0 est inférieur à quelques degrés [92]. On constate ainsi que le cisaillement ne dépend pas de la distance à l'axe. Le fait de cisailler le fluide entre un cône et un plan permet donc de s'affranchir de la variation du gradient résultant de l'éloignement de l'axe pour un cisaillement entre deux plans. Ceci a pour conséquence supplémentaire que la contrainte tangentielle est constante au sein de l'échantillon. On peut donc écrire directement la relation entre le couple total C appliqué sur l'axe et cette contrainte τ [92] :

$$\tau = \frac{3C}{2\pi a^3} \tag{2.64}$$

où a est le rayon du cône. Des équations (2.63) et (2.64), on déduit :

$$\eta_s = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \frac{3C \tan \Theta_0}{2\pi a^3 \Omega}. \tag{2.65}$$

La gamme de cisaillement accessible dans cette géométrie est limitée par la sensibilité de l'appareil aux cisaillements faibles. Aux cisaillements élevés, des écoulements secondaires peuvent apparaître limitant ainsi la fréquence maximale de rotation [90].

Mesures en oscillation

Une manière commode de quantifier la viscoélasticité est de soumettre l'échantillon à une contrainte sinusoïdale $\tau = \tau_0 \sin \omega t$, où τ_0 et ω sont respectivement l'amplitude de la déformation et la pulsation (reliée à la fréquence f par $\omega = 2\pi f$). Cette méthode est assez peu invasive par rapport à la plupart des techniques rhéologiques , en effet de faibles oscillations perturbent peu le système. Le cisaillement enregistré s'écrit alors sous la forme : $\dot{\gamma} = \dot{\gamma}_0 \sin(\omega t + \psi)$, où $\dot{\gamma}_0$ est l'amplitude du cisaillemnt résultant et ψ le déphasage entre la contrainte et le cisaillement. On peut alors définir les modules élastique G' et visqueux G" comme :

$$G' = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}_0} \cos \psi \text{ et } G" = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}_0} \sin \psi$$

Il est courant de définir la viscosité complexe η^* par :

$$\eta^* = \frac{\sqrt{G'^2 + G"^2}}{\omega} \tag{2.66}$$

Expérimentalement, pour réaliser ce genre de mesures, le cône du rhéomètre tourne d'un angle de 90°, en appliquant une force bien déterminée, on mesure ensuite l'angle de retour du cône, ainsi que la force de rappel et on en déduit les modules élastique et visqueux.

Pour un fluide purement élastique, G' est constant et G" nul, pour un fluide newtonien G' est nul. Pour un fluide viscoélastique, l'élasticité l'emporte aux temps courts et la viscosité aux temps longs.

Le rhéomètre utilisé

Nos mesures de rhéologie sont effectuées à l'aide d'un rhéomètre Reologica Stress Tech. Il s'agit d'un rhéomètre multifunction relié à un PC. La géométrie cône-plan que nous avons utilisée possède un rayon $a = 27.5$ mm et un angle d'ouverture de cône $\Theta_0 = 0.5°$, elle est nommée C55 (figure 2.19). Cette géométrie permet d'effectuer des mesures pour des cisaillements allant jusqu'à 6000 s^{-1}. Lors des expériences, le rhéomètre détermine la vitesse de rotation Ω et le couple C, et calcule le cisaillement $\dot{\gamma}$ à l'aide de l'équation

(2.63). La relation entre la contrainte τ et le couple C est déterminée par étalonnage par rapport à l'eau. Il est ainsi possible de remonter à la viscosité sous cisaillement $\eta_s = \tau/\dot{\gamma}$ à partir des mesures de la vitesse de rotation Ω et du couple C.

Chapitre 3

Effet de la charge de surface sur une phase lamellaire non ionique

3.1 Introduction

Dans le chapitre d'introduction, nous avons rappelé que les phases lamellaires de tensioactifs sont en général stabilisées soit par les répulsions stériques (phases lamellaires non ioniques, phases lamellaires inverses ou phases lamellaires ioniques préparées avec une solution saline), soit par les répulsions électrostatiques (phases lamellaires ioniques préparées avec de l'eau pure ou à faible concentration en sel). Quelques travaux ont été réalisés dans les régimes intermédiaires, dans des systèmes binaires assez dilués [93][94][95][96], ou dans des systèmes ternaires concentrés [97][98][9][50]. Il nous a semblé intéressant d'étudier systématiquement les modifications des paramètres élastiques d'une phase lamellaire concentrée (i.e. des fractions volumiques de membranes $0.2 < \phi_m < 0.5$), à la lumière des modèles théoriques récemment publiés [99][1][2]. Nous sommes partis d'une phase lamellaire à deux solvants (eau et décane) stabilisée par répulsions stériques, et avons étudié l'effet des faibles charges surfaciques sur ses constantes élastiques, en remplaçant une partie du tensioactif non ionique par un tensioactif ionique.

Ce problème a déjà été abordé par de nombreux groupes, tant du point de vue théorique qu'expérimental. Cependant, si des mesures systématiques de la rigidité de courbure moyenne κ d'une phase lamellaire avec la charge de surface ont été réalisées, à notre connaissance, aucune étude du module de compressibilité smectique n'a menée expérimentalement. Dans ce chapitre, nous exposerons les théories existantes, ainsi que les études expérimentales réalisées, puis nous présenterons les résultats que nous avons obtenus et les comparerons aux prédictions théoriques.

3.2 Position du problème et théories existantes

On a vu dans le premier chapitre que les interactions stabilisant les phases lamellaires étaient très bien modélisées dans deux cas limites, soit lorsque les répulsions stériques prédominent, soit lorsque les répulsions électrostatiques prédominent. Dans les régimes intermédiaires de salinité et de densité surfacique de charge, la combinaison des deux types d'interactions n'est pas évidente. Dès la fin des années 80, de nombreux théoriciens se sont intéressé à ce problème, en focalisant principalement leur attention sur le calcul de la contribution électrostatique au module de rigidité de courbure moyenne κ [100][101][102][103][104][99][105]. Tous les calculs réalisés s'appuient sur le Hamiltonien proposé par Helfrich en 1973 [21], et sur l'équation de Poisson-Boltzmann pour des surfaces chargées. La plupart des modèles considèrent d'abord une phase lamellaire stabilisée par répulsions stériques de rigidité initiale κ_0 puis calculent la contribution $\delta\kappa_{élec}$ à la rigidité, due au nuage de contre-ions, écranté ou non. La rigidité effective de la membrane devient alors : $\kappa_{eff} = \kappa_0 + \kappa_{élec}$. Trois modèles émergent de tous les résultats théoriques, ce sont ceux sur lesquels nous allons nous attarder. Par ailleurs, nous présenterons l'étude due à Lukatsky, Pincus et Safran [106][107] montrant comment les corrélations de fluctuations induisent une contribution attractive entre membranes chargées de même signe.

3.2.1 Le modèle de Harden et al.

Ce modèle, proposé en 1992 par Harden et al. [99], est en quelque sorte l'aboutissement des travaux entrepris par d'autres théoriciens depuis le début des années 90 : Pincus et al. [102], Higgs et Joanny [103]. Ces auteurs s'appuient sur le Hamiltonien proposé par Helfrich en 1973 [21] et sur l'équation de Poisson-Boltzmann pour des surfaces chargées, ils calculent alors la contribution électrostatique $\kappa_{élec}$ au module de rigidité de courbure moyenne κ_0. Trois longueurs pertinentes apparaissent dans ce modèle :

- la distance entre membranes en regard d_w
- la longueur d'écran de Debye $\lambda_D = \frac{0.3045}{\sqrt{[c_s]}}$ nm, où c_s est la concentration d'électrolyte en mol.l^{-1} (on se limite ici au cas des ions monovalents).
- la longueur de Gouy-Chapman $L_{GC} = \frac{1}{2\pi L_B \sigma}$, où σ est densité surfacique de charge (en nombre de charges unités e par unité de surface) et L_B la longueur de Bjerrum définie par : $L_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r k_B T}$ (0.71 nm pour l'eau à 20°C).

Cinq régimes limites s'imposent alors, que l'on peut représenter dans un diagramme (λ_D,L_{GC}) (figure 3.1). Pour chacun des régimes, la contribution $\delta\kappa_{élec}$ est déterminée,

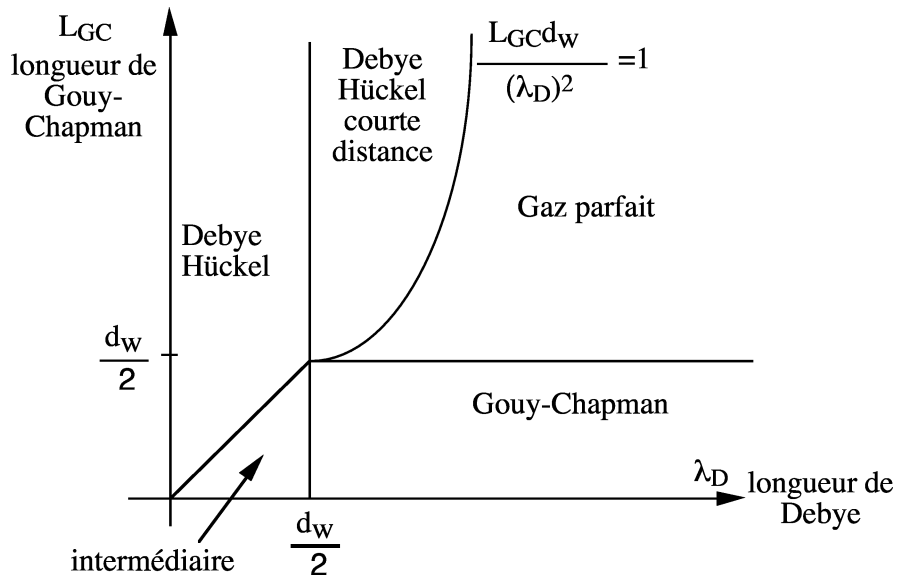


FIG. 3.1: *Diagramme (λ_D,L_{GC}), représentant les zones correspondant aux différents régimes limites pour le comportement de la contribution électrostatique au module de rigidité de courbure moyenne κ, d'après Harden et al. [99].*

soit par des arguments de loi d'échelles, soit analytiquement lorsque les calculs sont possibles. On obtient alors :

- Régime du gaz parfait : $\kappa_{élec} = \frac{1}{30\pi}\frac{k_B T d_w^3}{L_B L_{GC}^2}$
- Régime Debye-Hückel courte distance : $\kappa_{élec} = \frac{1}{30\pi}\frac{k_B T d_w^3}{L_B L_{GC}^2}$
- Régime Debye-Hückel : $\kappa_{élec} = \frac{3}{4\pi}\frac{k_B T \lambda_D^3}{L_B L_{GC}^2}$
- Régime intermédiaire : $\kappa_{élec} \propto \frac{k_B T \lambda_D}{L_B}$
- Régime Gouy-Chapman : $\kappa_{élec} \propto \frac{k_B T d_w}{L_B}$

Il est important de noter que ces calculs ont été réalisés en utilisant le mode classique d'ondulations qui correspond à des ondulations en phase des membranes en regard, et non pas le mode de compression péristaltique (ondulations en opposition de phase) qui implique non seulement la rigidité de la membrane mais aussi la compression du nuage de contre-ions entre les membranes. Pour cette raison, le mode de compression péristaltique est énergétiquement défavorable et donne des valeurs de $\kappa_{élec}$ très fortement surestimées pour les faibles densités de charges. De plus, ce modèle est un peu limité, car il ne prévoit pas les comportements de la rigidité dans les zones intermédiaires entre deux régimes. Un

article de revue sur les propriétés électrostatiques des membranes [108], permet de faire le point sur tous les modèles théoriques publiés jusqu'à sa parution.

Nous comparerons nos résultats expérimentaux à ce modèle théorique ultérieurement dans le manuscrit.

3.2.2 Le Modèle de Fogden et al.

En 1996, Fogden et al. [1] ont calculé les contributions électrostatiques aux rigidités de courbure moyenne et gaussienne de monocouches chargées dans l'eau sans ajout d'électrolyte. Seuls les contre-ions sont donc présents dans l'eau. Une solution perturbative à l'équation de Poisson-Boltzmann est proposée dans le cas de deux plans qui fluctuent, entre lesquels se trouvent les contre-ions. Les calculs de Fogden et al. [1] étendent les résultats de Harden et al. [99] à toutes les densités surfaciques de charge, et à toutes les concentrations de tensioactifs. Nous nous restreindrons ici à présenter les résultats obtenus pour les plans fluctuants sans électrolyte ajouté, pour plus de précisions, il conviendra de se reporter aux références [109][110], où sont calculées les contributions électrostatiques aux rigidités de courbure moyenne et gaussienne de membranes chargées, dans tous les régimes de salinité.

Les auteurs considèrent une cellule unité comportant deux **monocouches** de même densité surfacique de charge -σ, séparées par une couche d'eau d'épaisseur 2d (figure 3.2). Une de leurs hypothèses principales est que le champ électrostatique à l'intérieur des parties hydrophobes peut être considéré comme négligeable, ce qui revient à considérer qu'il n'existe aucun couplage électrostatique entre monocouches n'appartenant pas à la même cellule unité (figure 3.2).

Le potentiel électrostatique dans la région aqueuse est donné par l'équation de Poisson-Boltzmann non linéaire :

$$\nabla^2\psi = -\frac{e}{\epsilon_0\epsilon_r} n_0 exp\left(-\frac{e\psi}{k_B T}\right) \tag{3.1}$$

où ϵ_0 est la permittivité du vide, ϵ_r la permittivité relative du solvant, et n_0 la densité de contre-ions dans le plan x=0. Les auteurs supposent ensuite que les plans fluctuent selon une seule direction de l'espace (ici la direction y, voir figure 3.2) avec une amplitude a et une longueur d'onde $\frac{2\pi}{q}$ par rapport à leur nouvelle position moyenne $x = \pm d'$.

Deux modes de fluctuations sont considérés, l'un où les deux plans fluctuent en phase appelé mode pair, l'autre où ils fluctuent en opposition de phase appelé mode impair. Ces deux modes sont présentés sur la figure 3.3. Le mode pair est défini par l'équation suivante :

$$x = \pm d' + acos(qy) \tag{3.2}$$

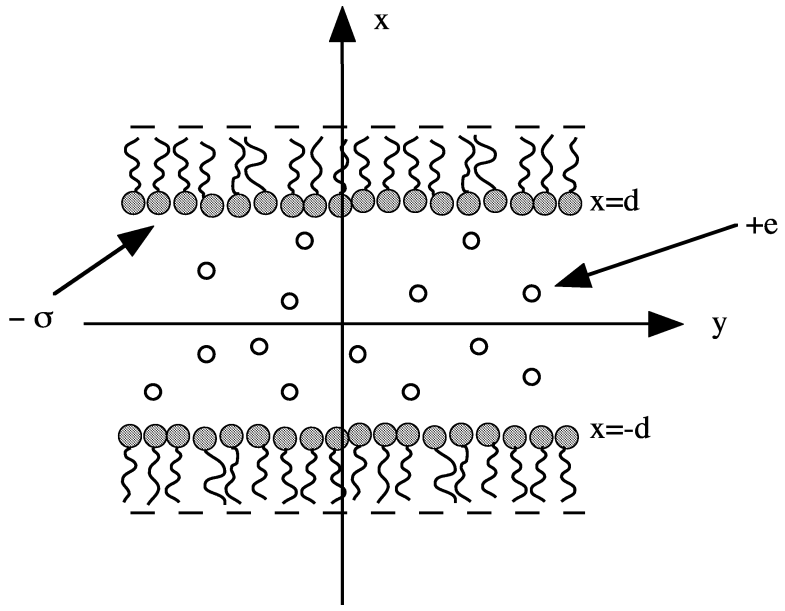


FIG. 3.2: *Représentation schématique de la cellule unité définie dans le modèle proposé par Fogden et al. [1]. Le champ électrostatique dans les parties hydrophobes est considéré négligeable. Il n'y a donc aucun couplage entre monocouches n'appartenant pas à la même cellule unité. L'épaisseur de la couche d'eau est notée 2d, la densité surfacique de charge -σ.*

tandis que le mode impair est défini par :

$$x = \pm d' \pm acos(qy) \tag{3.3}$$

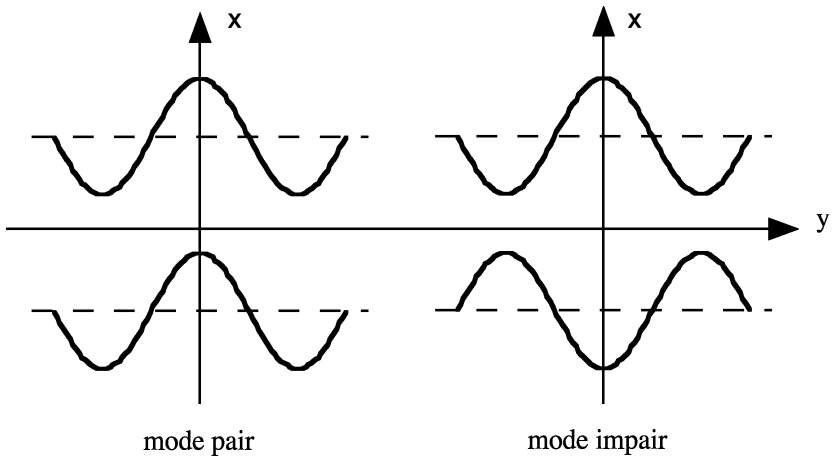


FIG. 3.3: *Schéma des fluctuations des monocouches selon les modes pair (à gauche), et impair (à droite), définis dans le modèle de Fogden et al.[1]. Le mode pair correspond aux ondulations en phase déjà présentées dans le modèle de Harden et al.[99], tandis que le mode impair correspond au mode de compression péristaltique du nuage de contre-ions. Ce dernier mode est défavorable énergétiquement parlant.*

Les densités surfaciques de charge sont supposées rester uniformes et constantes, ainsi que le volume du milieu aqueux et les aires des plans. Si bien que l'extension des plans dans la direction y est réduite par les fluctuations. Du coup pour de compenser le rétrécissement dans la direction y dû aux ondulations, 2d' est reliée à 2d par le facteur suivant :

$$\frac{d'}{d} = \frac{q}{2\pi} \int_0^{2\pi/q} dy \left[1 + (aqsinqy)^2\right]^{1/2} \tag{3.4}$$

Trois longueurs caractéristiques pertinentes apparaissent dans ce modèle :

- La distance d'eau entre membranes en regard 2d=d_w.
- La longueur de Gouy-Chapman : $L_{GC} = \frac{1}{2\pi L_B \sigma}$, où L_B est la longueur de Bjerrum et σ est densité surfacique de charge (en nombre de charges unités e par unité de surface).
- Et une troisième longueur caractéristique L_c, définie par : $L_C = \sqrt{\frac{2\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{n_0 e^2}}$. L_C correspond à la longueur d'écrantage des interactions électrostatiques en l'absence d'électrolyte ajouté.

Afin de réduire le nombre des paramètres, deux paramètres Λ et D sont définis comme les rapports des longueurs pertinentes :

$$\Lambda = \frac{d}{L_{GC}} \text{ et } D = \frac{d}{L_c}$$

Λ et D sont en réalité reliés par l'équation suivante :

$$\Lambda = DtanD \tag{3.5}$$

Aussi, il n'est pas nécessaire de connaitre n_0, puisque connaissant Λ on peut remonter à D.

L'amplitude a des fluctuations étant supposée petite devant L_c, le potentiel peut être développé en puissances de $\frac{a}{L_c}$. La contribution électrostatique à l'énergie libre moyennée sur les fluctuations est ensuite calculée et développée en puissance de q dans la limite des grandes longueurs d'onde. De ce calcul sont déduites les contributions aux modes de fluctuations pair et impair, et on obtient pour les modules de rigidité de courbure moyenne des monocouches, en unités k_BT, pour le mode pair :

$$\kappa_{pair,él} = \frac{4d\epsilon_0\epsilon_r(k_BT)}{e^2}\left[\frac{\Lambda\left(2\Lambda+1-D^2\right)}{\left(\Lambda^2+D^2\right)} - \left(1+\frac{D^2}{3}\right)\right] \tag{3.6}$$

et pour le mode impair

$$\kappa_{impair,él} = \frac{4d\epsilon_0\epsilon_r(k_BT)}{3e^2}\frac{\left(\Lambda^2+D^2\right)^2}{\left(\Lambda^2+\Lambda+D^2\right)^3}\left[\left(1-\frac{D^2}{15}\right)\Lambda^2 + 2\left(2-\frac{D^2}{5}\right)\Lambda + \left(3-D^2-\frac{D^4}{15}\right)\right] \tag{3.7}$$

En considérant certains cas limites correspondant à $D << 1$ (i.e. $\Lambda \approx D^2$) et $D \to \frac{\pi}{2}$ (i.e. $\Lambda \to \infty$), on retrouve les lois d'échelle prévues par Pincus et al. [102], Higgs et Joanny [103] et Harden et al. [99], moyennant un facteur 2 correspondant au fait que ces auteurs considèrent des bicouches tandis que Fogden et al. considèrent des monocouches.

Nos résultats expérimentaux seront analysés à la lumière de ce modèle théorique ultérieurement.

3.2.3 Le modèle de de Vries

En 1997, de Vries a proposé une théorie pour les fluctuations dans les phase lamellaires chargées sans sel ajouté [2], valable pour toutes les longueurs d'onde de fluctuations, contrairement aux autres théories valables pour les grandes longueurs d'onde. Le modèle de de Vries, harmonique en amplitude des fluctuations, s'appuie sur l'expression de l'énergie libre électrostatique récemment publiée par Fogden et al. [1].

Nous allons présenter son modèle harmonique valable pour les fluctuations de grandes longueurs d'onde et de petites amplitudes, par rapport à la longueur d'écrantage des interactions électrostatiques. Cette longueur d'écrantage est la même que celle proposée par Fogden et al. [1] : $L_c = \sqrt{\frac{2\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{n_0 e^2}}$ et les paramètres Λ et D sont définis de la même manière : $\Lambda = \frac{d}{L_{GC}}$, $D = \frac{d}{L_c}$ et sont reliés par $\Lambda = DtanD$, d étant la demie épaisseur d'eau entre membranes en regard. A partir des résultats de Fogden et al., il déduit la contribution électrostatique au module de compressibilité smectique $\bar{B}$:

$$\bar{B}_{él} = \frac{k_B T d_B}{2\pi L_B d^3} \frac{D^2 (\Lambda^2 + D^2)}{(\Lambda^2 + \Lambda + D^2)} \tag{3.8}$$

où d_B est la périodicité de la phase L_α. Lorsque la phase est totalement chargée, la longueur de Gouy-Chapman tend vers 0 donc on a $\Lambda \to \infty$ et $D \to \frac{\pi}{2}$ et l'expression 3.8 devient identique à l'expression 1.20, à un facteur multiplicatif près. Quant à l'expression de la rigidité de courbure moyenne, elle est la même que celle donnée par Fogden et al. pour le mode pair de fluctuations (formule 3.6).

De Vries a aussi déterminé la densité surfacique de charge critique σ_c, au dessus de laquelle le système lamellaire, stabilisé par les répulsions stériques, passe à une stabilisation par les interactions électrostatiques, elle vaut :

$$\sigma_c \approx \frac{\mu_3}{\kappa_0 L_B^{1/2} d^{3/2}} \tag{3.9}$$

où μ_3 est une constante numérique valant environ 0.1 pour κ_0, la rigidité de la membrane non chargée, autour de $k_B T$.

Nous comparerons nos résultats expérimentaux à ce modèle théorique plus loin dans le manuscrit.

3.2.4 Effet des corrélations de fluctuations : Lukatsky, Pincus et Safran

Peu de travaux ont été réalisés sur l'effet des charges de membranes sur le module de compressibilité smectique $\bar{B}$. A notre connaisance, outre les travaux de Dubois et al. [47] et Porcar et al. [111][9] présentés dans le chapitre d'introduction, et le modèle de de Vries [2], Lukatsky, Pincus et Safran se sont intéressés à ce problème.

Ces auteurs se sont plus exactement posés la question suivante : comment les fluctuations des charges de surface et du nuage de contre-ions qui leur est associé modifient-elles l'interaction entre deux surfaces chargées ? Ils montrent que les corrélations entre les fluctuations des charges de surface et des contre-ions induisent une contribution attractive

à l'interaction entre deux surfaces chargées du même signe. Les charges de surface sont considérées comme mobiles. Par une approximation analytique simple, ils démontrent que le couplage entre les fluctuations est plus important que les fluctuations elles-mêmes. La pression due aux fluctuations, exercée sur les surfaces chargées, est calculée pour deux régimes asymptotiques :

- Dans la limite où $d_w << L_{GC}$:

  d_w étant la distance d'eau entre surfaces chargées et L_{GC} la longueur de Gouy-Chapman. Les hypothèses faites par les auteurs impliquent que $d_w >> L_B$, où L_B est la longueur de Bjerrum. Ce régime correspond au cas où les contre-ions sont uniformément délocalisés. La contribution attractive de la pression vaut alors :

$$\Pi_{fl} = -\frac{7}{4}\frac{k_B T}{\pi d_w L_{GC}^2} \tag{3.10}$$

  Sachant que l'énergie libre par unité d'aire est reliée à la pression par la formule suivante [41] :

$$f = -\frac{1}{2A}\int_V \Pi dV = -\frac{1}{2}\int_0^{d_w} \Pi dx \tag{3.11}$$

  avec A l'aire de la surface chargée et $dV = Adx$, et que $\bar{B} = d_B \frac{\partial^2 f}{\partial x^2}$ on trouve finalement que la contribution au module de compresibilité smectique due aux corrélations de fluctuations vaut :

$$\bar{B}_{fl} = -\frac{7}{8}\frac{k_B T d_B}{\pi d_w^2 L_{GC}^2} \tag{3.12}$$

- Dans la limite où $d_w >> L_{GC}$:

  Ce régime correspond au cas où une majorité des contre-ions sont condensés sur la surface chargée, et très peu sont délocalisés. La contribution attractive de la pression vaut dans ce cas :

$$\Pi_{fl} = -\frac{k_B T}{d_w^3}\left[\frac{\zeta_R(3)}{8\pi} + 2 + \frac{\pi}{2} ln\left(\frac{2d_w}{L_{GC}}\right)\right] \tag{3.13}$$

  où ζ_R est fonction zeta de Riemann, on a $\frac{\zeta_R(3)}{8\pi} \approx 0.048$. Par le même raisonnement que précédemment, on trouve pour la contribution au module de compressibilité smectique due aux corrélations de fluctuations :

$$\bar{B}_{fl} = -\frac{k_B T d_B}{2d_w^4}\left[\frac{3\zeta_R(3)}{8\pi} + 5 + \frac{3\pi}{2} ln\left(\frac{2d_w}{L_{GC}}\right)\right] \tag{3.14}$$

Nous verrons en comparant ces prédictions à nos résultats expérimentaux s'il est possible d'observer expérimentalement l'effet des corrélations de fluctuations.

3.3 Expériences déjà réalisées

Bien entendu, nous ne sommes pas les premiers à étudier expérimentalement l'effet de faibles charges surfaciques de membranes sur les paramètres élastiques d'une phase lamellaire non ionique. Nous allons présenter ici les principaux résultats expérimentaux obtenus jusqu'à présent.

3.3.1 Systèmes binaires TA-eau dilués

Jonströmer, Schomäcker et Strey [93][94] ont rajouté de faibles proportions de tensioactif non ionique à un tensioactif ionique (environ 0.1%) dans des systèmes lamellaires très dilués. Ils observent une diminution de la périodicité avec la concentration de tensioactif ionique. Cette diminution est d'autant plus importante que la périodicité est grande. Elle s'explique par la réduction des fluctuations de la membrane. En effet, celle-ci s'aplatit à cause des répulsions électrostatiques dans le plan entre têtes polaires chargées. L'addition d'un électrolyte écrante partiellement les interactions électrostatiques, du coup la périodicité réaugmente. A forte concentration de tensioactif ionique, une transition vers une phase isotrope de vésicules est observée. Quant à la rigidité de courbure moyenne, elle augmente linéairement avec la concentration de tensioactif ionique, en bon accord avec les prédictions théoriques de Harden et al. [99].

Salamat et al. [95] ont étudié par réflectivité et diffusion de neutrons, les fluctuations d'une phase lamellaire non ionique ($C_{12}E_5$), au fur et à mesure de l'adjonction de faibles quantités d'un tensioactif ionique (sodium décyl sulfate). Ils observent une diminution de l'amplitude des fluctuations des membranes avec l'augmentation du rapport molaire (tensioactif ionique)/(tensioactif non ionique), ainsi qu'une diminution de l'intensité diffusée aux très petits angles et l'apparition de quasi-pics de Bragg d'ordre supérieur. Leurs observations expérimentales sont en bon accord avec le modèle théorique récemment développé par de Vries [2].

Enfin, von Berlepsch et de Vries [96] ont étudié le bilan entre les répulsions stériques et électrostatiques dans la phase lamellaire non ionique ($C_{10}E_3$), au fur et à mesure de l'adjonction de faibles quantités d'un tensioactif ionique (SDS). Ils observent qu'en dessous d'une densité surfacique de charge critique $\sigma_c \approx 1.5\ 10^{-4}$ e/nm^2, les phases lamellaires sont stabilisées par répulsions stériques. Pour σ_c au dessus de $6.25\ 10^{-3}$ e/nm^2, des structures non lamellaires se développent. Toutes les dilutions de la phase lamellaire présentent la déviation logarithmique typique, quelles que soient la densité surfacique de charge, ou la concentration d'électrolyte considérées, en accord avec le modèle théorique proposé par de Vries [2]. La périodicité diminue avec la concentration de tensioactif ionique, en bon

accord avec les résultats de Jonströmer, Schomäcker et Strey [93][94].

3.3.2 Systèmes ternaires concentrés

Fukuda et al. [97] ont remplacé 1% de tensioactif non ionique ($C_{12}E_5$) par du tensioactif ionique (SDS), dans le système ternaire $C_{12}E_5$-eau-décane. Ils se sont intéressés essentiellement aux effets sur la structure et sur l'équilibre des phases. En ce qui concerne la phase lamellaire directe, ils observent une diminution de la turbidité caractéristique du système ternaire non ionique, ainsi que l'apparition d'un quasi-pic de Bragg de second ordre. Ces modifications sont interprétées en utilisant le modèle de Harden et al. [99], comme le passage d'un phase stabilisée par répulsions stériques, à une phase stabilisée par répulsions électrostatiques. Leurs résultats ont été confirmés par les expériences de Rajagopalan et al. [98].

Porcar et al. [9][50] ont réalisé le même type d'expériences sur une phase lamellaire directe. Le tensioactif non ionique Triton X100 (noté TX) a été remplacé par un tensioactif ionique (CpCl) : 1 Cpcl pour 5 TX au maximum. A fraction volumique de membrane constante $\phi_m = 0.565$, ils observent, une légère diminution de la périodicité, tandis que l'épaisseur de la membrane reste constante. Quant à la rigidité de courbure moyenne de la membrane κ, elle augmente mais ils ne peuvent quantifier cette augmentation. L'étude des textures de la phase lamellaire sous microscope polarisant ne permet pas de distinguer de différences entre la phase neutre et la phase chargée. En revanche, lorsqu'on la dilue par de l'eau, la phase chargée démixe en deux phase lamellaires, alors que la phase neutre est encore diluable. Par ailleurs, pour la phase lamellaire inverse, ils n'observent aucune modification.

Des mesures systématiques de la rigidité de courbure moyenne et du module de compressibilité smectique avec la concentration de tensioactif ionique manquaient cruellement dans les systèmes ternaires concentrés (inverses et directs). C'est ce à quoi nous nous sommes intéressés.

3.4 Système expérimental choisi

Nous avons travaillé dans un système ternaire à deux solvants, l'eau et le décane, avec pour tensioactif le tétraéthylène glycol monododécyléther (noté $C_{12}E_4$, dont la formule chimique se trouve en annexe B). Le $C_{12}E_4$ est un tensioactif non ionique comportant une chaîne aliphatique de 12 carbones. Son aire par tête polaire a été mesurée par Sottman et al. [112] égale à 0.54 nm^2. Dans ce système ternaire, existent aussi bien une phase lamellaire

gonflée à l'eau (L_α directe) qu'une phase lamellaire gonflée au décane (L_α inverse). Tout comme dans le système $C_{12}E_5$-eau-octane, on peut passer continûment d'une phase L_α gonflée à l'eau à une phase lamellaire gonflée au décane [49].

Afin d'étudier l'effet de la charge superficielle sur les constantes élastiques de la phase lamellaire, nous avons remplacé une partie du tensioactif non ionique $C_{12}E_4$ par un tensioactif anionique le SDS (sodium dodécyl sulfate, formule chimique présentée en annexe B). Ce choix ne s'est pas fait au hasard : d'une part le SDS possède lui aussi une chaîne aliphatique de 12 carbones, d'autre part son aire par tête polaire est sensiblement la même égale à 0.54 nm ^{2} [113]. En effet de nombreuses études expérimentales ont montré que les constantes élastiques des phases lamellaires étaient fortement dépendantes de l'aire par tête polaire [22] et que l'insertion de chaînes de longueurs différentes avait un effet cotensioactif [17]. Le choix du SDS nous permet donc de nous affranchir des modifications dues à la longueur de la chaîne, ou à l'aire par tête polaire du tensioactif, et de nous focaliser sur l'effet de la charge surfacique de membrane.

3.5 La phase lamellaire inverse

Par phase lamellaire inverse, nous entendons une phase lamellaire où la membrane est constituée d'une double couche de tensioactifs renfermant de l'eau, diluée dans le solvant organique, ici le décane (figure 3.4).

Nous avons étudié la phase lamellaire inverse le long d'une ligne de dilution en gardant constant le rapport volumique $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_{eau}} = 0.62$, tandis que la fraction volumique de membranes définie ici comme $\phi_m = \frac{V_{TA}+V_{eau}}{V_{TA}+V_{eau}+V_d}$ variait entre 0.6 et 0.28. Nous avons remplacé 1% et 4 % de $C_{12}E_4$ par du SDS pour ces expériences. La concentration du tensioactif $C_{12}E_4$ sous forme de monomère dans le décane qui vaut 11g/l [114] a été prise en compte dans le calcul des fractions volumiques. Le mode de préparation des échantillons est présenté en annexe C.

3.5.1 Observations optiques

A 20°C, entre polariseurs croisés, tous les échantillons que nous avons retenus pour cette étude sont biréfringents. De plus, sous microscope polarisant, ils présentent des défauts de type sphérulites (oignons) ou stries huileuses. Ces défauts sont typiques de ceux des phases lamellaires [115]. Dans les domaines de fraction volumique de membranes que nous avons exploré, nous avons bien des phases lamellaires. Comme Porcar et al. [9][50][111], nous n'avons distingué aucune différence entre les textures de la phase neutre et celles de

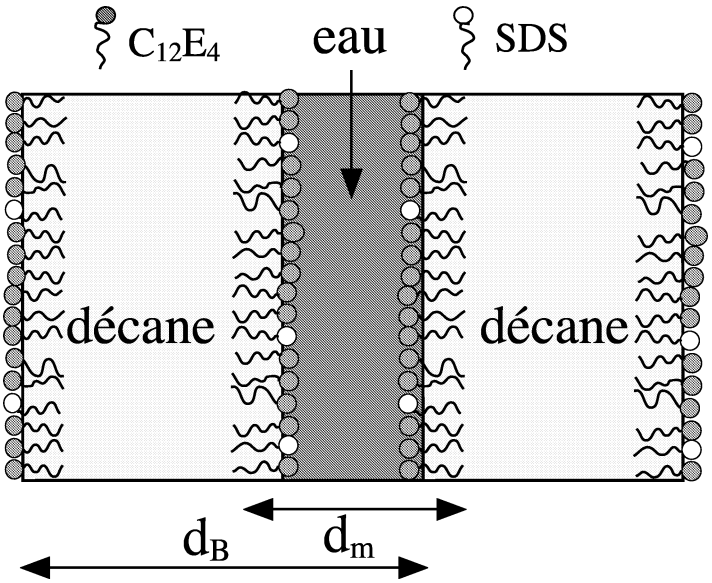


FIG. 3.4: *Schéma de la phase lamellaire inverse, dopée avec du SDS. Dans ce cas, la membrane est la double couche de tensioactifs renfermant l'eau, son épaisseur est d_m. La périodicité de la phase lamellaire est notée d_B.*

la phase chargée.

3.5.2 Diffusion des rayons X aux petits angles : absence de modifications

Nous avons réalisé les spectres de diffusion de rayons X de tous nos échantillons à 20°C. Il est apparu que la présence de SDS dans la phase L_α inverse n'entraînait aucun changement visible sur les spectres. Comme présenté sur la figure 3.5, à même fraction volumique de membrane, les spectres à 0% et 4% de SDS se superposent presque exactement.

A cette analyse qualitative, on peut ajouter l'analyse quantitative suivante. Tout d'abord, à fraction volumique de membrane fixée, la périodicité d_B ne varie pas avec la concentration de SDS. Ensuite, lorsqu'on trace d_B en fonction de ϕ_m^{-1} (loi de dilution, formule 1.30 [51]), à même fraction volumique de membrane, les points sont confondus quelle que soit la concentration de SDS (figure 3.6). De cette loi de dilution, nous avons déterminé l'épaisseur de la membrane $d_m = 5.1 \pm 0.2$ nm, et ce quelle que soit la concentration de SDS. Les spectres de rayons X ainsi que les ajustements par le modèle de Nallet sont présentés en annexe G.

Si on trace l'écart à la loi de dilution (i.e. $d_B\phi_m$ en fonction de $ln(d_B - d_m)$, formule

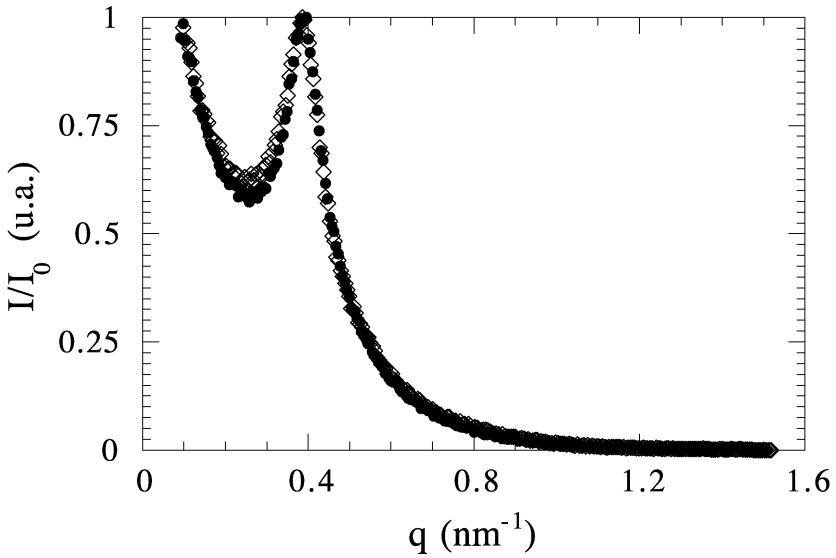


FIG. 3.5: *Spectres de deux phases lamellaires inverses, de même fraction volumique de membrane $\phi_m = 0.35$, non chargée ($\diamond$) et chargée à 4% en SDS ($\bullet$). Le rapport volumique $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_e}$ est constant et vaut 0.62.*

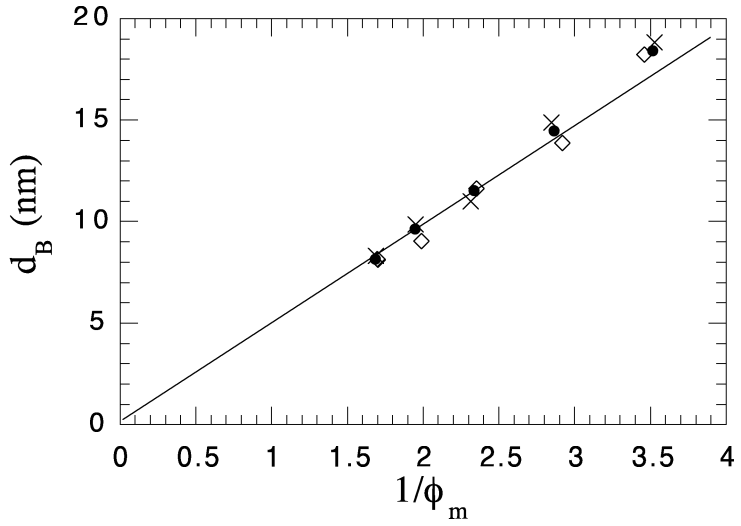


FIG. 3.6: *Loi de dilution pour trois phases lamellaires inverses, non chargée ($\diamond$), chargée à 1% ($\times$) et 4% de SDS ($\bullet$). Le rapport volumique $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_{eau}}$ vaut 0.62. La droite est le meilleur ajustement linéaire passant par l'origine des 4 premières fractions volumiques de membrane. Pour le dernier point correspondant aux grandes périodicités, on commence à observer expérimentalement l'écart à la loi de dilution. A partir de la valeur de la pente, on obtient $d_m = 5.1 \pm 0.2$ nm pour l'épaisseur de la membrane.*

1.35), à nouveau tous les points s'alignent sur une même droite (figure 3.7). De la pente de cette droite, et de la valeur déterminée pour l'épaisseur de la membrane par la loi de dilution, nous avons déduit κ la rigidité de la membrane, conformément aux modèles théoriques [52][53][54]. On obtient, en ajustant les points expérimentaux par l'équation 1.35, $\kappa = 0.7 \pm 0.2\ k_B T$. Cette valeur est déterminée avec une grande incertitude due à la faible pente de l'écart à la loi de dilution, mais aussi au nombre de points expérimentaux disponibles. La rigidité de la membrane reste donc identique pour une densité surfacique de charge allant de 0 à 4% de charges (en concentration molaire). Ce résultat est en accord avec ceux de Porcar et al. [9][50][111].

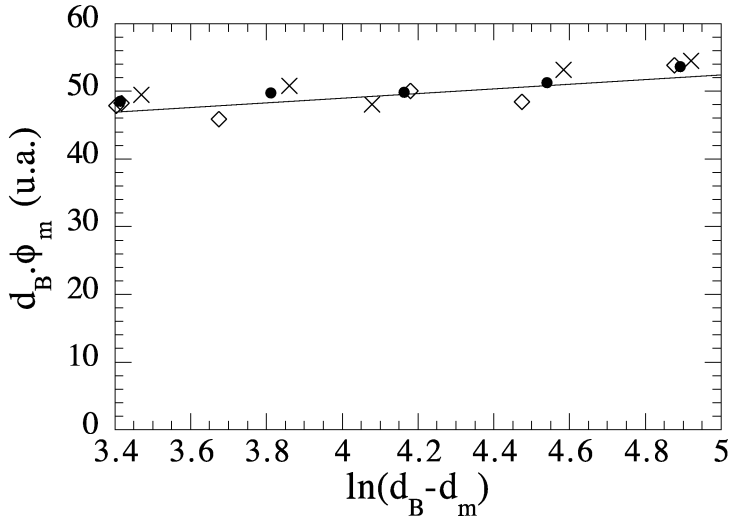


FIG. 3.7: *Ecart à la loi de dilution, tracé pour trois phase lamellaires inverses : non chargée (◇), chargée à 1% (×) et à 4% en SDS (●). La droite est le meilleur ajustement linéaire. De la valeur de sa pente et de l'épaisseur de la membrane déterminée par la loi de dilution, on trouve pour la rigidité de la membrane* $\kappa = 0.7 \pm 0.2\ k_B T$.

Les valeurs du paramètre de Caillé η ont été obtenues à partir de l'ajustement des spectres de rayons X par le modèle analytique de Nallet et al. [64]. Pour les phases lamellaires stabilisées par répulsions stériques, en utilisant la formule donnée par Helfrich [42] pour le potentiel d'interaction entre membranes, le paramètre de Caillé peut être réécrit sous la forme suivante si l'on considère notre système comme une phase lamellaire à un seul solvant [41] :

$$\eta = \alpha \left(1 - \frac{d_m}{d_B}\right)^2 \tag{3.15}$$

où α est un paramètre numérique qui théoriquement vaut $\frac{4}{3}$, mais qui expérimentalement peut être assez différent [15]. Pour les différentes concentrations de SDS, nous avons

donc tracé $\eta^{0.5}$ en fonction de d_B^{-1} (figure 3.8). La variation est linéaire dans tous les cas ce qui indique que même pour 4% de SDS la phase L_α est stabilisée par les répulsions stériques. L'ajustement par l'équation 3.15 donne $\alpha = 1.45 \pm 0.05$, et $d_m = 5.3 \pm 0.3$ nm pour l'épaisseur de la membrane, valeur en très bon accord avec celle précédemment déterminée par la loi de dilution. L'épaisseur de la membrane est indépendante du taux de charge, en bon accord avec les résultats de Porcar et al. [9][111]. Les phases lamellaires

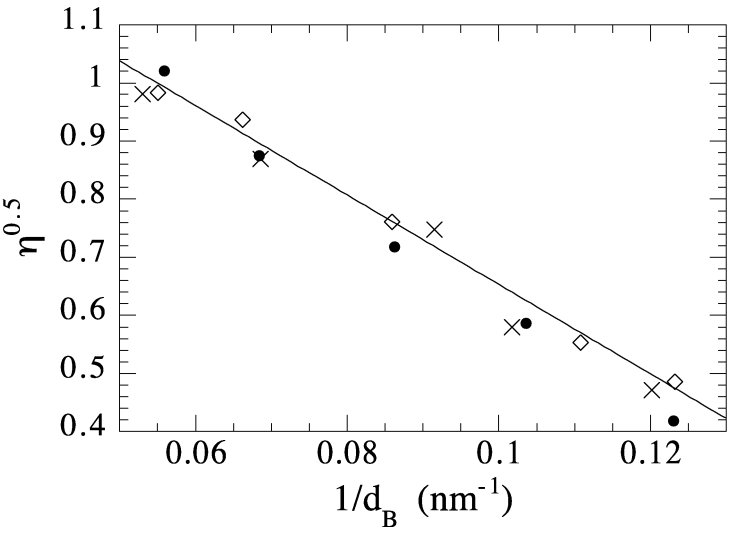


FIG. 3.8: *Variation de $\eta^{0.5}$ en fonction de d_B^{-1}, tracée pour trois phase lamellaires inverses : non chargée ($\diamond$), chargée à 1% ($\times$) et à 4% en SDS ($\bullet$). La taille des points est inférieure à l'erreur. La droite représente le meilleur ajustement par l'équation 3.15, et donne $\alpha = 1.45 \pm 0.05$ et $d_m = 5.3 \pm 0.3$ nm, en bon accord avec la valeur de l'épaisseur de membrane déterminée par la loi de dilution.*

inverses, dopées par 1 et 4% de SDS, continuent donc à être stabilisées par les répulsions stériques. La différence entre α=1.45 et $\frac{4}{3}$ pourrait provenir du traitement du système expérimental comme une phase lamellaire à un seul solvant.

Comparaison avec le modèle de Fogden

Nous avons vérifié par ailleurs que la contribution électrostatique paire à la rigidité de la membrane donnée par le modèle théorique de Fogden et al.[1] était négligeable par rapport à la rigidité initiale. Sachant que l'épaisseur de la membrane vaut environ 5 nm, et environ 3 nm pour la membrane sèche (il suffit pour cela de tracer d_B en fonction de la fraction volumique de tensioactif ϕ_{TA}^{-1}, voir par exemple [98]), l'épaisseur d'eau vaut environ 2 nm. Pour 4% de SDS, la longueur de Gouy-Chapman vaut environ 3 nm, donc en

utilisant la formule 3.6, on trouve 0.01 k_BT pour la contribution électrostatique paire à la rigidité. La contribution impaire, quant à elle diverge, ce qui est complètement aberrant. L'absence de modifications peut s'expliquer par la faible épaisseur d'eau (environ 2 nm) : la densité en contre-ions est si importante qu'ils s'auto-écrantent, seules les répulsions stériques stabilisent alors la phase L_α. Si l'on calcule une longueur de Debye équivalente à partir de la concentration de SDS, on trouve $\lambda_D = 0.73$ nm : au dela de cette distance qui est de l'ordre de la longueur de Bjerrum, l'effet des charges ne se fait plus sentir : une monocouche ne voit donc pas les charges de la monocouche située en regard.

Explication alternative

On peut aussi fournir une interprétation alternative à partir du modèle de phase lamellaire à deux solvants. Comme η et κ sont constantes, $\bar{B}$ doit être constant. On peut cependant imaginer que l'ajoût de charges de surface modifie les interactions entres monocouches de tensioactifs via l'eau (les répulsions augmentent ainsi que $\bar{B}_w$), mais comme le module de compressibilité smectique provient essentiellement du module de compressibilité smectique du décane, l'effet des interactions électrostatiques est imperceptible.

3.5.3 Effet de l'épaisseur d'eau gonflant la membrane

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une autre dilution de la phase lamellaire inverse en augmentant la quantité d'eau dans la membrane. Le rapport volumique $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_{eau}}$ a été maintenu égal à 0.385. La phase lamellaire inverse considérée était soit non chargée, soit chargée à 4% de SDS. L'ajustement de la périodicité en fonction de la fraction volumique de membrane (non présenté ici) ne dépend pas de la concentration de SDS, et donne 8.5±0.1 nm pour l'épaisseur de la membrane (non présenté ici). La variation de $\eta^{0.5}$ en fonction de d_B^{-1} est linéaire pour les deux dilutions, et l'ajustement des points expérimentaux par l'équation 3.15 donne $\alpha = 1.3 \pm 0.05$, et d_m=8.4±0.3 nm pour l'épaisseur de la membrane, en très bon accord avec la valeur obtenue par la loi de dilution. Jusqu'ici, on ne voit pas vraiment de différence avec l'autre dilution : la phase L_α dopée reste stabilisée par répulsions stériques.

Cependant, lorsqu'on trace l'écart à la loi de dilution (figure 3.9), on observe une diminution de la pente pour la phase dopée à 4% de SDS. Cette diminution correspond à une augmentation de la rigidité de la membrane : κ passe de 1.8± 0.4 à 2.4±0.4 k_BT. Etant donnée la grande incertitude sur les valeurs, cette variation n'est pas très importante, mais elle semble bien réelle. Nous avons calculé la contribution électrostatique paire à la rigidité de la membrane donnée par le modèle théorique de Fogden et al.[1] : sachant que l'épaisseur

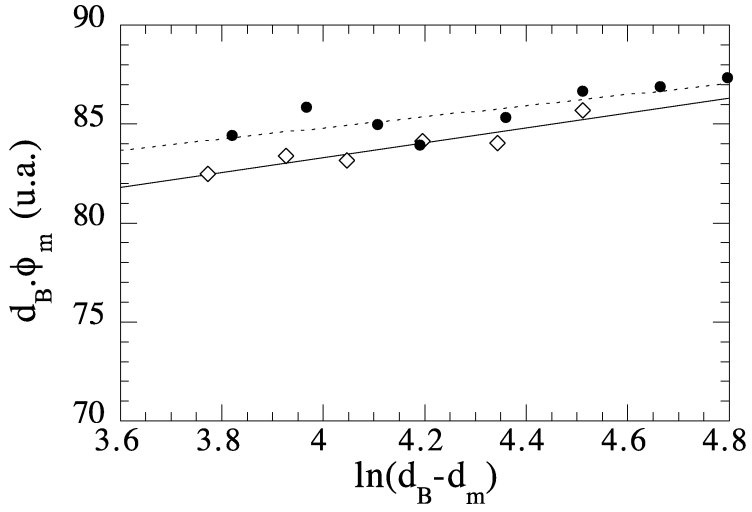


FIG. 3.9: *Ecart à la loi de dilution tracé pour deux phases lamellaires inverses telles que* $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_{eau}} = 0.385$ *: non chargée (◇) et chargée à 4% en SDS (●). Les droites sont les meilleurs ajustements linéaires (trait plein=0% de SDS ; pointillés=4% de SDS). La pente diminue avec la concentration de SDS. De la valeur de sa pente et de l'épaisseur de la membrane déterminée par la loi de dilution, on trouve respectivement pour la rigidité de la membrane : 1.8± 0.4* k_BT *(0% de SDS) et 2.4±0.4* k_BT *(4% de SDS). La pente de l'ajustement est relativement faible, c'est pourquoi nous avons une grande incertitude sur les valeurs de la rigidité.*

de la membrane vaut environ 8.5 nm, et environ 3 nm pour la membrane sèche (on la détermine en traçant d_B en fonction de ϕ_{TA}^{-1} [98]), l'épaisseur d'eau vaut environ 5.5 nm, en utilisant la formule 3.6, on trouve 0.1 k_BT pour la contribution électrostatique paire à la rigidité. Cette valeur n'est pas en contradiction avec ce qu'on observe expérimentalement. La contribution impaire , quant à elle diverge, ce qui est complètement aberrant. Cette augmentation de la rigidité peut s'expliquer comme suit : le nuage de contre-ions est moins dense que pour la dilution précédente, du coup l'autoécrantage des interactions électrostatique est moins important, et il est plus difficile de plier la membrane car cela obligerait deux surfaces chargées du même signe à se rapprocher. Si l'on calcule une longueur de Debye équivalente à partir de la concentration de SDS, on trouve $\lambda_D = 1.2$ nm : l'effet des charges se fait donc sentir un peu plus loin que dans le premier cas.

Par ailleurs, on remarquera que la rigidité de la membrane augmente avec l'épaisseur d'eau, dans le cas non chargé. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Porcar et al. [9][50][111], qui n'observent aucune variation de la rigidité en augmentant l'épaisseur d'eau dans une phase L_α inverse, mais aussi avec ceux de Freyssingeas et al. [116] qui observent une diminution de la rigidité avec l'augmentation de l'épaisseur de la membrane. Expérimentalement, les comportements sont très différents selon le système considéré et le problème semble rester ouvert. On peut cependant imaginer qu'une différence d'hydratation des têtes polaires avec la quantité d'eau disponible pourrait modifier la rigidité de la membrane, ceci restant à prouver.

3.5.4 Effet de la charge de surface sur le passage de la phase inverse à la phase directe

Nous avons réalisé une autre série de mesures, pour déterminer à quel moment l'effet des charges surfaciques se fait sentir. La fraction volumique de tensioactif a été fixée à 0.2, et l'on a fait varier le rapport volumique entre le décane et l'eau $\omega = \frac{V_d}{V_d+V_e}$ de 0.8 à 0.2, par pas de 0.2. Ceci revient à passer de la phase lamellaire inverse à la phase lamellaire directe. Ces mesures ont été réalisées pour deux phases lamellaires, une non chargée l'autre chargée à 4% de SDS. Les spectres de rayons X aux petits angles de tous les échantillons ont été enregistrés, et ajustés par le modèle de Nallet et al. [64]. Du côté de la phase lamellaire directe, les spectres sont profondément modifiés, nous reviendrons en détail dans la partie suivante sur ces modifications. Comme déjà présenté auparavant, la phase lamellaire inverse ne semble subir aucune modification. Le paramètre de Caillé η tracé en fonction de ω est présenté sur la figure 3.10.

Pour la phase non chargée, η présente un minimum pour ω autour de 0.5. Ce résultat est

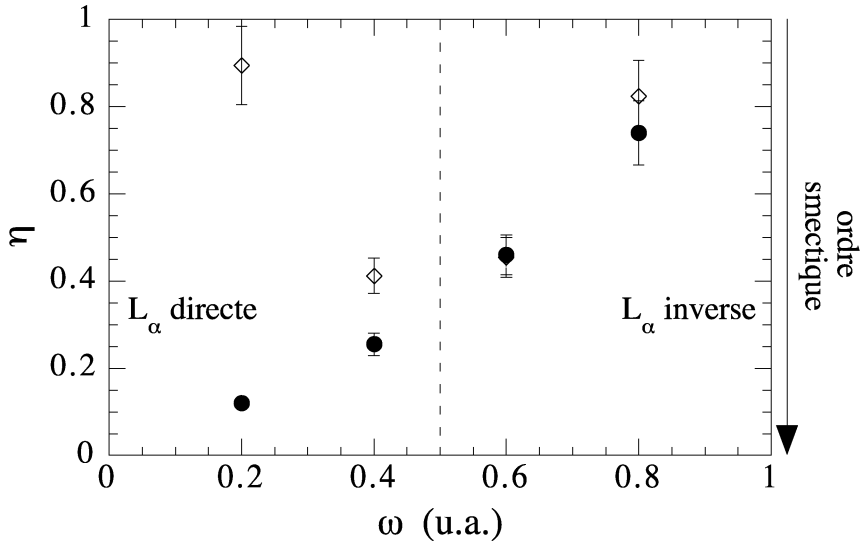


FIG. 3.10: *Variation du paramètre de Caillé η en fonction du rapport volumique $\omega = \frac{V_d}{V_d+V_e}$, pour deux phases lamellaires : non chargée ($\diamond$) et chargée à 4% en SDS ($\bullet$). La fraction volumique de tensioactif est fixée à 0.2. Dans la phase inverse ($\omega \geq 0.5$), η est identique dans les deux cas. Le paramètre de Caillé passe par un minimum autour de $\omega = 0.5$, pour la phase non chargée, en très bon accord avec les résultats de Oda et Litster [49]. Dans la phase chargée à 4% de SDS, η augmente quasi linéairement avec ω : la phase lamellaire directe chargée est mieux ordonnée que la phase inverse à cause des répulsions électrostatiques non écrantées entre membranes en regard.*

en parfait accord avec ceux de Oda et Litster [49] : pour les phase lamellaires non ioniques, des monocouches de tensioactif séparées par des quantités égales d'eau et d'huile sont plus ordonnées que des membranes en excès d'eau ou d'huile. En revanche, pour la phase lamellaire chargée à 4% de SDS, le paramètre de Caillé η augmente quasi-linéairement avec ω. Dans la phase lamellaire inverse ($\omega > 0.5$), η reste quasiment constant avec la concentration de SDS, tandis qu'il diminue dans la phase lamellaire directe. A cause de interactions électrostatiques, sur lesquelles nous reviendrons en détail ultérieurement, les membranes chargées séparées par de l'eau sont mieux ordonnées que la situation symétrique. On peut conclure de cette figure, que l'effet de la charge de surface se fait sentir dès que l'on passe dans une phase lamellaire directe, alors qu'il est négligeable dans la phase inverse.

3.5.5 Conclusion

En conclusion, lorsque la membrane est formée d'une double couche de tensioactifs renfermant une faible épaisseur d'eau, remplacer du tensioactif non ionique par de faibles concentrations de tensioactif ionique ne modifie en rien les paramètres structuraux et élastiques de la phase lamellaire. La périodicité d_B et l'épaisseur de membrane d_m restent identiques, tout comme la rigidité de courbure moyenne κ et le paramètre de Caillé η, donc a fortiori le module de compressibilité smectique. La phase lamellaire inverse, même chargée reste donc stabilisée par les répulsions stériques entre membranes. La faible épaisseur d'eau dans la membrane ($\approx$ 2 nm) explique cette absence de modifications : l'eau est si dense en contre-ions qu'ils s'auto-écrantent entre eux. Le modèle de Fogden [1] prévoit bien cette absence de modifications. Quand l'épaisseur d'eau augmente ($\approx$ 5 nm), des modifications commencent à être observables : diminution du paramètre de Caillé η et augmentation de la rigidité κ de la membrane. Nous avons aussi observé que dans une phase inverse non chargée, la rigidité de la membrane augmentait avec son épaisseur, en bon accord qualitatif avec les prédictions de Woo et al. [117]. Cette observation est en désaccord avec celles de Porcar et al. [9][50] et Freyssingeas et al. [116], il semble que la question de la dépendance de la rigidité avec l'épaisseur de la membrane reste ouverte.

3.6 La phase lamellaire directe

Voyons maintenant quelles modifications subit la phase lamellaire directe. La phase lamellaire directe est constituée de doubles couches de tensioactif renfermant du décane, périodiquement séparées par de l'eau (figure 3.11). La phase L_α directe a été étudiée le long d'une ligne de dilution pour des concentrations de SDS dans la membrane allant

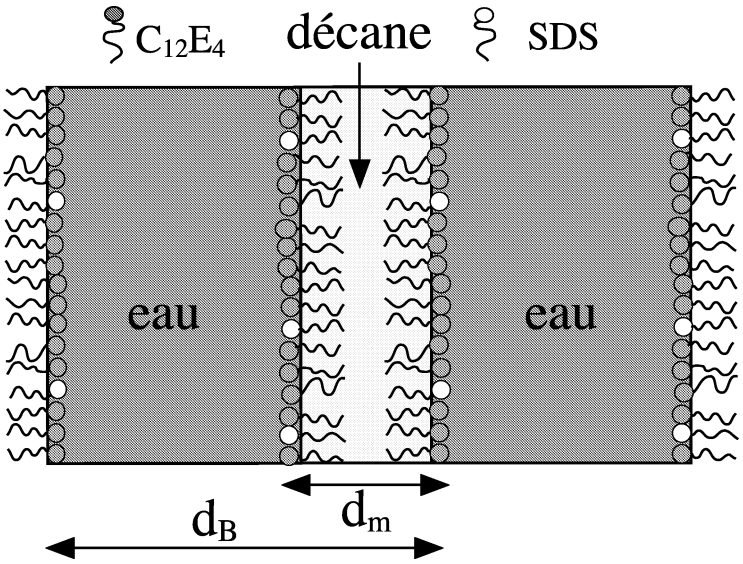


FIG. 3.11: *Schéma de la phase lamellaire directe dopée avec du SDS. L'épaisseur de la membrane est notée d_m et la périodicité d_B. La membrane est constituée d'une double couche de tensioactif renfermant du décane.*

de 0 à 6% en rapport molaire de SDS sur la totalité du tensioactif. Le rapport volumique $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d} = 0.554$ a été maintenu constant, ce qui revient à travailler à épaisseur de membrane constante, tandis que la fraction volumique de membrane, définie ici comme $\phi_m = \frac{V_{TA}+V_d}{V_{TA}+V_{eau}+V_d}$ varie entre 0.6 et 0.36 (pour 0% de SDS), ou entre 0.5 et 0.2 pour les autres pourcentages de SDS dans la membrane. Le mode de préparation des échantillons est présenté en annexe C.

3.6.1 Observations optiques.

Tout comme pour la phase inverse, entre polariseurs croisés, nos échantillons sont biréfringents à 20°C. En outre, les défauts qu'ils présentent au microscope polarisant sont typiques de ceux d'une phase lamellaire : stries huileuses et sphérulites [115]. Nous avons donc bien une phase lamellaire. Nous avons remarqué que la zone d'existence de la phase L_α le long de la droite de dilution définie ci-dessus est relativement étroite ($0.36 \leq \phi_m \leq 0.6$) pour la phase non dopée. En revanche, cette zone s'étend assez loin ($\phi_m \approx 0.2$), dès qu'on remplace 0.1% du $C_{12}E_4$ par du SDS. En résumé, il est possible de diluer plus la phase chargée que la phase non chargée, avant d'observer une démixion des échantillons. Cette observation est en désaccord avec les résultats de Porcar et al. [9][111]

qui observent exactement l'inverse dans un système très semblable au nôtre.

Par ailleurs, la phase lamellaire non chargée apparait assez turbide, à cause de son importante compressibilité osmotique [63]. Cette turbidité disparait complètement dès que la membrane est chargée avec 0.1% de SDS. Cette modification a déjà été observée par Fukuda et al. [97], dans un système équivalent. La compressibilité osmotique diminue avec la charge de surface car des répulsions électrostatiques apparaissent dans le système.

Dans ce système, la comparaison des défauts caractéristiques de la phase lamellaire, au microscope polarisant, entre phases chargées et non chargée est sujette à caution. En effet, l'introduction de répulsions électrostatiques dans la phase lamellaire déplace la température de transition vers la phase isotrope (environ 27°C pour la phase non chargée) vers des températures supérieures qui avoisinent rapidement 50°C pour des faibles taux de charge. Malheureusement, le SDS s'hydrolyse à partir de 50°C. Or, habituellement pour s'assurer que les défauts de textures observés ne proviennent pas du cisaillement subi par la phase lamellaire lorsqu'on l'introduit dans des capillaires ou entre lame et lamelle, on fait transiter les échantillons vers une phase isotrope, et l'on repasse dans la phase lamellaire en diminuant très lentement la température. Si l'on utilise ce procédé, en augmentant la température aux alentours de 50°C, on prend donc le risque que le SDS s'hydrolyse, et donc de ne plus être dans le même système. Nous n'avons pas voulu prendre ce risque, c'est pourquoi nous n'avons pas comparé les textures des phases non chargée et chargée.

3.6.2 Durcissement de l'ordre smectique

Nous avons réalisé les spectres de diffusion des rayons X aux petits angles de tous nos échantillons, à 20°C. Tous présentent au moins un quasi-pic de Bragg, caractéristique de la phase lamellaire. A même fraction volumique de membrane, on est frappé par la différence entre les spectres pour différentes concentrations de SDS (figure 3.12). Au fur et à mesure que la charge de surface augmente, on garde le quasi-pic de Bragg caractéristique d'une phase lamellaire, mais il s'affine, la remontée du signal aux petits angles disparait, et on voit progressivement pousser le second et parfois même le troisième ordre du quasi-pic de Bragg 3.12. Certains spectres de rayons X aux petits angles, ainsi que leur ajustement par le modèle de Nallet sont présentés en annexe G. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de Fukuda et al. [97]. L'effet électrostatique induit par le remplacement du tensioactif non ionique par un tensioactif ionique est évident : l'ordre smectique augmente visiblement de façon impressionnante pour de faibles charges de surface.

Afin de nous assurer que les modifications que nous avions observées n'étaient pas dues

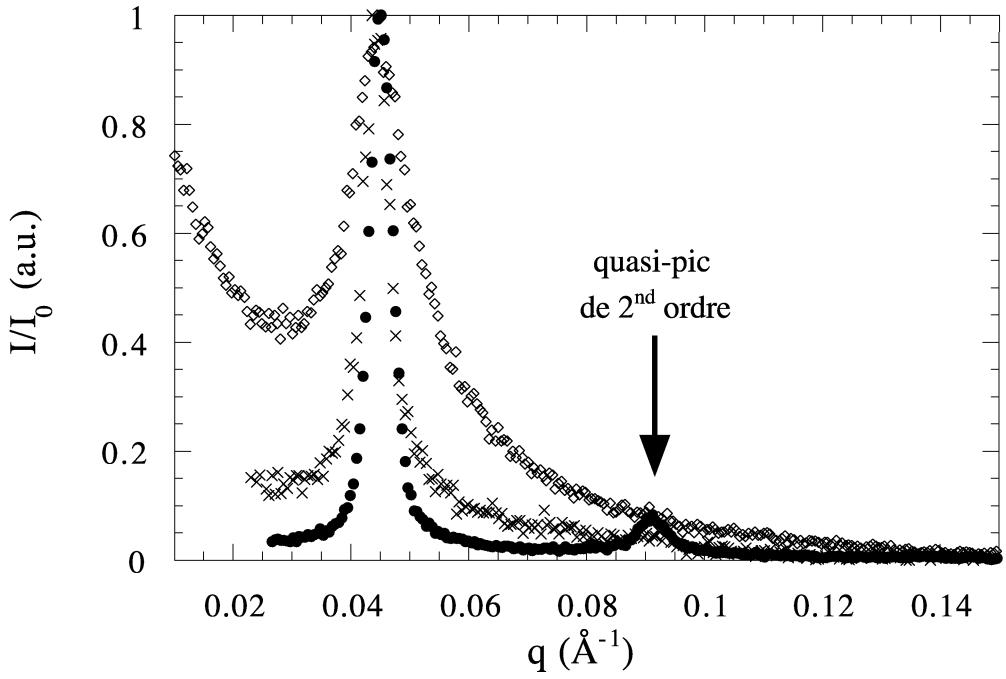


FIG. 3.12: *Spectres de rayons X aux petits angles, normalisés par rapport l'intensité du premier quasi-pic de Bragg, de 3 phases L_α directes, de même fraction volumique de membrane ϕ_m=0.4 ($\diamond$=0% de SDS, $\times$=0.4% de SDS et $\bullet$=3.5% de SDS). On observe le durcissement de l'ordre smectique, avec l'affinement du quasi-pic d'ordre 1, et l'apparition du quasi-pic de second ordre, au fur et à mesure que la densité surfacique de charge augmente. La flêche indique l'emplacement du quasi-pic de second ordre.*

à des changements de courbure spontanée, ou d'aire par tête polaire, dus au SDS, nous avons préparé la phase lamellaire contenant 4% de SDS avec de la saumure (0.1 M NaCl). Pour une même fraction volumique de membrane, les spectres de rayons X de la phase non ionique et de la phase chargée à 4% de SDS, préparée avec l'eau salée, se superposent exactement. En écrantant complètement les interactions électrostatiques, on revient à une phase stabilisée par répulsions stériques. Ceci nous prouve bien que les modifications observées sont d'origine électrostatique.

3.6.3 Diminution de la périodicité

Pour les "grandes" dilutions de la phase L_α ($\phi_m \approx 0.2$), on peut remarquer un léger décalage de la position du quasi-pic vers les plus grands vecteurs d'onde lorsque la concentration en SDS augmente (figure 3.13). Le même phénomène existe pour les "faibles"

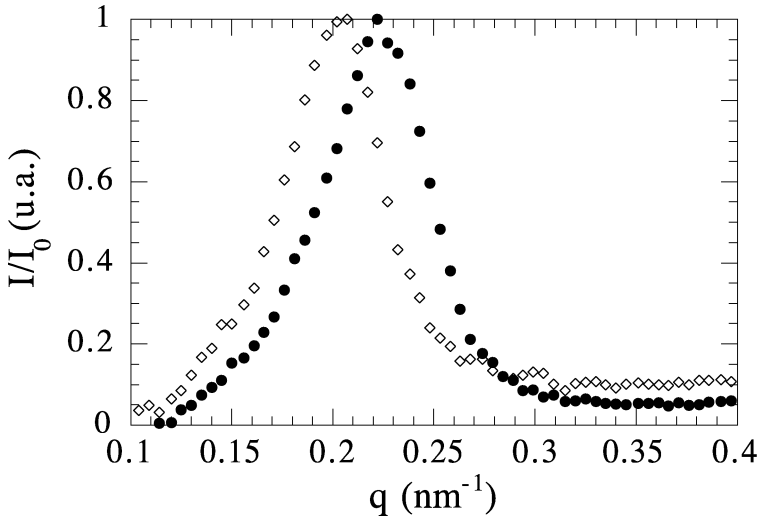


FIG. 3.13: *Spectres de rayons X de deux phases lamellaires, la fraction volumique de membrane vaut 0.2. L'intensité a été normalisée par rapport à l'intensité à la position du pic. On remarque un décalage de la position du pic vers les grands vecteurs d'onde pour la phase chargée à 3.5% de SDS (•), par rapport à celle chargée à 0.4% de SDS (◇).*

dilutions ($\phi_m \geq 0.4$) mais il faut, pour s'en rendre compte, tracer la distance de Bragg d_B en fonction de la concentration de SDS. Les points expérimentaux sont très bien ajustés par une droite (figure 3.14). La pente de d_B en fonction de la concentration de SDS diminue quand la concentration en membranes augmente : elle vaut par exemple 0.4 pour une fraction volumique de membrane égale à 0.2, tandis qu'elle est autour de 0.1 pour $\phi_m = 0.4$.

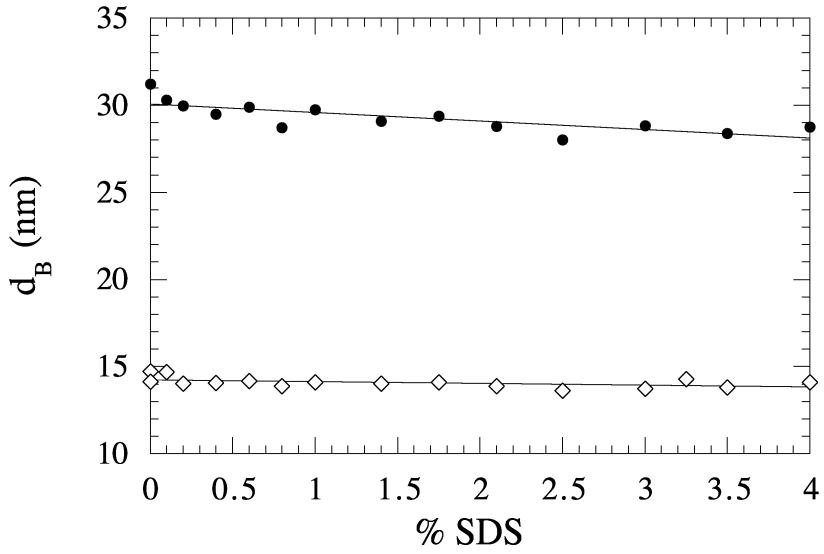


FIG. 3.14: *Variation de la périodicité de la phase lamellaire en fonction du pourcentage de SDS remplaçant le $C_{12}E_4$, pour deux fraction volumiques de membranes : $\phi = 0.4$(◇) et $\phi = 0.2$ (●). Les droites représentent le meilleur ajustement linéaire. La pente de celle du bas vaut 0.1, tandis que celle du haut vaut 0.4.*

Cette diminution de la périodicité avec la charge surfacique peut s'expliquer par une diminution des fluctuations des membranes : tout se passe comme si la présence des charges "repassait" les fluctuations (figure 3.15). Or, on l'a vu, plus les fluctuations sont importantes plus la périodicité effective s'écarte de la loi de dilution, donc, quand les fluctuations diminuent, on tend à observer une diminution de la périodicité. Du fait des répulsions électrostatiques, les têtes polaires chargées, présentes dans la même monocouche, se repoussent les unes les autres. Ceci agit comme une sorte de tension latérale qui entraine une diminution des fluctuations de la membrane, et donc de la périodicité de la phase lamellaire (figure 3.15). Ces résultats sont en bon accord avec ceux obtenus par

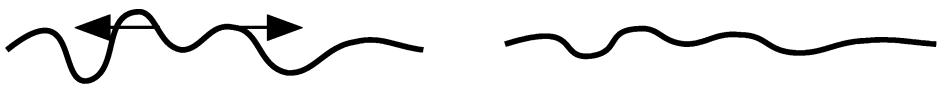


FIG. 3.15: *Représentation schématique du "repassage" que subit la membrane. Les flêches représentent les répulsions électrostatiques entre têtes polaires chargées se trouvant dans la même monocouche. Ces répulsions sont à l'origine de la diminution des fluctuations de la membrane (image de droite), et donc de la diminution de la périodicité de la phase lamellaire.*

Jonströmer, Schomäcker et Strey [93][94], mais aussi Salamat et al. [95] et von Berlepsch et de Vries [96], tant du point de vue de la diminution de la périodicité, que du point de vue de l'ampleur de cette diminution avec la fraction volumique de membrane.

3.6.4 L'épaisseur des membranes reste constante

Nous avons déterminé l'épaisseur des membranes par la loi de dilution classique (formule 1.30) : pour des pourcentages de SDS dans la membrane allant de 0 à 6%, on trouve pour l'épaisseur de la membrane $d_m = 5.6 \pm 0.2$ nm. L'épaisseur n'est pas affectée par l'introduction de répulsions électrostatiques, elle reste constante, quelle que soit la densité surfacique de charges (figure 3.16).

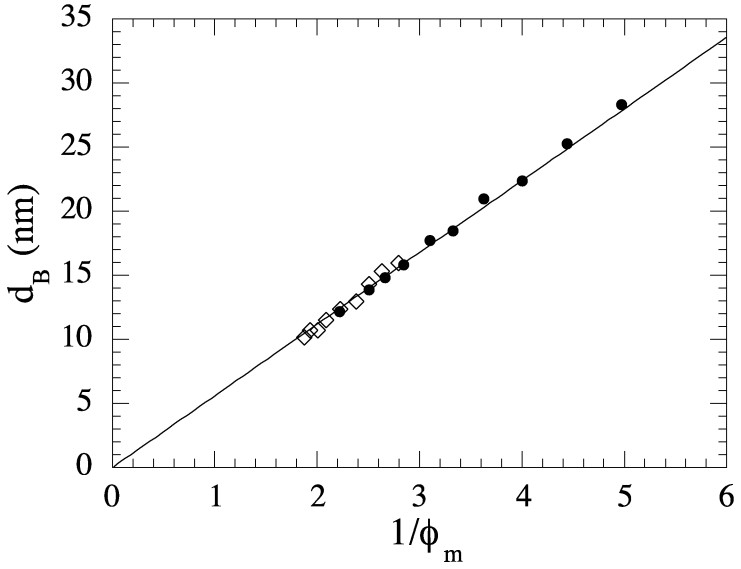


FIG. 3.16: *Loi de dilution de la phase lamellaire. Le rapport volumique* $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d} = 0.554$ *a été maintenu constant. Cette loi a été tracée pour deux pourcentages de SDS dans la membrane : 0% (◇) et 3.5% (●). La droite représente le meilleur ajustement liéaire aux points expérimentaux. Indépendamment du pourcentage de SDS, on trouve à partir de la pente, une épaisseur de membrane égale à* $d_m = 5.6 \pm 0.2$ *nm.*

3.6.5 Passage d'une stabilisation par répulsions stériques à des interactions électrostatiques dominantes

Tous les spectres de diffusion des rayons X aux petits angles ont été ajustés, sauf pour les très petits vecteurs d'onde, par le modèle de Nallet [64]. Nous avons obtenu ainsi le

paramètre de Caillé η.

Pour les phases chargées, quel que soit le pourcentage de SDS dans la membrane, il est impossible d'ajuster La variation de η en fonction de d_B par la formule proposée par Roux et Safinya [41] :

$$\eta = \sqrt{\frac{k_B T L_B}{2\kappa g}} \frac{\left(1 - \frac{d_m}{d_B}\right)^{3/2}}{d_B^{1/2}} \tag{3.16}$$

où $g = (1 - 3\epsilon_{PB} + 6\epsilon_{PB}^2)$ avec $\epsilon_{PB} = \frac{S}{d_w L_B}$, où S est la surface par charge unité, d_w l'épaisseur d'eau et L_B la longueur de Bjerrum. En effet, la densité surfacique de charge est trop faible, du coup ϵ_{PB} est de l'ordre de 1 et il faudrait poursuivre le développement à l'infini. Dès que le rapport molaire de SDS sur le tensioactif total dépasse 0.1% , lorsqu'on trace $\eta^{0.5}$ en fonction de d_B^{-1} par la formule 3.15, on observe toujours une variation linéaire (figure 3.17), comme pour n'importe quelle phase lamellaire stabilisée par les répulsions stériques [42]. Cependant l'épaisseur de membrane obtenue via l'ajustement est aberrante : on trouve autour de 3 nm alors que la loi de dilution donne 5.6 nm. En conclusion, dès

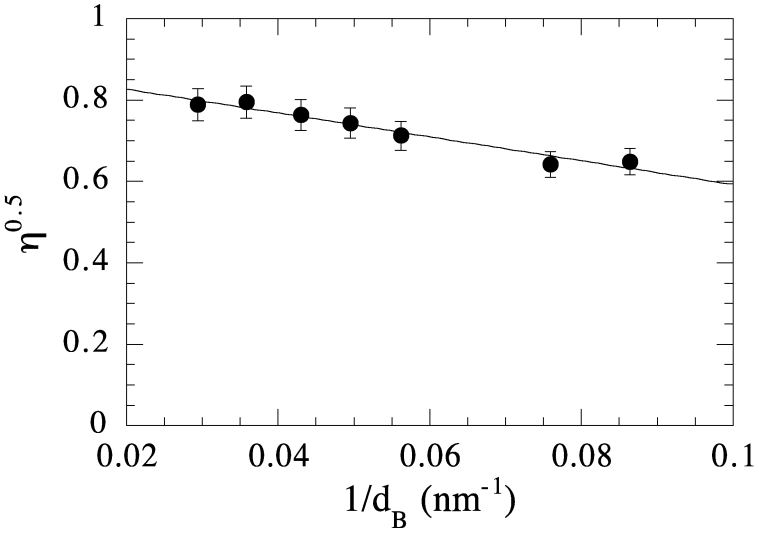


FIG. 3.17: *Variation de $\eta^{0.5}$ en fonction de d_B^{-1}, tracée pour une phase lamellaire chargée à 0.2% de SDS. La droite représente le meilleur ajustement par l'expression $\sqrt{\eta} = \sqrt{\alpha}\left(1 - \frac{d_m}{d_B}\right)$, et donne $\alpha = 0.8 \pm 0.05$ et $d_m = 3.3 \pm 0.2$ nm, en désaccord avec la valeur de l'épaisseur de membrane déterminée par la loi de dilution (5.6 nm).*

que l'on charge la surface des membranes, même très peu, les répulsions électrostatiques s'ajoutent aux répulsions stériques et ne peuvent plus être négligées.

De Vries a proposé une estimation de la densité surfacique critique, à partir de laquelle les interactions électrostatiques l'emportent sur les répulsions stériques [2] (formule 3.9),

qui devient, si on la transforme en pourcentage molaire de SDS dans la membrane :

$$\%SDS_c = \frac{0.1\sigma_{TP}}{0.1\sigma_{TP} + \kappa_0 L_B^{1/2} d_w^{3/2}} \tag{3.17}$$

où σ_{TP} est l'aire par tête polaire, L_B la longueur de Bjerrum, d_w l'épaisseur d'eau et κ_0 la rigidité de la membrane non chargée exprimée en unités k_BT. Pour une épaisseur d'eau de 5 nm, sachant que la rigidité κ_0 vaut 1 k_BT (voir plus loin), on trouve que le pourcentage critique de SDS vaut $\%SDS_c = 0.57\%$. Si l'épaisseur d'eau vaut 10 nm ou 20 nm on trouve respectivement $\%SDS_c = 0.2\%$ et $\%SDS_c = 0.07\%$. Si l'on croit ces valeurs, pour les faibles pourcentages de SDS (0.1%, 0.2%), on devrait observer deux zones dans les variations du paramètre d'ordre avec l'inverse de la périodicité : par exemple, en ajustant par l'expression 3.15 les valeurs de η correspondant à $d_w > 10$ nm pour la phase chargée à 0.2% de SDS, on devrait obtenir la bonne valeur de l'épaisseur de la membrane. Nous obtenons expérimentalement une épaisseur de membrane d'environ 2.5 nm. Ceci provient peut être de l'estimation du facteur 0.1 présent dans l'équation 3.17 qui surestime le pourcentage critique de charges, ou alors du faible nombre de points expérimentaux dont nous disposons.

3.6.6 Quantification du durcissment de l'ordre smectique

L'affinement du quasi-pic de Bragg avec l'augmentation de la concentration de SDS, observé expérimentalement, indique une diminution du paramètre de Caillé η. Les valeurs de η données par l'ajustement des spectres de rayons X par le modèle analytique de Nallet et al. [64], vont nous permettre de quantifier l'ordre de la phase phase lamellaire. Pour une fraction volumique de membrane ϕ_m fixée, nous avons tracé la variation du paramètre de Caillé η, en fonction du pourcentage de SDS dans la membrane (figure 3.18). Quelle que soit la fraction volumique de membrane choisie, on observe toujours une diminution du paramètre de Caillé, ce qui signifie une augmentation de l'ordre smectique au fur et à mesure que l'on charge la surface des membranes. Les points expérimentaux sont très bien ajustés par une exponentielle décroissante, sans que nous ayons un modèle pour l'expliquer. Ce type de variation n'est pas sans rappeler la variation du même paramètre avec la concentration de polysavons/polymères diblocs observée par Yang et al. [14], Warriner et al. [12] et Castro-Roman et al. [13]. L'effet de la pression latérale due aux répulsions stériques entre polymères dans la même membrane est semblable aux répulsions électrostatiques entre charge dans la même membrane : les fluctuations de la phase lamellaire sont "repassées" par cette tension latérale et l'ordre à grande distance s'améliore.

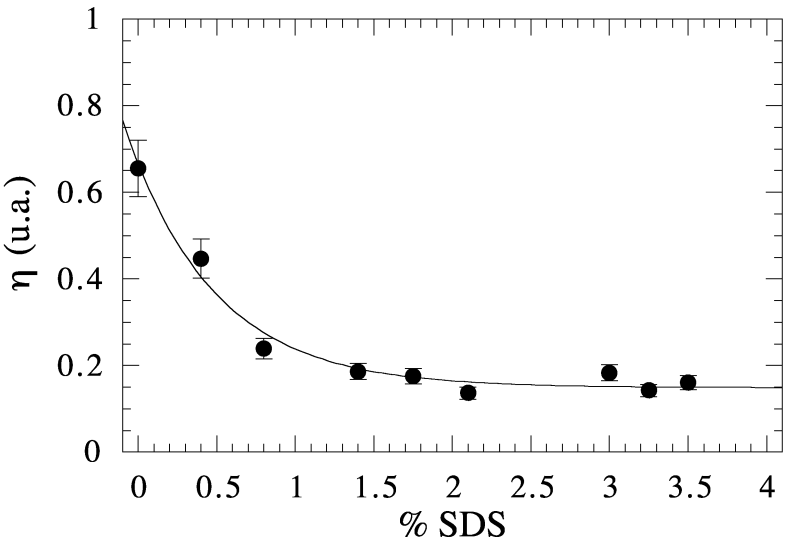


FIG. 3.18: *Variation typique du paramètre de Caillé η avec la concentration de SDS dans la membrane, pour une fraction volumique de membrane fixée $\phi_m = 0.4$. La ligne représente l'ajustement des points expérimentaux par une exponentielle décroissante. L'ajustement par cette fonction est purement empirique, et non expliqué par des arguments théoriques.*

3.6.7 Augmentation de la rigidité de la membrane

Afin d'estimer systématiquement la valeur de la rigidité de la membrane, nous avons tracé l'écart à la loi de dilution pour les différents pourcentages de SDS dans la membrane (i.e. $d_B\phi_m$ en fonction de $ln(d_B - d_m)$, formule 1.35). Jusqu'à 4% de SDS, il existe encore bel et bien un écart à la loi de dilution classique, au delà de cette valeur, les pentes sont de plus en plus faibles, et les ajustements donnent des valeurs de la pente avec des barres d'erreurs très importantes. Deux exemples d'écart à la loi de dilution ont été représentés sur la figure 3.19, les points expérimentaux ont été ajustés par une droite. La pente de l'ajustement diminue fortement avec la concentration de SDS dans la membrane, ce qui correspond à une augmentation de la rigidité des membranes. Cette méthode permet une détermination de la rigidité κ à 10-15% près étant donnée la faible pente des droites, et la difficulté de l'ajustement.

On peut alors tracer la variation de la rigidité des membranes avec la concentration de SDS (figure 3.20) : on observe une augmentation de la rigidité qui passe d'environ 1 k_BT à 4.5 k_BT pour des concentrations de SDS allant de 0% à 4% dans la membrane. Cette augmentation de la rigidité a été observée expérimentalement par Jonströmer, Schomäcker et Strey [93][94] dans des phases diluées. Porcar et al. [9][111] ont aussi observé un tel comportement dans les phases concentrées, mais ayant travaillé à trop forte concentration

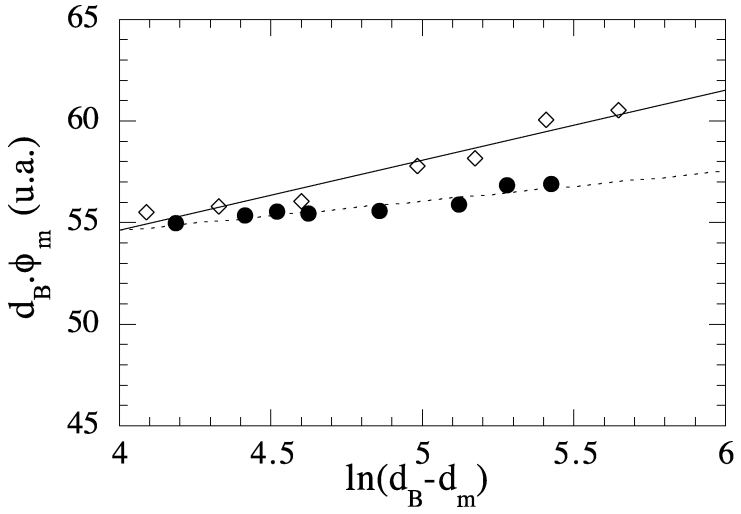


FIG. 3.19: *Ecart à la loi de dilution. Le rapport* $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d}$ *est fixé à 0.554. Les symboles (*$\diamond$*) correspondent à 0.2% de SDS dans la membrane, tandis que les (*$\bullet$*) correspondent à 3.5%. les droites sont les meilleurs ajustements linéaires selon la formule 1.35 (trait plein=0.2% de SDS, pointillés=3.5% de SDS). Plus le pourcentage de SDS dans la membrane est grand, plus la valeur de la pente donnée par l'ajustement est faible. La rigidité de la membrane augmente donc avec la densité surfacique de charge de la membrane.*

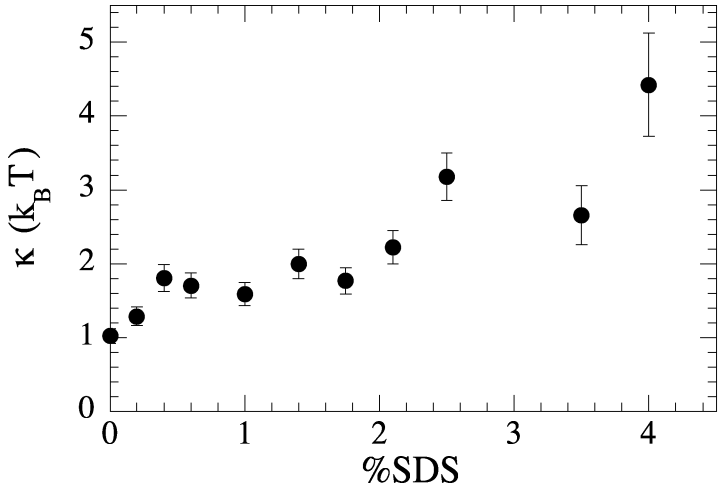


FIG. 3.20: *Variation de la rigidité de la membrane* κ *avec la concentration de SDS. La rigidité augmente au fur et à mesure que la membrane devient chargée. La rigidité initiale est multipliée par environ 4-5 pour un pourcentage de SDS de 4% dans la membrane.*

de tensioactif ionique, ils n'ont pas pu quantifier l'augmentation de rigidité.

3.6.8 Comparaison de l'augmentation de la rigidité κ avec le prédictions théoriques

Notre système se trouvant à cheval entre le régime du gaz parfait et celui de Gouy-Chapman dans le diagramme déterminé par Harden et al. [99] (figure 3.1), nous n'avons pas pu comparer nos résultats expérimentaux à leur modèle. En revanche, le modèle de Fogden et al. [1], valable pour toutes les concentrations de tensioactif et toutes les densités surfaciques de charges, a pu être utilisé. Les valeurs de la rigidité de la membrane que nous avons déterminées sont indépendantes de la dilution de la phase lamellaire. En revanche, les calculs de Fogden et al. dépendent de la dilution via les grandeurs D et Λ. Nous avons donc calculé les contributions électrostatiques provenant des fluctuations de la membrane selon les modes pair et impair, pour deux fractions volumiques de membranes : 0.2 et 0.45. Afin de tenir compte de la diminution des fluctuations, nous avons utilisé l'équation donnée par l'ajustement linéaire de la périodicité en fonction du pourcentage de SDS (figure 3.14), pour calculer la valeur de l'épaisseur d'eau. Les résultats sont présentés sur la figure 3.21. Pour les deux dilutions, on remarque que la contribution provenant du mode

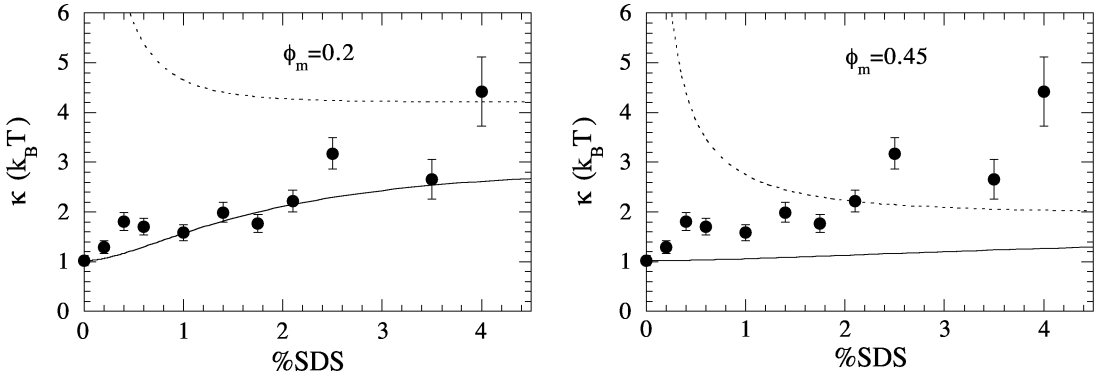


FIG. 3.21: *Variations de la rigidité de membrane avec le pourcentage de SDS, calculées d'après le modèle de Fogden et al. [1], pour deux fractions volumiques de membrane : $\phi_m = 0.2$ (phase L_α "diluée", à gauche) et $\phi_m = 0.45$ (phase L_α "concentrée", à droite). Le trait plein correspond à la contribution du mode de fluctuations pair (expression 3.6), les pointillés à celle du mode de fluctuations impair (expression 3.7).*

impair de fluctuations n'ajuste absolument pas les variations expérimentales : notamment, elle diverge lorsque la charge surfacique tend vers zéro. Ces observations vont dans le sens des prédictions de Harden et al. [99]. En effet ces auteurs prévoient que le mode

impair de fluctuations (ou mode péristaltique) est défavorable du point de vue énergétique car il implique la compression du nuage de contre-ions. La contribution électrostatique correspondant au mode pair de fluctuations, calculée pour une phase lamellaire "diluée" ($\phi_m = 0.2$), ajuste bien nos résultats expérimentaux (figure 3.21, gauche). Ce n'est absolument pas le cas pour la phase lamellaire concentrée ($\phi_m = 0.45$) (figure 3.21, droite). Le mauvais accord pourrait avoir pour origine une des hypothèses du modèle. En effet, le modèle néglige tout couplage électrostatique entre monocouche n'appartenant pas à la même cellule unité. Cette hypothèse semble être vérifiée expérimentalement dès que les membranes sont suffisamment éloignées les unes des autres (cas "dilué"). En revanche, dans la phase "concentrée" en membranes, il semble fort possible que les membranes soient trop proches pour que ce couplage puisse être négligé.

A ce stade, nous pouvons conclure partiellement que l'augmentation de la rigidité de la membrane, observée expérimentalement, est bien ajustée par la contribution électrostatique provenant du mode pair de fluctuations prévue théoriquement par Fogden et al. [1], dans le cas de membranes "diluées" ($\phi_m \leq 0.25$). Dans le cas de membranes "concentrées", le modèle sous-estime l'augmentation. Par ailleurs, la contribution électrostatique provenant du mode impair de fluctuations prévue théoriquement par Fogden et al. [1] n'ajuste absolument pas nos résultats expérimentaux.

3.6.9 Echec des mesures de rigidité par RMN

Pour confirmer nos résultats sur l'augmentation de la rigidité, nous avons envisagé de réaliser des expériences de RMN du deutérium, similaires à celles d'Auguste et al. [22] et Bouglet et al. [61][118] (voir chapitre 2), avec l'aide d'Erick Dufourc (IECB, Bordeaux). Pour cela, nous avons remplacé la moitié en masse du décane par du décane deutérié dans deux échantillons de même fraction volumique de membrane, l'un non chargé, l'autre chargé avec 4% de SDS. Si l'éclatement quadrupolaire caractéristique est bien observé pour l'échantillon non chargé, il est en revanche très difficile de bien l'observer pour 4% de SDS (figure 3.22), car la membrane est trop rigide. Pour cette raison, nous avons abandonné ce type d'expériences.

3.6.10 Vérification de l'augmentation de la rigidité avec un tensioactif cationique : le DTAB

Afin de nous assurer que les modifications que nous avons observées ne provenaient pas d'un effet spécifique du tensioactif anionique SDS, nous avons réalisé une dilution

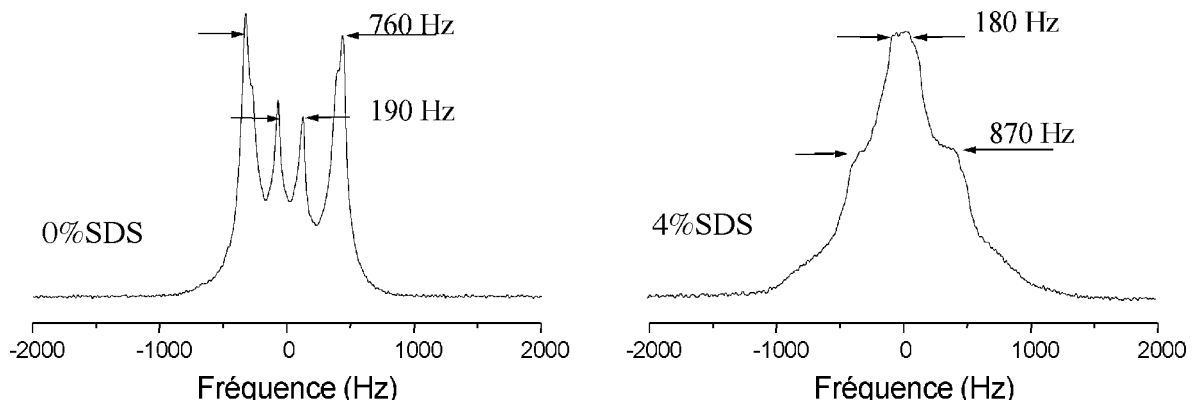


FIG. 3.22: *Spectres de RMN du deutérium d'une phase lamellaire non chargée (à gauche), et d'une chargée à 4% de SDS (à droite). La fraction volumique de membrane est la même : $\phi_m = 0.5$. L'éclatement quadrupolaire caractéristique est extrêmement bien défini pour la phase non chargée (gauche), tandis qu'il est difficile de distinguer les positions des pics pour l'échantillon chargé (droite).*

de la phase lamellaire ne remplaçant 0.1%, 1% et 4% du $C_{12}E_4$ par du DTAB (bromure dodécyl triméthyl ammonium, cationique, formule en annexe B). On observe exactement les mêmes choses :

- Il est possible de diluer plus la phase chargée avec du DTAB que la phase lamellaire non chargée, et ce dès que 0.1% de DTAB remplace le $C_{12}E_4$. La phase lamellaire perd sa turbidité lorsqu'elle est chargée.
- L'ordre smectique augmente avec la densité surfacique de charges (affinement du quasi-pic de Bragg, apparition des quasi-pics d'ordre supérieur, diminution du paramètre de Caillé η).
- A fraction volumique de membrane fixée, la périodicité de la phase lamellaire diminue à cause de la diminution des fluctuations de la membrane due au passage d'une phase laemllaire stabilisée par les répuslions stériques à une phase stabilisée par les interactions électrostatiques.
- L'épaisseur des membranes reste constante avec la densité surfacique de charge.
- Enfin, la rigidité de la membrane, déterminée par l'ajustement de l'écart à la loi de dilution, augmente avec la concentration de DTAB dans la membrane. Sur la figure 3.23, nous avons tracé les valeurs de la rigidité obtenues avec le SDS (•) et le DTAB (△). Pour 0.1 et 1%, la rigidité est quasiment identique. Pour 4%, il semble y avoir une différence, mais elle pourrait provenir de la difficulté d'ajuster la pente

de l'écart à la loi de dilution pour les fortes densités surfaciques de charge.

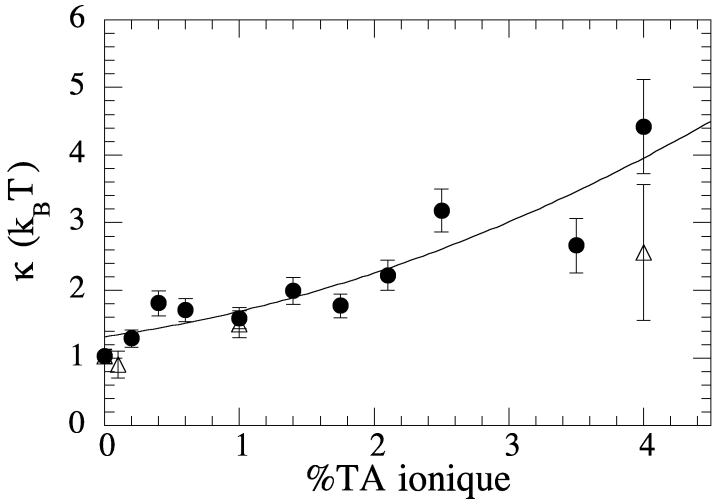


FIG. 3.23: *Variations de la rigidité de membrane avec le pourcentage de tensioactif ionique dans la membrane. Les valeurs obtenues pour le SDS (•) et pour le DTAB (△) sont en bon accord pour 0.1 et 1% de charge de surface. A 4%, le désaccord observé provient sans doute d'une mauvaise estimation de la pente de l'écart à la loi de dilution. Le trait représente le meilleur ajustement des points expérimentaux correspondant au SDS, par un polynôme du second degré.*

En conclusion, les modifications de la phase lamellaire, observées avec le remplacement du $C_{12}E_4$ par le SDS, ne sont pas spécifiques du SDS, ni du fait que ce tensioactif soit anionique, mais proviennent de son caractère ionique. Les mêmes modifications sont observées avec le DTAB cationique, qualitativement et quantitativement.

3.6.11 Variation en "cloche" du module de compressibilité smectique

Au fur et à mesure que la membrane devient chargée, l'ordre smectique augmente (η diminue), ainsi que la rigidité κ de la membrane. Or, on sait depuis les travaux de Caillé [65] que le paramètre de Caillé η est relié aux constantes élastiques de la phase lamellaire par :

$$\eta = q_0^2 \frac{k_B T}{8\pi\sqrt{K\bar{B}}} \tag{3.18}$$

où $K = \frac{\kappa}{d_B}$, et ce quelles que soient les interactions stabilisant la phase lamellaire. Ceci nous permet de déterminer le module de compressibilité smectique $\bar{B}$, à partir des déterminations indépendantes de η et κ.

Pour chaque fraction volumique de membrane, nous connaissons :

- la dépendance de la périodicité d_B en fonction de la concentration de SDS (figure 3.14)
- la dépendance de η en fonction de la concentration de SDS (figure 3.18)

Par ailleurs nous avons ajusté empiriquement la variation de la rigidité κ en fonction de la concentration de SDS par un polynôme du second degré, afin que nos résultats ne dépendent pas du modèle choisi (figure 3.23). En combinant toutes ces variations, nous avons donc accès à la variation du module de compressibilité smectique $\bar{B}$ avec la concentration de SDS, pour les différentes fractions volumiques de membrane.

Une courbe typique de celle que nous avons obtenues est représentée sur la figure 3.24. Le module de compressibilité smectique $\bar{B}$ augmente avec le pourcentage de charge dans la membrane, jusqu'à ce qu'il atteigne un maximum assez peu prononcé, puis il diminue en douceur. L'augmentation de $\bar{B}$ se comprend assez bien : la présence de charges

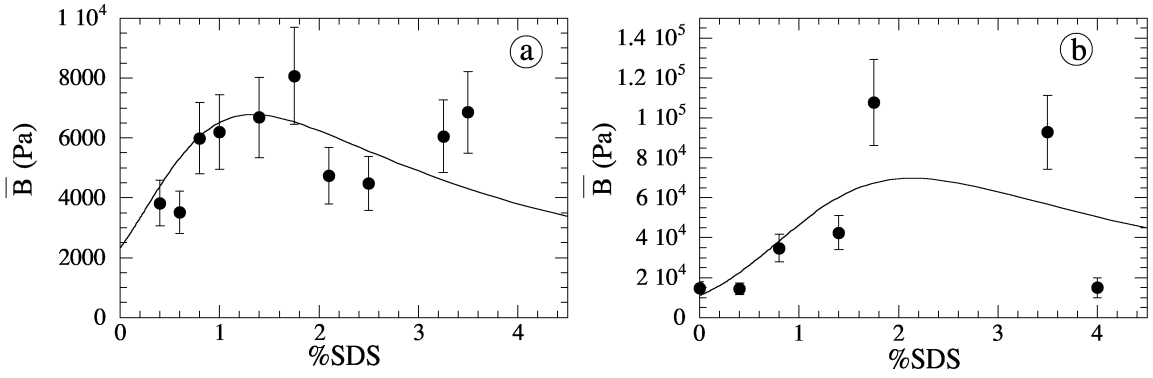


FIG. 3.24: *Variations typiques du module de compressibilité smectique avec la concentration de SDS : a) pour $\phi_m = 0.225$ (à gauche), b) $\phi_m = 0.45$ (à droite) . Les points correspondent au calcul direct à partir des valeurs expérimentales de η, κ et d_B, tandis que la ligne continue vient des valeurs données par les ajustements de $\eta(\%SDS)$ par une exponentielle décroissante, $d_B(\%SDS)$ par une droite et $\kappa(\%SDS)$ par un polynôme du second degré. $\bar{B}$ augmente fortement, atteint un maximum puis diminue légèrement. L'augmentation s'explique par les répulsions électrostatiques entre membranes en regard, jusqu'à ce que la longueur de Gouy-Chapman soit environ égale à la demie épaisseur d'eau (position du maximum). La diminution s'explique alors par la diminution progressive d'une épaisseur effective pour la membrane, correspondant à son épaisseur plus l'épaisseur de la couche de contre-ions condensés près de la surface chargée.*

à la surface des membranes induit non seulement les répulsions entre charges dans la

même membrane qui repassent les fluctuations, mais aussi des répulsions entre membranes en regard qui se superposent aux répulsions stériques. En d'autres termes, il est plus difficile de rapprocher des surfaces chargées du même signe que des membranes repoussées uniquement par répulsions stériques. Cette observation corrobore la diminution du signal aux petits vecteurs d'onde observée sur les spectres de rayons X : en effet ce signal représente les fluctuations de position, et est inversement proportionnel à $\bar{B}$ [26][66], les charges diminuent les fluctuations, donc $\bar{B}$ augmente.

En ce qui concerne la position du maximum, nous avons remarqué que la concentration de SDS pour laquelle on l'observe correspond à une longueur de Gouy-Chapman environ égale à la moitié de l'épaisseur d'eau dans l'échantillon. Lorsqu'on trace cette longueur de Gouy-Chapman en fonction de l'épaisseur d'eau (figure 3.25), les points expérimentaux sont assez bien ajustés par une droite de pente 0.4± 0.15. La décroissance de $\bar{B}$ peut alors

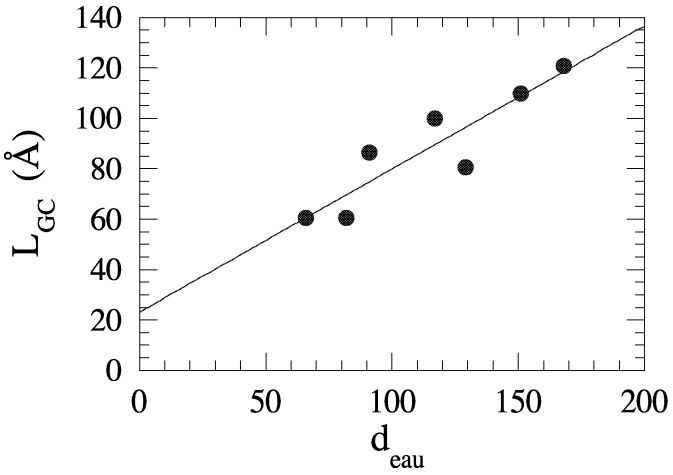


FIG. 3.25: *Variation de la longueur de Gouy-Chapman L_{GC} correspondant au pourcentage de SDS pour lequel le module de compressibilité smectique est maximum, en fonction de l'épaisseur d'eau. La droite représente le meilleur ajustement linéaire aux points expérimentaux. Cet ajustement donne 0.4± 0.15 pour la pente. $\bar{B}$ est donc maximum lorsque l'extension de chaque couche de contre-ions (i.e. L_{GC}) correspond environ à la moité de l'épaisseur d'eau.*

se comprendre assez facilement. Tant que la longueur de Gouy-Chapman L_{GC} est grande devant l'épaisseur d'eau, la membrane a une épaisseur d_m, mais lorsque L_{GC} diminue tout se passe comme si la membrane avait une épaisseur effective égale à d_m+2L_{GC} et comme si l'épaisseur d'eau valait d_w-$2L_{GC}$. Or, quelles que soient les interactions qui stabilisent la phase lamellaire, le module de compressibilité smectique est inversement proportionnel à l'épaisseur d'eau à une certaine puissance : $\bar{B} \propto \frac{1}{(d_w-2L_{GC})^x}$. Or, lorsque le pourcentage

de SDS dans la membrane augmente, L_{GC} diminue donc d_w-2L_{GC} augmente et on observe une diminution de $\bar{B}$.

3.6.12 Effet des interactions électrostatiques sur $\bar{B}(d_w)$

Quelles que soient les interactions qui stabilisent la phase lamellaire, le module de compressibilité smectique est inversement proportionnel à une puissance de l'épaisseur d'eau. Pour les différents pourcentages de SDS dans la membrane, nous avons ajusté $\bar{B}(d_w)$ par une loi de puissance : $\bar{B} \propto (d_w)^{-n}$. Un ajustement typique est présenté sur la figure 3.26 a). La valeur de la puissance n obtenue par l'ajustement est reportée en fonction du pourcentage de SDS sur la figure 3.26 b). Pour la phase non chargée, on

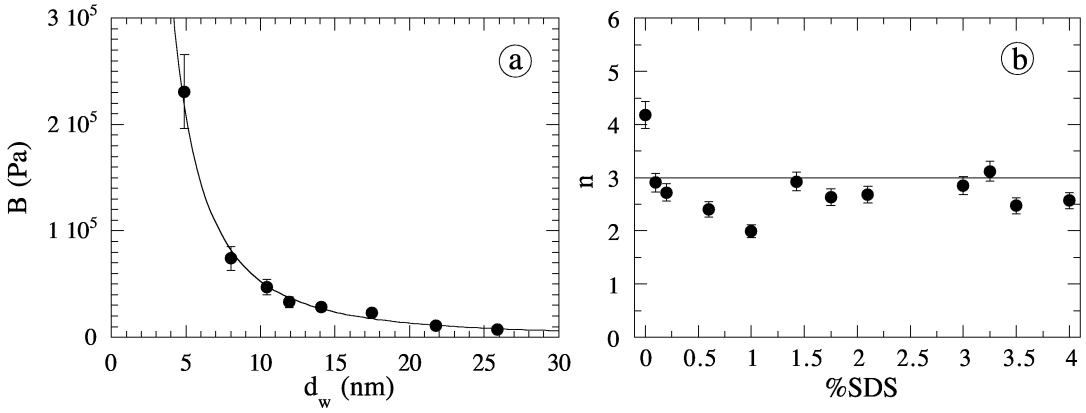


FIG. 3.26: *a) Variation typique du module de compressibilité smectique $\bar{B}$ avec l'épaisseur d'eau, tracée ici pour 1% de SDS dans la membrane.b) Puissance de la décroissance de $\bar{B}$ en fonction de d_w, obtenue à partir de l'ajustement des points expérimentaux, tracée en fonction du pourcentage de SDS. La ligne est un guide pour l'oeil elle correspond à n=3, cas où la phase lamellaire est stabilisée principalement par les répulsions électrostatiques.*

obtient n=4.1± 0.2, en très bon accord avec les prédictions théoriques de Helfrich [42]. Ensuite n diminue et finit par fluctuer autour de 3, valeur prévue théoriquement pour les phases lamellaires stabilisées par les répulsions électrostatiques. A peine charge-t-on la membrane que les répulsions électrostatiques jouent un rôle. Cette observation confirme le fait que nous n'observons pas de densité surfacique critique. Celle ci doit être trop faible pour que nous puissions l'observer expérimentalement.

3.6.13 Comparaison avec les prédictions théoriques pour $\bar{B}$

Modèle de de Vries [2]

Nous avons calculé la contribution électrostatique proposée par de Vries [2] (formule 3.8), pour différentes fractions volumiques de membrane, et comparé avec nos données expérimentales (figure 3.27). Dans tous les cas, les calculs théoriques prévoient une aug-

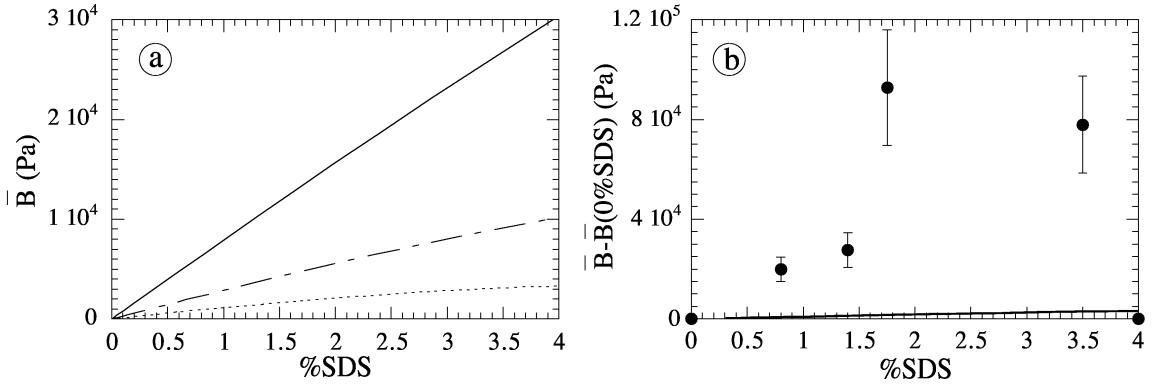


FIG. 3.27: *a) Variation de la contribution électrostatique du module de compressibilité smectique $\bar{B}$ avec le pourcentage de SDS, calculée d'après le modèle de de Vries [2] (formule 3.8), pour différentes distances entre membranes en regard : 5 nm (trait plein), 10 nm (trait discontinu) et 20 nm (pointillés). Le modèle prévoit donc une augmentation de $\bar{B}$, indépendamment de la distance entre membranes, d'autant plus forte que les membranes sont proches. Par contre, ni le maximum, ni la diminution de $\bar{B}$ ne sont prévus par ce modèle. b) Comparaison entre les prédictions de de Vries (trait plein) et nos résultats expérimentaux (•) pour $\phi_m = 0.45$. Le modèle ajuste mal nos données, aussi bien qualitativement que quantitativement.*

mentation du module de compressibilité smectique, augmentation d'autant plus importante que les membranes en regard sont proches (figure 3.27 a). En revanche, le maximum et la diminution, observés expérimentalement, ne sont pas prévus par le modèle. De plus, quantitativement, le modèle de de Vries n'ajuste pas bien nos résultats expérimentaux (figure 3.27 b).

Corrélations de fluctuations

Voyons maintenant si nous pouvons observer expérimentalement l'effet des corrélations de fluctuations prévu par Lukatsky, Pincus et Safran [106][107].

- Dans le cas où $d_w \ll L_{GC}$ (faibles densités de charge), nous avons calculé la longueur de Gouy-Chapman pour 0.1% de SDS : L_{GC}=121 nm. L'épaisseur d'eau est comprise entre 5 et 20 nm. En utilisant la formule 3.12, on trouve alors que la contribution des corrélations de fluctuations est comprise entre -5 et -32 Pa. Etant données les valeurs expérimentales du module de compressibilité smectique pour ce pourcentage de charge ($10^3\ Pa < \bar{B} < 10^4$), l'effet des corrélations de fluctuations est négligeable devant les répulsions, et donc non observable expérimentalement.
- Dans le cas où $d_w \gg L_{GC}$ (fortes densités de charge), nous avons calculé la longueur de Gouy-Chapman pour 4% de SDS : L_{GC}=3 nm. Pour une épaisseur d'eau de 20 nm ($\phi_m \approx 0.225$), en utilisant la formule 3.14, on trouve que la contribution des corrélations de fluctuations vaut environ 5000 Pa. Cette valeur n'est pas du tout négligeable devant les valeurs expérimentales (figure 3.24). La diminution de $\bar{B}$ que nous observons expérimentalement pourrait donc aussi s'expliquer par l'effet des corrélations de fluctuations prévues par Lukatsky, Pincus et Safran [106][107]. Le temps nous a manqué pour calculer numériquement la valeur théorique du module de compressibilité smectique en utilisant la méthode proposée par Porcar et al. [9][111], et la comparer avec la contribution des corrélations de fluctuations.

S'il nous est difficilement possible d'observer expérimentalement l'effet des corrélations de fluctuations dans le cas des faibles densités surfaciques de charge, il semble que la diminution du module de compressibilité smectique observée pour les "fortes" densités surfaciques de charge pourrait être expliquée par les corrélations de fluctuations.

3.6.14 Conclusion

Le remplacement de faibles quantités de tensioactif non ionique par un tensioactif ionique dans une phase lamellaire directe entraîne de profondes modifications de ses paramètres structuraux et élastiques. Au fur et à mesure que l'on charge la membrane, l'ordre smectique augmente, ce qui se traduit par l'affinement du quasi-pic de Bragg de premier ordre et l'apparition des quasi-pics d'ordre supérieur. Cette augmentation de l'ordre est quantifiée par la diminution du paramètre de Caillé η. L'introduction de répulsions électrostatiques entre charges dans la même monocouche induit une diminution des fluctuations de la membrane : tout se passe comme si les fluctuations étaient "repassées" par les charges. Cette diminution des fluctuations entraîne la diminution de la périodicité de la phase lamellaire. En revanche, l'épaisseur de la membrane reste constante.

Nous avons systématiquement déduit de l'écart à la loi de dilution la valeur de la rigidité de la membrane. Celle ci augmente avec la densité de charge : κ est multipliée par 4-5 pour

un pourcentage de charge allant de 0 à 4%. L'augmentation de la rigidité est bien ajustée par la contribution du mode pair de fluctuations proposée par Fogden et al. [1], dans le cas d'une phase lamellaire "diluée". Dans le cas d'une phase lamellaire "concentrée", le mauvais accord entre les prédictions de Fogden et al. et nos données expérimentales pourrait provenir d'une des hypothèses du modèle qui néglige tout couplage électrostatique entre monocouches n'appartenant pas à la même cellule unité.

Quant au module de compressibilité smectique, au fur et à mesure que l'on charge la membrane, il augmente, passe par un maximum puis diminue. L'augmentation s'explique par l'introduction des répulsions électrostatiques entre membranes. Nous avons remarqué que le pourcentage de SDS pour lequel $\bar{B}$ est maximum correspond à une longueur de Gouy-Chapman environ égale à la moitié de l'épaisseur d'eau dans l'échantillon. La diminution de $\bar{B}$ peut s'expliquer soit en considérant une épaisseur effective pour la membrane tenant compte de l'épaisseur de la couche de contre-ions, soit par l'effet des corrélations de fluctuations comme prédit par Lukatsky, Pincus et Safran [106][107].

3.7 Viscoélasticité de la phase lamellaire directe

Parmi les observations réalisées sur nos échantillons, il en est une que nous avons sciemment ommise jusqu'à présent : leur viscosité varie avec la quantité d'eau qu'ils contiennent, mais aussi avec la fraction molaire de tensioactif chargé. En effet, dans la phase lamellaire directe, les échantillons non chargés sont assez liquides et nous ont semblé de plus en plus liquides au fur et à mesure de leur dilution par l'eau. Cet effet de la dilution semble identique pour les faibles pourcentages de SDS dans la membrane, typiquement en dessous de 1%. En revanche, au dessus de 1% de SDS dans les membranes, l'effet de la dilution par de l'eau paraît être inversé : plus la fraction volumique d'eau est importante, plus les échantillons paraissent visqueux, certains ressemblent même à des gels. Des observations similaires ont été faites par Keller et al. [119] et Warriner et al. [12], sur des phases lamellaires contenant des polymères greffés. De plus, nous avons remarqué qu'à fraction volumique de membrane égale, plus les membranes sont chargées, plus les échantillons semblent visqueux.

3.7.1 Echec de la microscopie électronique

Afin d'élucider l'origine de ce comportement viscoélastique, nous avons envisagé de réaliser des observations de nos échantillons en microscopie électronique. Nous avons pensé en premier lieu à des expériences de cryofracture. Le principe de cette méthode est présenté

de manière exhaustive ailleurs [120][121]. Ce type d'expérience nécessite le remplacement d'environ 30% de l'eau par du glycérol, pour éviter la formation de cristaux de glace lors de la congélation. Malheureusement, le remplacement de l'eau par le mélange eau-glycérol a entrainé un changement total des propriétés viscoélastiques que nous avions observées, et même des transitions de phases. Tadeusz Gulik (CGM, Gif sur Yvette) a bien voulu tenter de réaliser les expériences sans glycérol, mais la mauvaise congélation de nos échantillons ne nous a pas permis d'observer quoi que ce soit.

Face à cet échec, nous avons songé à la microscopie électronique en film mince (ou cryo-TEM). Cette technique, présentée exhaustivement ailleurs [122], consiste à former un film mince d'échantillon sur une grille de microscopie électronique puis à le congeler afin de pouvoir l'observer. La faible épaisseur des échantillons permet d'éviter la formation de cristaux de glace lors de la congélation. Nous avons réalisé quelques essais avec Gervaise Mosser (Institut Curie et LPS de l'ENS). La forte concentration en tensioactif de nos échantillons les rend malheureusement opaques, et nous n'avons rien pu observer. Les expériences de microscopie électronique ont donc été abandonnées.

3.7.2 Origine de la viscoélasticité de la phase lamellaire

Les changements de comportements viscoélastiques que nous avons observés peuvent s'expliquer soit par l'effet des charges de membrane, soit par les défauts d'alignement de la phase lamellaire. Dans une phase lamellaire contenant des polymères greffés, Keller et al. [119] et Warriner et al. [11][12] ont montré que la viscoélasticité provenait des défauts caractéristiques d'alignement de la phase, piégés par des enchevêtrements entre défauts.

Nous avons fait l'hypothèse que les défauts d'alignement piégés par les charges sont à l'origine du comportement viscoélastique que nous observons. En effet, le SDS a tendance à former des micelles en solution, ce qui signifie qu'il a une faible courbure spontanée. Il aura tendance à créer des zones courbées, donc des défauts. Si l'on admet ce raisonnement, on devrait pouvoir observer une ségrégation du SDS dans les zones de défauts.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons envisagé de remplacer le SDS par une tensioactif ionique sur lequel un groupement fluorescent a été greffé. Nous avons retenu le 5-N(dodécanoylamino)fluorescéine (noté C_{12fluo}, M=530). Pour des pH autour de 8.5, le C_{12fluo} absorbe la lumière autour de 495 nm, et fluoresce autour de 518 nm. Ce tensioactif est chargé lorsqu'il fluoresce. Nous avons observé des phases lamellaires contenant 0.5 et 2% de ce tensioactif au microscope de fluorescence, dans un capillaire fin (0.2 mm d'épaisseur). La fluorescence émise est si intense que tout l'échantillon paraît fluorescent et qu'il est impossible de distinguer des zones bien séparées. On pourrait remplacer le

SDS par du benzène sulfonate, tensioactif chargé comportant un noyau aromatique, dont la fluorescence est différente selon qu'il est isolé ou agrégé. [123]

Les charges de surface piègent les défauts

Escalante et Hoffmann [124] ont montré que les défauts d'alignement devaient apparaître lors du cisaillement utilisé pour la préparation des échantillons, et n'étaient pas intrinsèquement dus aux charges. Pour nous en convaincre, nous avons réalisé une expérience suggérée par Heinz Hoffmann (U. Bayreuth, Allemagne). Nous avons préparé une phase lamellaire de notre système ternaire, dans laquelle 4% de $C_{12}E_4$ a été remplacé par un tensioactif zwitterionique le C_{14}DMAO. Ce tensioactif est quasiment neutre dans l'eau pure mais peut être protoné en présence de méthylforméate ou de diéthyloxalate [124], en proportions stochiométriques. Il est donc possible de charger la phase lamellaire, après l'avoir mélangée. Nous avons préparé les échantillons avec de l'eau pure additionnée de méthylforméate, afin de charger les membranes, ce qui arrive au bout de quelques heures. Ce laps de temps passé, les échantillons paraissent assez liquides. Nous en avons cisaillé un au moyen du vortex : il est devenu très viscoélastique et l'est resté pendant de nombreuses semaines. Lors du cisaillement, le système emmagasine une énergie bien supérieure à l'énergie thermique k_BT, du coup les défauts ne relaxent pas spontanément, mais restent figés.

3.7.3 Quantification de la viscoélasticité

Nous avons essayé de quantifier ces modifications du comportement viscoélastique par des mesures de rhéologie, en collaboration avec Daniel Bonn (LPS de l'ENS). Nous avons travaillé avec une géométrie cône-plan (voir chapitre 2). Le rapport volumique tensioactif sur tensioactif plus décane $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d}$ a été fixé à 0.554. Les échantillons ont été préparés comme indiqué dans l'annexe C, puis gardés dans un bain thermostaté pendant une semaine environ avant les expériences. Nous avons réalisé des mesures en oscillation (voir chapitre 2), mais aussi des mesures de cisaillement dans le temps, à taux de cisaillement fixé. Les échantillons plutôt liquides ont été prélevés au moyen d'une pipette Pasteur, tandis que ceux très viscoélastiques l'ont été avec une petite spatule. Le plan du rhéomètre est maintenu à 20°C par un bain thermostaté, la pièce étant par ailleurs thermostatée à la même température.

Effet de la dilution sur la viscosité

Des phases lamellaires à 0, 0.1 et 3.5% de SDS ont été étudiées en fonction de la fraction volumique de membrane ϕ_m, après avoir été cisaillées pendant 2400 s à un taux de cisaillement constant (0.1 s^-1) pour éliminer une partie des défauts d'alignement [125][124]. Cet alignement partiel est confirmé par la variation de la viscosité : elle diminue au fur et à mesure du temps (figure 3.28) pour tous les échantillons, quel que soit le pourcentage de SDS dans la membrane. Les phase lamellaires ont ce qu'on appelle un comportement thixotrope. On remarquera que la viscosité de la phase fortement chargée reste supérieure

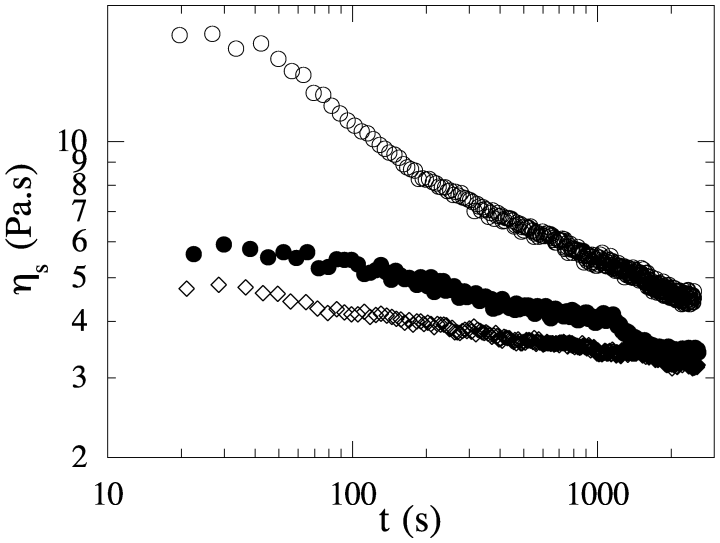


FIG. 3.28: *Variation de la viscosité η_s avec le temps, à fraction volumique de membrane fixée $\phi_m = 0.4$ et taux de cisaillement fixé 0.1 s^{-1}. Différents pourcentages de SDS dans la membrane sont présentés : 0% (◇), 0.1% (●) et 3.5% (○). On observe une diminution de la viscosité avec le temps, quelle que soit la densité surfacique de charge, qui correspond à l'élimination d'une partie des défauts. La phase lamellaire s'aligne partiellement lors du cisaillement.*

à celle des deux autres phases lamellaires : les défauts sont plus difficiles à éliminer dans la phase fortement chargée.

Les variations des modules élastique G' et visqueux G" avec la fraction volumique de membrane ϕ_m ont tracées pour trois pourcentages de SDS dans la membrane (0 et 0.1% figure 3.29, 3.5% figure 3.30), pour une fréquence d'oscillation fixée (0.02 Hz). Le comportement des phases non chargée ou faiblement chargée confirme l'intuition qui veut que la viscosité diminue lorsqu'on dilue l'échantillon. On observe une augmentation de G' et G" avec la fraction volumique de membrane (i.e. une diminution avec la dilution). Plus

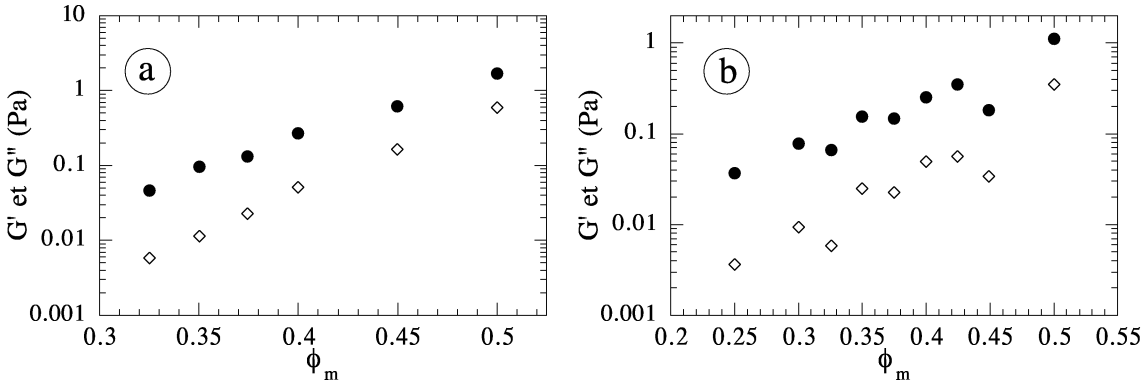


FIG. 3.29: *Variations des modules élastique G'(◇) et visqueux G" (●) avec la fraction volumique de membrane ϕ_m, présentée pour des dilutions des phases lamellaires non chargée (graphe a), chargée à 0.1% (graphe b). Les valeurs présentées correspondent à une fréquence d'oscillation fixée (0.02 Hz), le comportement est sensiblement identique pour les autres fréquences. G' et G" augmentent avec la fraction volumique de membrane (i.e. diminuent avec la dilution), et les échantillons sont toujours plus visqueux qu'élastiques (G">G').*

la phase lamellaire est concentrée en membranes, plus elle a un comportement visqueux et élastique. Par ailleurs, quelle que soit la fraction volumique de membrane, la viscosité l'emporte sur l'élasticité (G">G').

En revanche, pour la phase lamellaire fortement chargée, le comportement est sensiblement différent. G' et G" diminuent avec la fraction volumique de membrane : cela veut dire que plus on dilue la phase lamellaire, plus elle devient visqueuse et élastique. Ce résultat quantitatif confirme nos observations qualitatives sur les tubes à essais. La viscosité augmente d'un ordre de grandeur et l'élasticité de 2 ordres de grandeurs lorsque la fraction volumique de membrane passe de 0.5 à 0.2. En ce qui concerne le bilan entre l'élasticité et la viscosité, pour les faibles fractions volumiques de membrane l'élasticité l'emporte sur la viscosité (G'>G") puis le comportement s'inverse pour $\phi_m > 0.25$ et le caractère visqueux des échantillons l'emporte sur le caractère élastique (G">G').

Effet de la densité surfacique de charge

Quelle que soit la fraction volumique de membrane considérée, on peut remarquer que les modules G' et G" correspondant à 3.5% de SDS sont toujours supérieurs à ceux correspondants aux deux autres pourcentages de charges. Il semble donc que le cisaillement imposé aux échantillons élimine moins facilement les défauts dans la phase très chargée

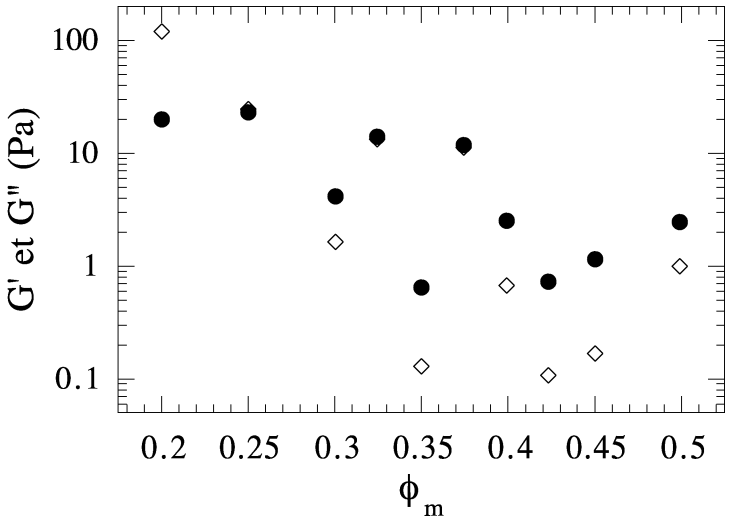


FIG. 3.30: *Variations des modules élastique G'(◇) et visqueux G" (●) avec la fraction volumique de membrane ϕ_m, présentée pour une dilution de la phases lamellaire chargée à 3.5% de SDS. Les valeurs présentées correspondent à une fréquence d'oscillation fixée (0.02 Hz), le comportement est sensiblement identique pour les autres fréquences. G' et G" diminuent avec la fraction volumique de membrane (i.e. diminuent avec la dilution), et les échantillons sont toujours plus visqueux qu'élastiques (G">G') dès que $\phi_m > 0.25$.*

que dans les deux autres. Afin d'étudier l'effet de la densité surfacique de charge, nous avons réalisé une expérience en fixant la fraction volumique de membrane à 0.4, et en faisant varier le taux de charge de la membrane entre 0 et 4% de SDS. Les valeurs de G' et G" correspondantes sont présentées sur la figure 3.31, pour une fréquence d'oscillation fixée (0.02Hz). On observe une augmentation de G' et G" avec le taux de charge de surface des membranes. Le nombre de défauts restant après cisaillement est d'autant plus important que la phase est chargée. Ces observations sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les répulsions électrostatiques jouent un rôle stabilisateur pour les défauts.

Questions ouvertes

Nous avons mesuré les modules élastique et visqueux avant de cisailler les échantillons et nous obtenons des résultats qui suggèrent que le comportement viscoélastique est plus compliqué qu'il n'y paraît.

Pour les phases non chargée ou faiblement chargée, le comportement viscoélastique est similaire avant et après cisaillment : G' et G" augmentent avec la fraction volumique de membrane (non présenté ici). Plus la phase lamellaire est concentrée en membranes,

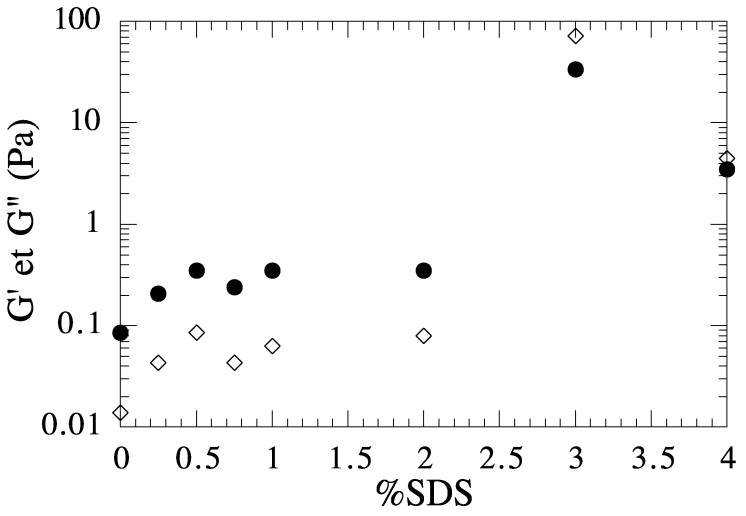


FIG. 3.31: *Variation des modules élastique G' (◇) et visqueux G" (●) avec le pourcentage de SDS dans la membrane, à fraction volumique de membrane fixée : $\phi_m = 0.4$, pour une fréquence d'oscillation fixée (0.02 Hz), après 40 minutes de cisaillement. G' et G" augmentent avec la concentration de SDS.*

plus elle a un comportement visqueux et élastique. Par ailleurs, quelle que soit la fraction volumique de membrane, la viscosité l'emporte sur l'élasticité (G">G'), sauf lorsque $\phi_m = 0.5$ où les deux modules sont du même ordre de grandeur. Jusque là pas de problème.

En revanche, avant le cisaillement, les modules élastique et visqueux de la phase fortement chargée (3.5% de SDS) sont quasiment constants avec la fraction volumique de membrane (figure 3.32). De plus l'élasticité l'emporte sur la viscosité pour quasiment toutes les fractions volumiques de membrane. A ce stade, nous ne savons pas expliquer cette différence de comportement avant et après cisaillement. Il serait nécessaire de réaliser les expérience de rhéologie sous microscope polarisant, afin d'observer l'évolution des défauts d'alignement lors du cisaillement. Le couplage de la rhéologie avec des expériences de diffusion du rayonnement (lumière, RX, neutrons) serait aussi des plus souhaitables.

3.7.4 Conclusion

Nous avons observé des comportements viscoélastiques très différents pour les phases lamellaires directes peu chargées (% SDS<1%) et très chargées (% SDS>1%). La dilution des premières entraîne une diminution de la viscoélasticité tandis que le comportement inverse est observé pour les phases très chargées. De plus, à fraction volumique de membrane fixée, la viscoélasticité semble augmenter avec la densité surfacique de charges. Les tech-

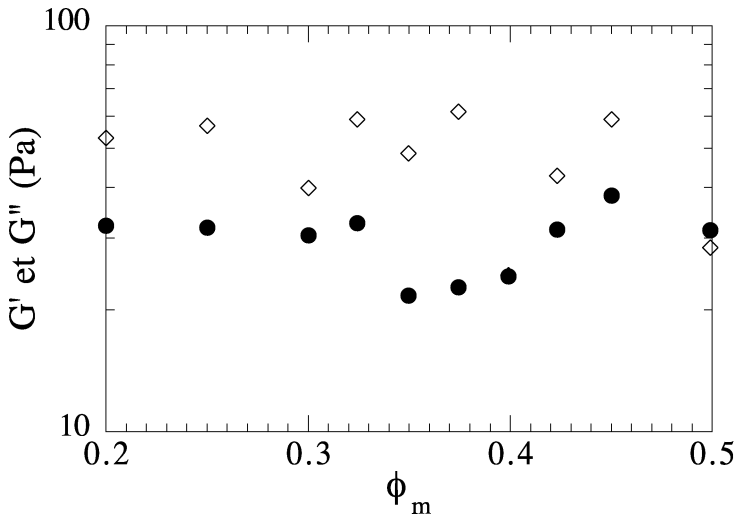


FIG. 3.32: *Variation des modules élastique G' (◇) et visqueux G" (●) avec la fraction volumique de membrane ϕ_m avant le cisaillement pour une fréquence d'oscillation fixée (0.02 Hz). G' et G" sont quasiment indépendants de la dilution.*

niques de microscopie électronique (cryofracture et cryo-TEM) ont échoué pour essayer de comprendre ces modifications au niveau microscopique. Nous avons confirmé les résultats d'Escalante et al. [124] qui ont montré que la viscoélasticité de la phase lamellaire venait de ses défauts d'alignement, ceux-ci apparaissant lors du cisaillement de préparation des échantillons et ne sont pas destabilisés par l'agitation thermique.

Nous avons essayé de quantifier la viscoélasticité de nos échantillons lamellaires par des mesures de rhéologie. En accord avec la littérature [125][124], nous avons observé qu'à taux de cisaillement constant la viscosité diminue au cours du temps. Cette diminution est attribuée à une élimination partielle des défauts (i.e. à un alignement progressif de la phase lamellaire).

Après cisaillement, pour les phases non ou peu chargées (% SDS<1%), les modules élastique et visqueux diminuent lorsque la fraction volumique de membrane diminue (i.e. lorsqu'on dilue). En revanche, pour les phases très chargées (% SDS>1%) , une diminution de la fraction volumique de membrane entraîne une augmentation des modules G' et G". A fraction volumique de membrane fixée, les modules augmentent avec la densité surfacique de charge. Les défauts sont d'autant plus faciles à éliminer que la phase lamellaire est peu chargée.

Avant cisaillement, le comportement viscoélastique des phases très chargées est différent : les modules élastique et visqueux sont quasiment constants avec la fraction volumique de membrane et la hase lamellaire est plus élastique que visqueuse.

A l'heure actuelle nous ne sommes pas en mesure d'expliquer l'origine de ce comportement. L'observation in situ des défauts sous microscope polarisant lors du cisaillement, ainsi que le couplage de la rhéologie à des expériences de diffusion du rayonnement permettraient de mieux appréhender ces phénomènes. Par ailleurs, la fluorimétrie sur des phases lamellaires contenant du benzène sulfonate pourrait donner des indications sur une éventuelle ségrégation du tensioactif chargé.

3.8 Conclusion

Phase lamellaire inverse

Remplacer du tensioactif non ionique par de faibles concentrations de tensioactif ionique ne modifie en rien les paramètres structuraux et élastiques de la phase lamellaire inverse : la périodicité d_B, l'épaisseur de membrane d_m, la rigidité de courbure moyenne κ, le paramètre de Caillé η et le module de compressibilité smectique restent identiques. La phase lamellaire inverse, même chargée reste donc stabilisée par les répulsions stériques entre membranes. Nous expliquons cette absence de modifications par un auto-écrantage des contre-ions, très denses dans la faible quantité d'eau qui leur est impartie. Lorsqu'on gonfle un peu la membrane par de l'eau, l'écrantage devient moins important et l'effet des charges surfaciques commence à se faire sentir. En outre, pour la phase non chargée, nous avons avons observée une augmentation de la rigidité de la membrane avec l'épaisseur de la membrane, en contradiction avec d'autres résultats expérimentaux. Cette dernière observation mériterait d'être approfondie.

Phase lamellaire directe

En revanche, le remplacement de faibles quantités de tensioactif non ionique par un tensioactif ionique dans une phase lamellaire directe entraîne de profondes modifications de ses paramètres structuraux et élastiques. Au fur et à mesure que l'on charge la membrane, on observe une augmentation de l'ordre smectique, se traduisant par un affinement du quasi-pic de Bragg de premier ordre et une apparition des quasi-pics d'ordre supérieur. L'augmentation de l'ordre est quantifiée par la diminution du paramètre de Caillé η et s'explique par les répulsions électrostatiques entre membranes en regard mais aussi entre têtes polaires appartenant à la même monocouche. Les répulsions électrostatiques entre charges dans la même monocouche induisent une diminution des fluctuations de la membrane : tout se passe comme si les fluctuations étaient "repassées" par les charges, entraînant la diminution de la périodicité de la phase lamellaire.

La rigidité de la membrane augmente avec la densité de charge : κ est multipliée par 4-5 pour un pourcentage de charge allant de 0 à 4%, en bon accord avec la contribution du mode pair de fluctuations proposée par Fogden et al. [1], dans le cas d'une phase lamellaire "diluée". Dans le cas d'une phase lamellaire "concentrée", le mauvais accord entre les prédictions de Fogden et al. et nos données expérimentales pourrait venir de l'impossibilité de négliger les interactions entre membranes non premières voisines.

Le module de compressibilité smectique varie en "cloche" au fur et à mesure que l'on charge la membrane : il augmente, passe par un maximum puis diminue. L'augmentation s'explique par l'introduction des répulsions électrostatiques entre membranes. Nous avons remarqué que le pourcentage de SDS pour lequel $\bar{B}$ est maximum correspond à une longueur de Gouy-Chapman environ égale à la moitié de l'épaisseur d'eau dans l'échantillon. La diminution de $\bar{B}$ peut s'expliquer soit en considérant une épaisseur effective pour la membrane tenant compte de l'épaisseur de la couche de contre-ions, soit par l'effet des corrélations de fluctuations prédit par Lukatsky, Pincus et Safran [106][107]. Il nous est difficile pour l'instant de trancher entre ces deux possibilités. Le calcul numérique de la contribution électrostatique théorique du module de compressibilité smectique reste à effectuer et à comparer aux effets des corrélations de fluctuations de manière plus quantitative.

Nous avons observé des comportements viscoélastiques très différents pour les phases lamellaires directes peu chargées (% SDS<1%) et très chargées (% SDS>1%), que nous avons essayé de quantifier par des mesures de rhéologie. Nous avons, semble-t-il, confirmé les résultats d'Escalante et al. [124] prouvant que la viscoélasticité de la phase lamellaire provenait de ses défauts d'alignement. Ceux-ci sont piégés par les charges de surface, et ne sont pas destabilisés par l'agitation thermique. Après cisaillement, pour les phases non ou peu chargées (% SDS<1%) la diminution de la fraction volumique de membrane entraîne une diminution des modules élastique et visqueux. En revanche, lorsque la fraction volumique de membrane diminue, on observe une augmentation des modules G' et G" pour les phase très chargées (% SDS>1%). A fraction volumique de membrane fixée, après cisaillement, les modules augmentent avec la densité surfacique de charge : l'élimination des défauts d'alignement est d'autant plus difficile que la densité surfacique de charge est importante. Quant à au comportement viscoélastique des phase fortement chargées, observé avant cisaillement, il reste inexpliqué pour l'instant : les modules élastique et visqueux sont quasiment constants avec la fraction volumique de membrane et la phase lamellaire est plus élastique que visqueuse. L'observation des défauts sous microscope polarisant lors du cisaillement, ainsi que le couplage de la rhéologie à des expériences de diffusion du rayonnement seraient de la plus grande aide. Par ailleurs, la fluorimétrie sur

des phases lamellaires contenant du benzène sulfonate pourrait donner des indications sur une éventuelle ségrégation du tensioactif chargé.

Chapitre 4

Phase lamellaire dopée par un peptide tribloc rigide

4.1 Introduction

De nombreuses études, tant théoriques [126][127][128][129][130][131][132][133][134][135]-[136], qu'expérimentales [3][4][5][6][7][8][11][9][10][12][13][14], ont été menées ces dernières années sur les phases de membranes (L_α, L_3, vésicules) contenant des polymères. La plupart des expériences ont été réalisées avec des polymères flexibles ou semiflexibles en solution [3][4][5][6][7][8][9][10], ou avec des polymères flexibles diblocs ou triblocs ou des polysavons [11][12][13][14]. A notre connaissance, quasiment aucun travail expérimental n'a porté sur les modifications des paramètres élastiques de phases lamellaires contenant des polymères très rigides [15][16]. Cependant, des modèles théoriques traitant ce type d'inclusions existent [137][138][139][140][141][142][143]. Afin d'obtenir un polymère rigide, on peut par exemple synthétiser un peptide organisé en hélice α. Connaissant sa séquence, on a une grande reproductibilité en taille et en structure lors de sa synthèse. Afin de favoriser la présence du peptide à l'interface hydrophile-hydrophobe, nous avons pensé à un peptide tribloc hydrophobe-hydrophile-hydrophobe. Ce chapitre traitera du peptide que nous avons finalement retenu pour cette étude, de sa structure en solution aqueuse et dans des phases de membranes, ainsi que de son effet sur les paramètres élastiques d'une phase lamellaire directe non ionique.

4.2 Système hôte pour le peptide

Le système expérimental que nous avons choisi comme système hôte pour le peptide est la phase lamellaire directe de $C_{12}E_4$-eau-décane, étudiée dans le chapitre 3. Nous nous sommes placés à un rapport volumique constant $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d} = 0.554$, en faisant varier la quantité d'eau de sorte que la fraction volumique de membrane $\phi = \frac{V_{TA}+V_d+V_{pep}}{V_{TA}+V_d+V_{pep}+V_{eau}}$ varie entre 0.38 et 0.52. Cette phase lamellaire est stabilisée par les interactions d'ondulations. La préparation des échantillons est présentée en annexe C, tandis que certains spectres de rayons X et leurs ajustements par le modèle de Nallet sont en annexe G.

4.3 Où la phase éponge vient nous sauver

Un problème est immédiatement apparu : la phase lamellaire étant biréfringente, il est impossible d'utiliser les méthodes spectroscopiques (absorption, dichroïsme circulaire) pour caractériser le peptide dans cette phase. Nous avons cependant découvert l'existence d'une phase isotrope, située au même endroit que la phase lamellaire dans le diagramme de phase ($\phi_m = 0.38$), mais à plus haute température. Entre 27°C et 30°C, les échantillons apparaissent noirs entre polariseurs croisés, dans les tubes à essai. Les spectres de rayons X aux petits angles de cette phase présentent une bosse de corrélation (figure 4.1 gauche). L'intensité diffusée décroît en q^{-2}, puis en q^{-4} (figure 4.1 droite). Ces éléments sont typ-

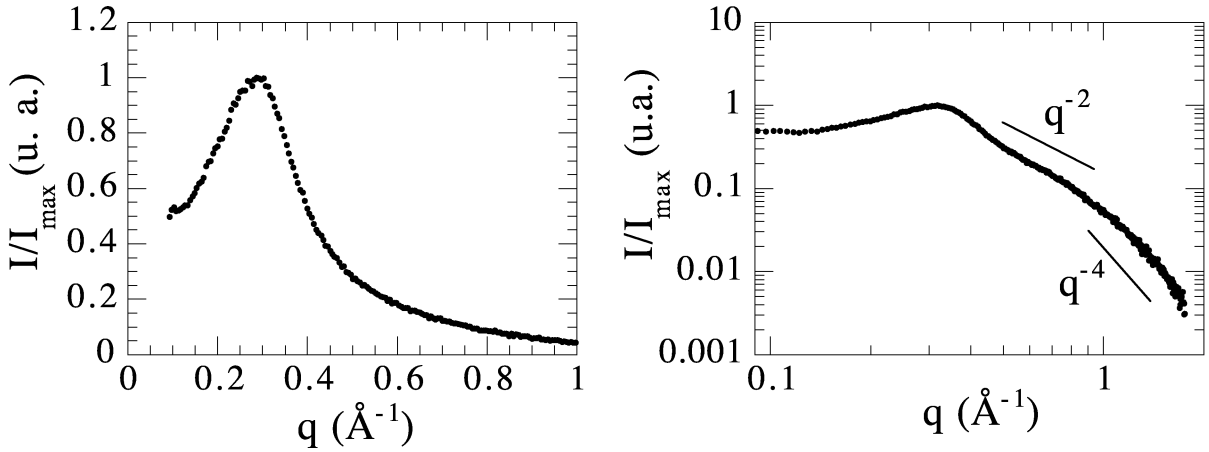


FIG. 4.1: *Spectre typique de diffusion de rayons X aux petits angles d'une phase éponge : à gauche tracé en représentation linéaire, ce qui permet de voir la bosse de corrélation, à droite, tracé en échelle log-log, afin de mettre en valeur les dépendances en q^{-2} et q^{-4}. La dépendance en q^{-2} est quelque peu perturbée ici par la position de la bosse de corrélation.*

iques d'une phase éponge qui consiste en une double couche de tensioactifs multiconnectée, séparant l'eau en deux espaces distincts [27][75][144]. Dans notre système expérimental, la double couche de tensioactifs contient du décane, on l'appelera dorénavant membrane. Localement la structure de la phase éponge est la même que celle de phase lamellaire : une membrane entourée d'eau. Pour une macromolécule, l'environnement est donc le même dans une phase lamellaire et dans une phase éponge.

C'est dans cette phase éponge que les mesures spectroscopiques sur le peptide seront réalisées : spectroscopie d'absorption, de fluorescence, dichroïsme circulaire. Ces mesures nous fourniront des informations sur le peptide dans un environnement membranaire.

4.4 Le peptide

4.4.1 Sa séquence

En collaboration avec Peter Kahn (Rutgers University, USA) et Marcel Waks (LIP, Paris VI), la séquence du peptide a été déterminée de manière à obtenir deux parties hydrophobes aux extrémités du peptide, encadrant une partie hydrophile. La séquence du peptide a été calculée au moyen du programme Insight II (Molecular Simulations Inc., San Diego, USA). Les longueurs des liaisons covalentes, de leurs angles ainsi que des rayons de Van der Waals sont les valeurs standard. La partie hydrophile, globalement neutre pour s'affranchir des interactions de type électrostatique, a été modélisée de façon à former une hélice α rigide (voir chapitre 2). La séquence finalement retenue est la suivante :

(Ala-Ser-Pro-Ala-Leu-Trp)-
(Lys-Lys-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Gln-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Lys-Lys)-
(Trp-Leu-Leu-Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Leu)

Le peptide possède donc deux extrémités hydrophobes : l'une de 6 et l'autre de 9 acides aminés, tandis que sa partie hydrophile centrale est composée de 15 acides aminés. Les symboles de trois lettres définissant les différents acides aminés sont explicités dans l'annexe A.

Dans la séquence du peptide, un tryptophane (Trp) a été placé à chacune des jonctions hydrophile-hydrophobe. D'une part, sa présence nous permet de mesurer la concentration du peptide par spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet (voir chapitre 2), d'autre part, le spectre de fluorescence du tryptophane étant très sensible à l'environnement (hydrophile/hydrophobe), la spectrofluorimétrie pourra nous fournir des informations sur le voisinage du peptide dans les phase de membranes fluides. Yum Keung Yip (Hunter College, New York, USA) a réalisé la synthèse de ce peptide.

4.4.2 Sa structure

Afin d'étudier la structure secondaire du peptide, nous avons réalisé des expériences de dichroïsme circulaire, en collaboration avec Alain Chaffotte (BGM, Institut Pasteur Paris). Des mesures ont été effectuées aussi bien sur le peptide en solution aqueuse (0.83 mg/ml), que sur le peptide solubilisé dans la phase éponge (préparée avec une solution aqueuse de peptide à 0.83 mg/ml).

Protocole expérimental

Toutes les mesures ont été réalisées à 28°C. Les spectres de dichroïsme ont été mesurés dans le lointain ultraviolet (200-260 nm) pour déterminer si le peptide était organisé en hélice α comme modélisé initialement. Les échantillons été placés dans une cellule Hellma circulaire de 0.2 mm de chemin optique. La gamme des longueurs d'onde a été explorée par pas de 0.5 nm. Pour améliorer le rapport signal/bruit, cinq spectres ont été réalisés, le signal de la phase "nue" (eau ou phase éponge) a été soustrait du signal mesuré, puis les spectres ont été moyennés.

Mesures en solution aqueuse

Le spectre du peptide dans l'eau est reproduit sur la figure 4.2. Il présente un minimum autour de 202 nm. Ce spectre est typique d'un peptide désordonné (voir chapitre 2). En solution aqueuse, le peptide n'est donc pas organisé en hélice α, contrairement à ce que prévoyait le modèle de repliement de Peter Kahn.

Mesures dans la phase éponge

La phase éponge contient une fraction volumique de membrane $\phi_m = 0.38$, la concentration finale de peptide dans l'échantillon vaut donc 0.515 mg/ml. Le spectre du peptide dans la phase éponge se trouve sur la figure 4.3. Il présente un double minimum à 208 nm et 222 nm, qui est caractéristique d'une structure en hélice α (voir chapitre 2). La proximité de membranes semble renforcer l'organisation du peptide en hélice.

La forme du spectre d'une hélice α est indépendante de la longueur de l'hélice (chapitre 2). Cependant, il est possible de déterminer le pourcentage d'hélice dans le peptide, en utilisant la formule empirique proposée par Chen et al. [145] :

$$\%hélice = \frac{[\theta]_{obs}}{395}\left(\frac{2.57}{n_{AA}-1}-1\right) \tag{4.1}$$

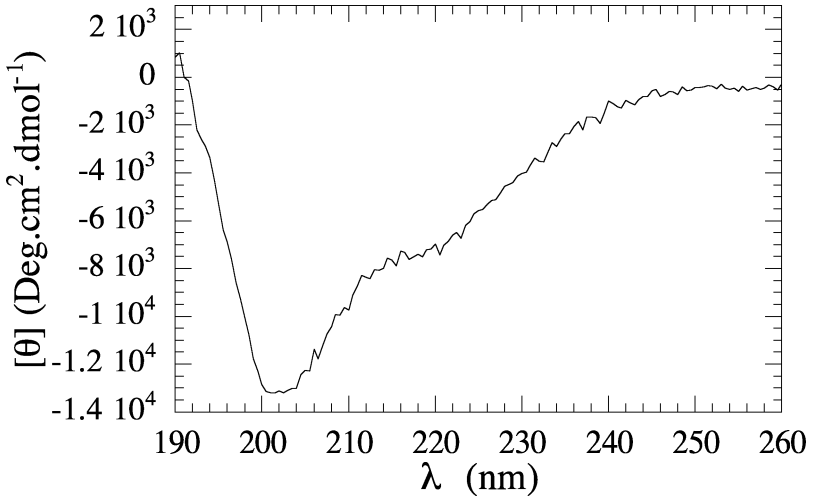


FIG. 4.2: *Spectre de dichroïsme en lointain ultraviolet d'une solution aqueuse de peptide à 0.83 mg/ml.* $[\theta]$ *est l'ellipticité molaire par résidu, définie dans le chapitre 2. Les mesures ont été réalisées à 28°C. Le minimum situé autour de 202 nm n'est caractéristique d'aucune structure organisée. Ce spectre est typique d'un peptide désordonné.*

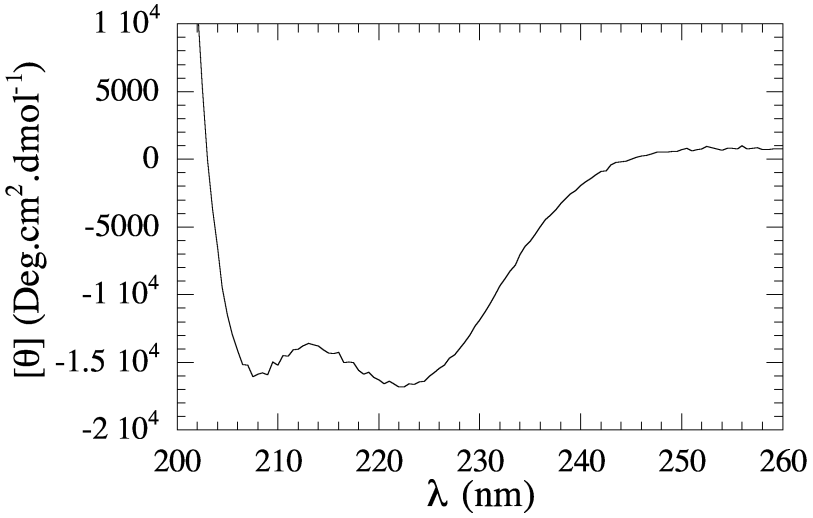


FIG. 4.3: *Spectre de dichroïsme en lointain ultraviolet d'une phase éponge de fraction volumique de membrane* $\phi_m = 0.38$. $[\theta]$ *est l'ellipticité molaire par résidu, définie dans le chapitre 2. La concentration totale de peptide dans l'échantillon vaut 0.515 mg/ml. On observe sur le spectre un double minimum à 208 et 222 nm, caractéristique d'une structure en hélice* α. *L'environnement membranaire induit l'organisation du peptide en hélice* α.

où $[\theta]_{obs}$ est l'ellipticité molaire moyenne par résidu (acide aminé) à 222 nm, et n_{AA} le nombre de résidus (acides aminés). On obtient 40% d'hélice α pour le peptide dans les phases de membranes fluides, en bon accord qualitatif avec le modèle de repliement du peptide proposé par Peter Kahn. Cela correspond à une hélice formée par 12 acides aminés. Sachant qu'il faut 3.6 acides aminés pour un pas d'hélice (0.54 nm de long), la partie structurée en hélice α mesure donc 1.8 nm de long [146]. Quant aux parties non structurées, en supposant que la chaîne polypeptidique est complètement étirée, sachant que la distance entre 2 carbones de cette chaîne vaut 0.36 nm [146], on trouve respectivement 3.6 nm et 2.15 nm de long.

Finalement, dans une phase de membranes fluides (L_α ou L_3), notre peptide possède deux extrémités hydrophobes non organisées respectivement de 3.6 et 2.15 nm de long, encadrant une hélice α hydrophile de 1.8 nm de long pour un diamètre d'environ 1 nm (figure 4.4).

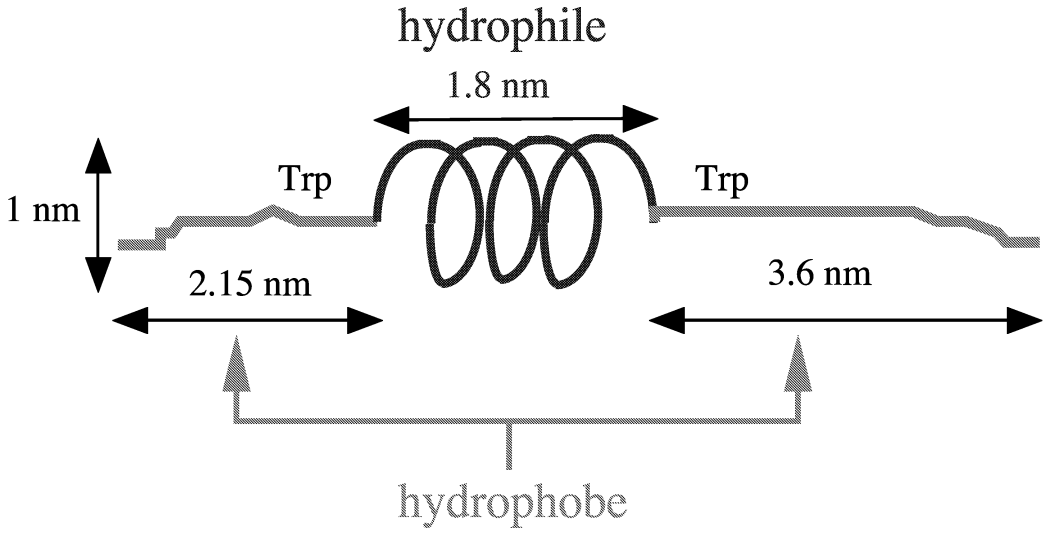


FIG. 4.4: *Représentation schématique de la structure secondaire du peptide, dans les phases de membranes fluides. Les deux extrémités hydrophobes sont désordonnées tandis que la partie centrale hydrophile est organisée en hélice α rigide. Les tryptophanes (Trp) sont proches de la zone où le peptide devient organisé.*

4.4.3 Localisation du peptide dans les phases de membranes

Mesures de tension de surface

Afin de vérifier le caractère amphiphile de notre peptide, nous avons mesuré la tension de surface eau-décane ainsi que la tension de surface d'une solution aqueuse de peptide (0.10 mg/ml)-décane. La méthode du poids de la goutte a été retenue à cause de sa simplicité de mise en oeuvre. Nous nous sommes assurés que l'eau ne contenait pas d'impuretés tensioactives en faisant varier la vitesse du piston (0.1 à 1 mm/min). Ce changement de vitesse n'a pas entraîné de variation du poids de la goutte, prouvant la pureté de l'eau que nous avons utilisée, ainsi que la qualité du nettoyage de notre verrerie. Dans les deux cas (eau pure et solution aqueuse de peptide), dix gouttes ont été pesées (vitesse du piston=1 mm/min), dont le poids a ensuite été moyenné. L'évaporation du décane a été prise en compte. Nous avons mesuré une tension de surface eau-décane égale à 48± 1 mN/m, en bon accord avec la valeur de 53 mN/m mesurée par Goebel et Lunkenheimer [147]. La légère différence entre nos résultats expérimentaux et les leurs vient sans doute du fait que le décane que nous avons utilisé n'a pas été purifié. La tension de surface descend à 30± 1 mN/m lorsqu'on fait la mesure avec une solution aqueuse de peptide à 0.10 mg/ml. Cette diminution de la tension superficielle confirme le caractère amphiphile de notre peptide : il se place à l'interface hydrophile-hydrophobe comme nous le souhaitions.

Spectrofluorimétrie

Le tryptophane (Trp) est un acide aminé aromatique, dont le spectre de fluorescence est extrêmement sensible à l'environnement de l'acide aminé. Nous avons donc utilisé la spectrofluorimétrie en émission, pour déterminer la localisation relative du peptide par rapport au film de tensioactif, matérialisant l'interface entre le décane et l'eau dans les phases de membranes fluides. Le tryptophane absorbe dans l'ultraviolet avec un maximum autour de 282 nm (figure 2.13). C'est donc autour de cette longueur d'onde que nous avons excité nos échantillons, plus exactement à 290 nm. Nous avons réalisé les spectres dans l'eau, et dans la phase éponge, avec la même concentration de peptide dans les deux cas : 0.035 mg/ml. Les échantillons ont été placés dans des cellules Hellma de chemin optique 1 cm, la température a été maintenue à 28°C par un bain thermostaté. Les spectres obtenus sont présentés sur la figure 4.5. Le spectre du peptide dans l'eau présente un pic de fluorescence relativement large dont le maximum se situe autour de 350 nm. Le spectre du peptide dans la phase éponge présente un pic tout aussi large, mais légèrement décalé par rapport au premier, avec un maximum autour de 340 nm. Ce décalage indique

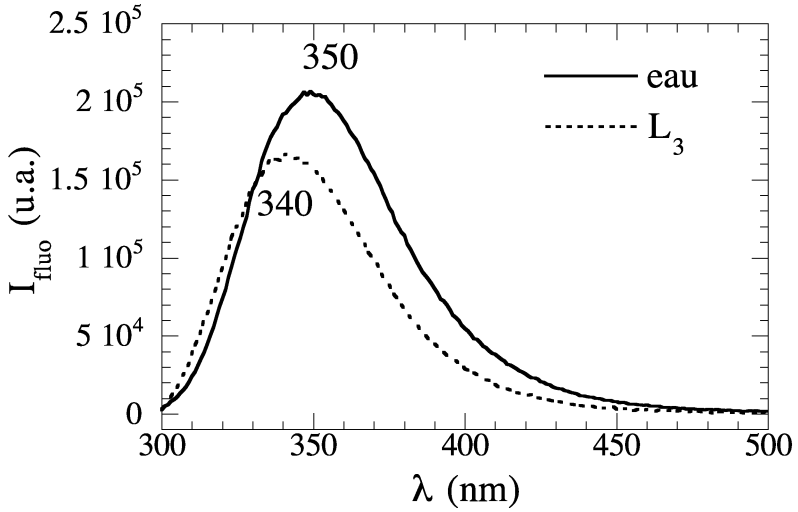


FIG. 4.5: *Spectres d'émission de fluorescence d'une solution aqueuse de peptide (trait plein), et d'une phase éponge décorée par le peptide (pointillés). La concentration de peptide est identique pour les deux échantillons : 0.035 mg/ml. La longueur d'onde d'excitation est 290 nm. Le décalage de la bande d'émission de fluorescence, de 350 nm vers 340 nm, indique une environnement plus hydrophobe pour les tryptophanes présents dans la séquence du peptide. Nous interprétons ce décalage comme une proximité de la membrane pour les extrémités hydrophobes du peptide.*

un changement d'environnement pour les tryptophanes du peptide. Ils se trouvent dans une région plus hydrophobe qu'en solution. Nous supposons que ce décalage en longueur d'onde de la fluorescence correspond au peptide couché sur la membrane.

Conclusion

Les mesures de tension de surface indiquent la présence du peptide à l'interface hydrophile-hydrophobe, confirmant ainsi sa nature amphiphile. Cette présence à l'interface est corroborée par les mesures de spectrofluorimétrie. Les deux tryptophanes, présents dans la séquence du peptide, "voient" un environnement plus hydrophobe dans les phases de membranes fluides que dans l'eau. Nous interprétons ces résultats en supposant que, dans les phases de membranes fluides, le peptide, dont la partie hydrophile est structurée en hélice α rigide, se couche sur la membrane. Il est cependant difficile de déterminer si les extrémités hydrophobes non structurées sont couchées sur la membrane ou insérées dans celle-ci.

4.5 Effet du peptide sur la phase lamellaire

Nous avons systématiquement étudié les modifications des propriétés élastiques induites par l'insertion du peptide dans la phase lamellaire. Dans un premier temps, nous nous sommes placés à fraction volumique de membrane constante $\phi_m = 0.38$, et avons fait varier la concentration de peptide en solution aqueuse, de manière à ce que le rapport molaire $R = \frac{[peptide]}{[TA]}$ varie entre 0 et 5.2 10^{-4}. Des spectres de rayons X aux petits angles ont été réalisés pour tous les échantillons.

4.5.1 Conservation de la périodicité

Comme on le remarque sur la figure 4.6, la périodicité de la phase lamellaire reste inchangée avec la concentration de peptide. En effet, pour tous les échantillons préparés à la même fraction volumique de membrane ϕ_m=0.38, la position du quasi-pic de Bragg reste quasiment constante : q_0=0.42± 0.005 nm^{-1}.

4.5.2 Diminution du paramètre de Caillé η

L'observation des spectres de la figure 4.6 indique que le quasi-pic de Bragg s'affine lorsque la concentration de peptide dans l'échantillon augmente. Bien que le peptide ait été conçu de manière à être globalement neutre, nous nous sommes demandés si l'affinement

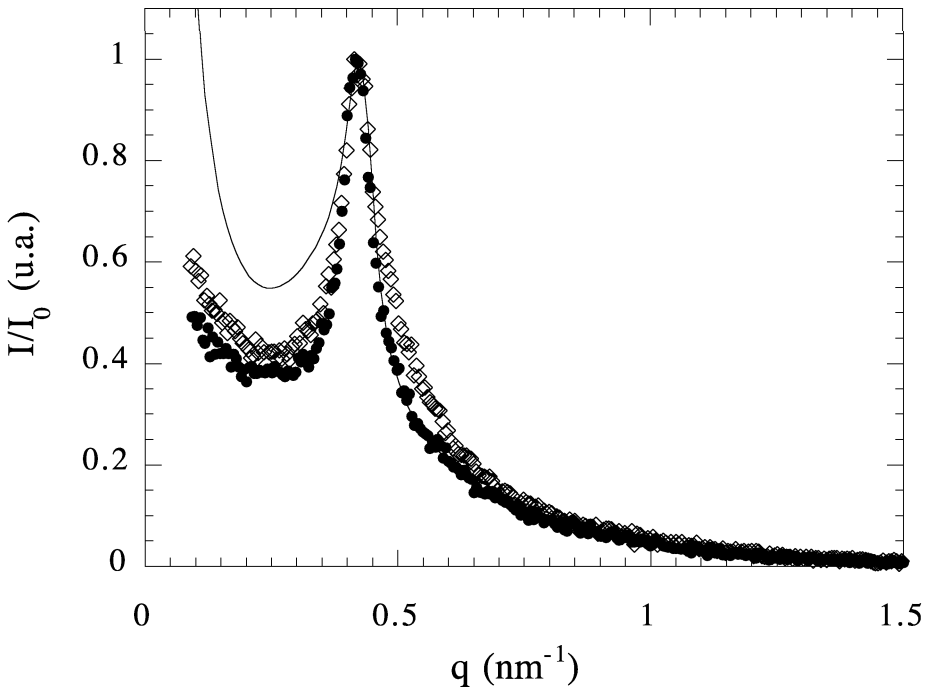


FIG. 4.6: *Spectres de rayons X aux petits angles d'une phase lamellaire "nue" (◇, R=0) et d'une phase lamellaire décorée par le peptide (●, R=5.2 10^{-4}). La fraction volumique de membrane est $\phi_m = 0.38$ dans les deux cas. Le quasi-pic de Bragg ne change pas de position ($q_0 \approx 0.42$ nm^{-1}), mais il s'affine lorsque R augmente. Le traît plein représente le meilleur ajustement d'après Nallet et al. [64] pour la phase lamellaire décorée par le peptide (●, R=5.2 10^{-4}).*

du pic ne pouvait pas provenir d'un effet électrostatique résiduel non désiré. Nous avons donc préparé deux phases lamellaires décorées par le peptide, l'une avec de l'eau pure, l'autre avec de la saumure (NaCl à 0.2M), à même fraction volumique de membrane $\phi_m = 0.38$ et même quantité de peptide R=4.4 10^{-4}. Les spectres de diffusions des rayons X aux petits angles de ces deux phases sont exactement superposables (non présentés ici). De plus, les valeurs de la périodicité ainsi que du paramètre de Caillé sont identiques pour les deux phases : d_B=15 nm et η=0.76 $\pm$ 0.05. L'écrantage d'éventuelles interactions électrostatiques résiduelles ne modifiant absolument pas la largeur du quasi-pic de Bragg, ni le paramètre de Caillé correspondant, nous en avons déduit que l'affinement ne provenait pas d'interactions électrostatiques. La phase lamellaire décorée par le peptide continue à être principalement stabilisée par les répulsions stériques, tout comme la phase lamellaire "nue".

La largeur du quasi-pic est quantifiée par le paramètre de Caillé η (chapitre 2). Les valeurs de η ont été obtenues en ajustant les spectres par le modèle analytique proposé par Nallet et al. [64]. Sur la figure 4.7, nous avons tracé η en fonction du rapport molaire $R = \frac{[peptide]}{[TA]}$, pour deux fractions volumiques de membrane ϕ_m=0.38 (graphe a) et 0.48 (graphe b). Dans les deux cas, on observe une décroissance de η lorsque R augmente. Cette décroissance est très bien ajustée par une droite (figure 4.7). La pente semble être indépendante de la fraction volumique de membrane. η caractérisant l'ordre de la phase lamellaire, sa diminution indique un durcissement de l' ordre smectique lorsque le peptide décore les membranes de la phase lamellaire.

Cette diminution du paramètre de Caillé η a été observée par Warriner et al.[12] et Castro-Roman et al. [13] dans les phases lamellaires contenant de très faibles concentrations des polymères greffés.

4.5.3 Renormalisation de l'épaisseur de la membrane

Pour les phases lamellaires stabilisées par répulsions stériques, en utilisant la formule donnée par Helfrich [42] pour le potentiel d'interaction entre membranes, le paramètre de Caillé peut être réécrit sous la forme suivante [41] :

$$\eta = \alpha \left(1 - \frac{d_m}{d_B}\right)^2 \tag{4.2}$$

où α est un paramètre numérique qui théoriquement vaut $\frac{4}{3}$, mais qui expérimentalement peut être assez différent [15]. A fraction volumique de membrane constante, sachant que la périodicité reste inchangée, la diminution de η implique forcément une variation de l'épaisseur de la membrane d_m. Comme déjà proposé par Castro-Roman et al. [13], la

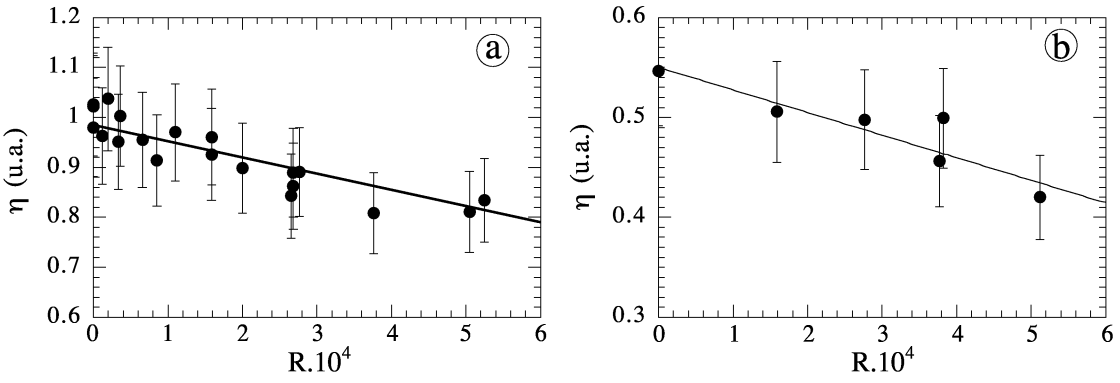


FIG. 4.7: *Variation du paramètre de Caillé η avec le rapport molaire $R = \frac{[peptide]}{[TA]}$, à fraction volumique de membrane fixée $\phi_m = 0.38$ (graphe a) et $\phi_m = 0.48$ (graphe b). Les droites représentent les meilleurs ajustements linéaires. La phase lamellaire devient de plus en plus ordonnée, au fur et à mesure qu'elle est décorée par le peptide. Les équations données par l'ajustement sont : $\eta(R) = 0.98\,[1 - (0.034 \pm 0.0035)10^4 R]$ pour $\phi_m = 0.38$ (graphe a) et $\eta(R) = 0.55\,[1 - (0.04 \pm 0.0035)10^4 R]$ pour $\phi_m = 0.48$ (graphe b). On remarquera que les valeurs des pentes sont sensiblement identiques. La différence de pente doit venir du faible nombre de points disponibles pour $\phi_m = 0.48$.*

variation du paramètre de Caillé se traduit donc par une épaisseur effective d_{meff} pour la membrane décorée. Cette épaisseur effective peut être déterminée en renversant la formule précédente :

$$d_{meff} = d_B \left(1 - \sqrt{\frac{\eta}{\alpha}}\right) \tag{4.3}$$

La valeur de α a été prise égale à 2.5 environ de manière à retrouver l'épaisseur de la membrane nue (5.6 nm) pour R=0, déterminée par la loi de dilution. On peut alors tracer l'épaisseur effective d_{meff} en fonction de R (figure 4.8). L'épaisseur effective de la membrane augmente avec la concentration de peptide atteignant 6.6 nm pour un rapport molaire $R = \frac{[peptide]}{[TA]}$ égal à $5.2\ 10^{-4}$. On notera que les données correspondant à $\phi_m = 0.48$ retournent sensiblement la même variation de d_{meff} que pour $\phi_m = 0.38$.

On peut rendre compte de la variation de l'épaisseur effective par un modèle géométrique simple, identique à celui proposé par Castro-Roman dans la limite où la fraction de polymère $\phi_p \ll 1$ [67]. Soit une membrane d'épaisseur d_{m0} décorée des deux côtés par des cylindres d'épaisseur Δh correspondant au diamètre d'une hélice α (1 nm [146]) (figure 4.9). Si on coupe la membrane en deux, l'épaisseur moyenne d'une demie membrane peut alors s'écrire comme la somme des deux épaisseurs $\frac{d_{m0}}{2}$ et $\frac{d_{m0}}{2} + \Delta h$, moyennée par

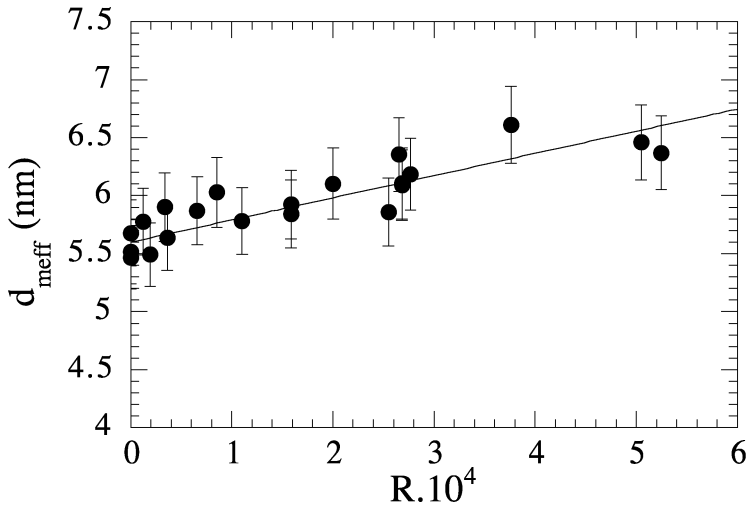


FIG. 4.8: *Variation de l'épaisseur effective de la membrane avec le rapport molaire - $R = \frac{[peptide]}{[TA]}$. La droite est le meilleur ajustement linéaire à la formule 4.5, en prenant 5.6 nm pour d_{m0} et 1 nm pour Δh. L'équation donnée par l'ajustement est : $d_{meff} = 5.6(1+0.34\ R\ 10^4)$ en nm. Les points correspondent à la fraction volumique de membrane $\phi_m = 0.38$. A partir des données correspondant à $\phi_m = 0.48$, on obtient sensiblement le même résultat que pour $\phi_m = 0.38$.*

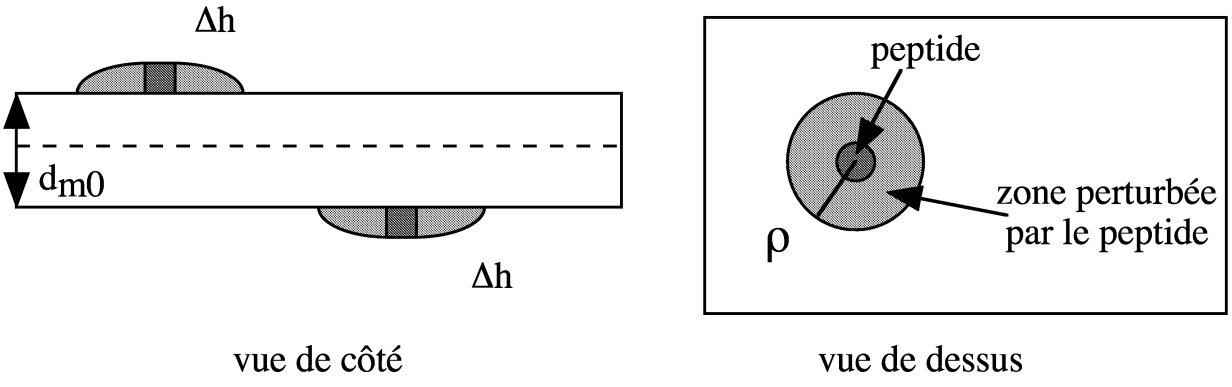


FIG. 4.9: *Représentation schématique de notre membrane décorée . d_{m0} est l'épaisseur de la membrane "nue", le peptide couché sur la membrane est matérialisé par un cylindre d'épaisseur Δh, et ρ est le rayon sur lequel la présence du peptide perturbe la membrane. L'épaisseur moyenne d'une telle membrane vaut : $d_{meff} = d_{m0} + 2\phi_p \Delta h$, où ϕ_p est la fraction surfacique de membrane perturbée par le peptide.*

leurs fractions surfaciques respectives. La demie épaisseur moyenne s'écrit donc

$$\frac{1}{2}d_{meff} = (1-\phi_p)\frac{d_{m0}}{2} + \phi_p(\frac{d_{m0}}{2} + \Delta h) \tag{4.4}$$

où ϕ_p est la fraction surfacique de membrane perturbée par le peptide. En multipliant cette expression par deux pour tenir compte de l'épaisseur de la membrane entière, et en simplifiant l'expression, on obtient :

$$d_{meff} = d_{m0} + 2\phi_p\Delta h \tag{4.5}$$

La fraction surfacique de membrane perturbée par la présence du peptide ϕ_p peut être reliée au rapport molaire R par la formule suivante :

$$\phi_p = R\frac{\Sigma}{\sigma} \tag{4.6}$$

où Σ est l'aire perturbée par un peptide et σ l'aire par tête polaire du tensioactif (0.54 nm^2 [112]). De l'ajustement de la variation de $d_{meff}(R)$ par la formule 4.5 (figure 4.8), nous avons déterminé Σ, l'aire perturbée par un peptide : Σ=513 nm^2. L'effet du peptide se fait donc sentir sur la membrane au delà de son extension réelle, dans un rayon $\rho = \sqrt{\frac{\Sigma}{\pi}}$ d'environ 13 nm autour de la position du peptide. Cette distance est 6 fois plus grande que la longueur de l'hélice α (2.2 nm). Cependant, des modèles théoriques [137][139] prédisent que lorsqu'il y a une différence d'épaisseur entre une inclusion transmembranaire et la membrane, cette dernière peut être perturbée sur une distance pouvant atteindre jusqu'à 5 fois la différence d'épaisseur. Bien entendu notre peptide n'est pas transmembranaire, mais ces modèles prévoient, par des arguments de courbure de la membrane, que l'effet d'une particule hôte se propage sur des distances supérieures à sa simple extension réelle sur la membrane, ce qui est compatible avec nos observations.

Nous n'avons pas réussi observer expérimentalement de variation de l'épaisseur par diffusion des rayons X aux petits angles. Soit la quantité de peptide est trop petite, soit les densités électroniques du peptide et de l'eau sont assez proches l'une de l'autre, comme c'est déjà le cas pour les densités électroniques de l'eau et des têtes polaires de tensioactif, et l'on a un mauvais contraste.

4.5.4 Rigidification de la membrane

La variation de η signifie que la présence du peptide modifie les paramètres élastiques de la phase L_α puisque d'après Caillé [65], η est inversement proportionnel à la racine de $K\bar{B}$: $\eta = \frac{q_0^2 k_B T}{8\pi\sqrt{K\bar{B}}}$. Nous avons donc réalisé des lois de dilution de notre phase lamellaire

pour différentes concentrations de peptide sur la membrane, afin d'obtenir une estimation de la rigidité des membranes décorées, à partir de la correction à la loi de dilution.

Dans un premier temps nous n'avons pas tenu compte de la renormalisation de l'épaisseur effective induite par le peptide, et avons utilisé d_m=5.6 nm, déterminé par la loi de dilution classique, dans l'expression 1.35 de l'écart à la loi de dilution. La variation de la rigidité de la membrane obtenue est présentée sur la figure 4.10. La rigidité double pour R allant

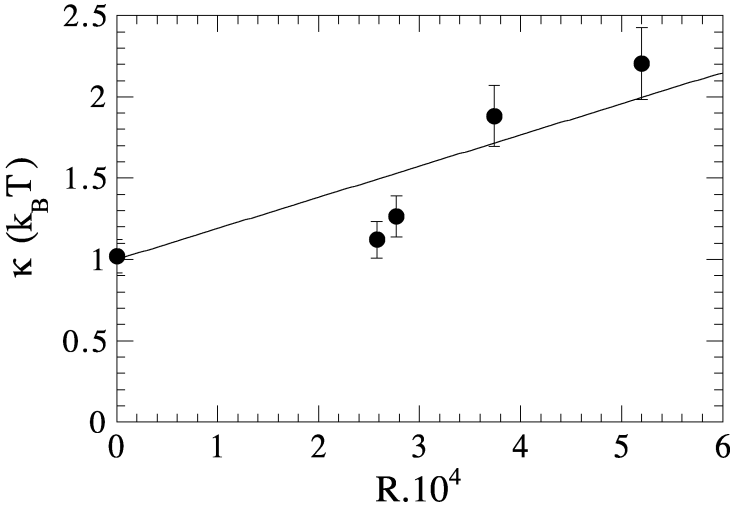


FIG. 4.10: *Variation de la rigidité de courbure moyenne en fonction du rapport molaire* $R = \frac{[peptide]}{[TA]}$. *La droite représente le meilleur ajustement linéaire, en fixant pour ordonnée à l'origine la rigidité* κ_0 *de la membrane "nue". L'ajustement donne pour l'équation de la droite :* $\kappa_{eff} = 1 + 0.2\ 10^4 R$ *en unités* $k_B T$.

de 0 à 5.2 10^{-4}. De faibles quantités de peptide entraînent donc de fortes modifications de la rigidité de la membrane.

Dans un second temps, il nous a semblé plus cohérent de tenir compte de l'épaisseur effective pour déterminer la rigidité κ. Aussi nous avons remplacé l'épaisseur d_m par l'épaisseur effective d_{meff} dans l'expression 1.35 de l'écart à la loi de dilution. Deux exemples d'écarts à la loi de dilution sont présentés sur la figure 4.11 : on remarquera que la pente diminue avec la concentration de peptide, ce qui signifie une augmentation de la rigidité des membranes avec la quantité de peptides adsorbés, et ce en tenant compte de la renormalisation de l'épaisseur. La variation de la rigidité $\kappa(R)$ est tracée sur la figure 4.12. On peut noter l'impressionnant effet, induit sur la rigidité, par de si faibles concentrations de peptide : la rigidité triple, passant d'environ 1 k_BT à environ 3 k_BT pour des rapports molaires $R = \frac{[peptide]}{[TA]}$ aussi faibles que 5.2 10^{-4}. La variation de κ est très bien ajustée par une droite ayant pour ordonnée à l'origine la rigidité κ_0 de la membrane "nue" (figure

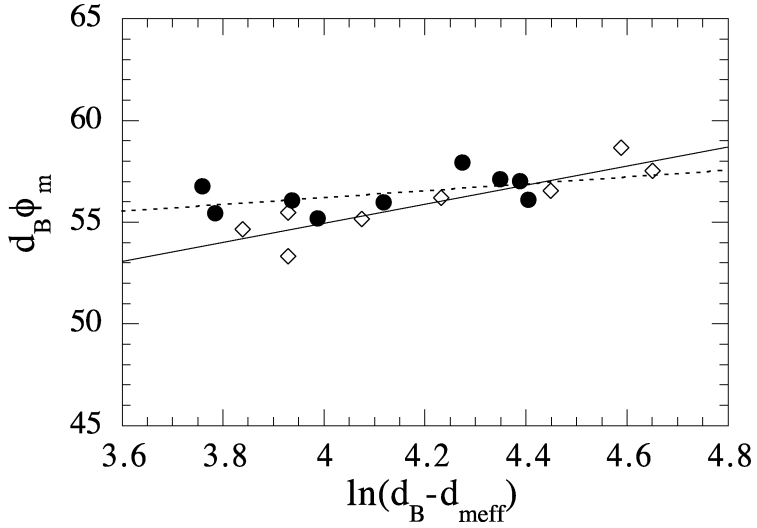


FIG. 4.11: *Exemple de deux écarts à la loi de dilution pour une phase L_α "nue" ($\diamond$, R=0) et décorée ($\bullet$, R=5.2 10^{-4}). Les droites sont les meilleurs ajustements linéaires à l'écart à la loi de dilution 1.35. Le trait plein correspond à R=0, tandis que les pointillés correspondent à R=5.2 10^{-4}. La pente de l'écart à la loi de dilution diminue avec la concentration de peptide, ce qui indique que les membranes se rigidifient au fur et à mesure qu'elles se couvrent de peptide.*

4.12). L'adsorption de notre peptide sur la membrane de tensioactifs rigidifie donc la phase lamellaire.

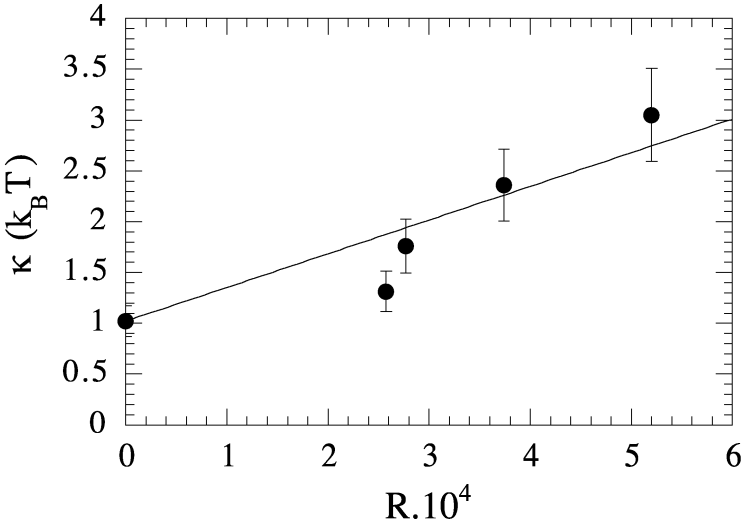


FIG. 4.12: *Variation de la rigidité de courbure moyenne en fonction du rapport molaire* $R = \frac{[peptide]}{[TA]}$. *La droite représente le meilleur ajustement linéaire, en fixant pour ordonnée à l'origine la rigidité* κ_0 *de la membrane "nue". L'ajustement donne pour l'équation de la droite :* $\kappa_{eff} = 1 + 0.33\ 10^4 R$ *en unités* $k_B T$.

Dans les phases lamellaires contenant des polymères greffés, cette rigidification de la membrane n'a été observée ni par Warriner et al. [11][12] jusqu'à 8% de concentration molaire de polymère, ni par Castro-Roman et al. [67] jusqu'à des rapports R environ 25 fois supérieurs à ceux pour lesquels nous avons travaillé. En revanche, Yang et al. [14] ont observé un doublement de la rigidité des membranes d'une phase lamellaire dans laquelle ils avaient ajouté 4% de polysavons en poids. Si l'on transforme la concentration de polysavons nécessaire pour observer une telle augmentation en rapport molaire $R = \frac{[nbred'ancres]}{[TA]}$, on trouve alors $R \approx 1.6\ 10^{-2}$ ce qui correspond à environ 30 fois plus de polysavons que de peptide. On conçoit aisément que la nature rigide de notre peptide joue un rôle prépondérant dans l'ampleur de la rigidification observée.

4.5.5 Mesures de rigidité par RMN du deutérium

Nous avons tenté de confirmer l'augmentation de la rigidité par la mesure de l'éclatement quadrupolaire en fonction de la dilution (voir chapitre 2) en collaboration avec Dror Warschawski (IBPC, Paris). Ces mesures nécessitent l'utilisation d'une molécule deutériée insérée dans la monocouche de tensioactifs. L'idéal aurait été d'utiliser du $C_{12}E_4$ deutérié,

mais sa synthèse se fait sur demande et coûte une fortune. Nous nous sommes contentés d'utiliser du décane deutérié, en espérant qu'il s'insère dans la monocouche de tensioactifs. Deux phases lamellaires ont été étudiées : l'une "nue", l'autre décorée par le peptide de sorte que R=0.7 10^{-4}. Dans les deux phases, la moitié en poids du décane a été remplacé par du décane perdeutérié. Deux spectres caractéristiques sont présentés sur la figure 4.13. Trois éclatements quadrupolaires, correspondant aux positions non équivalentes

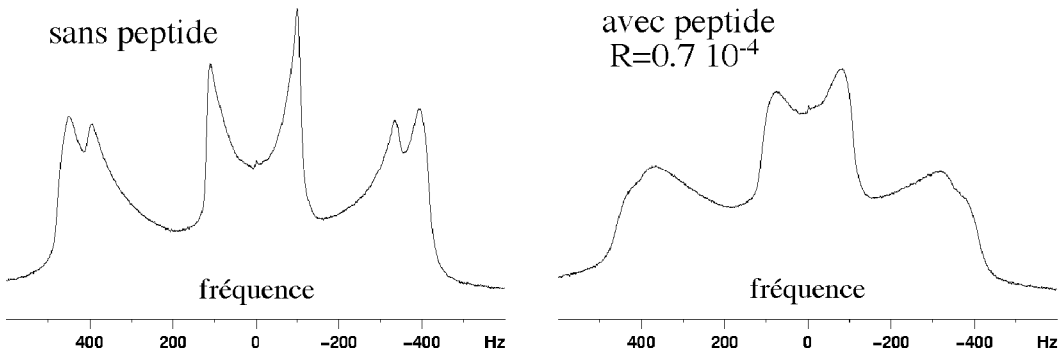


FIG. 4.13: *Spectre de RMN du deutérium de deux échantillons lamellaires de fraction volumique de membrane ϕ_m=0.52. Le spectre de gauche correspond à la phase lamellaire "nue", celui de droite à celle décorée par le peptide (R=0.7 10^{-4}). Sur les deux spectres, on distingue trois éclatements quadrupolaires correspondant aux différentes positions non équivalentes des liaisons C-D [61]. On observe aussi une raie isotrope associée aux molécules de deutérium naturellement présentes dans l'eau. La valeur de l'éclatement quadrupolaire diminue avec la présence du peptide, ce qui correspond à une rigidification de la membrane. Qualitativement, ces résultats confirment ceux obtenus par les rayons X.*

des liaisons C-D sont observables, ainsi qu'une raie isotrope centrée à la fréquence 0 Hz provenant des molécules de deutérium naturellement présentes dans l'eau. Par rapport à Auguste et al.[22] et Bouglet et al. [118][61], on remarquera que moins d'éclatements sont distingables et que la valeur des éclatements est moins importante : autour de 1 kHz pour le premier éclatement chez Bouglet et al. [61], tandis pour nos échantillons on observe environ 0.2 kHz. Cette différence provient sans doute de la molécule sonde que nous avons choisie. En effet le décane se trouve à l'intérieur de la membrane, mais n'est pas à l'interface hydrophile-hydrophobe comme un tensioactif ou un cotensioactif. Le décane doit s'insérer faiblement entre les chaînes aliphatiques du $C_{12}E_4$, ce qui nous permet tout de même d'observer des éclatements. Lors de la dilution, de la phase lamellaire, seul l'éclatement le plus central varie, ce qui confirme une faible insertion du décane dans la

monocouche de tensioactif : l'éclatement passe d'environ 0.2 kHz pour la phase lamellaire "nue" à environ 0.15 kHz pour la phase lamellaire décorée par le peptide (quand d_w=5 nm).

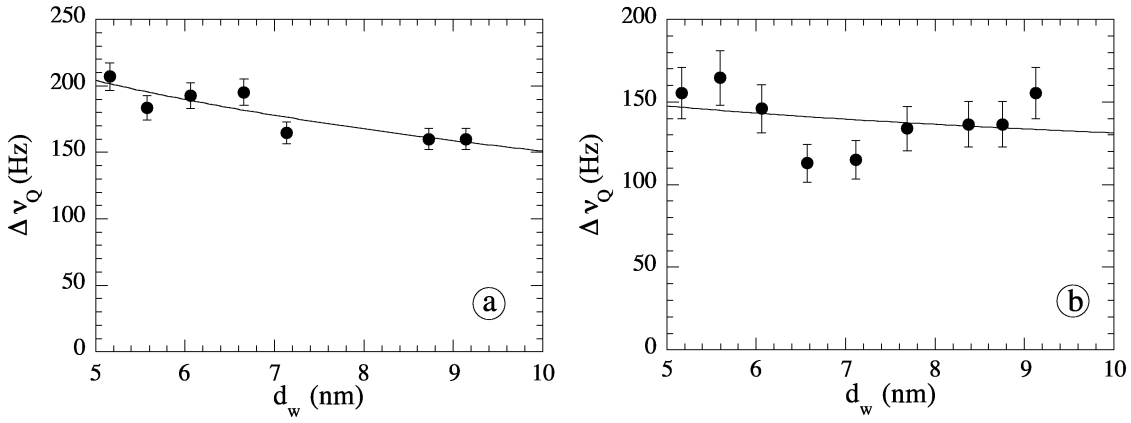


FIG. 4.14: *Variation de l'éclatement quadrupolaire avec l'épaisseur d'eau. a) Phase lamellaire "nue" b) Phase lamellaire décorée par le peptide (R=0.7 10^{-4}). Les traits pleins correspondent au meilleur ajustement d'après la formule 2.60. L'ajustement est bon pour la phase "nue", il donne κ=1.4±0.2 k_BT. Pour la phase décorée, l'ajustement est assez mauvais et donne κ=1.8±1 k_BT. Compte tenu de l' incertitude sur nos mesures, nous ne pouvons pas confirmer quantitativement la rigidification de la phase lamellaire.*

Nous avons tracé la variation de l'éclatement quadrupolaire en fonction de l'épaisseur d'eau pour ces deux phases (figure 4.14). Nous avons ajusté ces données par la formule 2.60, présentée dans le chapitre 2. L'ajustement des données correspondant à la phase lamellaire nue est bon, et donne pour la rigidité de la membrane κ=1.4±0.2 k_BT, en très bon accord avec la valeur obtenue par l'écart à la loi de dilution (κ=1 ± 0.2 k_BT). Les points expérimentaux de la phase décorée par le peptide sont assez dispersés (figure 4.14 b)), et l'ajustement donne une erreur importante pour la rigidité : κ=1.8±1 k_BT. Il est difficile de confirmer quantitativement la rigidification de la membrane, à cause de la dispersion des points. La technique utilisée est peu sensible pour nos échantillons, sans doute à cause de la mauvaise insertion du décane dans le film de tensioactifs. Il serait sans doute pertinent d'envisager le marquage au deutérium du tensioactif afin de réaliser systématiquement des mesures de rigidité par RMN. Cependant, qualitativement, la diminution de l'éclatement quadrupolaire de la phase lamellaire décorée par rapport à celui de la phase lamellaire nue va plutôt dans le sens d'une rigidification de la membrane.

4.5.6 Affaiblissement des interactions membranaires

Nous avons déterminé de manière indépendante la variation du paramètre de Caillé $\eta(R)$ et de la rigidité de la membrane $\kappa(R)$ déterminée en considérant l'épaisseur effective. En utilisant la formule de Caillé [65], on peut calculer le module de compressibilité smectique correspondant $\bar{B}(R)$:

$$\bar{B}(R) = \frac{q_0^3 (k_B T)^2}{32\pi\kappa(R)\eta^2(R)} \tag{4.7}$$

Nous avons effectué ce calcul à fraction volumique de membrane fixée ϕ_m=0.38 et pour $0 < R < 5.2\ 10^{-4}$, le résultat est présenté sur la figure 4.15. Le module de compressibilité smectique $\bar{B}$ diminue avec la concentration de peptide sur la membrane : il est divisé par deux lorsque le rapport molaire R passe de 0 à $5.2\ 10^{-4}$. Les interactions entre membranes sont donc affaiblies lorsque les membranes sont décorées par le peptide.

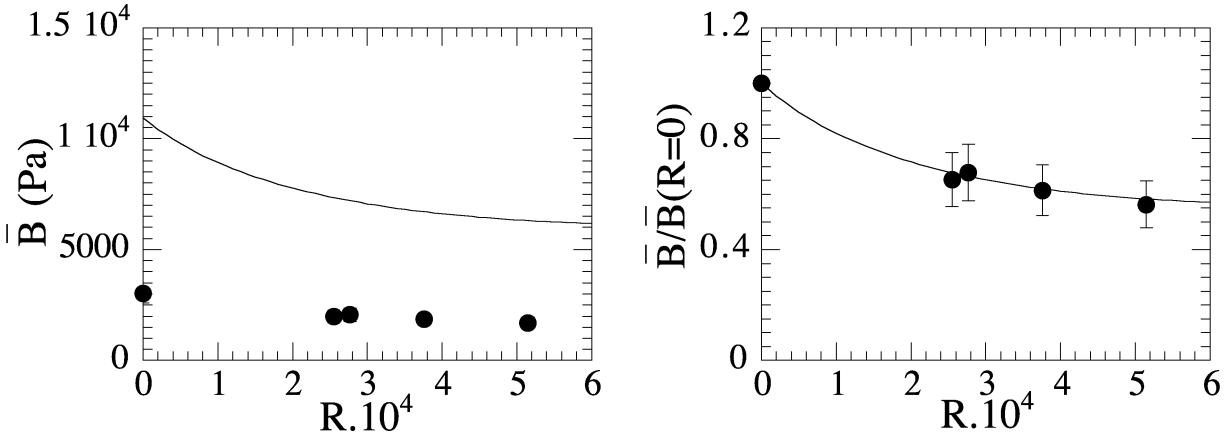


FIG. 4.15: *Variation du module de compressibilité smectique $\bar{B}$ en fonction du rapport molaire R, pour une fraction volumique de membrane fixée : $\phi_m = 0.38$. Les points correspondent aux résultats expérimentaux issus des déterminations indépendantes de η et κ. La ligne représente les prédictions théoriques, calculées à partir de la contribution des répulsions stériques (formule 4.8), où il a été tenu compte à la fois de la rigidification et de l'augmentation de l'épaisseur effective de la membrane. A gauche, les valeurs sont en unités du système international ; à droite, elles ont été normalisées par rapport à la valeur à concentration de peptide nulle $\bar{B}(R = 0)$, afin de s'affranchir des problèmes de préfacteurs.*

Cette diminution de $\bar{B}$ est également observée pour d'autres fractions volumiques de membrane : par exemple, pour $\phi_m = 0.48$, le module de compressibilité smectique est

divisé par deux lorsque le rapport molaire R passe de 0 à 5.2 10^{-4}. Le comportement présenté sur la figure 4.15 est donc un comportement caractéristique.

Dans le cas des polysavons greffés, Yang et al. [14] observent au contraire un renforcement des répulsions entre membranes au fur et à mesure qu'elles sont décorées par les polysavons. Ils n'expliquent cependant pas l'origine de cette répulsion supplémentaire.

Dans notre système, nous avons vérifié que la phase lamellaire décorée par le peptide continuait à être stabilisée par les répulsions stériques entre membranes (voir 4.5.2). A partir du potentiel d'interaction membranaire proposé par Helfrich [42], on peut calculer la contribution des répulsions stériques au module de compressibilité smectique :

$$\bar{B}_{ond} = d_B \frac{9\pi^2 (k_B T)^2}{64\kappa d_s^4} \tag{4.8}$$

Pour tenir compte de l'augmentation de l'épaisseur effective de la membrane, nous avons remplacé dans l'expression précédente d_s par $(d_B - d_{meff})$. Nous avons exactement utilisé les valeurs retournées par l'ajustement de $d_{meff}(R)$, puis en prenant les valeurs données par l'ajustement de $\kappa(R)$, nous avons obtenu la dépendance de $\bar{B}$ avec le rapport molaire R, présentée sur la figure 4.15 (trait plein). Qualitativement, l'accord entre les résultats expérimentaux et les prédictions théoriques est bon : le module de compressibilité smectique diminue avec la concentration de peptide sur la membrane. En revanche, quantitativement, les prévisions théoriques sont toujours supérieures d'un facteur 3 aux valeurs expérimentales (figure 4.15). Afin de s'affranchir de ce problème de préfacteur, on peut normaliser $\bar{B}(R = 0)$ à 1 (figure 4.15 b). L'augmentation de l'épaisseur effective d_{meff} et de κ explique donc bien la diminution de $\bar{B}$. Un modèle de phase lamellaire à deux solvants n'explique pas le problème de préfacteur, il aurait plutôt tendance à l'accentuer. Ce problème reste à l'heure actuelle non compris.

4.6 Comparaison avec les modèles existants

L'influence de polymères flexibles sur la rigidité de membranes de tensioactifs a fait l'objet de nombreuses études théoriques. En revanche, peu nombreux sont les modèles élaborés pour des membranes décorées d'inclusions rigides. Dans cette partie, nous rappelerons rapidement les modèles conçus pour des polymères flexibles, ainsi que leurs principales prédictions. Nous nous attarderons ensuite plus longuement sur les prévisions concernant les inclusions rigides. La modélisation de notre peptide rigide par une inclusion rigide semble en effet plus pertinente.

4.6.1 Inclusions flexibles ou semi-flexibles

Comme nous ne pouvons déterminer si notre peptide est adsorbé sur la membrane ou si ses parties hydrophobes s'y insèrent, nous avons considéré les modèles existants pour des polymères adsorbés ou greffés.

Les polymères adsorbés

Certains modèles [127][128][129] prédisent une diminution de la rigidité κ de la membrane lorsque le polymère s'adsorbe sur celle-ci, que cette adsorption soit réversible ou irréversible. Ces modèles été rejetés car ils ne s'accordent visiblement pas avec nos résultats expérimentaux.

En 1990, De Gennes [126] a étudié les variations de rigidité d'une membrane de tensioactifs sur laquelle un polymère flexible s'adsorbe. La rigidité effective résultant de cette adsorption augmente logarithmiquement avec la taille du polymère, et s'écrit comme :

$$\kappa \approx \kappa_0 + \beta k_B T ln\left(\frac{R_F}{a}\right) \tag{4.9}$$

où κ_0 est la rigidité de la membrane nue, β une constante numérique, R_F le rayon de Flory du polymère ($R_F \propto N^{3/5}a$), a la taille d'un monomère et N le nombre de monomères. Notre variation de κ est extrêmement mal ajustée par une augmentation logarithmique, c'est pourquoi nous avons abandonné la comparaison avec ce modèle théorique.

Les polymères greffés

Dans le cas de polymères hydrophiles possèdant des ancres hydrophobes, les modèles se séparent cette fois encore en deux groupes :

- Le premier groupe prévoit une diminution de la rigidité de la membrane [135][136].
- Le second une augmentation de la rigidité de la membrane [130][131][132][133][134].

Nous n'analyserons pas nos observations expérimentales à l'aide des modèles élaborés pour des polymères flexibles ou semi-flexibles car il nous a semblé hasardeux d'assimiler notre peptide rigide à de telles inclusions. Il nous a cependant paru important d'y faire allusion.

4.6.2 Inclusions rigides

Champ moyen

A première vue, un raisonnement de type "champ moyen" pour des inclusions rigides semble bien adapté à notre système expérimental pour calculer la rigidité de la membrane

décorée. Imaginons la membrane décorée comme une membrane de rigidité initiale κ_0, piquetée de zones de rigidité $\kappa_0 + \delta\kappa$ correspondant aux inclusions rigides (figure 4.16). Dans le cas où la variation relative de rigidité $\frac{\delta\kappa}{\kappa_0}$ est petite devant 1, la rigidité effective de la membrane peut alors s'écrire comme :

$$\kappa_{eff} = (1 - \phi)\kappa_0 + \phi(\kappa_0 + \delta\kappa) = \kappa_0 + \phi\delta\kappa \tag{4.10}$$

où ϕ est la fraction surfacique d'inclusions sur la membrane. Ce modèle néglige toutes interactions entre inclusions. Si on l'applique à nos résultats expérimentaux, en prenant

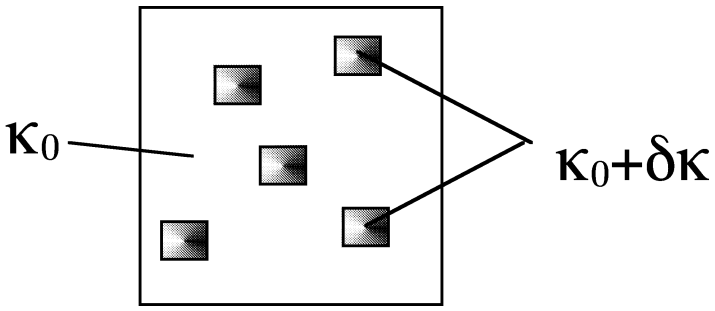


FIG. 4.16: *Représentation schématique d'une membrane à deux rigidités, vue de dessus. κ_0 est la rigidité de la membrane nue et $\kappa_0 + \delta\kappa$ celle des inclusions. Cette membrane modèle est utilisée aussi bien pour le modèle de champ moyen, que pour le modèle de Netz et Pincus [138] et celui de Sens et Turner [142].*

pour fraction surfacique de peptide celle correspondant à la fraction surfacique de membrane perturbée par le peptide, l'ajustement de l'augmentation de la rigidité est très bon (figure 4.12). Cependant, à partir de cet ajustement, on obtient pour la variation relative de la rigidité $\frac{\delta\kappa}{\kappa_0} \approx 3$. L'hypothèse de départ du modèle de champ moyen n'étant pas vérifiée, l'autocohérence n'est pas conservée. Ce modèle ne peut pas être appliqué à nos résultats expérimentaux car la rigidification des membranes est trop importante.

Modèle de Netz et Pincus.

En 1995, Netz et Pincus ont proposé un modèle pour calculer la rigidité effective d'une membrane isolée, décorée d'inclusions rigides [138], en tenant compte des interactions entre inclusions. Comme dans le modèle de champ moyen présenté juste avant, la membrane peut être imaginée comme une membrane de rigidité initiale κ_0, piquetée de zones de rigidité $\kappa_0 + \delta\kappa$ correspondant aux inclusions rigides (figure 4.16).

En utilisant une approche perturbative, ils prévoient l'existence de trois types de phases, selon les interactions entre les inclusions :

- Une phase désordonnée où les inclusions sont réparties aléatoirement.
- Une phase où les inclusions ont tendance à s'agréger.
- Une phase où les inclusions sont ordonnées selon réseau hexagonal afin de maximiser leur distance de séparation.

Le comportement de phases peut être expliqué par l'existence d'interactions entre inclusions, supposées être plus rigides que la membrane qui les entoure. Les fluctuations de la membrane entraînent alors une attraction due au couplage des rigidités, et une répulsion due au couplage entre les courbures spontanées. Dans le premier cas, on observera plutôt une agrégation des inclusions, tandis que dans le second cas elles s'ordonneront selon un réseau hexagonal. Tous les calculs ont été réalisés en prenant pour hypothèse : $\frac{\delta\kappa}{\kappa_0} << 1$.

La rigidité effective de la membrane a été calculée dans le cas d'une phase complètement désordonnée, lorsque la plus grande longueur d'onde des fluctuations $\xi_{||}$ (formule 1.33) est grande devant la taille du tensioactif (ce qui est presque toujours le cas) :

$$\frac{1}{\kappa_{eff}} = \frac{1-\phi}{\kappa_0} + \frac{\phi}{\kappa_0 + \delta\kappa} \tag{4.11}$$

où ϕ est la fraction surfacique d'inclusions sur la membrane. Cette rigidité est inférieure à celle que l'on peut déterminer par le modèle de champ moyen : le couplage entre les inclusions a donc pour effet de "ramollir" la membrane par rapport au modèle de champ moyen.

Sous les mêmes hypothèses, la formule 4.11 reste valable pour la phase où les inclusions sont ordonnées.

Dans le cas d'inclusions agrégées, si la taille des domaines agrégés est supérieure à $\xi_{||}$, la rigidité effective s'écrit comme :

$$\frac{1}{\kappa_{eff}} = \left[\frac{1-\phi}{\sqrt{\kappa_0}} + \frac{\phi}{\sqrt{\kappa_0 + \delta\kappa}}\right]^2 \tag{4.12}$$

où ϕ est la fraction surfacique d'inclusions sur la membrane.

Le modèle de Netz et Pincus [138] est a priori bien adapté à notre sytème. Nous avons d'abord considéré le cas où les inclusions sont réparties aléatoirement mais non agrégées (identique à celui où les inclusions sont ordonnées), puis celui où elles s'agrègent. Voyons comment ces prévisions ajustent nos résultats.

- Supposons les peptides non agrégés répartis aléatoirement sur la membrane (ou ordonnés). On peut alors utiliser la formule 4.11 du modèle pour ajuster nos résultats

expérimentaux. Nous avons pris pour la fraction surfacique de peptide, celle correspondant à la fraction surfacique de membrane perturbée par le peptide $\phi_p = R\frac{\Sigma}{\sigma}$, où Σ est l'aire perturbée par le peptide (513 nm^2) et σ l'aire par tête polaire du tensioactif (0.54 nm^2). Nous arrivons très bien à ajuster la variation de $\frac{\kappa_0}{\kappa_{eff}}$ en fonction de R par $(1+\alpha R)$ (figure 4.17). D'après le modèle, α est relié à la variation relative

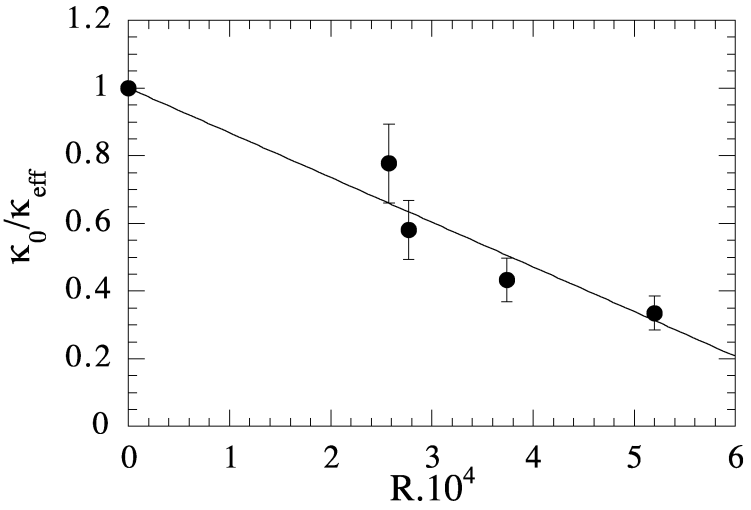


FIG. 4.17: *Variation de $\frac{\kappa_0}{\kappa_{eff}}$ en fonction du rapport molaire R. La droite représente le meilleur ajustement linéaire, en fixant à 1 l'ordonnée à l'origine. Cet ajustement donne pour la pente : $\alpha = -(1.3 \pm 0.1).10^3$, ce qui correspond à $\frac{\delta\kappa}{\kappa_0} \approx -3.7$, hors du domaine d'application du modèle.*

de rigidité $\frac{\delta\kappa}{\kappa_0}$ par :

$$\alpha = \frac{\Sigma}{\sigma}\left[\left(1+\frac{\delta\kappa}{\kappa_0}\right)^{-1} - 1\right] \tag{4.13}$$

On trouve alors $\frac{\delta\kappa}{\kappa_0} \approx -3.7$. L'hypothèse de départ du modèle n'étant pas vérifiée, l'autocohérence n'est pas conservée. Ce modèle ne s'applique qu'à de faibles augmentations de la rigidité, ce qui n'est pas vérifié expérimentalement dans notre système.

– Supposons maintenant que les peptides soient agrégés sur la membrane, et que la dimension des agrégats soit supérieure à la plus grande longueur d'onde des fluctuations de la membrane $\xi_{||}$. On peut alors appliquer la formule 4.12 du modèle de Netz et Pincus pour ajuster nos résultats expérimentaux. Nous avons pris pour fraction surfacique de peptide celle correspondant à la fraction surfacique de membrane perturbée par le peptide $\phi_p = R\frac{\Sigma}{\sigma}$. Nous avons ajusté la variation de $\frac{\kappa_0}{\kappa_{eff}}$ en fonction

de R en réécrivant l'expression 4.12 sous la forme :

$$\frac{\kappa_0}{\kappa_{eff}} = \left[1 + R\frac{\Sigma}{\sigma}\left(\frac{1}{\sqrt{1+\frac{\delta\kappa}{\kappa_0}}} - 1\right)\right]^2 \tag{4.14}$$

L'ajustement est présenté sur la figure 4.18. Il donne pour la variation relative de rigidité $\frac{\delta\kappa}{\kappa_0} \approx -1$. Cette fois encore la valeur obtenue ne vérifie pas les hypothèses de départ, et l'autocohérence n'est pas conservée.

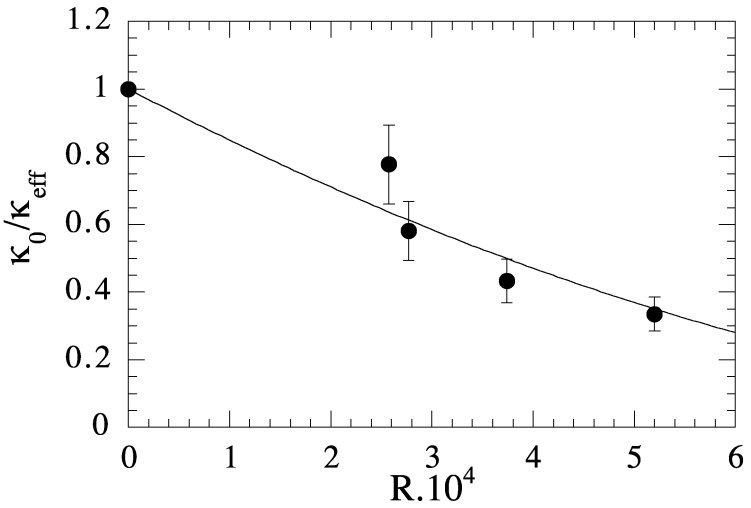


FIG. 4.18: *Variation de $\frac{\kappa_0}{\kappa_{eff}}$ en fonction du rapport molaire R. Le trait représente le meilleur ajustement à la formule 4.14, qui donne : $\frac{\kappa_0}{\kappa_{eff}} = [1 - (7.8 \pm 0.8).10^2 R]^2$, qui correspond à $\frac{\delta\kappa}{\kappa_0} \approx -1$, en désaccord avec les hypothèses initiales.*

En conclusion, bien que le modèle proposé par Netz et Pincus ajuste bien nos résultats, dans les cas d'inclusions non agrégées réparties aléatoirement, ordonnées ou agrégées, les valeurs de la variation relative de la rigidité sortent du cadre des hypothèses qui valident le modèle. Ce modèle, valable pour de faibles variations de la rigidité ($\frac{\delta\kappa}{\kappa_0} \ll 1$), ne peut donc pas s'appliquer à l'importante rigidification que nous avons observée expérimentalement.

Modèle de Chen

Chen a établi un modèle phénoménologique pour expliquer la variation de la rigidité de membrane de phases lamellaires décorées par des cylindres transmembranaires [143]. Les cylindres de rayon r_P et de hauteur d_m l'épaisseur de la membrane permettent de modéliser des protéines. Chen considère qu'il existe un couplage entre la fraction surfacique

de cylindres et la courbure de la membrane. Ce couplage peut être caractérisé par une constante λ_c.

Pour de petites fractions surfaciques ϕ de cylindres, le modèle prévoit une augmentation linéaire de la rigidité avec ϕ et avec la constante de couplage λ_c :

$$\kappa_{eff} = \kappa_0 + 2\lambda_c\phi \tag{4.15}$$

où $\lambda_c = \frac{3}{2}\kappa_0\frac{r_P^2}{r_1^2}$ pour $r_P >> r_1$, et κ_0 est la rigidité de la membrane nue, r_P le rayon du cylindre et r_1 est le rayon moyen de la tête polaire du tensioactif. Finalement, on obtient :

$$\kappa_{eff} = \kappa_0\left(1 + 3\frac{r_P^2}{r_1^2}\phi\right) \tag{4.16}$$

Le modèle prévoit aussi un amincissement de l'épaisseur des membranes, ainsi qu'une diminution de la périodicité, dus à la diminution du froissage de la membrane au fur et à mesure qu'elle se couvre de cylindres. L'épaisseur effective d_{meff} de la membrane décroît linéairement avec la fraction surfacique de cylindres. Quant à la périodicité d_B, elle diminue avec la fraction surfacique de cylindres selon une loi exponentielle. Les formules explicites n'ont pas été présentées car elles sont un peu longues et n'apporteraient rien à la compréhension.

Expérimentalement, nous n'observons pas de variation de la périodicité, et en plus l'épaisseur effective de la membrane augmente. De façon évidente, le modèle de Chen ne s'accorde pas à nos résultats expérimentaux.

Modèle de Sens et Turner.

Sens et Turner ont récemment développé un modèle afin de prévoir les modifications induites par des inclusions rigides sur les propriétés élastiques des phases lamellaires [142]. Ils se sont particulièrement intéressés aux modifications des spectres de diffusion aux petits angles. Les variations du paramètre de Caillé η ont été étudiées, ou plus exactement celle du produit des constantes élastiques $K\bar{B}$, relié on l'a vu à η par la formule de Caillé [65].

Trois types d'inclusions ont été considérées, deux symétriques et une asymétrique (figure 4.19).

- Les inclusions de type "pincement" et "gonflement" (figure 4.19 1)) ont le même effet sur les constantes élastiques : elles "ramollissent" la phase lamellaire, entraînant une diminution de $K\bar{B}$ modélisée sous la forme :

$$(K\bar{B})_P = \frac{K\bar{B}}{\left(1 + \chi\frac{c}{\bar{B}}\right)^2} \tag{4.17}$$

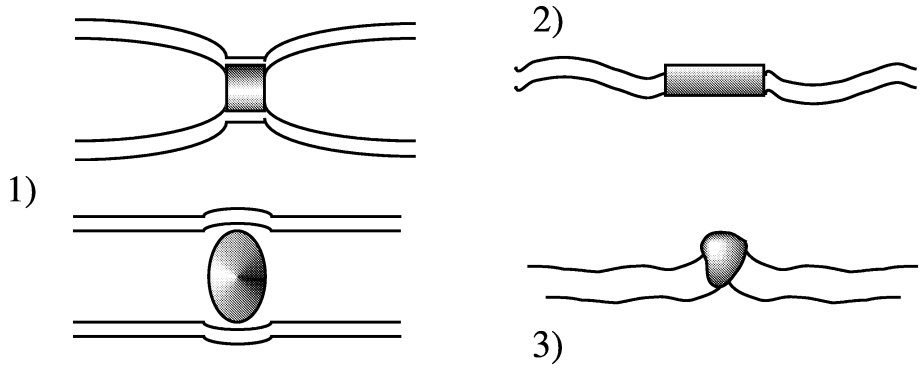


FIG. 4.19: *Représentation schématique des différents types d'inclusions considérées par Sens et Turner [142] : 1) pincement (haut) et gonflement (bas), 2) rigide, 3) courbure. Les deux premières sont des inclusions symétriques tandis que la dernière est asymétrique.*

où χ est une constante numérique, et c la concentration moyenne des inclusions. De telles inclusions entraînent un élargissement du quasi-pic de Bragg caractéristique de la phase lamellaire.

- Les inclusions dites rigides sont supposées rigidifier localement la membrane (figure 4.19), de sorte que, comme dans le modèle de Netz et Pincus [138], on leur associe une rigidité $\kappa_0 + \delta\kappa$. Ces inclusions "durcissent" l'ordre smectique de la phase lamellaire, ce qui entraîne un affinement du quasi-pic de Bragg. La variation du produit des constantes élastiques s'écrit alors si $\frac{\delta\kappa}{2\kappa_0}\phi << 1$:

$$(K\bar{B})_R = \frac{K\bar{B}}{\left(1 - \frac{\delta\kappa\phi}{2\kappa_0}\right)^2} \tag{4.18}$$

où ϕ est la fraction surfacique de membrane occupée par les inclusions.

- Quant aux inclusions de type courbure, asymétriques, leur effet ne se traduit pas par une renormalisation du produit des constantes élastiques. Sens et Turner ont cependant calculé une loi de Caillé où apparaît la signature des inclusions asymétriques. Ils insistent sur le faible effet de ce type d'inclusions, qu'ils supposent fort difficilement détectable expérimentalement.

Ce modèle assez complet est le seul avec celui de Chen [143] qui considère une phase lamellaire et non pas une membrane isolée. Les prédictions de Sens et Turner sont en outre assez facilement observables expérimentalement par des expériences de diffusion du rayonnement (sauf pour les inclusions de type courbure).

Nous nous sommes servis du modèle de Sens et Turner [142], pour ajuster nos résultats expérimentaux. Cette fois encore, la fraction surfacique de peptide a été remplacée par celle correspondant à la fraction surfacique de membrane perturbée par le peptide ϕ_p, déterminée expérimentalement à partir de l'augmentation de l'épaisseur effective de la membrane. A partir des valeurs du paramètre de Caillé η, nous avons calculé le produit $\kappa\bar{B}$ des constantes élastiques. La variation de $\kappa\bar{B}$ en fonction de R pour une fraction volumique de membrane $\phi_m = 0.38$ est reproduite sur la figure 4.20. Nous avons ajusté

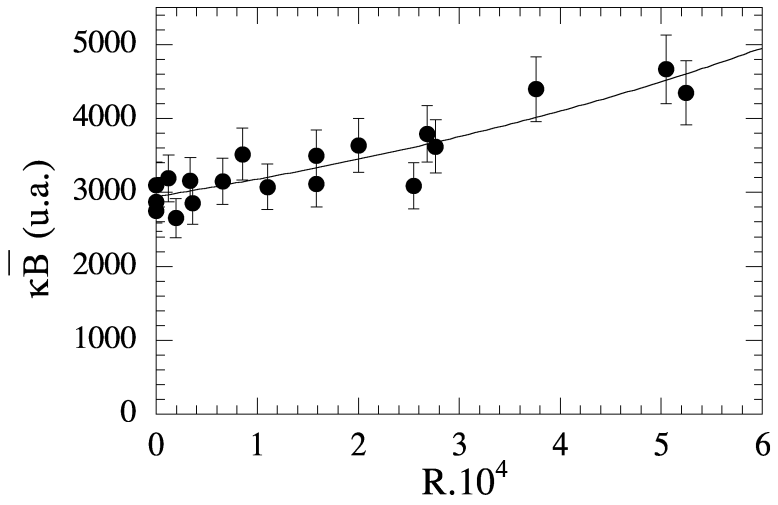


FIG. 4.20: *Variation de $\kappa\bar{B}$ en fonction de R, pour une fraction volumique de membrane fixée $\phi_m = 0.38$. Les points représentent les valeurs expérimentales déterminées à partir de l'ajustement du paramètre η par le fit de Nallet, tandis que la ligne est le meilleur ajustement par l'expression 4.18 du modèle de Sens et Turner. Les barres d'erreur proviennent de l'erreur sur la détermination de η. L'ajustement est très bon et donne : $\kappa\bar{B}_{eff} = (2950 \pm 50)\,(1 - (0.038 \pm 0.004)\ 10^4 R)^{-2}$ ce qui correspond à $\frac{\delta\kappa}{\kappa_0} = 0.8 \pm 0.08$. Comme $\phi_p < 0.5$, on a toujours $\frac{\delta\kappa}{2\kappa_0}\phi << 1$. Le modèle de Sens et Turner prévoit donc une rigidification locale de la membrane environ égale au double de la rigidité de la membrane "nue".*

cette variation par l'expression 4.18 du modèle de Sens et Turner. L'ajustement est très bon et donne $\kappa\bar{B}_{eff} = (2950 \pm 50)\,(1 - (0.038 \pm 0.004)\ 10^4 R)^{-2}$. La variation relative de rigidité déterminée vaut alors $\frac{\delta\kappa}{\kappa} \approx 0.8 \pm 0.08$. Etant donné qu'on a toujours $\phi_p < 0.5$, la condition $\frac{\delta\kappa}{2\kappa}\phi_p \ll 1$ est toujours vérifiée. La zone où le peptide perturbe la membrane a donc une rigidité sensiblement égale au double de celle de la membrane "nue".

Le modèle de Sens et Turner ajuste donc bien nos résultats expérimentaux mais ne permet malheureusement pas de déduire la variation de la rigidité de la membrane car

le module de compressibilité smectique varie simultanément. Par ailleurs ce modèle ne tient pas compte des interactions entre inclusions que Netz et Pincus considèrent pour une membrane isolée. Un modèle valable pour les phases lamellaires et tenant compte des interactions entre inclusions serait des plus souhaitables.

Modèle heuristique

Woo et al. [117] ont démontré en 1992 que la rigidité d'une membrane sèche de tensioactif devait varier comme la longueur l de la chaîne aliphatique à la puissance 3 : $\kappa \propto l^3$. Une modification de la monocouche de tensioactif pourrait donc avoir tendance à modifier la rigidité κ. Nous avons alors essayé de relier la rigidification de nos membranes à l'augmentation de leur épaisseur effective. La variation de $\Delta\kappa = \kappa(R) - \kappa(0)$ en fonction de $\Delta d_{meff} = d_{meff} - d_{m0}$, peut être ajustée par une loi de puissance (figure 4.21 a). L'ajustement donne :

$$\Delta\kappa \propto (\Delta d_{meff})^{2\pm0.4} \tag{4.19}$$

La loi de puissance donnée par l'ajustement est en assez bon accord avec les prévisions

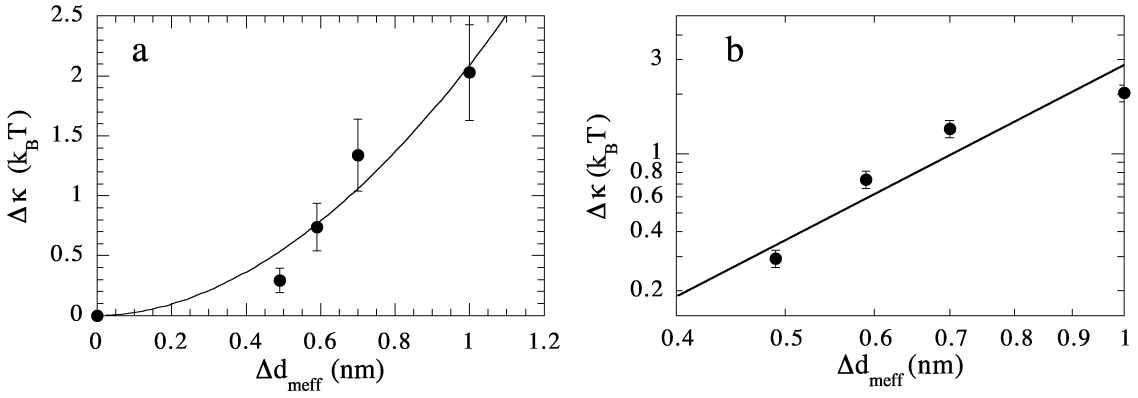


FIG. 4.21: *Variation de $\Delta\kappa = \kappa(R) - \kappa(0)$ en fonction de $\Delta d_{meff} = d_{meff} - d_{m0}$ en représentation linéaire a) ou log-log b). Dans le premier cas (a), la ligne correspond à l'ajustement par une loi de puissance d'exposant 2± 0.4. Dans le second cas (b), la droite a pour pente 3 et correspond aux prédictions de Woo et al. [117] pour les membranes sèches de tensioactifs . L'augmentation effective de l'épaisseur de la membrane expliquerait donc l'augmentation de la rigidité.*

de Woo et al. [117]. La différence pourrait s'expliquer par le faible nombre de points expérimentaux dont nous disposons. Par ailleurs, on peut tracer $\Delta\kappa$ en fonction de Δd_{meff} en représentation log-log : une droite de pente 3 passe assez bien par les points

expérimentaux (figure 4.21 b). Pour confirmer l'hypothèse que l'augmentation de la rigidité est liée à l'augmentation d'épaisseur de la monocouche, il serait pertinent de complèter ces mesures.

En conclusion, l'augmentation de la rigidité semble bien corrélée à l'augmentation de l'épaisseur effective de la membrane, et ce en bon accord avec les modèles existant pour des membranes sèches de tensioactifs. En revanche, le modèle de Netz et Pincus n'est pas à même d'expliquer l'importante rigidification observée expérimentalement. Ce modèle n'est en effet valable que pour de faibles rigidifications de la membrane. Son extension à une plus large gamme de rigidités serait souhaitable.

4.7 Conclusion

Nous avons fait synthétiser un peptide tribloc hydrophobe-hydrophile-hydrophobe globalement neutre. Les spectres de dichroïsme circulaire, réalisés dans le lointain ultraviolet, indiquent que le peptide se trouve dans une forme désorganisée en solution aqueuse, tandis que sa partie hydrophile s'organise en hélice α rigide, en présence de membranes de tensioactifs.

De par son caractère amphiphile, ce peptide se place aux interfaces hydrophile-hydrophobe. Des mesures de tension superficielle, à l'interface entre l'eau et le décane, ont en effet montré que sa dissolution dans l'eau, en faibles concentrations, entraîne une diminution de la tension de surface eau-décane. Les spectres de fluorescence des tryptophanes présents dans la séquence du peptide, réalisés dans l'eau et dans la phase éponge, soulignent le changement d'environnement pour ces acides aminés dans les phases de membranes fluides. Dans les phases lamellaire et éponge, le peptide couche sa partie hydrophile, organisée en hélice α rigide, sur la surface de la membrane. En ce qui concerne ses extrémités hydrophobes, aucun élément ne nous permet de trancher entre une insertion dans la membrane ou une simple adsorption sur celle-ci.

L'effet du peptide, en tant qu'inclusion, sur les propriétés élastiques de la phase lamellaire a été étudié en détail. Son insertion dans la phase lamellaire entraîne une diminution du paramètre de Caillé η, linéaire en concentration de peptide. Nous avons vérifié que cette diminution n'était pas d'origine électrostatique. La phase lamellaire décorée par le peptide continue à être principalement stabilisée par les répulsions stériques entre membranes. La diminution de η a pu être interprétée par une augmentation de l'épaisseur effective de la membrane induite par le peptide [13]. Un modèle géométrique simple de membrane décorée nous a permis d'estimer à 13 nm le rayon de la perturbation induite par le peptide sur la membrane. Cette valeur est en bon accord qualitatif avec les modèles théoriques qui

prévoient la portée de la perturbation d'une inclusion transmembranaire [137][139]. Par ailleurs, la diminution du paramètre de Caillé est bien ajustée par le modèle théorique élaboré par Sens et Turner [142] et s'explique par un doublement local de la rigidité de la membrane, induit par la présence du peptide. Ce modèle ne permet malheureusement pas de prévoir la variation de la rigidité de la membrane.

Le peptide induit aussi une importante augmentation de la rigidité κ de la membrane, linéaire en concentration de peptide : la rigidité triple pour un rapport molaire peptide-tensioactif aussi faible que $5.2\ 10^{-4}$. A ce jour, les modèles théoriques connus, considérant l'effet d'inclusions rigides sur les propriétés élastiques d'une phase L_α, ne permettent pas d'expliquer une augmentation aussi importante. Leurs hypothèses sont en effet très restrictives et ne rendent compte que de faibles augmentations de la rigidité. Nous avons cependant pu expliquer l'augmentation de la rigidité par l'augmentation de l'épaisseur effective de la membrane provoquée par l'insertion du peptide, en utilisant les prédictions théoriques de Woo et al. [117] pour les membranes sèches de tensioactifs. Des mesures complémentaires s'avèrent nécessaires pour confirmer cette explication.

Quant au module de compressibilité smectique $\bar{B}$, il diminue avec la concentration de peptide, indiquant un affaiblissement des interactions entre membranes décorées. A un préfacteur numérique près, cette diminution est très bien ajustée par les prédictions de Helfrich, en tenant compte à la fois de la rigidification de la membrane et de l'augmentation de son épaisseur effective. L'explication de cette différence de préfacteur entre la théorie et l'expérience reste à élucider.

Les expériences de RMN du deutérium avec du décane deutérié ne nous ont pas permis de confirmer quantitativement la rigidification de la membrane, il faudrait envisager de réaliser les mêmes expériences avec du $C_{12}E_4$ deutérié. La quantification de cette rigidification par des expériences de diffusion de la lumière sur des phases lamellaires non orientées ou des phases éponges, en utilisant le modèle de Zilman et Granek [148] est aussi envisageable. Il serait intéressant d'élargir cette étude à des peptides de structure similaire (hydrophobe-hydrophile-hydrophobe), en faisant varier la longueur de la partie hydrophile rigide organisée en hélice α. Le rôle exact des parties hydrophobes pourrait aussi être étudié en reprenant la même séquence et en éliminant une des extrémités hydrophobes. On pourrait aussi essayer d'obliger une tel peptide hydrophobe-hydrophile-hydrophobe à ne pas se coucher sur la membrane, mais à y rester perpendiculaire, de façon à ponter deux membranes entres elles : par exemple en chargeant la surface de la membrane et la partie hydrophile du peptide avec des charges de même signe. Nous pourrions alors comparer les "boutons-pressions" ainsi formés dans une phase lamellaire directe à ceux ayant déjà été étudiés dans les phase lamellaires inverses [15][16].

Chapitre 5

La protéine LH2

5.1 Introduction

Dans la continuité du travail réalisé sur la phase lamellaire contenant le peptide tribloc, en collaboration avec Françoise Reiss-Husson (Centre de Génétique Moléculaire, Gif sur Yvette), nous nous sommes attachés à l'étude de l'insertion de la protéine transmembranaire collectrice de la lumière LH2 de Rubrivivax Gelatinosus dans une phase cubique de monooléine. Des essais ont aussi été tentés dans les phases lamellaire et éponge des systèmes $C_{12}E_4$-eau-décane et $C_{12}E_2$-eau.

Ce travail résulte de deux motivations principales.

- Récemment Landau et Rosenbuch [149] ont montré que l'inclusion de la bactériorhodopsine dans une phase cubique de monooléine permettait d'obtenir des cristaux diffractant à haute résolution [150][151][152], alors que cette protéine est notoirement difficile à cristalliser en solution de détergent. Avant de faire de tels essais sur le LH2 nous avons voulu vérifier si on pouvait l'incorporer dans cette phase et sous quelle forme.
- Par ailleurs, il nous semblait intéressant d'étudier les modifications que pouvait engendrer l'insertion de protéines dans la phase cubique, comme nous l'avions fait en nous intéressant aux modifications entraînées par l'insertion du peptide tribloc dans les phases de membranes fluides. En effet les travaux sur la cristallisation ont négligé l'aspect concernant d'éventuelles modifications structurelles entraînées par la protéine sur le milieu et du milieu sur la protéine. Des expériences de spectroscopie d'absorption et de fluorescence ont été réalisées sur le LH2, en solution d'octylglucoside (utilisée comme contrôle) et après incorporation dans la phase cubique. De plus, cette incorporation a été étudiée en mesurant le coefficient de diffusion de la

protéine dans la phase cubique par des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchîment. Ce type d'expérience nous permet de vérifier l'incorporation dans la membrane de monooléine, mais aussi de déterminer la taille de la protéine dans une telle matrice et donc d'avoir une idée de sa structure dans cet environnement.

5.2 Structure du LH2

L'antenne collectrice de lumière LH2 (de l'anglais Light Harvesting complex) de la bactérie pourpre, Rubrivivax gelatinosus, est une protéine membranaire ou plus exactement **un complexe pigment-protéine** oligomérique. Ce complexe appartient à une classe structurale commune aux bactéries pourpres qui a été résolue par rayons X, au niveau atomique pour deux espèces [153][154], et à moins bonne résolution pour deux autres [155][156]. Le LH2 peut être considéré comme un modèle de protéine transmembranaire très hydrophobe, présentant des domaines hydrophiles réduits. Les complexes se trouvent en général sous forme oligomérique, avec pour unité de base un hétérodimère composé de deux polypeptides courts (notés α et β), contenant chacun une hélice α transmembranaire. Les hétérodimères s'associent par 8 [154] ou 9 [153][155][156] selon les espèces, de manière à former un cylindre creux dont l'axe est à peu près parallèle à ceux des hélices α transmembranaires. La hauteur du cylindre est estimée à 5 nm tandis que son diamètre extérieur vaut environ 8 nm. La surface extérieure du cylindre est formée des sous-unités β tandis que les sous-unités α composent sa surface intérieure (figure 5.1).

Les pigments, composés de trois bactériochlorophylles, notées Bchl, et d'un caroténoïde par hétérodimère, sont enfouis à l'intérieur des hélices, dans les sites d'attache hydrophobes présents dans les deux sous-unités (figure 5.1). Ils sont liés comme cofacteurs au LH2 et sont des indicateurs très sensibles de l'état natif, car ils présentent des bandes d'absorption caractéristiques, qui se déplacent s'ils sont relâchés hors de leur site protéique. Les Bchls sont distribuées dans deux zones de structure et de propriétés spectrales différentes. La première zone forme un anneau de molécules prises en sandwich entre les hélices hydrophobes α et β. Ces Bchls absorbent dans l'infrarouge autour de 850 nm, on les appelle B850. Les autres Bchls se trouvent plus proches de la face cytoplasmique de la membrane et forment un second anneau entre les hélices β, elles absorbent à 800 nm et sont donc nommées B800. Quant au caroténoïde, il s'étend sur toute la région transmembranaire. Dans cette configuration, l'énergie lumineuse est transférée des pigments absorbant à courte longueur d'onde (caroténoïde et Bchl-B800) vers ceux absorbant à

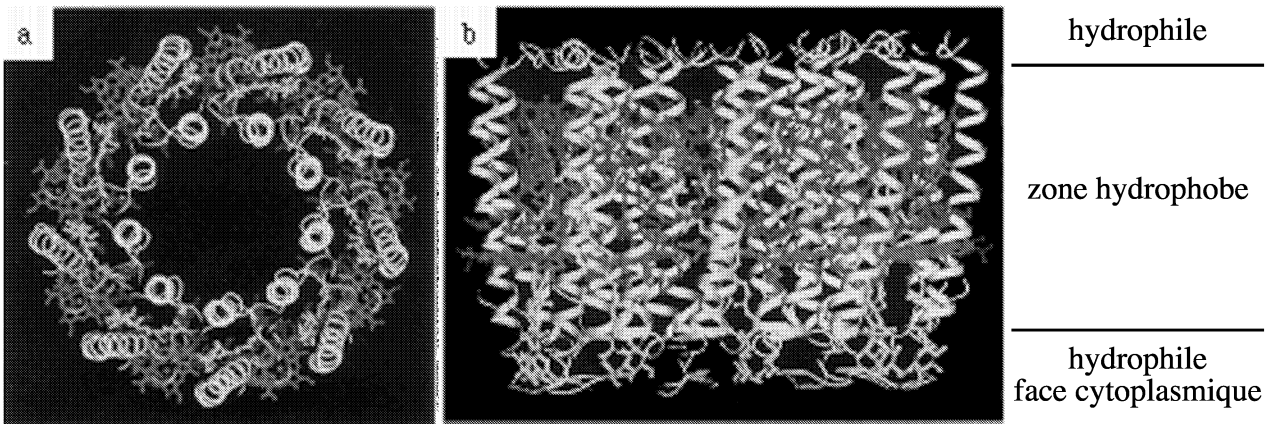


FIG. 5.1: *Complexe nonamérique de LH2 (d'après Mc Dermott et al. [153]), la structure a été déterminée par diffraction de rayons X sur la protéine cristallisée. Vue de dessus (à gauche) ou de côté (à droite). Les unités de protéine du complexe sont représentées en blanc, tandis que les Bchl-B800 sont en vert, les Bchl-B850 en rouge et les caroténoïdes en jaune. L'oligomère peut être modélisé par un cylindre creux de hauteur 5 nm et de diamètre extérieur 8 nm.*

plus grande longueur d'onde (Bchl-B850). Dans le LH2 isolé, cette énergie est finalement réémise sous forme de fluorescence à 850 nm par la Bchl-B850. Nous présenterons les spectres caractéristiques du LH2, dans les parties suivantes de ce chapitre. Les techniques de spectroscopie d'absorption et de fluorescence ont été utilisées pour tester l'état dans lequel se trouvait le LH2 dans les phases dans lesquelles nous l'avons introduit et déceler de potentiels changements de structure du complexe.

5.3 Le LH2 en solution d'octylglucoside.

5.3.1 Présentation du système.

La protéine LH2 purifiée est en solution dans un tampon 1,3-bis-[tris(hydroxymethyl)-methylamino]-propane 50 mM (M=282.3), que l'on notera dorénavant BisTris, à pH=9. Ce tampon contient 8 mg/ml d'octyl-β-D-glucopyranoside (ou octylglucoside noté OG, M=292.4, cmc 26 mM i.e. 7.8 mg/ml [157], formule chimique en annexe B), 1 mM d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique, M=292.2) et 0.1 M de NaCl, ainsi que 0.1% de NaAzide pour éviter la croissance de microorganismes. La purification a été réalisée en tensioactif LDAO (lauryl diméthylamine oxyde) selon un protocole publié en 1996[158], puis le LDAO a été échangé contre de l'OG soit par adsorption de la protéine sur des

colonnes de DEAE-Sepharose, soit par des cycles de concentration/dilution à travers des membranes d'ultrafiltration. Différentes études ont montré que la protéine solubilisée dans ces détergents conservait ses propriétés d'absorbance et de transfert d'énergie [159][158]

L'octylglucoside est un tensioactif non ionique. Des solutions aqueuses d'OG ont été étudiées par diffusion dynamique de la lumière et sédimentation par Kameyama et Tagaki [157]. Ils ont montré que l'OG formait des micelles sphériques de rayon hydrodynamique 2.35 nm à 22°C. Le LH2 n'étant pas complètement hydrophobe, il ne se trouve probablement pas dans les micelles d'OG mais les monomères d'OG s'adsorbent plutôt sur la protéine de manière à protéger ses zones hydrophobes. On peut imaginer que la protéine est comme entourée d'une "ceinture" d'OG (figure 5.2), avec éventuellement du tensioactif adsorbé sur l'intérieur du cylindre creux.

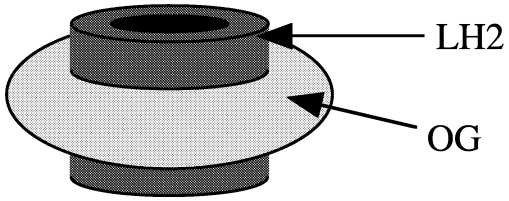


FIG. 5.2: *Représentation schématique du complexe LH2-octylglucoside : Une "ceinture" d'octylglucoside, adsorbée sur la protéine, protège ses parties hydrophobes et lui permet de rester stable en solution aqueuse. Il est possible que l'OG s'adsorbe également à l'intérieur du cylindre.*

Nous avons mesuré le spectre d'absorption du LH2 dans le tampon (figure 5.3). Il est identique à celui de la protéine dans son environnement membranaire naturel (comme prévu), et servira donc d'état de contrôle. On observe les bandes d'absorption des caroténoïdes : un massif comportant trois pics à 460 nm, 487 nm et 518 nm (figure 5.3). On distingue aussi l'absorption de la bactériochlorophylle à 365 (bande de Soret), 590 nm (bande Q_x), 800 nm et 854 nm (figure 5.3). Les deux premières bandes sont communes à toutes les Bchl, les deux dernières correspondent respectivement à la Bchl-B800 et la Bchl-B850. La mesure de l'absorption à 854 nm permet de mesurer la concentration de protéine connaissant le coefficient d'extinction molaire d'un hétérodimère $\epsilon_{LH2} = 382000$ à 854 nm [160]. Le poids moléculaire d'un hétérodimère ($\alpha\beta$) valant 12464 Da (d'après sa séquence [159]), une concentration de protéine de 1 mg/ml correspond à une absorbance 30.6 à 854 nm sur 1 cm de chemin optique (voir chapitre 2).

Le spectre d'émission de fluorescence réalisé en excitant à 488 nm dans les bandes d'absorption des caroténoïdes est présenté sur la figure 5.4, le pic présent correspond à la fluorescence naturelle du LH2 dans l'infrarouge à 854 nm, on observe aussi une émission

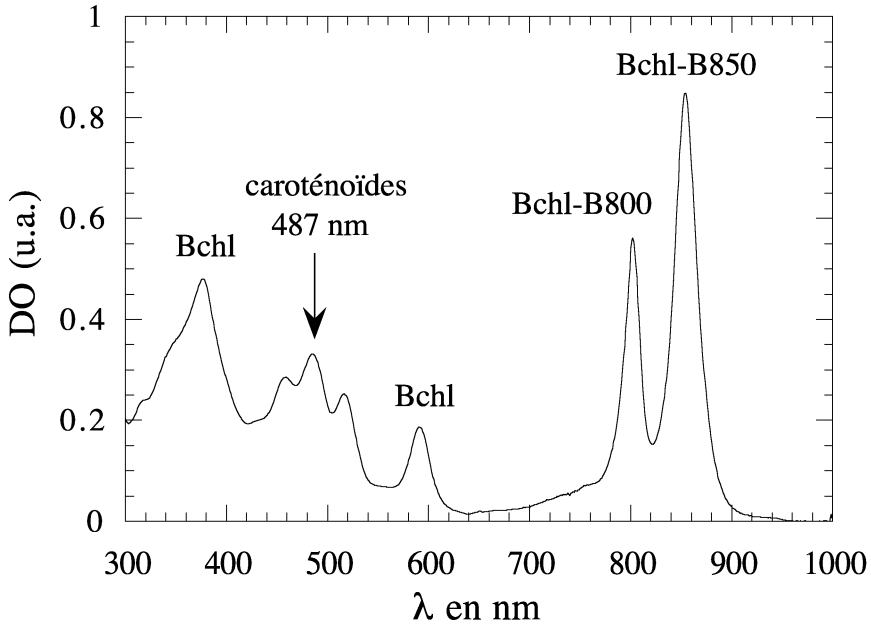


FIG. 5.3: *Spectre d'absorption du LH2 à 0.27 mg/ml en solution d'OG dans le tampon BisTris. On distingue les bandes d'absorption caractéristiques des caroténoïdes (460, 487 et 518 nm) et de la bactériochlorophylle (365, 590, 800 et 854 nm). Les deux premières bandes de la Bchl sont peu sensibles à l'environnement, contrairement aux deux dernières.*

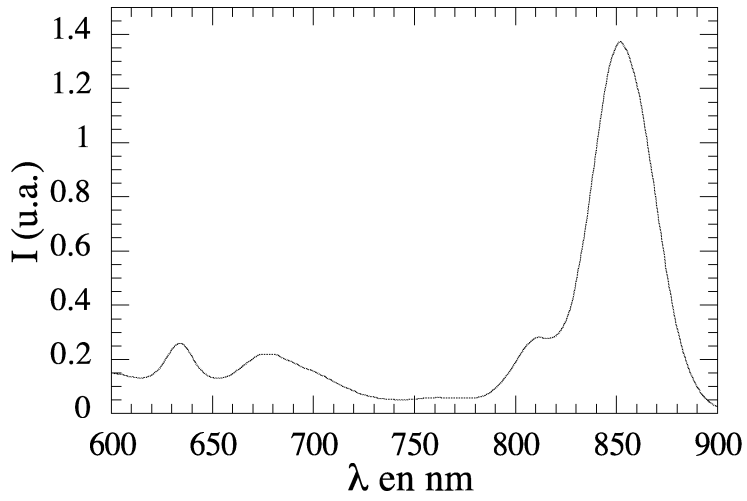


FIG. 5.4: *Spectre d'émission de fluorescence du LH2 en tampon BisTris (excitation à 488 nm). La fluorescence naturelle du LH2 est observable à 854 nm. Ce spectre sera utilisé comme contrôle.*

mineure vers 810 nm provenant d'une faible partie des Bchl-B800 ne transférant pas d'énergie aux Bchl-B800.

5.3.2 Taille du complexe LH2-OG.

Afin de déterminer l'effet du tensioactif sur la protéine, nous nous sommes intéressés à la taille du complexe formé par le LH2 et l'octylglucoside. Ceci permet de vérifier si la protéine est sous forme oligomérique ou monomérique. Plusieurs types d'expériences étaient envisageables : la diffusion dynamique de la lumière, la diffusion de rayons X aux petits angles, ou le recouvrement de fluorescence après photoblanchîment. La diffusion de la lumière a été écartée à cause de des propriétés d'absorption et de fluorescence de la protéine. Quant à la diffusion de rayons X aux petits angles, la faible différence de densité électronique entre le complexe et le solvant, à laquelle s'ajoutait la faible concentration de complexe, nous ont fait perdre tout espoir d'obtenir une quelconque information : les spectres étaient dominés par le bruit de fond et donc il était impossible d'en tirer le moindre renseignement. Toutes ces raisons nous ont incités à nous tourner vers le recouvrement de fluorescence. Ces expériences ont été mises au point en utilisant la fluorescence naturelle du LH2 émise par la BChl-B850 autour de 850 nm (figure 5.4), en excitant à 488 nm dans la bande d'absorption des caroténoïdes[1].

Dans les expérience de recouvrement de fluorescence, le coefficient de diffusion mesuré expérimentalement ne permet pas, la plupart du temps, d'obtenir directement le rayon hydrodynamique de l'objet diffusant. En effet le coefficient de diffusion peut être écrit comme un développement au premier ordre en la fraction volumique ϕ de complexe, de la façon suivante :

$$D = D_O(1 + \alpha\phi + \ldots) \tag{5.1}$$

où α est un coefficient lié aux interactions entre objets diffusants. Pour les sphères dures, les nombreux modèles théoriques prévoient un coefficient α compris entre -2.5 et -1 [161]. Il est donc de rigueur de mesurer le coefficient de diffusion pour plusieurs concentrations de complexes et d'extrapoler à concentration nulle pour obtenir D_0 et le rayon hydrodynamique R_{H0}, relié à D_0 par la formule de Stokes-Einstein [162] :

$$D_O = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_{H0}} \tag{5.2}$$

où η est la viscosité du solvant (ici η=1 cP pour le tampon).

[1]Pour ces mesures deux détecteurs ont été testés : un photomultiplicateur Philips dont la sensibilité était faible à 850 nm, puis une photodiode Hamamatsu C-5401 de réponse plus adaptée. Les deux détecteurs ont donné les mêmes résultats.

Etant données les faibles fractions volumiques de complexe pour lesquelles nous avons travaillé ($\phi_{LH2-OG} \approx 10^{-3}$), nous avons considéré que les micelles étaient suffisamment peu nombreuses et assez éloignées les unes des autres pour que les interactions entre elles soient négligeables. On peut alors considérer que le coefficient d'autodiffusion mesuré correspond à D_0. Nous avons pu déterminer un coefficient d'autodiffusion du complexe :

$$D_{LH2} = 7 \pm 0.4\ 10^{-7} cm^2 s^{-1}$$

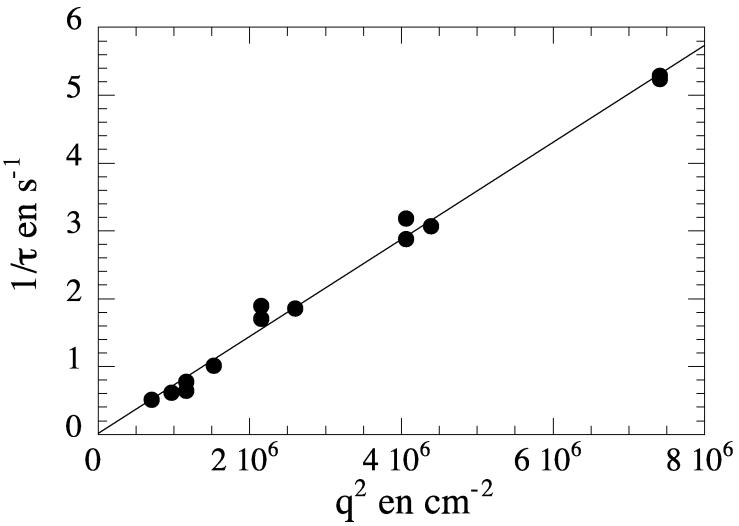


FIG. 5.5: *Points expérimentaux obtenus lors de l'expérience de recouvrement de fluorescence sur la solution micellaire d'OG contenant le LH2 à 20°C. La droite est le meilleur ajustement linéaire, de sa pente on détermine le coefficient d'autodiffusion des micelles mixtes LH2-OG.*

Si on considère que le complexe est sphérique, par la formule de Stokes-Einstein (équation 5.2), cette valeur de D_{LH2} retourne un rayon hydrodynamique R_{H0}=3.1±0.2 nm. On peut raffiner ce modèle sachant que les résultats de diffraction de rayons X sur les cristaux de LH2 font pencher vers un cylindre creux de hauteur 5 nm et de diamètre 8 nm [153]. Nous avons alors considéré le LH2 entouré de sa "ceinture" d'OG comme un ellipsoïde de révolution de demi axes a=2.5 nm et b. Si on utilise alors les formules de Perrin qui relient le coefficient d'autodiffusion aux dimensions de l'ellipsoïde [163][164][165], on obtient :

$$D_O = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} G(\rho) \text{ où } \rho = \frac{b}{a} \tag{5.3}$$

et si $\rho > 1$ (ellipsoïde oblate ou citrouille)

$$G_O(\rho) = \rho\sqrt{\rho^2 - 1}\arctan\left[\sqrt{\rho^2 - 1}\right] \tag{5.4}$$

et si $\rho < 1$ (ellipsoïde prolate ou cigare)

$$G_P(\rho) = \frac{1}{\sqrt{1-\rho^2}} ln \left[\frac{1+\sqrt{1-\rho^2}}{\rho} \right] \tag{5.5}$$

Cette dernière fonction $G_P(\rho)$ est toujours supérieure à 1.

Dans le cas présent, on trouve $G(\rho) = 0.816 \pm 0.047$. $G(\rho) < 1$ correspond à un ellipsoïde de forme oblate avec $\rho = 1.32 \pm 0.1$, et on obtient finalement b=3.3 $\pm$ 0.1 nm. Le complexe OG-LH2 peut donc être modélisé comme un ellipsoïde oblate de 5 nm de longueur sur 6.6 nm de largeur. L'ordre de grandeur des dimensions du complexe est en très bon accord avec les données cristallographiques [153][154].

Il nous a semblé intéressant de comparer les dimensions que nous venons de déterminer, à celles du complexe formé par le LH2 et un autre détergent, le LDAO. En solution micellaire dans le LDAO, un coefficient de diffusion égal à 2.5 10^{-7}cm^2.s^{-1} a été mesuré pour le LH2, par vitesse de sédimentation. Le poids moléculaire déterminé par cette méthode a été interprété comme étant celui d'une assemblée heptamérique [166]. Si on applique le même modèle ellipsoïdal à ce coefficient de diffusion, on obtient encore un ellipsoïde oblate, de 5 nm de longueur sur 5.4 nm de largeur. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles déterminées précédemment. Comme le complexe LH2-LDAO est sous forme heptamérique, la valeur du coefficient de diffusion déterminée par FRAPP, et les dimensions associées, nous font penser que le complexe LH2-OG est sous forme octamérique. Des différences d'hydratation des têtes polaires du détergent ou de pénétration des chaînes aliphatiques dans les parties hydrophobes de la protéine peuvent aussi expliquer les petites différences de dimension. Les dimensions obtenues sont du même ordre de grandeur que celles déterminées à partir des modèles cristallographiques pour une assemblée nonamérique [153][154] quoique un peu inférieures. Ceci va dans le sens d'une structure 3-D plus compacte des oligomères en solution micellaire.

C'est la solution micellaire d'OG que nous avons utilisée pour préparer la phase cubique contenant le LH2.

5.4 La phase cubique

Parmi toutes les mésophases formées en solubilisant un tenisoactif dans l'eau, les phases découvertes dans les années soixante par l'équipe de Vittorio Luzzati [167] sortent un peu du lot. En effet, elles présentent des pics de Bragg caractéristiques de la symétrie cubique. Ces phases sont optiquement isotropes (noires entre polariseurs croisés) et très visqueuses. Six phases cubiques ont été identifiées à ce jour, trois de type "micellaire" et trois de

type bicontinu [168][169]. Très schématiquement, on peut imaginer les phases cubiques micellaires comme un arrangement cubique de micelles de tensioactif entourées d'eau. Dans les phase cubiques dites bicontinues, une bicouche de tensioactifs sépare l'espace en deux sous-espaces d'eau distincts, complètement déconnectés l'un de l'autre (figure 5.6). En réalité, les structures formées sont beaucoup plus complexes, nous renvoyons au travail de Mariani et al. [169] pour plus de détails.

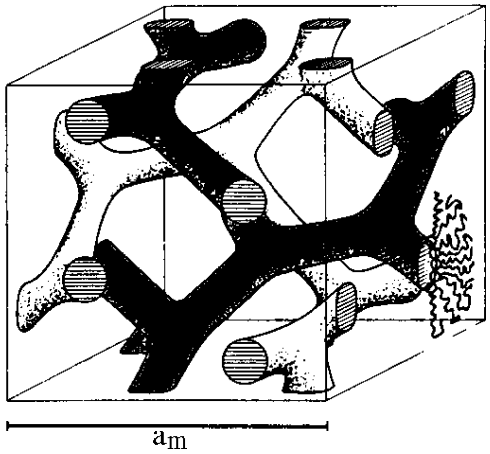


FIG. 5.6: *Représentation schématique d'une maille de la phase cubique bicontinue de type Q230 (notée aussi Ia3d), d'après Seddon [170]. Les deux sous espaces d'eau sont représentés en blanc et noir. On voit bien qu'ils sont complètement déconnectés.* a_m *est le paramètre de maille.*

Nous nous sommes intéressés aux phases cubiques bicontinues car elles ont servi de matrice à Landau et Rosenbuch pour la cristallisation de la bactériorhodopsine [149]. Dans le système eau-monooléine (notée MO) qu'ils ont utilisé, deux phases cubiques bicontinues sont présentes : la Q230 (notée aussi Ia3d d'après le groupe de symétrie auquel elle appartient) de structure cubique corps centré, et la Q224 (notée aussi Pn3m) de structure cubique primitive. De nombreux auteurs se sont attaqués au diagramme de phase du système eau-MO [171][172][25][173]. Nous avons utilisé le diagramme de phases déterminé par Briggs et al. en 1996 [25], complété par Qiu et Caffrey en 2000 [173], il est reproduit sur la figure 5.7.

Il est intéressant de noter que les bicouches dans les phases cubiques bicontinues peuvent être modélisées par des surfaces minimales. Charvolin et Sadoc ont par exemple montré que la surface passant par le milieu de la bicouche était une surface minimale [174]. En ce qui concerne la phase Q230, elle correspond à la surface dite gyroïde [175] qui est représentée sur la figure 5.8. C'est la phase Q230 que nous avons choisie pour y

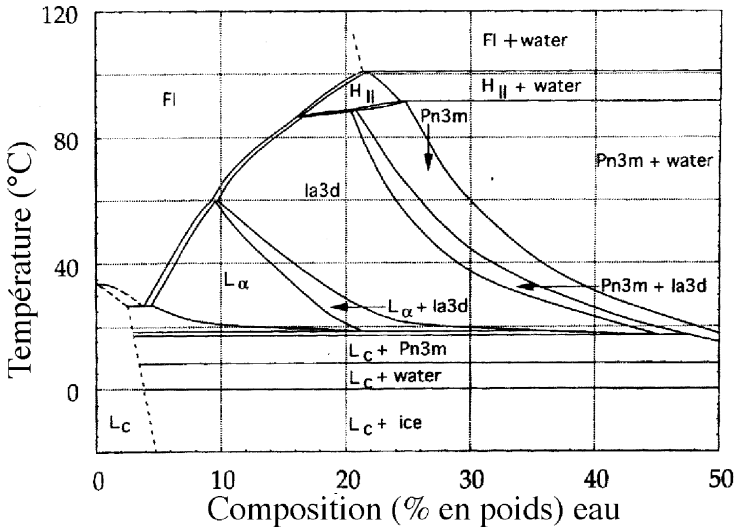
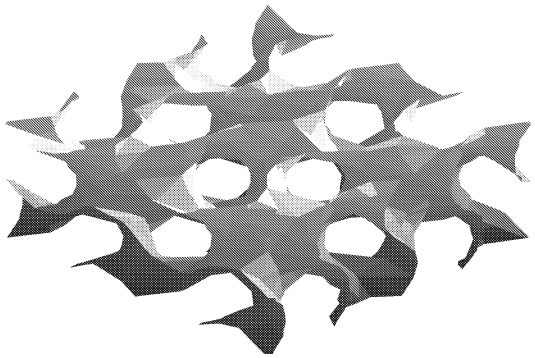


FIG. 5.7: *Diagramme de phase du système MO-eau déterminé par Qiu et Caffrey [173]. HII correspond à la phase hexagonale, L_α à la phase lamellaire, L_c à une phase lamellaire comportant un ordre cristallin dans le plan des lamelles et FI à une phase fluide isotrope. Ia3d et Pn3m sont respectivement les phases cubiques Q230 et Q224.*



sin(x)cos(y)+sin(y)cos(z)+sin(z)cos(x)=0

FIG. 5.8: *Surface minimale de type gyroïde qui correspond à la phase cubique Q230 ainsi que l'équation qui la caractérise.*

insérer le LH2 car elle occupe un domaine assez étendu dans le diagramme de phases, notamment autour de la température ambiante (figure 5.7).

5.4.1 Modes de préparation de la phase cubique.

Nous avons utilisé deux méthodes de préparation de la phase cubique.

- La première méthode de préparation est la technique classique [176][149] qui consiste à hydrater la monooléine anhydre avec la quantité désirée de tampon en centrifugeant le mélange à 24°C. La centrifugation dure environ 3 heures à 10000 g.
- L'autre technique de préparation utilise un mélangeur constitué de deux seringues reliées en vis à vis. Cheng et al. ont décrit en détail ce montage en 1998 [177] ; mais le mélangeur a déja utilisé auparavant avec succès [25]. Le montage est très simple : deux férules par lesquelles passe une aiguille de diamètre intérieur 0.41 mm sont soudées entre elles (figure 5.9). On visse cette double férule sur l'une des seringues.

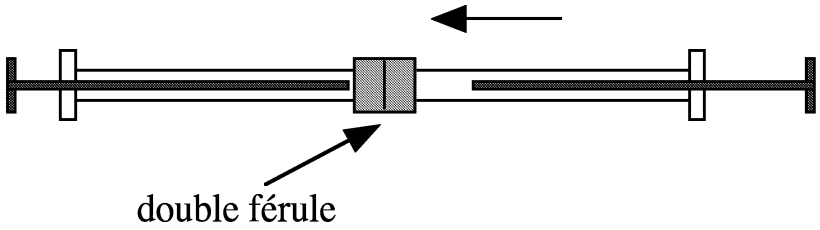


FIG. 5.9: *Représentation schématique du mélangeur double seringue inventé par Cheng et al. [177] pour préparer des phases cubiques.*

Puis, la monoléine est pesée dans cette seringue. On prélève alors la solution aqueuse avec l'autre seringue, et l'on pèse la quantité désirée pour obtenir la phase cubique. On relie enfin les seringues au moyen de la double férule (figure 5.9), puis on hydrate la monooléine anhydre en injectant la solution aqueuse dans la première seringue. On fait ensuite subir au mélange une centaine d'allers-retours jusqu'à ce qu'il soit bien homogène. Comme le corps des seringues est en verre transparent, on peut s'assurer de l'homogénéité du mélange et, en plaçant la seringue entre polariseurs croisés, on peut vérifier que le mélange est isotrope. En revissant une aiguille sur la seringue contenant l'échantillon, on transfère alors la phase cubique dans le porte échantillon désiré (capillaire RX ou cellule de FRAPP). Cheng et al. [177] ont vérifié que cette dernière méthode donnait les mêmes résultats que la centrifugation et notamment que les allers et retours n'entraînaient pas d'échauffement de l'échantillon, donc de déshydratation du mélange.

5.4.2 Résistance de la phase cubique aux additifs

Afin de tester d'éventuels changements de structure de la phase cubique induits par les composants du tampon BisTris, nous avons préparé différentes phase cubiques à environ 66% de monooléine en poids à 20°C. Cette température et cette composition ont été choisies car des récentes expériences ont prouvé la métastabilité de certaines mésophases du système MO-eau en dessous de cette température [173]. Les densités des différentes solutions aqueuses ont été supposées égales à 1 mg/ml. Une phase cubique préparée avec de l'eau a été utilisée comme échantillon de contrôle. Nous avons préparé des phases cubiques avec du BisTris 50 mM à pH=9, 1 mM EDTA et 0.1 M NaCl, à différentes concentrations d'octylglucoside (0, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml, 12 mg/ml et 16 mg/ml). Aux erreurs de concentration près, les spectres de diffusion des rayons X aux petits angles sont absolument identiques . Un spectre typique de ceux que nous avons obtenus est reproduit sur la figure 5.10, on y distingue six pics de Bragg dont les positions correspondent aux vecteurs d'onde q_i. Les rapports $\frac{q_i}{q_1}$ de ces vecteurs d'onde valent respectivement : 1.162, 1.538, 1.658, 1.854 et 1.94 pour i allant de 2 à 6, ils correspondent approximativement aux rapports suivants : $\sqrt{\frac{4}{3}}$, $\sqrt{\frac{7}{3}}$, $\sqrt{\frac{8}{3}}$, $\sqrt{\frac{10}{3}}$ et $\sqrt{\frac{11}{3}}$. Ces rapports sont typiques d'une structure cubique corps centré [178]. On a donc bien préparé la phase cubique Q230 présente dans le système MO-eau, et ce quelle que soit la concentration d'OG dans le tampon. Quant aux rapports $\frac{q_i}{q_1}$, ils permettent d'indexer les pics par les indices (hkl) suivants : (211), (220), (321), (400), (420) et (332), comme indiqué sur la figure 5.10. Dans le tableau 5.4.2, on a reporté les différents indices ainsi que les distances de Bragg correspondant aux pics et enfin le paramètre de maille a_m. Celui-ci est relié aux indices ($h_i k_i l_i$) et à la position q_i du pic par la formule suivante :

$$a_m = \frac{2\pi}{q_i}\sqrt{h_i^2 + k_i^2 + l_i^2} \tag{5.6}$$

On trouve a_m=13.1 $\pm$ 0.3 nm, cette valeur est en bon accord avec le paramètre de maille déterminé par Larsson [172], mais un peu plus petite que celui déterminé par Briggs et al. [25]. Ce léger désaccord peut provenir des erreurs de pesée, mais aussi d'une hydratation non désirée de la monooléine lors des décongélations-recongélations. Cependant l'erreur est minime et n'intervient pas dans les mesures que nous avons réalisées.

En conclusion, lorsque la phase cubique Q230 est préparée avec un tampon contenant de faibles concentrations d'additifs (sel, tensioactifs), sa structure est conservée et ce jusqu'à 16 mg/ml d'OG dans le tampon BisTris. Ceci a déjà été montré par Landau et al. [179]. Nous avons effectivement travaillé à de faibles concentration d'OG et de sel. A de plus fortes concentrations de tensioactifs, la phase cubique peut être déstabilisée : Ai

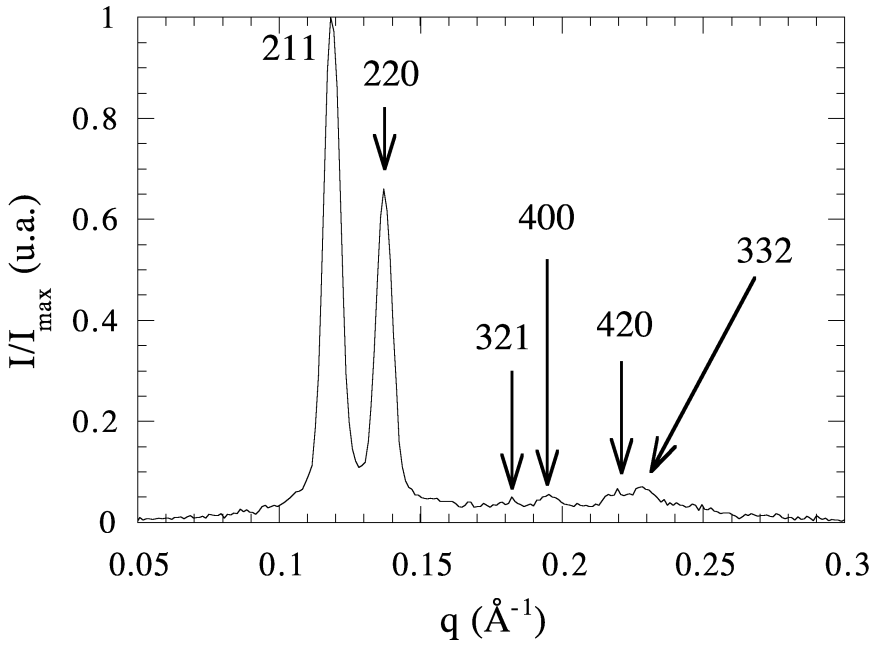


FIG. 5.10: *Spectre de diffusion des rayons X aux petits angles, typique d'une phase cubique à environ 33% de solution aqueuse. Le spectre a été normalisé par rapport à l'intensité maximale. Les pics sont indexés.*

Indices (hkl)	d (nm)	a_m (nm)
211	5.35±0.1	13.1±0.1
220	4.6±0.1	13.0±0.1
321	3.5±0.05	13.1±0.1
400	3.23±0.02	12.9±0.1
420	2.89±0.03	12.9±0.1
332	2.77±0.03	13.0±0.1

TAB. 5.1: Indexation des pics des phases cubiques, distances entre plans équivalents et paramètres de maille correspondants.

et Caffrey ont très récemment montré [180] qu'à partir d'une certaine concentration de dodécylmaltoside (0.1 M), la phase cubique transite vers une phase lamellaire.

5.5 Phase cubique contenant le LH2 naturel

Nous avons vérifié avant toute chose que la phase cubique était conservée intacte après insertion du LH2 contenu dans le tampon. Le spectre de diffusion des rayons X aux petits angles obtenu n'est pas modifié par l'insertion de la protéine, et ce pour des concentrations de protéine allant jusqu'à 3 mg/ml dans le tampon : la position des pics de Bragg est inchangée. L'insertion du LH2 ne modifie donc absolument pas la structure de la phase cubique Q230, du moins pour les faibles concentrations pour lesquelles nous avons travaillé. En effet, pour de fortes concentrations de bactériorhodopsine, Rowe et al. ont observé des modifications de structure [181]. Nous avons donc préparé une phase cubique avec un tampon contenant 15 mg/ml de LH2. Son spectre de diffusion des rayons X aux petits angles est reproduit sur la figure 5.11.

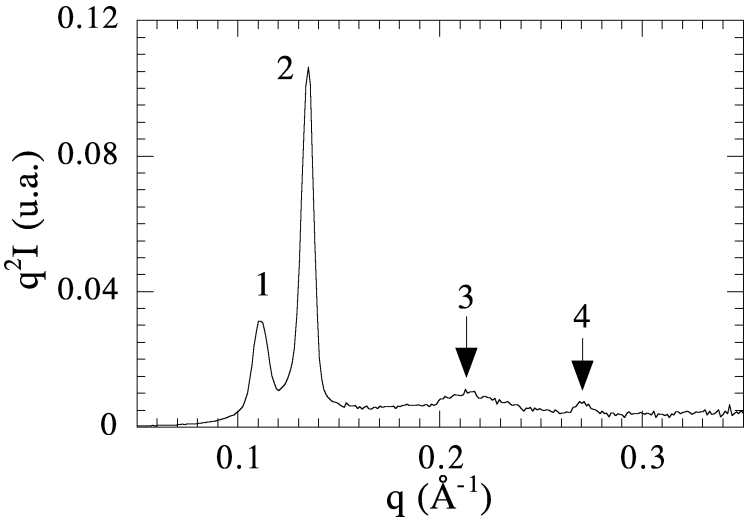


FIG. 5.11: *Spectre de diffusion de rayons X d'une phase cubique de MO préparée avec un tampon à 15mg/ml de LH2. Afin de faire ressortir les pics mineurs, on a tracé le spectre en q^2I en fonction de q. On distingue 4 pics. Les pics numérotés 1 et 3 correspondent à la phase cubique Q230 et peuvent être indexés 211 et 332. Le paramètre de maille de cette phase cubique vaut 13.9±0.1 nm. Quant aux pics 2 et 4, ils correspondent aux deux premiers ordres d'une phase lamellaire, de périodicité d_B=4.65±0.05 nm. Lorsqu'on concentre la phase cubique en protéine, on obtient donc un système biphasique : cubique/lamellaire.*

On distingue 4 pics, numérotés de 1 à 4 aux positions q_i :0.1102 Å^{-1}, 0.1347 Å^{-1}, 0.2125 Å^{-1} et 0.269 Å^{-1}. Le rapport $\frac{q_3}{q_1}$=1.928 est proche de $\sqrt{\frac{11}{3}}$. Les pics 1 et 3 correspondent donc aux pics 211 et 332 d'une phase cubique Q230, dont le paramètre de maille vaut alors 13.9±0.1 nm. Le rapport $\frac{q_4}{q_2}$=1.997 est proche de 2. Les pics 2 et 4 seraient donc ceux d'une phase lamellaire de période d_B=4.65±0.05 nm, en coexistence avec la phase cubique. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Rowe et al. [181].

5.5.1 Modification des propriétés spectrales

Mesures d'absorption

Le spectre d'absorption du LH2 dans la phase cubique a été réalisé en pressant la phase cubique entre deux fenêtres de quartz d'une cuve Hellma (0.2 mm d'épaisseur). Le spectre ainsi obtenu est présenté sur la figure 5.12, où l'on peut le comparer avec celui de la protéine en micelles d'octylglucoside.

On constate que le spectre est modifié à plusieurs niveaux :

- L'absorption provenant de la Bchl-B800 à 800 nm disparaît, elle est remplacée par un pic large de faible intensité vers 770 nm.
- Les bandes d'absorption des caroténoïdes (max. 465 nm) sont déplacées vers le bleu par rapport au LH2 en solution (max. 488 nm)
- L'absorption à 854 nm, provenant de la BChl-B850 est légèrement modifiée (faible déplacement vers le rouge à 859 nm).

Ces changements sont observés aussitôt que la phase cubique est formée et le bandes d'absorption n'évoluent plus dans le temps sur une échelle de 24 heures. Des observations similaires ont été réalisées sur du LH2 issu de Rv. gelatinosus en présence d'un tensioactif ionique non dénaturant le lithium dodécylsulfate [160]. Dans ce dernier cas, on considère que le changement spectral de la bande à 800 nm traduit le détachement de la BChl-B800, plus faiblement liée que les 2 autres, sans modifications globales de la structure du LH2. La bande d'absorption observée autour de 770 nm correspond à la Bchl libre [182][183][184]. Plus récemment, il a été montré que ce relargage de la Bchl-B800 était un phénomène réversible : en effet les sites d'attache vides sont capables de réincorporer des Bchl ou même des dérivés de celles-ci [182][183][184]. Dans ces expériences, il a aussi été démontré que le détachement des Bchl-B800 intervenait sans perturber profondément la structure du LH2 : les mesures d'absorption et de dichroïsme circulaire montrent que l'assemblage des Bchl-B850 et des caroténoïdes n'était pas perturbé et que les interactions de la Bchl-B850 avec le squelette de la protéine n'étaient pas modifiées [183].

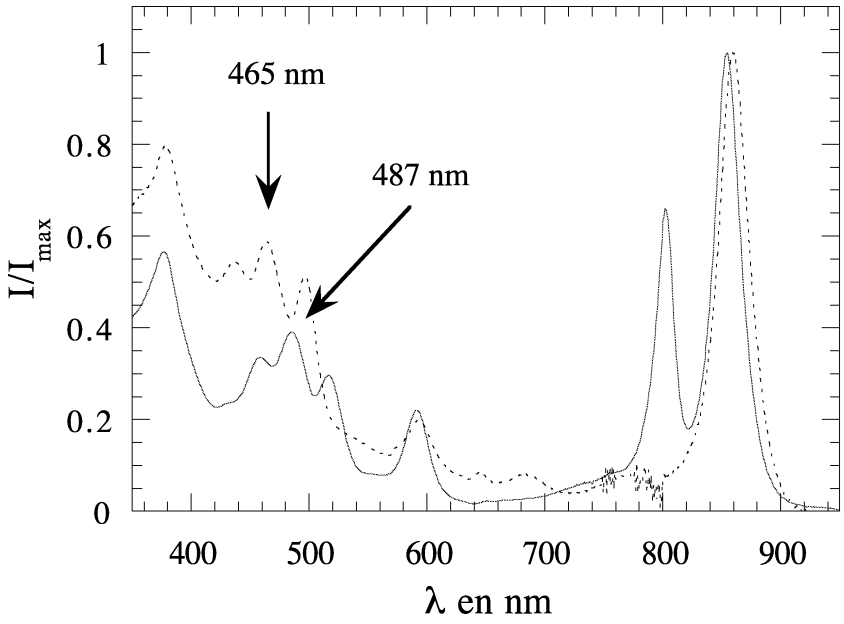


FIG. 5.12: *Spectres d'absorption du LH2 dans une phase cubique à 66% de monooléine (trait pointillé) et dans une solution micellaire d'OG (trait plein). Les absorbances ont été normalisées par rapport à leur maximum à 859 et 854 nm respectivement. En phase cubique, le massif des caroténoïdes est décalé vers le bleu, tandis que la bande de la Bchl-B850 l'est vers le rouge. Quant à la bande à 800 nm de la Bchl-B800, elle est remplacée par une large bande vers 770 nm. La structure de la protéine est vraisemblablement modifiée par la courbure de la membrane dans la phase cubique, avec un détachement de la Bchl-B800 hors de son site d'attache. Le LH2 inséré dans la Q230 a donc une structure différente de la forme naturelle.*

En conclusion, ces études nous apprennent donc que l'incorporation du LH2 dans la phase cubique Q230 entraine un détachement des Bchl-B800 de leur site d'attache, selon un mécanisme que l'on ne connaît pas. Ce détachement entraîne des modifications d'absorption des autres pigments. Le déplacement des bandes d'absorption des caroténoïdes, observé ici, indique que la structure du LH2 est vraisemblablement modifiée. Cependant, on ne sait pas si la modification intervient juste au niveau du site de liaison du pigment, ou s'il s'agit d'une modification de l'assemblée oligomérique. Quant au décalage vers le rouge de la bande B850, il peut être attribué à un nouvel environnement lipidique de ce pigment. Inséré en phase cubique de monooléine, le LH2 se trouve dans une forme modifiée mais non dénaturée, comme suggéré par la persistence d'une partie de ses propriétés d'absorption.

Afin de déterminer quel paramètre -contrainte exercée sur le LH2 par la courbure de la membrane ou forte concentration en MO- était à l'origine des modifications spectrales dans la phase cubique, nous avons inséré le LH2 dans une phase lamellaire de MO (15% d'eau en poids) à 25C. Cette phase a été préparée en centrifugeant la MO avec le tampon sans protéine (14% en poids), on a ensuite rajouté le 1% de tampon contenant le LH2. L'échantillon a été vortexé puis laissé à 25C pour s'équilibrer. Le spectre d'absorption de la protéine obtenu est présenté sur la figure 5.13.

Si l'on fait exception du pic de la Bchl-B800 qui persiste plus que dans la phase cubique, le spectre du LH2 dans la phase lamellaire est sensiblement identique à celui pris dans la phase cubique. Ce n'est donc pas la contrainte exercée sur la protéine par la forte courbure de la membrane dans la phase cubique qui est à l'origine des modifications structurales (et donc spectrales) que nous avons observées. Il semble donc plus raisonnable d'imputer ces modifications à la forte concentration en monooléine (ou à la faible concentration en eau ce qui revient au même).

Mesures de fluorescence

Les modifications structurales reflétées par les changements observés sur le spectre d'absorption sont corroborées par le spectre de fluorescence. En excitant dans les bandes des caroténoïdes à 488 nm, un échantillon de LH2, soit mélangé avec une dispersion de MO en excès de solution aqueuse, soit dans une phase cubique, on obtient les spectres présentés sur la figure 5.14.

Dans le premier cas on observe une bande d'émission à 850 nm provenant de la Bchl-B850. Dans le second cas, la bande d'émission à 850 nm est totalement supprimée. L'absence de fluorescence de la Bchl dans la phase cubique ne vient donc pas de la MO

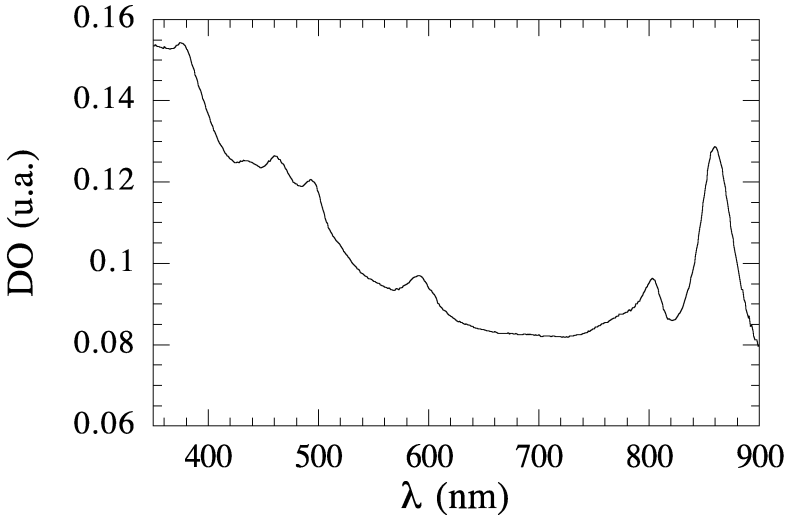


FIG. 5.13: *Spectres d'absorption du LH2 dans une phase lamellaire de MO (15% de tampon en poids). Les modifications sont similaires à celles observées dans la phase cubique. Le pic de la Bchl-B800 est un peu moins affecté. Ceci prouve que les modifications structurales du complexe proviennent de la forte concentration en MO (i.e. la faible teneur en eau) des phases et pas de la contrainte exercée par la courbure de la membrane sur la protéine dans la phase cubique.*

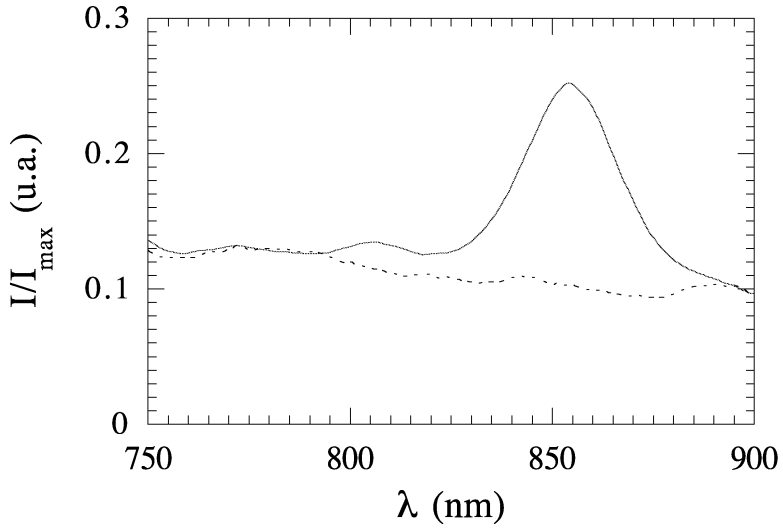


FIG. 5.14: *Spectres d'émission de fluorescence du LH2 dans une phase cubique à 66% de monooléine (trait pointillé) et dans une dispersion de monooléine en excès de solution micellaire d'OG (trait plein). La longueur d'onde d'excitation est 488 nm. La fluorescence à 850 nm, visible dans la dispersion de MO, mais absente dans la phase cubique, indique que la structure de la phase cubique modifie l'assemblée des pigments du LH2 : le transfert d'énergie entre les caroténoïdes et les Bchl est supprimé.*

elle-même, mais pourrait provenir de l'abolition du transfert d'énergie entre caroténoïdes et Bchl due aux modifications de structure de la protéine induite par la phase cubique : la distance entre ces pigments pourrait avoir changé, mais nous ne pouvons pas le vérifier. La disparition de la fluorescence n'est pas encore bien comprise et nous devons malheureusement nous contenter d'hypothèses pour l'expliquer. Il est possible que la forte courbure de la membrane dans la phase cubique induise une "torsion" sur l'assemblée oligomérique de LH2, qui serait à l'origine des modifications structurelles qui se traduisent sur les spectres. On peut envisager d'insérer le LH2 dans une phase lamellaire de MO dans laquelle la protéine ne subirait pas de torsion.

Les expériences de recouvrement de fluorescence dans la phase cubique pourraient nous apporter des indications sur la taille du LH2 en phase cubique. Elles n'ont donc pas pu être menées en utilisant la fluorescence naturelle de LH2 puisqu'elle est supprimée.

5.6 Le LH2 marqué en solution micellaire

5.6.1 Marquage de la protéine

Il a donc fallu marquer le LH2 afin de déterminer son coefficient d'autodiffusion dans la phase cubique. Nous pensons pouvoir, à partir de cette valeur, déterminer la taille du complexe oligomérique dans la membrane de monooléine. Le marquage a été réalisé par deux groupements fluorescents différents, réagissant avec les groupements amines de la protéine, et capables de former des liaisons amides stables : le 7-chloro-4-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) ou le 5-carboxy-6-fluorescein-6N-hydroxysuccinimide ester (appelé Fluos par la suite). Le protocole utilisé pour le marquage du LH2 a été détaillé ailleurs [185]. Dans les 2 cas, le marquage se traduit par la fluorescence en électrophorèse sur gel-SDS de l'une (NBD) ou des 2 (Fluos) sous-unités du LH2. Concernant ce marquage, il nous semble important de faire deux remarques :

- Tout d'abord, les deux marqueurs peuvent réagir avec la phosphatidyléthanolamine qui est un des lipides résiduels liés à la protéine [166].
- Ensuite la disparition de la fluorescence du NBD-LH2 au bout d'environ une semaine indique l'instabilité du marquage par le NBD.

5.6.2 Mesures de spectroscopie d'absorption.

Nous avons réalisé des mesures d'absorption sur les protéines marquées Fluos et NBD en solution micellaire d'OG, afin d'observer si le marquage modifiait la protéine, mais

aussi d'évaluer la quantité de protéine marquée.

Le Fluos-LH2

Dans l'infrarouge, le spectre d'absorption du Fluos-LH2 est identique à celui du LH2 natif. Cette absence de modification indique que l'accrochage du marqueur n'est pas venu perturber les sites d'attache des pigments Bchls. Dans le visible, l'absorbance du Fluos-LH2 à 490 nm est augmentée, se superposant avec celle des caroténoïdes. Il s'agit de l'absorbance du marqueur Fluos. En effet la différence des spectres (Fluos-LH2 moins LH2 natif) (figure 5.15) présente une bande d'absorption dont le maximum se situe à 501 nm. L'intensité de cette bande indique la présence de 0.95 moles de Fluos par mole d'hétérodimère ($\alpha\beta$) connaisant le coefficient d'extinction molaire du marqueur $\epsilon_{Fluos} = 74000$ à 498 nm, donné par le fournisseur. Le marquage Fluos ne perturbe donc pas la

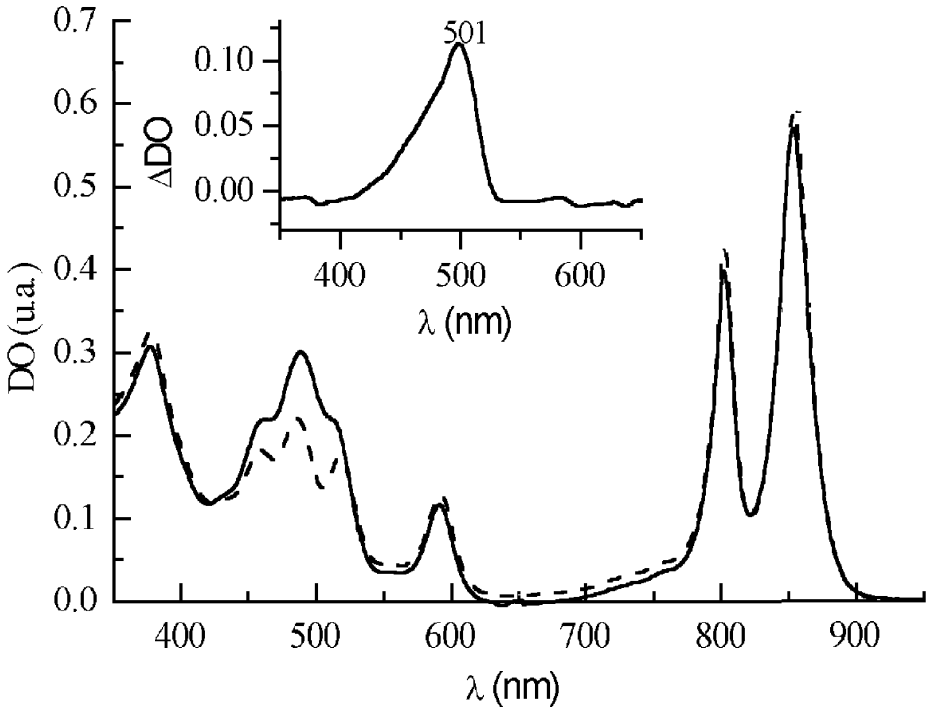


FIG. 5.15: *Spectres d'absorption du Fluos-LH2 (trait plein) et du LH2 natif (pointillés) en solution micellaire d'OG, l'insert correspond à la différence des spectres (Fluos-LH2 moins LH2 natif). L'absorbance infrarouge n'est pas modifiée. Le spectre de différence prouve qu'environ une mole de marqueur est liée par mole d'hétérodimère ($\alpha\beta$).*

structure du LH2, et conduit à l'accrochage d'environ une mole de marqueur par mole d'hétérodimère ($\alpha\beta$).

Le NBD-LH2

Les bandes d'absorption dans l'infrarouge ne sont pas perturbées. Dans le visible l'absorbance augmente. Le spectre de différence (NBD-LH2 moins LH2 natif) présente une bande d'absorption à 474 nm. Cette absorption est connue pour être caractéristique du produit de la réaction entre le NBD-Cl et les amines primaires comme celles des résidus de lysine. Cependant, le spectre de différence présente aussi un maximum secondaire faible, qui pourrait indiquer une modification de l'absorption des caroténoïdes. On ne peut donc qu'estimer le maximum de NBD lié, qui varie pour les différentes préparations entre 1 et 2.3 mole par mole d'hétérodimère ($\alpha\beta$) en prenant pour coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{NBD} = 26000$ à 475 nm [186]. Le marquage NBD ne perturbe donc pas la structure du LH2, et conduit, selon les préparations, à l'accrochage d'entre 1 et 2.3 moles de marqueur par mole d'hétérodimère ($\alpha\beta$).

5.6.3 Mesures de fluorescence

Les mesures de fluorescence réalisées en excitant les protéines marquées en solution micellaire d'OG à 488 nm présentent à la fois les bandes d'émission caractéristiques de la protéine et des marqueurs, comme on peut le voir sur la figure 5.17.

Ces mesures ont montré une disparition de la fluorescence du NBD-LH2 au cours du temps, prouvant l'instabilité du marquage. Nous avons donc abandonné les expériences avec ce marqueur. La protéine est donc bien marquée par le Fluos, sans que sa structure soit modifiée. Il est donc possible de réaliser les mesures de recouvrement de fluorescence sur le LH2 inséré dans une phase cubique de monooléine.

5.6.4 Mesures de recouvrement de fluorescence.

Des mesures sur les solutions micellaires ont été réalisées après marquage du LH2. Le coefficient d'autodiffusion trouvé est identique à celui de la protéine non marquée, pour le Fluos-LH2. Ceci est une confirmation supplémentaire de l'absence de modifications de la structure de l'assemblée oligomérique du LH2 par le marquage fluorescent.

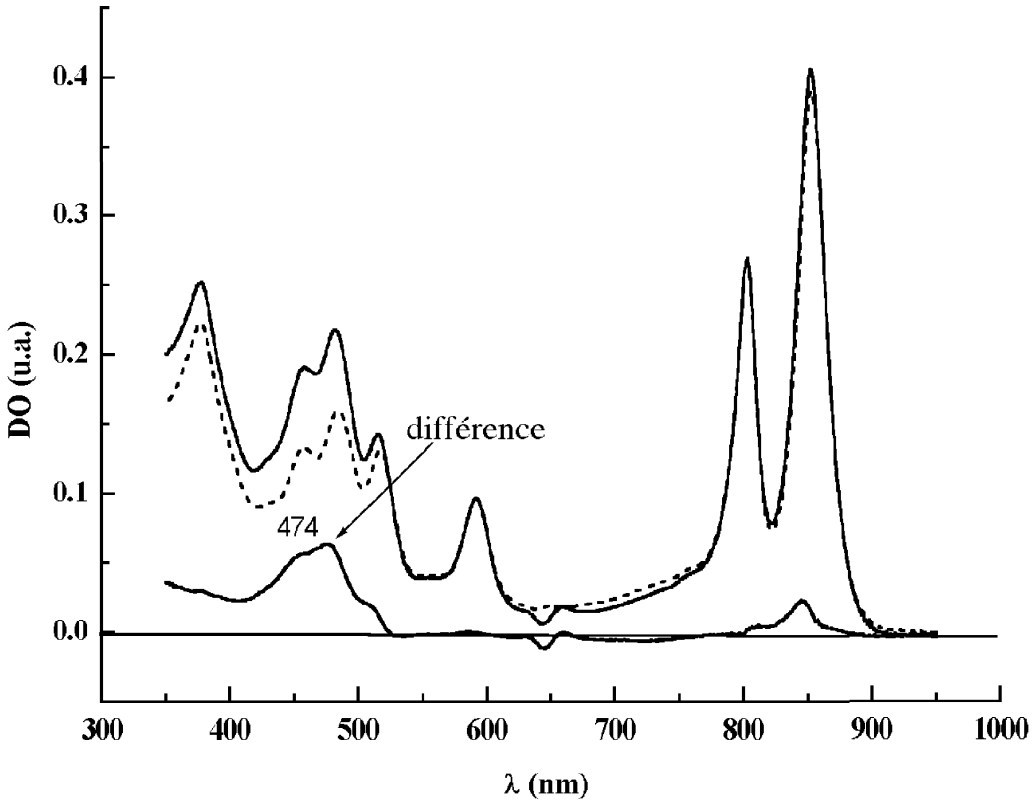


FIG. 5.16: *Spectres d'absorption du NBD-LH2 (trait plein) et du LH2 natif (pointillés) en solution micellaire d'OG. Le spectre du dessous en trait plein correspond à la différence des spectres (NBD-LH2 moins LH2 natif). L'absorption infrarouge n'est pas modifiée. Le spectre de différence montre que l'absorption des caroténoides est modifiée, et permet d'estimer qu'entre 1 et 2.3 moles de marqueur sont attachées à une mole d'hétérodimère ($\alpha\beta$).*

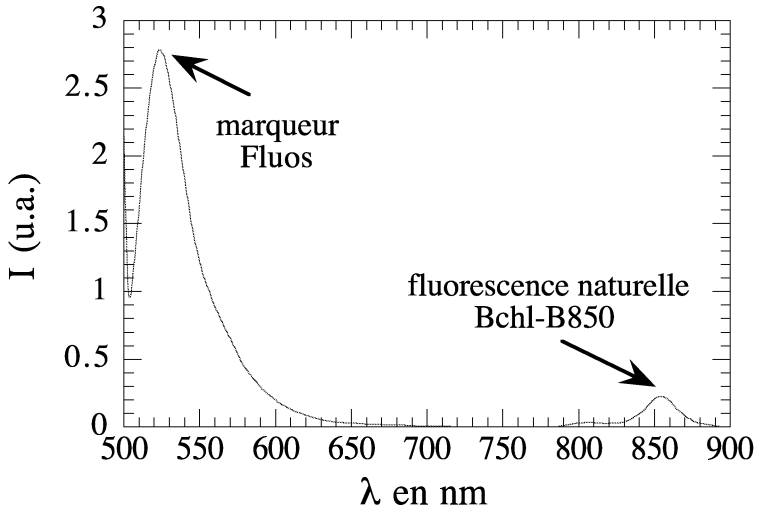


FIG. 5.17: *Spectres de fluorescence du Fluos-LH2 en solution micellaire d'OG, excité à 488 nm. Les bandes des fluorescences naturelle et "artificielle" sont bien visibles. Le marquage est efficace et nous permet donc de réaliser les expériences de FRAPP en phase cubique de monooléine.*

5.7 Phase cubique contenant le LH2 marqué par un groupement fluorescent

5.7.1 Mesures spectroscopiques

Nous avons réalisé le spectre d'absorption du Fluos-LH2, après insertion dans la phase cubique. Ce spectre présente les mêmes modifications que le LH2 non marqué, avec en plus une augmentation de l'absorbance, autour de 501 nm, qui correspond aux bandes d'absorption du marqueur. En ce qui concerne le spectre de fluorescence, seules la bande d'émission du marqueur Fluos est visible, la bande d'émission de la Bchl-B850 étant supprimée, comme pour la protéine non marquée. La fluorescence du marqueur Fluos n'est pas bloquée par les modifications structurales de la protéine en phase cubique. Nous allons donc pouvoir mener à bien les expériences de recouvrement de fluorescence sur la protéine dans la phase cubique.

5.7.2 Mesures de recouvrement de fluorescence

Phase cubique "nue"

Afin de vérifier que le groupement fluorescéine fluoresce bien dans la phase cubique, nous y avons inséré un tensioactif fluorescent, le 5-N(octadécanoylamino)fluorescéine (noté C_{18fluo}, M=613, 5mM dans le tampon BisTris). Ce marqueur possède une chaîne aliphatique de 18 carbones comme la monooléine, tandis qu'un groupement fluorescéine se trouve sur sa tête polaire. Maldonado et al. ont montré [30] que, dans une phase éponge, ce marqueur diffusait par sauts dans la membrane avec sa chaîne dans la partie hydrophobe tandis que le groupement fluorescent se trouve à l'interface eau-tensioactif Nous avons réalisé des mesures de recouvrement de fluorescence sur cette phase cubique Q230. Le coefficient d'autodiffusion que nous avons déterminé vaut :

$$D_{fluo}=6.2 \pm 0.2\ 10^{-8}\mathrm{cm}^2.\mathrm{s}^{-1}$$

Cette valeur est en très bon accord avec celle déterminée par Cribier et al. en 1993 [80] dans la même phase cubique Q230, mais en utilisant des lipides fluorescents, ayant des chaînes comportant soit 6, soit 18 carbones, marqués par un groupement NBD en différentes positions de la chaîne aliphatique.

Mesures sur le Fluos-LH2 en phase cubique.

Nous avons réalisé sur le Fluos-LH2 inséré en phase cubique, les mesures de recouvrement de fluorescence. Elles donnent pour le coefficient d'autodiffusion :

$$D_{Fluos}= 1.4 \pm 0.2\ 10^{-8}\mathrm{cm}^2.\mathrm{s}^{-1}$$

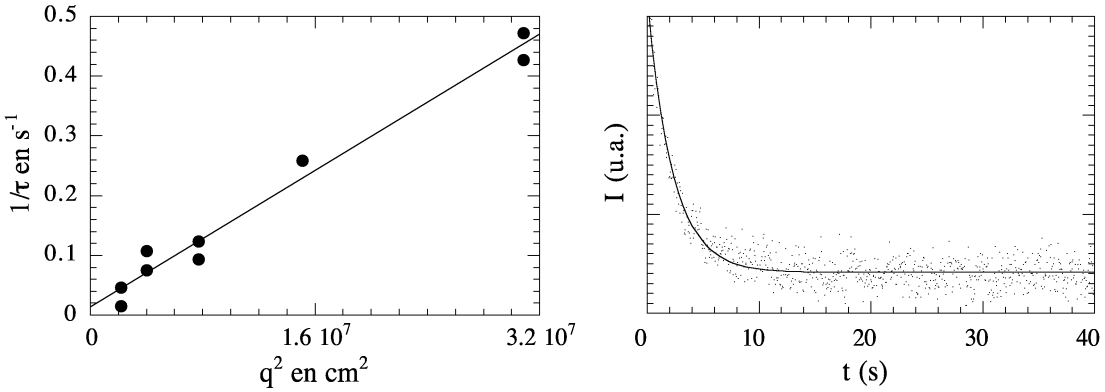


FIG. 5.18: *Résultats des mesures de FRAPP sur la phase cubique contenant le Fluos-LH2 à 2 mg/ml. A droite est présenté un exemple typique de la décroissance du contraste entre franges, la ligne correspond à l'ajustement des points expérimentaux par une exponentielle décroissante.*

Comparaison avec les modèles théoriques.

Le coefficient d'autodiffusion que nous avons mesuré, ne correspond pas au coefficient d'autodiffusion de la protéine se déplacant sur une membrane plane (déplacement à 2 dimensions). En effet, Anderson et Wennerström [187] ont montré que qu'il faut tenir compte d'un facteur d'obstruction dû au repliement de la membrane dans tout l'espace. Ces auteurs ont considéré la diffusion bidimensionnelle sur différentes surfaces minimales. Les solutions analytiques exactes n'existant pas, les équations ont été discrétisées afin d'être résolues numériquement par une méthode d'éléments finis. Le coefficient de diffusion en surface varie avec la fraction volumique de composants polaires ϕ_p suivant l'équation :

$$D_s = D_{s0}(a_s - b_s\phi_p^2) \tag{5.7}$$

où D_{s0} est le coefficient de diffusion sur une membrane plane et a_s et b_s des constantes. $a_s = \frac{2}{3}$ indépendemment de la topologie des phases, tandis que b_s est étroitement liée à la topologie de la surface minimale où a lieu la diffusion. Les valeurs de b_s ont été calculées pour la surface primitive de Schwartz ($b_s = 0.45$) et pour la surface I-WP ($b_s = 0.6$) mais pas pour la surface G qui correspond à la phase Q230.

Nous avons utilisé ce modèle théorique pour déterminer le coefficient de diffusion libre de la protéine sur la membrane. En première approximation, nous avons pris $\phi_p = \phi_{eau}$=0.33 et nous avons calculé le D_{s0} correspondant aux deux topologies connaissant D_{Fluos}. Selon la surface modèle que l'on choisit, on trouve $D_{s0-Fluos}$=2.3 $\pm$ 0.3 10^{-8}cm^2.s^{-1} (surface de type P) ou $D_{s0-Fluos}$=2.2 $\pm$ 0.3 10^{-8}cm^2.s^{-1} (surface IWP). Ces résultats peuvent être regroupés en écrivant que $D_{s0-Fluos}$=2.3 $\pm$ 0.3 10^{-8}cm^2.s^{-1} pour le LH2 diffusant sur une membrane plane.

Il nous faut maintenant relier ce coefficient d'autodiffusion, à la dimension du LH2, pour avoir des informations sur son état oligomérique.

Pour des particules en solution, nous aurions pu directement utiliser le rapport des deux coefficients de diffusion pour déterminer la taille du LH2, connaissant celle du tensioactif fluorescent. Dans les phases de membranes, les deux espèces (protéine et tensioactif) ne diffusent pas de la même manière. Un tensiactif diffuse par sauts selon le modèle proposé par Cohen et Turnbul [188] présenté en annexe D. Quant à une grosse particule confinée dans la membrane (par exemple une protéine membranaire), son coefficient de diffusion suit le modèle de Saffman et Delbrück que nous allons présenter.

Modèle de Saffman et Delbrück Saffman et Delbrück ont proposé en 1975 [189] un modèle permettant de déterminer le coefficient d'autodiffusion d'un cylindre confiné dans

une membrane. Il s'agit d'un modèle hydrodynamique, valable lorsque le diamètre du cylindre est plus grand que le diamètre d'un monomère de tensioactif. Ces auteurs analysent le mouvement d'une particule cylindrique de rayon r incorporée dans une membrane d'épaisseur d_m comme indiqué sur la figure 5.19. En calculant le déplacement quadratique moyen à partir de l'équation de Langevin :

$$m\frac{d\ \vec{v}}{dt} = -\xi\ \vec{v} + \vec{F} \tag{5.8}$$

où m et $\vec{v}$ sont la masse et la vitesse de la molécule, $-\xi\ \vec{v}$ le frottement dû au solvant et $\vec{F}$ une force aléatoire due à l'agitation thermique. Les viscosités respectives de la membrane du liquide qui l'entoure sont η_m et η. Le coefficient de diffusion bidimensionnel du cylindre vaut alors :

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\eta_m d_m}\left(ln\frac{\eta_m d_m}{\eta r} - \gamma'\right) \tag{5.9}$$

où γ' est la constante d'Euler (0.5772). Ce modèle est valable pour une particule diffusant

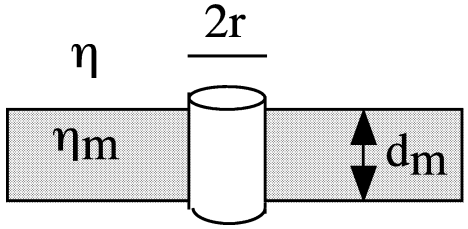


FIG. 5.19: *Illustration du modèle hydrodynamique de Saffman et Delbrück. Les particules cylindriques se déplacent dans un liquide continu de viscosité η_m tandis que le solvant a une viscosité η.*

sur une membrane plane, il a été utilisé avec succès pour décrire la diffusion bidimensionnelle d'une grande quantité de protéines membranaires dans des bicouches lipidiques [190][191]. Cependant il ne tient pas compte des interactions hydrodynamiques entres particules diffusant.

L'application de ce modèle nécessite la connaissance de la viscosité de la membrane. La solution pour déterminer ce paramètre a consisté à mesurer le coefficient d'autodiffusion d'un peptide transmembranaire composé d'une hélice α unique (diamètre=1 nm) inséré dans la phase cubique. Le peptide que nous avons retenu, composé de 18 acides aminés, possède la séquence suivante : Lys-Lys-Gly-$(Leu)_{12}$-Lys-Lys-Ala-Am et à son extrémité N-terminale un groupement FITC a été greffé. La masse molaire du FITC vaut 389, celle du peptide fluorescent vaut 2405. REF HODGES. Ce peptide nous a été fourni

par Robert S. Hodges (University of Alberta, Canada). La phase cubique a été préparée au moyen du mélangeur à deux seringues présenté précédemment : 0.5 mg de peptide lyophilisé a été ajouté à la monooléine (≈40mg). Le coefficient d'autodiffusion que nous avons mesuré par FRAPP à 20°C vaut D_{pep}=2.4±0.2 10^{-8}cm^2.s^{-1}. Nous avons utilisé le même coefficient d'obstruction que pour le LH2 ce qui donne pour le peptide diffusant sur une membrane plate D_{pep0}=3.9±0.3 10^{-8}cm^2.s^{-1}. En prenant pour l'épaisseur de la membrane la valeur de 3.5 nm déterminée par Briggs et al. [25] et pour le rayon du peptide 0.5 nm, nous avons calculé le coefficient d'autodiffusion donné par la formule 5.9 de Saffmann et Delbrück [189] pour différentes valeurs de la viscosité de la membrane. Nous avons retenu la viscosité pour laquelle ont obtenait D_{pep0}. Finalement la viscosité de la membrane de monooléine vaut $\eta_m = 1.5 \pm 0.15$ P, soit 150 fois plus que celle de l'eau. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles que l'on peut trouver dans la littérature [190][192].

En utilisant cette valeur et en renversant la formule 5.9 pour le LH2, on trouve finalement que le rayon de la protéine vaut R_{LH2}=7±2 nm. Ce rayon est environ deux fois plus grand que celui déterminé par cristallographie. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence. La première est que le modèle cylindrique est trop simplifié pour la protéine. La seconde est que le LH2 qui diffuse entraîne avec lui des lipides, ce qui expliquerait cette dimension quelque peu surestimée. Au vu de cette dimension du complexe LH2, on peut affirmer que la protéine reste oligomérique dans la phase cubique. Il est cependant difficile de déterminer son degré d'oligomérie avec précision.

5.8 Insertion du LH2 dans les phases de membranes fluides du système $C_{12}E_4$-eau-décane

L'insertion du LH2 dans les phases de membranes fluides , lamellaire et éponge, a été tentée afin d'étudier les modifications des paramètres élastiques que pouvait entraîner une protéine de membrane. On peut aussi se demander comment la membrane, plus fluide que celle de MO, peut modifier la structure de la protéine.

5.8.1 Préparation des phases lamellaire et éponge avec le tampon BisTris

Avant toute insertion du LH2 en micelles d'octylglucoside dans la phase lamellaire, il fallait nous assurer que cette phase ne disparaissait pas si on la préparait avec le tampon

dans lequel la protéine était solubilisée. Nous avons donc préparé une phase lamellaire de $C_{12}E_4$-eau-décane de fraction volumique de membrane égale à 0.4 avec le tampon.

A 20°C, le spectre de diffusion des rayons X aux petits angles est bien celui d'une phase lamellaire, avec un quasi-pic de Bragg, l'échantillon est biréfringent entre polariseurs croisés. A 28°C en revanche, l'échantillon paraît isotrope entre polariseurs croisés et son spectre de diffusion présente d'une part une bosse de corrélation d'autre part une dépendance en q^{-2} puis en q^{-4} qui sont caractéristiques de la phase éponge. Pour une fraction volumique de membrane ϕ_m=0.4, le remplacement de l'eau par le tampon BisTris ne perturbe pas l'existence des phases lamellaire et éponge du système $C_{12}E_4$-eau-décane.

5.8.2 Préparation des mêmes phases avec la protéine.

La phase lamellaire a ensuite été préparée avec le tampon dans lequel la protéine avait été solubilisée. Afin de nous vérifier l'état de la protéine nous avons réalisé à 30°C des mesures d'absorption de la phase contenant la protéine contre la même phase sans la protéine. En effet, il semble que la présence de la protéine change légèrement le frontières de la transition lamellaire-éponge, c'est pourquoi il nous a fallu nous placer à 30°C. Le spectre obtenu est présenté sur la figure 5.20.

La bande d'absorption à 850 nm a complètement disparu. Par ailleurs, les bandes d'absorption des caroténoïdes sont décalées vers le bleu : le maximum d'absorption passe de 487 nm à 463 nm, comme dans la phase cubique. La bande d'absorption de la Bchl-B800 se décale vers 760, ce qui correspond on l'a vu à la Bchl-B800 libre. Les Bchl se sont probablement détachées de la protéine et les sites d'attache des caroténoïdes sont altérés. Tout ceci indique une substantielle modification structurale de la protéine, le plus significatif étant la disparition de la bande d'absorption de la Bchl-B850. Il est fort probable que la protéine soit complètement dénaturée dans le système $C_{12}E_4$-eau-décane.

Cette dénaturation a été confirmée par le spectre d'émission de fluorescence réalisé dans la même phase, en excitant à 488 nm. Celui ci, présenté sur la figure 5.21 présente bien la bande fluorescence du marqueur fluorescéine vers 520 nm (non montrée), mais la fluorescence naturelle à 850 nm a complètement disparu, même si celle à 800 nm persiste un peu. Il est probable que le décane présent dans nos phases de membranes fluides soit à l'origine de la dénaturation de la protéine, car le tensioactif que nous avons utilisé ($C_{12}E_4$) fait partie d'une famille fréquement utilisée pour la reconstitution des protéines membranaires en micelles.

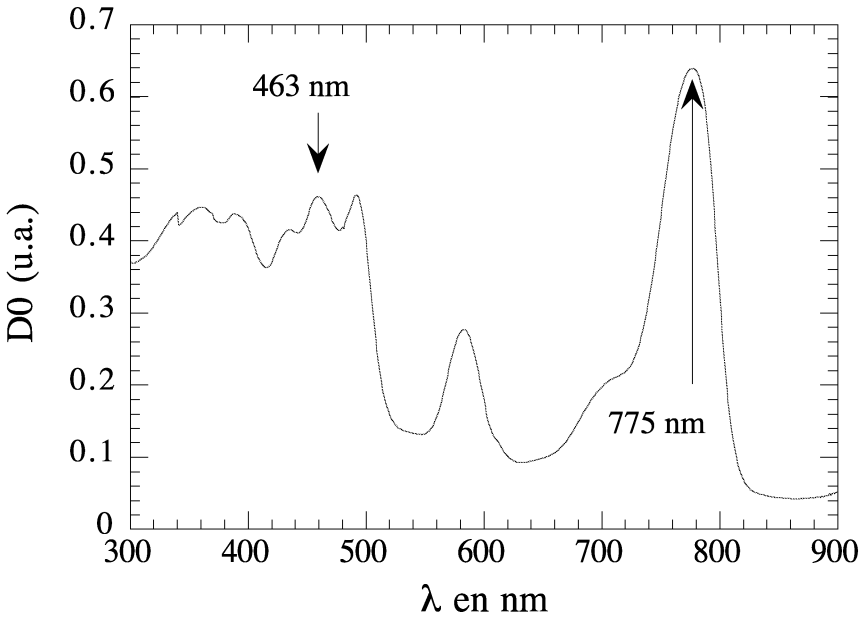


FIG. 5.20: *Spectre d'absorption du LH2 dans une phase éponge à 30° C. Les bandes des caroténoïdes sont déplacées, la Bchl-B800 se détache, entraînant un déplacement de la bandes à 800 nm vers 775 nm. Quant à la bande à 850 nm, elle a complètement disparu.*

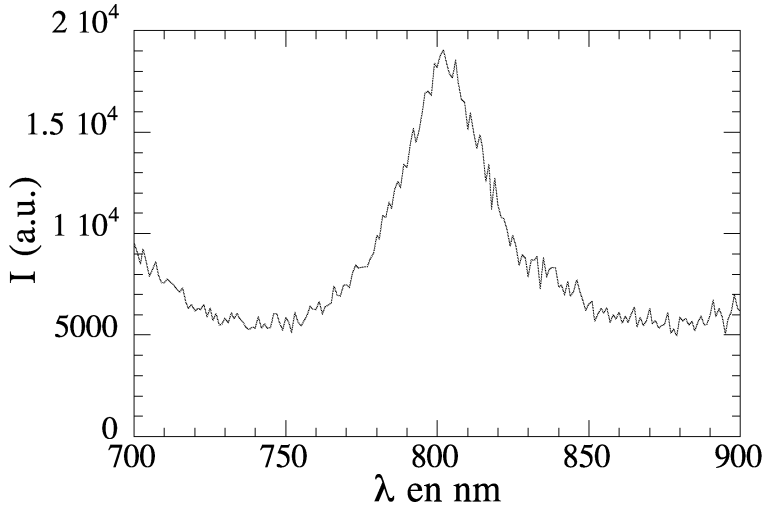


FIG. 5.21: *Spectre de fluorescence du LH2 marqué FLUOS dans une phase éponge à 30° C la longueur d'onde d'excitation est 488 nm. On observe une bande large autour de 800 nm, la fluorescence naturelle à 850 nm a complètement disparu.*

5.8.3 Phase éponge alternative

Afin de vérifier si le décane était à l'origine de la dénaturation du LH2, nous avons inséré cette protéine dans une phase éponge ne contenant pas de solvant organique, constituée d'un tensioactif de la même famille que le $C_{12}E_4$. Nous avons utilisé le système $C_{12}E_2$-eau, dont le diagramme de phase a été très récemment réactualisé par Lynch et al. [193]. Dans ce diagramme (figure 5.22), la phase éponge existe dans une domaine assez large de températures et de concentrations. Nous avons choisi de nous placer dans ce diagramme

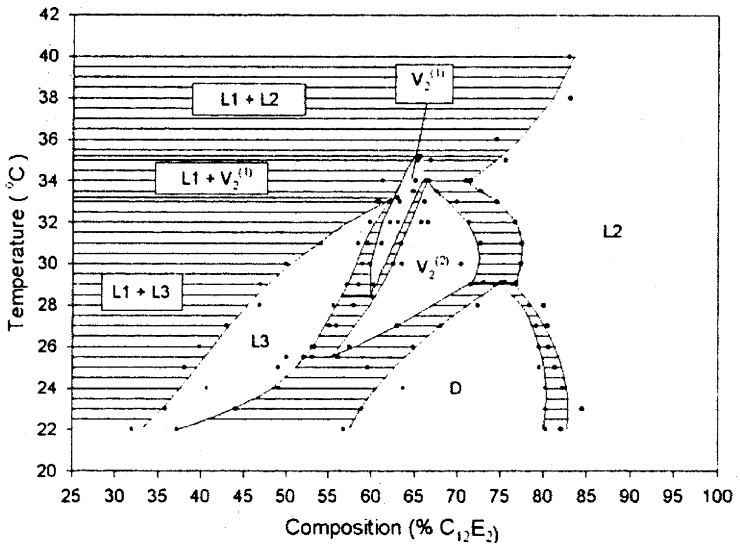


FIG. 5.22: *Diagramme de phase du système binaire $C_{12}E_2$-eau, établi récemment par Lynch et al. [193].*

à 25°C pour 45% de tensioactif en poids, pour éviter une possible dénaturation de la protéine à plus haute température. Une incubation à 25°C du LH2 en tampon BisTris a en effet prouvé que la protéine était stable à cette température pendant plusieurs jours.

Préparation de la phase éponge avec le tampon

Nous avons vérifié que la phase éponge n'était pas perturbée par le tampon BisTris utilisé pour la préparer : Les spectres de rayons X aux petits angles d'un échantillon préparé avec de l'eau et d'un échantillon préparé avec le tampon BisTris utilisé pour solubiliser la protéine sont quasiment superposables (figure 5.23). Ces spectres présentent un bosse de corrélation, de plus l'intensité varie en q^{-2}. Les échantillons apparaissent isotropes entre polariseurs croisés. Tous ces élements suggèrent que nous avons bien retrouvé la

phase éponge. Le remplacement de l'eau par le tampon n'a donc pas perturbé le système.

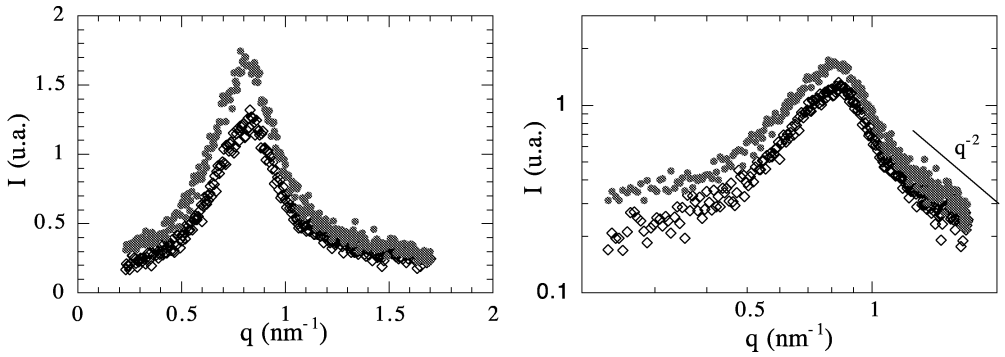


FIG. 5.23: *Spectres de rayons X aux petits angles de la phase éponge du système $C_{12}E_2$-eau. A gauche en réprésentation I(q), à droite en représentation log-log pour mettre en valeur la dépendance en q^{-2}. Les symboles $\diamond$ représentent la phase éponge préparée avec l'eau, tandis que les $\bullet$ représentent celle préparée avec le tampon BisTris sans protéine.*

Insertion du LH2 dans la phase éponge ($C_{12}E_2$-eau)

La phase éponge a ensuite été préparée avec le tampon contenant le LH2 à 0.2 mg/ml. La présence de la protéine ne perturbe pas la phase. Nous avons réalisé un spectre d'absorption du LH2 dans cette phase, présenté sur la figure 5.24. Le spectre est modifié à plusieurs niveaux par rapport au spectre natif.

- Les bandes d'absorption des caroténoïdes sont, cette fois encore, décalées vers le bleu.
- La bande caractéristique de la Bchl-B850 disparaît totalement.
- La bande caractéristique de la Bchl-B800 disparaît totalement.
- Une large bande autour de 770 nm apparaît.

La large bande correspond à la Bchl libre comme on l'a vu précédemment [182][183][184]. On peut donc affirmer que l'insertion du LH2 dans la phase éponge du système $C_{12}E_2$-BisTris entraîne le détachement des bactériochlorophylles. Comme dans la phase éponge du système $C_{12}E_4$-eau-décane, ces modifications du spectre font penser à une dénaturation du LH2. Cette hypothèse est confirmée par les mesures de fluorescence dans la phase éponge. Le LH2 en phase éponge a été excité à une longueur d'onde de 488 nm. Le spectre de fluorescence présente plusieurs pics, le plus intense étant celui à 790 nm, mais le pic caractéristique à 850 nm a disparu. Le transfert d'énergie entre la Bchl-B800 et la

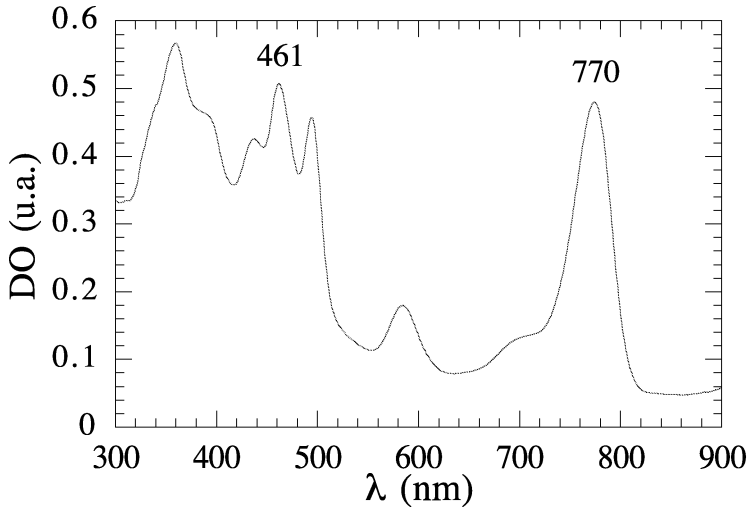


FIG. 5.24: *Spectre d'absorption du LH2 dans la phase éponge du système $C_{12}E_2$-BisTris. Les bandes des caroténoïdes sont décalées vers le bleu par rapport au spectre pris dans l'état natif. Les bandes d'absorption de la Bchl à 850 nm et 800 nm disparaissent complètement. Elles sont remplacées par une large bande autour de 770 nm, correspondant à la Bchl libre.*

Bchl-B850 n'a plus lieu. Les pics résiduels doivent venir des pigments en solution. Le tensioactif $C_{12}E_2$ dénature donc le LH2. Ces mesures infirment donc notre hypothèse initiale : le décane n'est vraisemblablement pas à l'origine de la dénaturation de la protéine dans le système $C_{12}E_4$-eau-décane. Les tensioactifs de la famille C_iE_j sont moins inoffensifs qu'il n'y paraît au premier abord pour la protéine LH2 et sont responsables de sa dénaturation. Expérimentalement, il est fréquent qu'un tensioactif qui solubilise bien une protéine membranaire en faible concentration (micelles) ait un effet dénaturant en plus forte concentration.

5.8.4 Conclusion

En conclusion, les tensioactifs $C_{12}E_4$ et $C_{12}E_2$, que nous avons utilisés pour obtenir des phases éponges, sont moins inoffensifs pour la protéine que nous ne l'avions supposé. Dans les deux systèmes, les spectres d'absorption et de fluorescence montrent que le LH2 est dénaturé. Contrairement à ce que nous avions supposé, le décane n'est pas à l'origine de la dénaturation observée, ce sont les tensioactifs qui sont responsables de cette dénaturation. Les effets de cette protéine sur les paramètres élastiques des phases de membranes fluides n'ont donc pas été étudiés. L'étude du diagramme de phases du sytème OG-eau réalisée par Sakya et al. [194] montre qu'il existe une phase lamellaire et une phase cubique de type

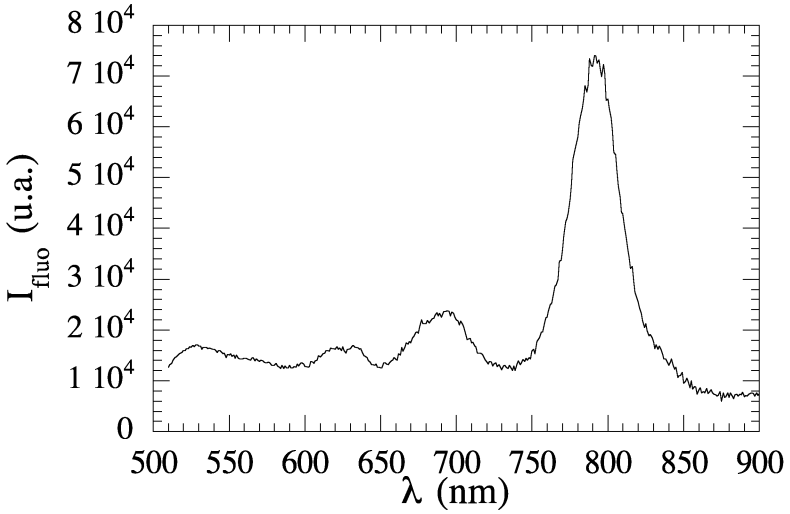


FIG. 5.25: *Spectre de fluorescence du LH2 dans la phase éponge du système $C_{12}E_2$-BisTris. La longueur d'onde d'excitation est 488 nm. La fluorescence native à 850 nm a complètement disparu. On observe cependant des pics de fluorescence que l'on peut supposer provenir des pigments libres.*

Q230 dans ce système, à très faible concentration d'eau. Il serait intéressant d'envisager des expériences avec le LH2 dans ce système, mais la taille de la maille (≈4 nm) est peut être trop petite pour le LH2. Par ailleurs, il est possible que la concentration d'OG nécessaire pour former ces phases soit très importante et dénature le LH2.

5.9 Conclusion

Les succès reportés dans la cristallisation de la bactériorhodopsine dans cette phase ont conduit à un certain optimisme : ce type de cristallisation semblait d'un intérêt général pour les protéines de membranes, ce qui sous-entend que leur structure en solution était conservée dans la phase cubique. Ceci a d'ailleurs été vérifié par spectroscopie pour la bactériorhodopsine.

Les résultats obtenus sur l'incorporation du LH2 dans la phase cubique de monooléine sont inattendus et modèrent cet optimisme. En effet, nous avons constaté que le LH2 subit, dans cette phase, des modifications affectant les modes de liaison de certains pigments, bien que le dimère de Bchl absorbant vers 855 nm, qui est enfoui dans un site hydrophobe, ne soit pas touché et que l'état oligomérique de la protéine semble préservé. La similitude entre les spectres pris dans la phase cubique et dans la phase lamellaire prouvent que les modifications spectrales ne proviennent pas de la contrainte exercée sur la protéine par

la forte courbure de la membrane de monooléine. Ces effets pourraient être dûs à la forte concentration en monooléine (et/ou à la faible teneur en eau). Tout ceci nous a conduit à ne pas tenter de cristallisation du LH2 dans la phase cubique. Ces modifications ont été détectées parce que les pigments liés à la protéine sont très sensibles à leur environnement, et seraient passés inaperçues si la protéine n'avait pas ces cofacteurs. Des tests fonctionnels semblent donc nécessaires si la cristallisation d'autres protéines en phase cubique est envisagée.

Nous avons introduit le LH2 dans des phases de membranes fluides. Les expériences de spectroscopie d'absorption et de fluorescence réalisés dans les phase éponges ont malheureusement montré que le LH2 y était dénaturé. Du coup l'étude des modifications des paramètres élastiques induits par cette protéine dénaturée perdait son intérêt. Ces essais ont par ailleurs confirmé la fragilité de la protéine en présence de tensioactifs de la famille C_iE_j (polyéthylèneglycol alkyléthers) en forte concentration. L'existence d'une phase lamellaire et d'une phase cubique de type Q230 dans le système OG-eau, pourrait permettre de mener à bien l'étude des modifications des paramètres élastiques des membranes entraînées par l'insertion du LH2 dans la phase lamellaire, mais aussi d'essayer de cristalliser le LH2 en phase cubique. Il faudra s'assurer de la non dénaturation de la protéine dans ces systèmes, il est en effet possible que la petite taille de la maille en phase cubique d'OG ($\approx$4 nm) soit trop petite pour le LH2, ou que la concentration d'OG soit trop importante.

Conclusion générale

Le travail présenté dans cette thèse s'article en deux thèmes principaux. Le premier est l'étude des modifications des paramètres élastiques d'une phase lamellaire non ionique, par différentes "perturbations" que nous lui avons fait subir. La première perturbation a consisté à charger progressivement la surface des monocouches, la seconde à introduire dans la phase lamellaire un peptide tribloc rigide. Nous avons par ailleurs étudié les transformations structurales subies par une protéine transmembranaire (le LH2) dans une phase cubique de monooléine et des phases éponges de tensioactifs.

Effet de la charge de surface

Dans une phase lamellaire inverse, charger les membranes ne modifie en rien les paramètres structuraux et élastiques de la phase lamellaire. La périodicité d_B et l'épaisseur de membrane d_m restent identiques, tout comme la rigidité de courbure moyenne κ et le paramètre de Caillé η, donc a fortiori le module de compressibilité smectique. La phase lamellaire inverse, même chargée reste donc stabilisée par les répulsions stériques entre membranes, à cause de l'auto-écrantage des contre-ions, en bon accord avec les prédictions de Fogden et al. [1]. Quand l'épaisseur d'eau augmente, des modifications commencent à se faire sentir : diminution du paramètre de Caillé η et augmentation de la rigidité de la membrane κ. Nous avons aussi observé que dans une phase inverse non chargée, la rigidité de la membrane augmente avec son épaisseur. Cette observation est en désaccord avec celles de Porcar et al. [9][111] et Freyssingeas et al. [116], il semble que la question de la dépendance de la rigidité avec l'épaisseur de la membrane reste ouverte.

En revanche, charger la membrane modifie profondément les paramètres structuraux et élastiques de la phase lamellaire directe. Lorsqu'on augmente la densité surfacique de charge, l'ordre smectique s'améliore, ce qui se traduit par un affinement du quasi-pic de Bragg de premier ordre et une apparition des quasi-pics d'ordre supérieur. Cette augmentation de l'ordre est quantifiée par la diminution du paramètre de Caillé η. L'introduction de répulsions électrostatiques entre charges dans la même monocouche induit une diminu-

tion des fluctuations de la membrane : tout se passe comme si les fluctuations étaient "repassées" par les charges. Cette diminution implique une diminution de la périodicité, tandis que l'épaisseur de la membrane reste constante. Nous avons systématiquement mesuré la valeur de la rigidité de la membrane. Celle ci augmente avec la densité de charge, en bon accord avec la contribution du mode pair de fluctuations proposée par Fogden et al. [1], dans le cas d'une phase lamellaire "diluée". Quant au module de compressibilité smectique $\bar{B}$, au fur et à mesure que l'on charge la membrane, il augmente, passe par un maximum puis diminue. L'augmentation s'explique par l'introduction des répulsions électrostatiques entre membranes. Nous avons remarqué que le pourcentage de SDS pour lequel $\bar{B}$ est maximum correspond à une longueur de Gouy-Chapman environ égale à la moitié de l'épaisseur d'eau dans l'échantillon. La diminution de $\bar{B}$ peut s'expliquer, soit en considérant une épaisseur effective pour la membrane tenant compte de l'épaisseur de la couche de contre-ions, soit par l'effet des corrélations de fluctuations prédit par Lukatsky, Pincus et Safran [106][107]. Des calculs numériques de la contribution électrostatique théorique de $\bar{B}$ permettraient de trancher entre ces deux explications.

Nous avons observé des comportements viscoélastiques très différents pour les phases lamellaires directes peu chargées (% SDS<1%) et très chargées (% SDS>1%), que nous avons essayé de quantifier par des mesures de rhéologie. Nous avons confirmé les résultats d'Escalante et al. [124] prouvant que la viscoélasticité de la phase lamellaire provenait de ses défauts d'alignement. Ceux-ci sont piégés par les charges de surface, et ne sont pas destabilisés par l'agitation thermique. Après cisaillement, pour les phases non ou peu chargées (% SDS<1%) la diminution de la fraction volumique de membrane entraîne une diminution des modules élastique et visqueux. En revanche, lorsque la fraction volumique de membrane diminue, on observe une augmentation des modules G' et G" pour les phase très chargées (% SDS>1%). A fraction volumique de membrane fixée, après cisaillement, les modules augmentent avec la densité surfacique de charge : l'élimination des défauts d'alignement est d'autant plus difficile que la densité surfacique de charge est importante. Quant au comportement viscoélastique des phase fortement chargées, observé avant cisaillement, il reste inexpliqué pour l'instant : les modules élastique et visqueux sont quasiment constants avec la fraction volumique de membrane et la phase lamellaire est plus élastique que visqueuse. L'observation des défauts sous microscope polarisant lors du cisaillement, ainsi que le couplage de la rhéologie à des expériences de diffusion du rayonnement seraient de la plus grande aide. Par ailleurs, la fluorimétrie sur des phases lamellaires contenant du benzène sulfonate pourrait donner des indications sur une éventuelle ségrégation du tensioactif chargé.

Effet d'un peptide rigide tribloc

Nous avons fait synthétiser un peptide tribloc hydrophobe-hydrophile-hydrophobe globalement neutre. Les spectres de dichroïsme circulaire indiquent que le peptide se trouve dans une forme désorganisée en solution aqueuse, tandis que sa partie hydrophile s'organise en hélice α rigide en présence de membranes de tensioactifs. Ce peptide amphiphile se place aux interfaces hydrophile-hydrophobe, comme prouvé par les mesures de tension superficielle, à l'interface entre l'eau et le décane. Les spectres de fluorescence réalisés dans l'eau et dans la phase éponge, soulignent le changement d'environnement pour les tryptophanes du peptide, dans les phases de membranes fluides. Dans les phases lamellaire et éponge, le peptide couche sa partie hydrophile, organisée en hélice α rigide, sur la surface de la membrane.

L'effet du peptide sur les propriétés élastiques de la phase lamellaire a été étudié en détail. La périodicité de la phase lamellaire reste constante. L'introduction du peptide entraîne une diminution du paramètre de Caillé η, la phase lamellaire décorée restant cependant stabilisée par les répulsions stériques entre membranes. La diminution de η a pu être interprétée par une augmentation de l'épaisseur effective de la membrane induite par le peptide [13], et un modèle géométrique simple de membrane décorée nous a permis d'estimer à 13 nm le rayon de la perturbation induite par le peptide sur la membrane. Cette dimension est en bon accord qualitatif avec les modèles théoriques prévoyant la portée de la perturbation d'une inclusion transmembranaire d'épaisseur différente de celle de la membrane [137][139]. Le peptide entraîne aussi une importante augmentation de la rigidité κ de la membrane qui triple pour un rapport molaire peptide-tensioactif aussi faible que $5.2\ 10^{-4}$. La plupart des modèles théoriques existants ne sont pas adaptés pour expliquer une telle augmentation. Leurs hypothèses sont en effet très restrictives et ne permettent de rendre compte que de faibles augmentations de la rigidité ($\frac{\delta\kappa}{\kappa_0} \ll 1$). L'augmentation de la rigidité peut être expliquée par l'augmentation de l'épaisseur effective de la membrane provoquée par l'insertion du peptide, en utilisant les prédictions théoriques de Woo et al. [117] pour les membranes sèches de tensioactifs.

Quant au module de compressibilité smectique $\bar{B}$, il diminue avec la concentration de peptide, indiquant un affaiblissement des interactions entre membranes décorées. A un préfacteur numérique près, cette diminution est très bien ajustée par les prédictions de Helfrich, en tenant compte à la fois de la rigidification de la membrane et de l'augmentation de son épaisseur effective. La différence de préfacteur entre la théorie et l'expérience reste pour l'instant à élucider.

Les expériences de RMN du deutérium avec du décane deutérié ne nous ont pas permis

de confirmer quantitativement la rigidification de la membrane, il faudrait envisager de réaliser les mêmes expériences avec du $C_{12}E_4$ deutérié. La quantification de cette rigidification par des expériences de diffusion de la lumière sur des phases lamellaires non orientées ou des phases éponges, en utilisant le modèle de Zilman et Granek [148] est aussi envisageable. Il serait intéressant d'élargir cette étude à des peptides de structure similaire (hydrophobe-hydrophile-hydrophobe), en faisant varier la longueur de la partie hydrophile rigide organisée en hélice α. Le rôle exact des parties hydrophobes pourrait aussi être étudié en reprenant la même séquence et en éliminant une des extrémités hydrophobes. On pourrait aussi essayer d'obliger une tel peptide hydrophobe-hydrophile-hydrophobe à ne pas se coucher sur la membrane, mais à y rester perpendiculaire, de façon à ponter deux membranes entres elles. Nous pourrions alors comparer le "bouton-pression" ainsi formé dans la phase lamellaire directe à ceux ayant déjà été étudiés dans des phase lamellaires inverses [15][16].

La protéine LH2

Les succès reportés dans la cristallisation de la bactériorhodopsine dans la phase cubique ont conduit à un certain optimisme, modéré par les résultats obtenus sur l'incorporation du LH2 dans la phase cubique de monooléine.

En effet, nous avons constaté que le LH2 subit, dans cette phase, des modifications affectant les modes de liaison de certains pigments, bien que le dimère de Bchl absorbant vers 855 nm ne soit pas touché et que l'état oligomérique de la protéine semble préservé. Ces effets proviennent de la forte concentration en monooléine (et/ou à la faible teneur en eau) et pas de la contrainte exercée sur le complexe par la courbure de la membrane. Tout ceci nous a conduit à ne pas tenter de cristallisation du LH2 dans la phase cubique. Ces modifications ont été détectées parce que les pigments liés à la protéine sont très sensibles à leur environnement, et seraient passés inaperçues si la protéine n'avait pas ces cofacteurs. Des tests fonctionnels semblent donc nécessaires si la cristallisation d'autres protéines en phase cubique est envisagée.

Nous avons introduit le LH2 dans des phases de membranes fluides. Les expériences de spectroscopie d'absorption et de fluorescence réalisés dans les phase éponges ont malheureusement montré que le LH2 y était dénaturé. Du coup l'étude des modifications des paramètres élastiques induits par cette protéine dénaturée perdait son intérêt. Ces essais ont par ailleurs confirmé la fragilité de la protéine en présence de tensioactifs de la famille C_iE_j (polyéthylèneglycol alkyléthers) en forte concentration.

L'existence d'une phase lamellaire et d'une phase cubique de type Q230 dans le système

OG-eau, pourrait permettre de mener à bien l'étude des modifications des paramètres élastiques des membranes entraînées par l'insertion du LH2 dans la phase lamellaire, mais aussi d'essayer de cristalliser le LH2 en phase cubique. Il faudra s'assurer de la non dénaturation de la protéine dans ces systèmes, il est en effet possible que la petite taille de la maille en phase cubique d'OG ($\approx$4 nm) soit trop petite pour le LH2.

Annexe A

Acides Aminés.

A.1 Formules chimiques des différents groupes d'acides aminés

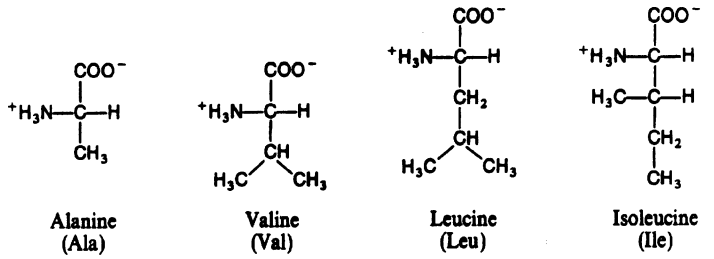


FIG. A.1: *Acides aminés hydrophobes.*

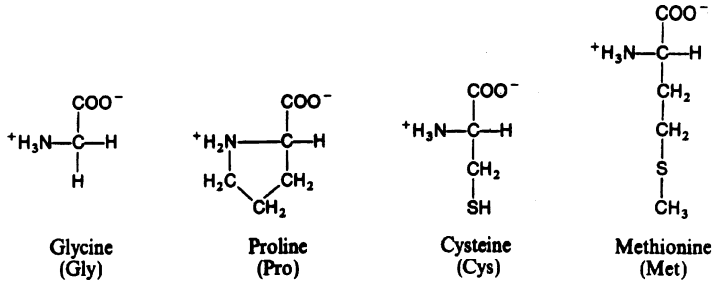


FIG. A.2: *Acides aminés non polaires.*

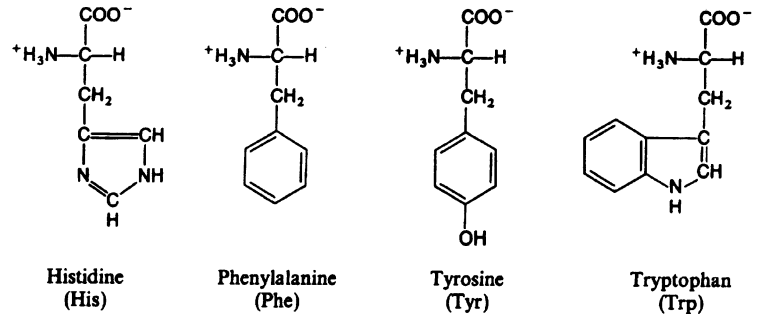


FIG. A.3: *Acides aminés aromatiques.*

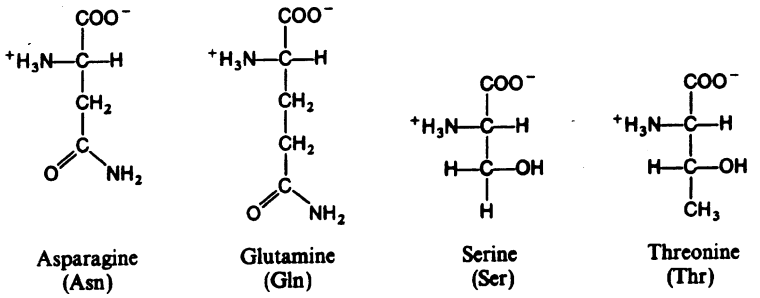


FIG. A.4: *Acides aminés polaires.*

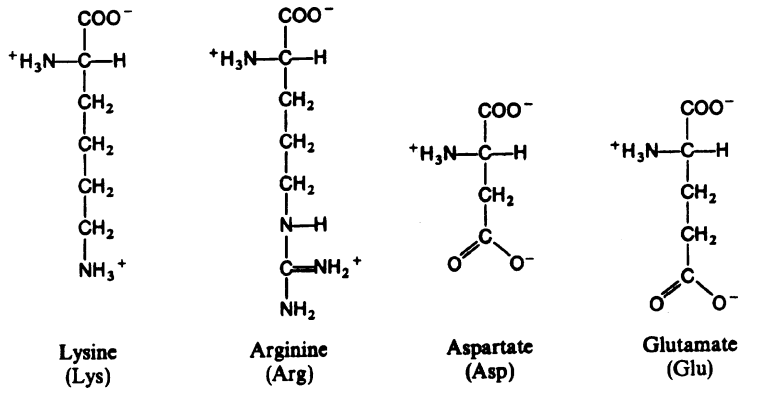


FIG. A.5: *Acides aminés chargés.*

A.2 Abréviations utilisées pour les acides aminés

Acide Aminé	Abréviation	Symbole	Type
Alanine	Ala	A	hydrophobe
Arginine	Arg	R	chargé (+)
Asparagine	Asn	N	polaire
Aspartate	Asp	D	chargé (-)
Cystéine	Cys	C	non polaire
Glutamine	Gln	Q	polaire
Glutamate	Glu	E	chargé (-)
Glycine	Gly	G	non polaire
Histidine	His	H	aromatique
Isoleucine	Ile	I	hydrophobe
Leucine	Leu	L	hydrophobe
Lysine	Lys	K	chargé (+)
Méthinonine	Met	M	non polaire
Phénylalanine	Phe	F	aromatique
Proline	Pro	P	non polaire
Sérine	Ser	S	polaire
Thréonine	Thr	T	polaire
Tryptophane	Trp	W	aromatique
Tyrosine	Tyr	Y	aromatique
Valine	Val	V	hydrophobe

TAB. A.1: *Acides aminés, leurs différentes abréviations (3 lettres ou 1 lettre) et leur classification à $pH = 7$, tiré de Cantor et Schimmel [195].*

Annexe B

Formules chimiques et masses molaires des différents composants

– tétraéthylène glycol monododécyl éther (noté $C_{12}E_4$), non ionique :
Masse molaire : 362.55 g/mol

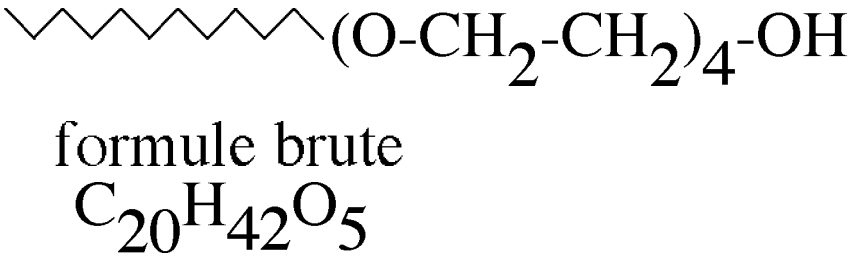


FIG. B.1: *Formules brute et développée du $C_{12}E_4$.*

– sodium dodécyl sulfate (noté SDS), anionique :
Masse molaire : 288.4 g/mol

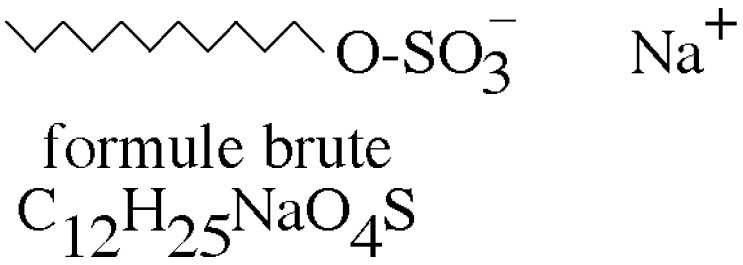


FIG. B.2: *Formules brute et développée du SDS.*

– bromure dodécyl triméthyl ammonium (noté DTAB), cationique :
Masse molaire : 308.35 g/mol

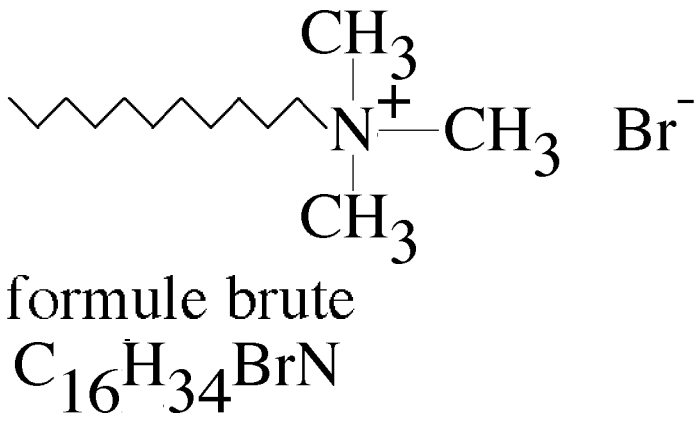


FIG. B.3: *Formules brute et développée du DTAB.*

– diéthylène glycol monododécyl éther (noté $C_{12}E_2$), non ionique :
Masse molaire : 274.45 g/mol

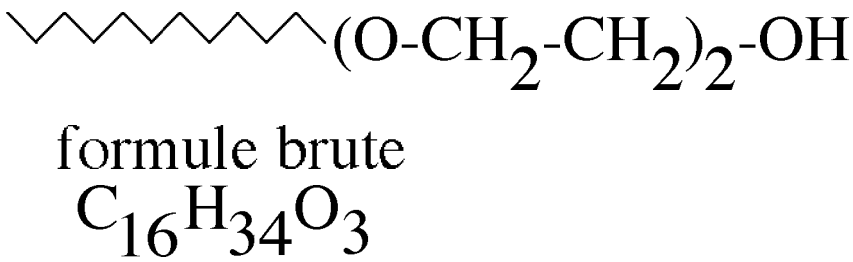


FIG. B.4: *Formules brute et développée du $C_{12}E_2$.*

– octyl-β-D-glucopyranoside (ou octylglucoside noté OG), non ionique :
Masse molaire : 292.4 g/mol

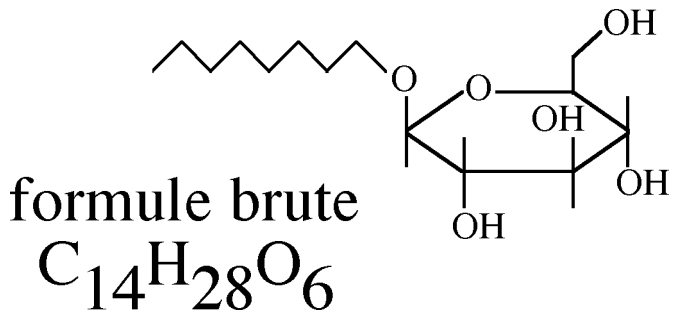


FIG. B.5: *Formules brute et développée de l'octylglucoside (OG).*

– 1-monooléyl-rac-glycérol (ou monooléine noté MO), non ionique :
Masse molaire : 356.5 g/mol

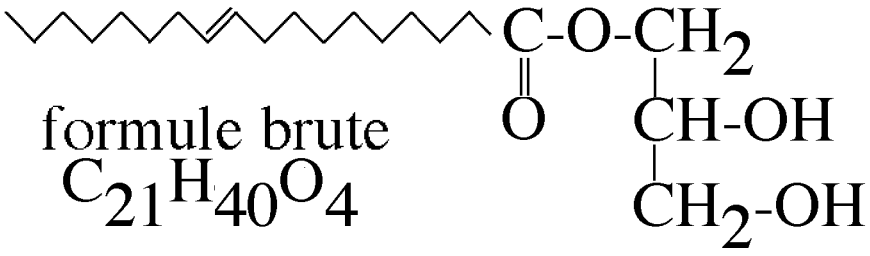


FIG. B.6: *Formules brute et développée de la monooléine (MO).*

Annexe C

Mode de préparation des échantillons

C.1 Densités utilisées pour les différents composants

Comme nous avons travaillé à 20°C, ou autour de cette température, nous avons considéré les densités volumiques constantes.

- eau/solutions aqueuses : 1 g/ml
- décane : 0.73 g/ml
- $C_{12}E_4$: 0.942 g/ml (mesurée au pycnomètre)
- Mélange $C_{12}E_4$+SDS (994/6 molaire) : 0.9435 g/ml (mesurée au pycnomètre)
- Mélange $C_{12}E_4$+SDS (99/1 molaire) : 0.945 g/ml (mesurée au pycnomètre)
- Mélange $C_{12}E_4$+SDS (96/4 molaire) : 0.949 g/ml (mesurée au pycnomètre)
- monooléine : 1 g/ml en première approximation

Pour les mélanges de fractions molaires de SDS intermédiaires, nous avons pris les valeurs intermédiaires à celles mesurées.

En ce qui concerne les mélanges DTAB-$C_{12}E_4$, nous avons négligé les variations de densité.

C.2 Système $C_{12}E_4$-eau-décane

C.2.1 Phase lamellaire inverse

Pour les lois de dilution de la phase lamellaire inverse, nous avons procédé comme suit :

Une solution mère de tensioactif et d'eau a été préparée par pesée, de sorte que le rapport volumique $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_{eau}} = 0.62$ (ou 0.385). En supposant que les volumes restent constants, et que l'on peut additionner les densités volumiques, nous avons préparé les échantillons en pesant les quantités nécessaires de cette solution mère, auxquelles nous avons rajouté le décane par pesée. Les échantillons ont ensuite été mélangés au moyen d'un vortex, puis centrifugés pendant 5 minutes à 3000 g, afin que tous les composants soient au fond du tube. Les échantillons sont ensuite placés dans un bain thermostaté à la température désirée.

C.2.2 Phase lamellaire directe

Pour les lois de dilution de la phase lamellaire directe, nous avons procédé comme suit :

Une solution mère de tensioactif et de décane a été préparée par pesée de sorte que le rapport volumique $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d} = 0.554$. En supposant que les volumes restent constants, et que l'on peut additionner les densités volumiques, nous avons préparé les échantillons en pesant les quantités nécessaires de cette solution mère, auxquelles nous avons rajouté l'eau par pesée. Les échantillons ont ensuite été mélangés au moyen d'un vortex, puis centrifugés pendant 5 minutes à 3000 g, afin que tous les composants soient au fond du tube. Les échantillons sont ensuite placés dans un bain thermostaté à la température désirée.

C.3 Système $C_{12}E_4$-eau-décane + peptide

La préparation de ces échantillons est quasiment semblable à celle des échantillons de la phase lamellaire directe (voir ci-dessus), à l'insertion du peptide près.

Pour l'insertion du peptide dans le système, nous avons procédé de deux manières :

- La première méthode a consisté à peser le peptide lyophilisé dans un tube, et à y rajouter les autres composants (solution mère de tensioactif et de décane, puis eau), exactement comme pour la phase lamellaire nue. Le désavantage de cette méthode est qu'elle oblige à peser de "grandes" quantités de peptide.
- Le seconde méthode nous a permis d'optimiser l'utilisation des quantités de peptide à notre disposition. Nous avons mis le peptide en solution dans l'eau, puis avons mesuré sa concentration par spectroscopie d'absorption (voir chapitre 2). La phase lamellaire a ensuite été préparée comme présenté ci-dessus, en remplaçant l'eau par la solution aqueuse de peptide. On peut alors ajuster précisément la concentration de peptide désirée et rajoutant de l'eau à l'échantillon.

Les deux méthodes donnent les mêmes résultats, mais la seconde est plus pratique et permet de mieux quantifier la quantité de peptide dans les échantillons.

C.4 Système MO-eau/solution de protéine

Les différents modes de préparation des phase cubiques ont été détaillés dans le chapitre 5, auquel il conviendra de se reporter.

C.5 Système $C_{12}E_2$-eau

Le diagramme de phase de ce système ayant été déterminé en poids [193], nous avons simplement pesé les quantités nécessaires de tensiactif et de solution aqueuse de manière à obtenir 45% de tensioactif en poids par rapport au poids total de l'échantillon. Le mélange a ensuite été passé au vortex, puis centrifugé pendant 5 minutes à 3000 g. Les tubes ont ensuite été placés dans un bain thermostaté à la température désirée. Ces échantillons mettant environ une journée pour arriver à l'équilibre il convient de les mélanger environs toutes les deux heures.

Annexe D

Modèle de diffusion par sauts

Ce modèle a d'abord été développé pour la diffusion tridimensionnelle par Cohen et Turnbul [188]. Puis il a été transposé avec succès à la diffusion bidimensionnelle de lipides [196] ou de tensioactifs [197] sur des bicouches ou des monocouches. Le mouvement d'une particule se déroule en trois étapes schématisées sur la figure D.1 :

- Les fluctuations de la membrane créent une aire libre dans le voisinage de la molécule diffusante.
- Si cette aire est suffisamment grande, la molécule se déplace vers elle (elle "saute").
- L'aire, laissée libre par le départ de la molécule, disparaît lorsque les molécules qui forment la membrane remplissent le vide laissé, où qu'une autre molécule "saute" à sa place.

La répétition de ce processus est à l'origine de la trajectoire brownienne de la molécule.

Le coefficient de diffusion moyen s'écrit alors :

$$D = Gd^* \sqrt{\frac{2k_B T}{m}} exp\left(-\frac{\gamma a^*}{a_f}\right) \tag{D.1}$$

où G est un facteur géométrique, d* le diamètre moyen de l'aire disponible à la molécule diffusante, m la masse de cette molécule, γ un facteur correctif qui permet de tenir compte du croisement des aires libres, a* la section transversale de la molécule diffusante et a_f, l'aire libre par tête polaire. Ce modèle de diffusion par sauts n'est pas applicable à une protéine qui est beaucoup trop grosse.

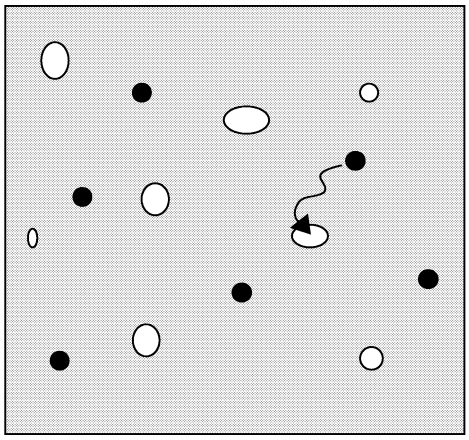


FIG. D.1: *Illustration du modèle moléculaire de diffusion par sauts. Les fluctuations de densité créent des espaces vides (schématisés ici en blanc), vers lesquels , s'ils sont assez grands, les molécules diffusantes (schématisées en noir) peuvent sauter.*

Annexe E

Estimation des interactions de Van der Waals

On a vu dans le chapitre 1 que la contribution desinteractions de Van der Waals au module de compressibilité smectique s'écrit :

$$\bar{B}_{VDW} = -d_B \frac{A_H}{2\pi} \left[\frac{1}{d_s^4} + \frac{1}{(d_B + d_m)^4} - \frac{2}{d_B^4} \right] \tag{E.1}$$

La constante A_H appelée constante de Hamaker dépend des molécules composant le milieu via leur constante diélectrique et leur indice de réfraction. Dans le cadre de la théorie DLP [198], elle peut être décomposée en deux contributions, la première statique A_{H0} [37] due aux interactions de Keesom et de Debye [199][200][17], la seconde dispersive $A_{H\nu}$ due aux interactions de London [201]. Dans le cas d'une couche de solvant organique entre deux milieux semi-infinis d'eau (ou le contraire), on a :

$$A_{H0} = \frac{3}{4} k_B T \frac{(\epsilon_o - \epsilon_w)^2}{(\epsilon_o + \epsilon_w)^2} \tag{E.2}$$

où ϵ_o et ϵ_w sont les constantes diélectriques relatives du solvant organique et de l'eau et

$$A_{H\nu} = \frac{3}{8\sqrt{2}} h\nu_e \frac{(n_o^2 - n_w^2)^2}{(n_o^2 + n_w^2)^{3/2}} \tag{E.3}$$

où n_o et n_w sont les indices de réfraction du solvant organique et de l'eau,h la constante de Planck (h=6.626 10^{-34} J.s) et ν_e une fréquence de coupure (égale à 3. 10^{15} s^{-1} [202]). Dans le cas de notre système, nous pouvons utiliser ce modèle et ne pas tenir compte d'une couche de tensioactif car l'indice du $C_{12}E_4$ (1.44) est quasiment identique à celui du décane (1.412). Connaissant l'indice de l'eau (1.33) et sa constante diélectrique (80) et celle du décane ($\epsilon_o = n_o^2$=1.99), on trouve finalement pour la constante de Hamaker :

A_H=1.1 k_BT

Nous pouvons alors estimer la contribution de Van der Waals et la comparer à celles des répulsions stériques.

E.1 Phase lamellaire inverse

Le long de la droite de dilution telle que le rapport volumique $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_{eau}}$ = 0.62, la périodicité varie entre 8 et 18 nm et l'épaisseur de la membrane vaut environ 5.3 nm.

Dans un premier cas (d_B=8 nm) on trouve :

- $\bar{B}_{VDW}$=-1 10^5 Pa
- $\bar{B}_{ond}$=1.2 10^6 Pa

Dans le second cas (d_B=18 nm) on a :

- $\bar{B}_{VDW}$=-300 Pa
- $\bar{B}_{ond}$=5500 Pa

Dans les deux cas, la contribution des interactions de Van der Waals est négligeable devant celle des répulsions stériques (environ 10% de sa valeur).

E.2 Phase lamellaire directe

Le long de la droite de dilution telle que le rapport volumique $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d}$ = 0.554, la périodicité est toujours inférieure ou égale à 15 nm et l'épaisseur de la membrane vaut environ 5.6 nm.

Dans un premier cas (d_B=115 nm) on trouve :

- $\bar{B}_{VDW}$=-5500 Pa
- $\bar{B}_{ond}$=49000 Pa

Dans un second cas (d_B=15 nm) on a :

- $\bar{B}_{VDW}$=-1000 Pa
- $\bar{B}_{ond}$=10800 Pa

Dans les deux cas, la contribution des interactions de Van der Waals est négligeable devant celle des répulsions stériques (environ 10% de sa valeur).

Annexe F

Comparaison de deux méthodes de détermination de la rigidité

Nous avons comparé l'écart à la loi de dilution pour le phase lamellaire directe du système $C_{12}E_4$-eau-décane, le long de la droite de dilution telle que le rapport volumique $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d} = 0.554$, avec la méthode proposée par Lei et Lei [56]. Cette méthode repose sur la connaissance de l'épaisseur du solvant que renferme la double couche de tensioactif (eau pour la phase lamellaire inverse ou solvant organique pour la phase lamellaire directe), à partir de la périodicité déterminée par diffusion du rayonnement et de la fraction volumique de chaque composant. L'épaisseur de solvant organique d_o s'écrit comme :

$$d_o = \phi_o d_B \tag{F.1}$$

où ϕ_o est la fraction volumique de solvant organique. La variation de d_o avec d_B peut être ajustée par l'expression suivante :

$$d_o = d_{o0}\left[1 + \frac{k_B T}{8\pi\kappa} ln\left(\frac{4\kappa q_{max}^2 (d_B - d_m)^2}{3\pi k_B T} + \sqrt{1 + \left(\frac{4\kappa q_{max}^2 (d_B - d_m)^2}{3\pi k_B T}\right)^2}\right)\right] \tag{F.2}$$

où d_{o0} est l'épaisseur de solvant organique sans fluctuations et q_{max} le plus grand vecteur d'onde des fluctuations selon le plan moyen des membranes. Nous avons pris $q_{max} = \frac{\pi}{\sqrt{\sigma}}$ où σ correspond à l'aire par tête polaire du tensioactif.

L'ajustement par l'expression précédente est présenté sur la figure F.1, il est très bon et donne κ=1$\pm$ 0.2 k_BT. L'écart à la loi de dilution est quant à lui présenté sur la figure F.2 et l'ajustement par l'expression 1.35 donne κ=1$\pm$ 0.1 k_BT.

Les deux déterminations donnent des valeurs de la rigidité identiques. Nous nous sommes donc contentés de l'écart à la loi de dilution.

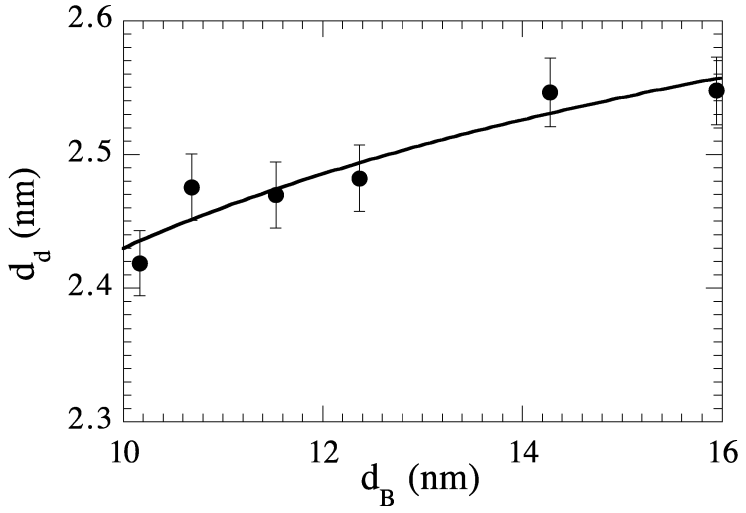


FIG. F.1: *Variation de l'épaisseur de solvant organique d_o en fonction de la périodicité d_B. La ligne correspond au meilleur ajustement par l'expression F.2 qui donne d_{o0}=2± 0.1 nm et κ=1± 0.2 $k_B T$, en très bon accord avec la valeur déterminée par l'écart à la loi de dilution (figure F.2).*

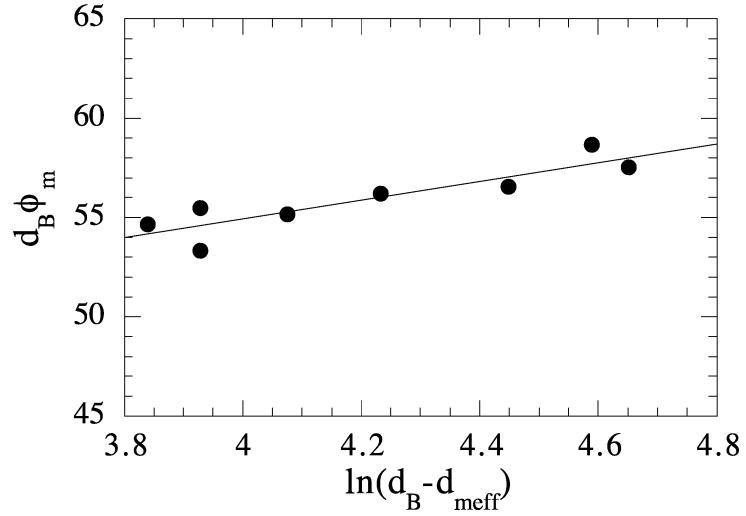
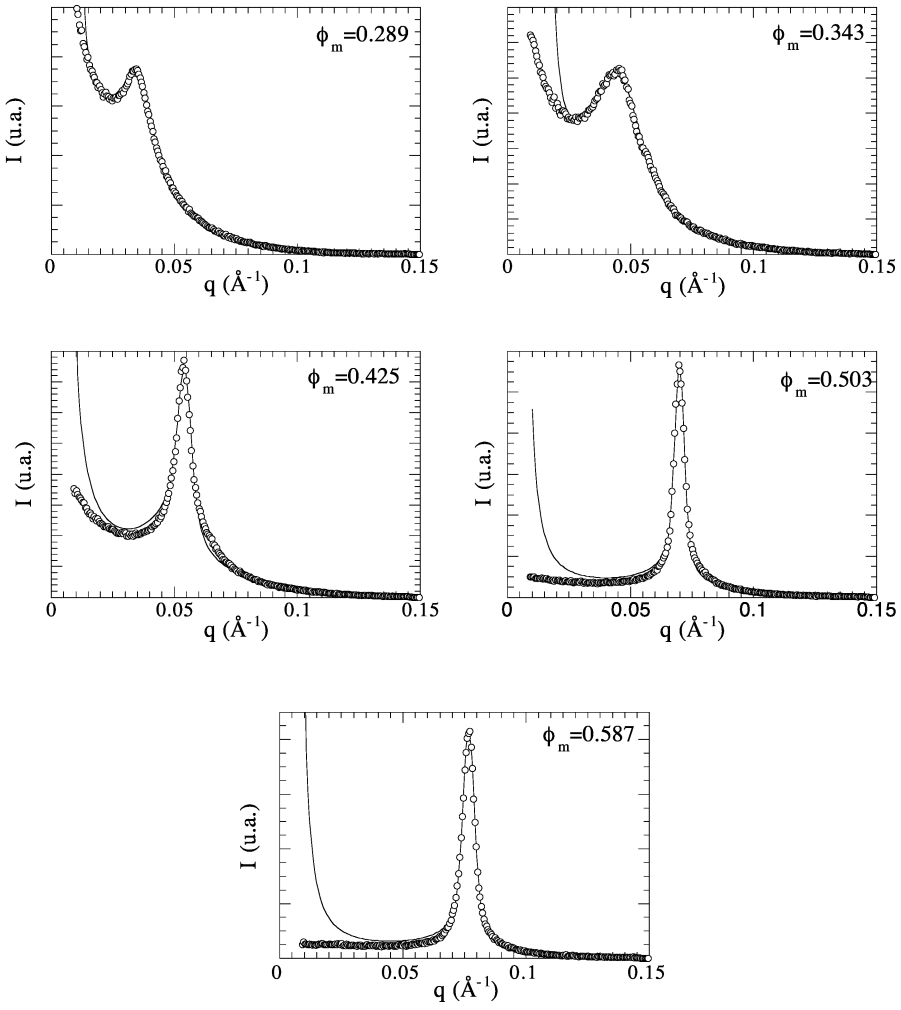


FIG. F.2: *ecart à la loi de dilution. La droite correspond au meilleur ajustement par l'expression 1.35 et donne κ=1± 0.1 $k_B T$.*

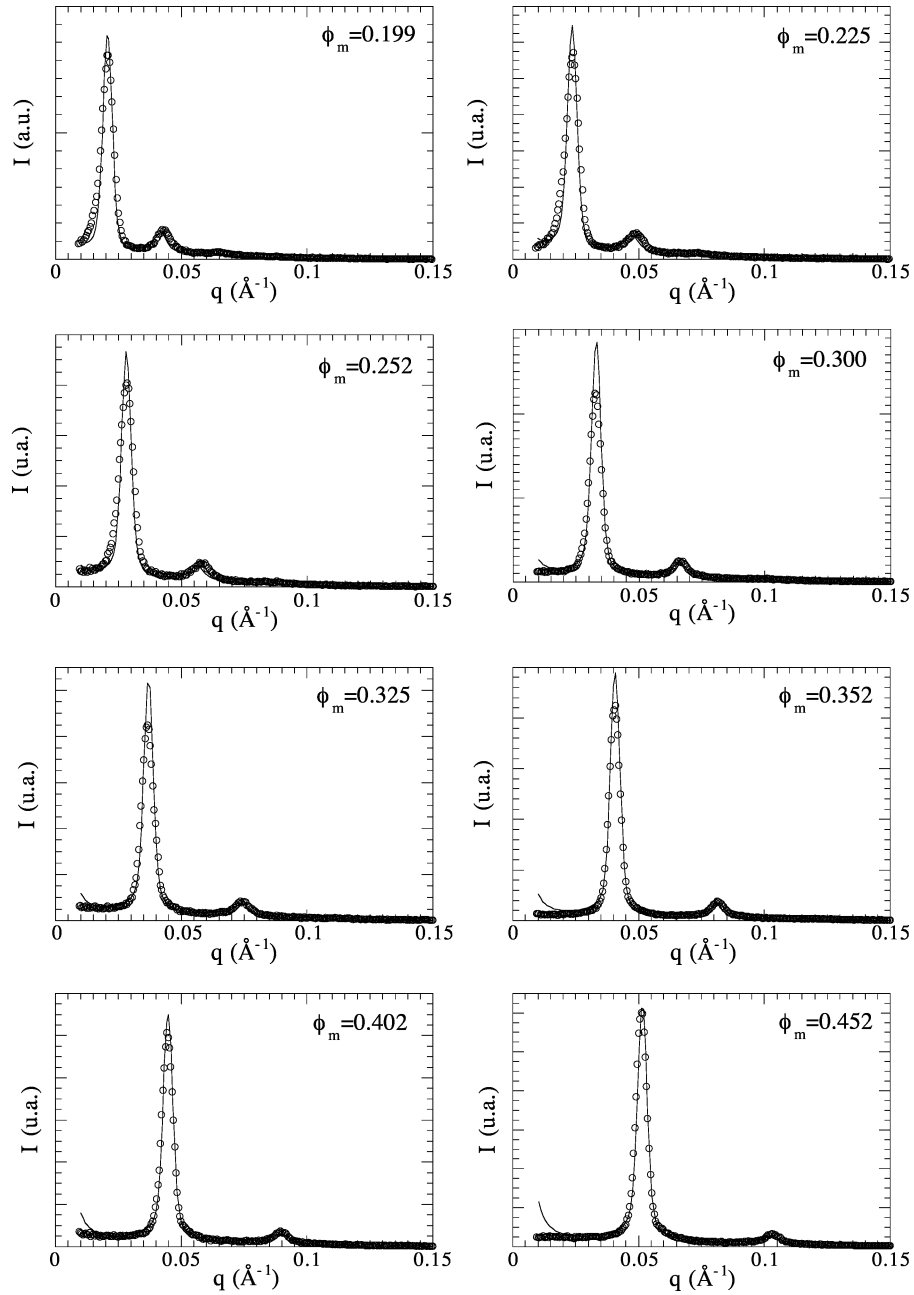
Annexe G

Spectres de rayons X

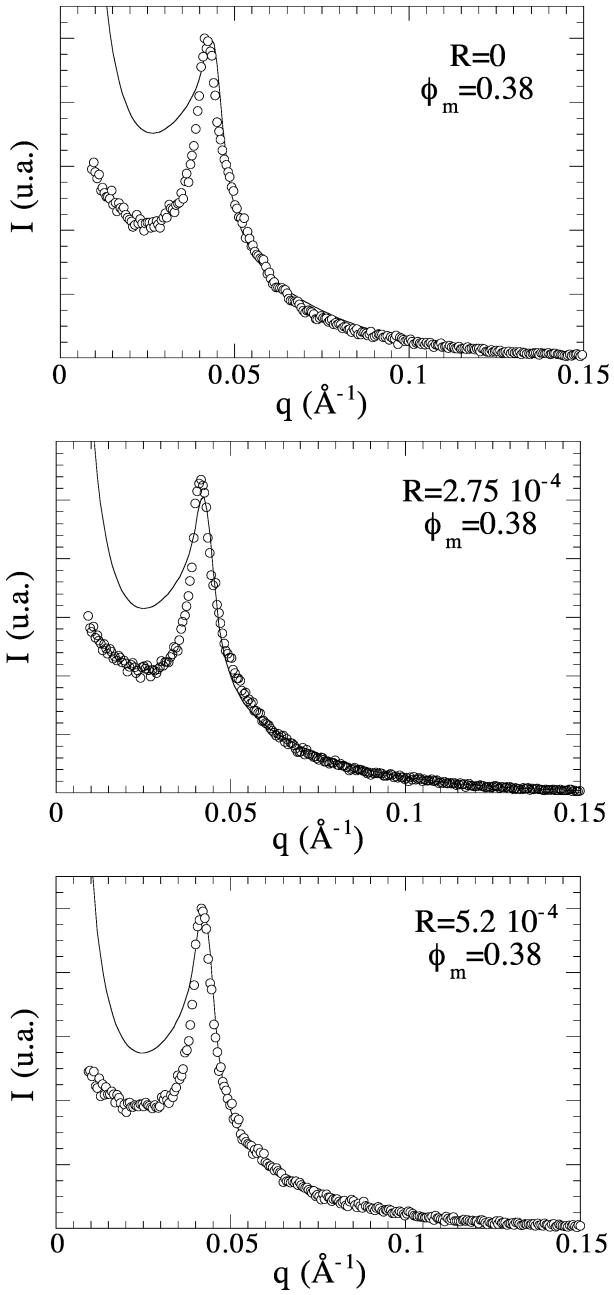
Phase lamellaire inverse non chargée : $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_{eau}} = 0.62$



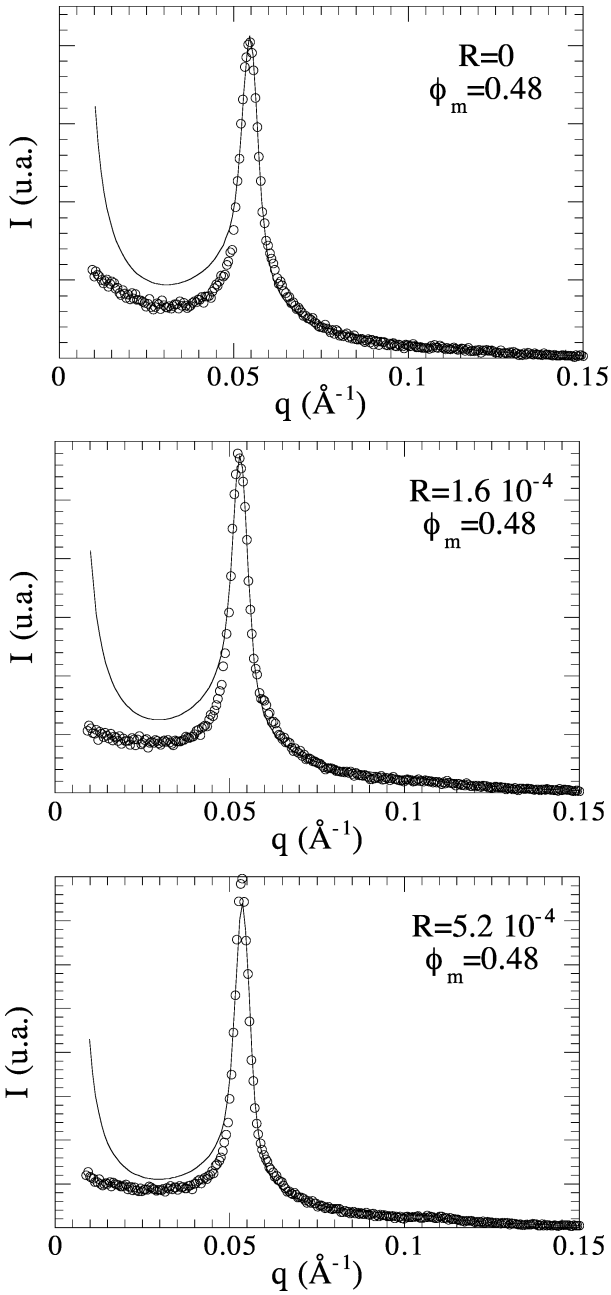
Phase lamellaire directe chargée (1.75% de SDS) : $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d} = 0.554$



Phase lamellaire décorée par le peptide : $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d} = 0.554$



Phase lamellaire décorée par le peptide : $\frac{V_{TA}}{V_{TA}+V_d} = 0.554$



Bibliographie

[1] A. Fogden, J. Daicic, D. J. Mitchell, and B. W. Ninham. *Physica A*, **234** :167, 1996.

[2] R. de Vries. *Phys. Rev. E*, **56** :1879, 1997.

[3] I. Iliopoulos and U. Olsson. *J. Phys. Chem.*, **98** :1500, 1994.

[4] P. Kékicheff, B. Cabane, and M. Rawiso. *J. Coll. Int. Sci.*, **120** :51, 1984.

[5] C. Ligoure, G. Bouglet, and G. Porte. *Phys. Rev. Lett.*, **71** :3600, 1993.

[6] M.-F. Ficheux, A.-M. Bellocq, and F. Nallet. *J. Phys. II (France)*, **5** :823, 1995.

[7] E. Z. Radlinska, T. Gulik-Krzywicki, F. Lafuma, D. Langevin, W. Urbach, C. E. Williams, and R. Ober. *Phys. Rev. Lett.*, **74** :4237, 1995.

[8] E. Z. Radlinska, T. Gulik-Krzywicki, F. Lafuma, D. Langevin, W. Urbach, and C. E. Williams. *J. Phys. II (France)*, **7** :1393, 1997.

[9] L. Porcar, C. Ligoure, and J. Marignan. *J. Phys. II (France)*, **7** :1, 1997.

[10] G. Bouglet and C. Ligoure. *Eur. Phys. J. B*, **9** :137, 1999.

[11] H. E. Warriner, S. H.J. Idziak, N. L. Slack, P. Davidson, and C. R. Safinya. *Science*, **271** :969, 1996.

[12] H. E. Warriner, S. L. Keller, S. H. J. Idziak, N. L. Slack, P. Davidson, J. A. Zasadzinski, and C. R. Safinya. *Biophys. J.*, **75** :272, 1998.

[13] F. Castro-Roman, G. Porte, and C. Ligoure. *Phys. Rev. Lett.*, **82** :109, 1999.

[14] Y. Yang, R. Prudhomme, K. M. McGrath, P. Richetti, and C. M. Marques. *Phys. Rev. Lett.*, **80** :2729, 1998.

[15] C. Nicot, M. Waks, R. Ober, T. Gulik-Krzywicki, and W. Urbach. *Phys. Rev. Lett.*, **77** :3485, 1996.

[16] N. Taulier, C. Nicot, M. Waks, R. S. Hodges, R. Ober, and W. Urbach. *Biophys. J.*, **78** :857, 2000.

[17] J. N. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces.* Academic Press, 1985.

[18] P. Ekwall. *Advances in liquid crystals.* Academic Press, New York, 1975.

[19] G. Porte. *J. Phys. Cond. Matter*, **4** :8649, 1992.

[20] C. Coulon, D. Roux, and M. E. Cates. *J. Phys. Chem.*, **96** :4174, 1992.

[21] W. Helfrich. *Zu Naturforsch.*, **28c** :693, 1973.

[22] F. Auguste, P. Barois, L. Fredon, B. Clin, E. J. Dufourc, and A. M. Bellocq. *J. Phys. II (France)*, **4** :2197, 1994.

[23] L. D. Landau. *Phys. z. Sow.*, **2** :26, 1937.

[24] R. E. Peierls. *Helv. Phys. Acta Suppl.*, **7** :81, 1934.

[25] J. Briggs, H. Chung, and M. Caffrey. *J. Phys. II (France)*, **6** :723, 1996.

[26] G. Porte, J. Marignan, P. Bassereau, and R. May. *J. Phys. (France)*, **49** :511, 1988.

[27] D. Gazeau, A.-M. Bellocq, D. Roux, and T. Zemb. *Europhys. Lett.*, **9** :447, 1989.

[28] R. Strey, R. Schomaecker, D. Roux, F. Nallet, and U. Olsson. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **86** :2253, 1990.

[29] R. Strey, W. Jahn, G. Porte, and P. Bassereau. *Langmuir*, **6** :1635, 1990.

[30] A. Maldonado, W. Urbach, and D. Langevin. *J. Phys. Chem. B*, **101** :8079, 1997.

[31] P. G. de Gennes and C. Taupin. *J. Phys. Chem.*, **86** :2294–2304, 1982.

[32] D. Sornette. *Europhys. Lett.*, **2** :715–724, 1986.

[33] L. Peliti and S. Leibler. *Phys. Rev. Lett.*, **54** :1690–1693, 1985.

[34] W. Helfrich. *J. Phys. (France)*, **46** :1263–1268, 1985.

[35] F. David. *Europhys. Lett.*, **6** :603–608, 1988.

[36] L. Golubovic and T. C. Lubensky. *Europhys. Lett.*, **10** :513–518, 1989.

[37] J. Mahanty and B. W. Ninham. *Dispersion forces.* London, 1976.

[38] H.C. Hamaker. *Physica*, **4** :1058, 1937.

[39] J. Marra. *J. Coll. Int. Sci.*, **109** :11, 1986.

[40] R. P. Rand. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10** :277, 1981.

[41] D. Roux and C. R. Safinya. *J. Phys. (France)*, **49** :307–318, 1988.

[42] W. Helfrich. *Zu Naturforsch.*, **33a** :305, 1978.

[43] P. G. De Gennes. *J. Phys Coll C4 Suppl. N11-12*, **30** :C4–65, 1969.

[44] F. Bochard and P. G. De Gennes. *Pramana Suppl.*, **1**, 1975.

[45] Patricia Bassereau. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II, 1990.

[46] F. Nallet, D. Roux, and J. Prost. *J. Phys. (France)*, **50** :3147–3165, 1989.

[47] M. Dubois, T. Zemb, L. Belloni, A. Delville, P. Levitz, and R. Setton. *J. Chem. Phys.*, **96** :2278–2286, 1992.

[48] C. R. Safinya, D. Roux, G. S. Smith, S. K. Sinha, P. Dimon, N. A. Clarck, and A. M. Bellocq. *Phys. Rev. Lett.*, **57** :2718–2721, 1986.

[49] R. Oda and J. D. Litster. *J. Phys. II (France)*, **7** :815, 1997.

[50] L. Porcar, J. Marignan, C. Ligoure, and T. Gulik-Krzywicki. *Langmuir*, **16** :193, 2000.

[51] F. C. Larché, S. El Qebbaj, and J. Marignan. *J. Phys. Chem.*, **90** :707, 1986.

[52] W. Helfrich and R. M. Servuss. *Il Nuovo Cimento*, **3** :137, 1984.

[53] L. Golubovic and T. C. Lubensky. *Phys. Rev. B*, **39** :12110, 1989.

[54] D. Roux, F. Nallet, E. Freyssingeas, G. Porte, P. Bassereau, M. Skouri, and J. Marignan. *Europhys. Lett.*, **17** :575, 1992.

[55] Eric Freyssingeas. Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux, 1994.

[56] N. Lei and X. Lei. *Langmuir*, **14** :2155, 1998.

[57] J. M. Di Meglio and P. Bassereau. *J. Phys. II (France)*, **1** :247–255, 1991.

[58] C. Quilliet, P. Fabre, and M. Veyssié. *J. Phys. II (France)*, **3** :1371–1386, 1993.

[59] F. Nallet, D. Roux, and J. Prost. *Phys. Rev. Lett.*, **62** :276, 1989.

[60] F. Nallet, D. Roux, C. Quilliet, P. Fabre, and S. T. Milner. *J. Phys. II (France)*, **4** :1477–1499, 1994.

[61] Gérard Bouglet. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II, 1997.

[62] G. Porte, J. Appell, P. Bassereau, and J. Marignan. *J. Phys. (France)*, **50** :1335, 1989.

[63] F. Nallet, D. Roux, and S. T. Milner. *J. Phys. (France)*, **51** :2333, 1990.

[64] F. Nallet, R. Laversanne, and D. Roux. *J. Phys. II (France)*, **3** :487, 1993.

[65] A. Caillé. *C. R. Hebd. Acad. Sci. Paris B*, **274** :891, 1972.

[66] G. Porte, J. Marignan, P. Bassereau, and R. May. *Europhys. Lett.*, **7** :713, 1988.

[67] Francisco Castro-Roman. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II, 1999.

[68] P. Bassereau, J. Marignan, and G. Porte. *J. Phys. (France)*, **48** :673, 1987.

[69] R. Zhang, R. M. Suter, and J. F. Nagle. *Phys. Rev. E*, **50** :5047, 1994.

[70] V. M. Kaganer, B. I. Ostrovskii, and W. H. Dejeu. *Phys. Rev. A*, **44** :8158, 1991.

[71] C. Ligoure. communication privée.

[72] N. Lei, C. R. Safinya, and R. F. Bruinsma. *J . Phys. II (France)*, **5** :1155, 1995.

[73] L. Gunther, Y. Imry, and J. Lajzerowicz. *Phys. Rev. A*, **22** :1773, 1980.

[74] O. Glatter and O. Kratky. *Small Angle X-Ray Scattering.* Academic Press, London, 1982.

[75] M. Skouri, J. Marignan, J. Appel, and G. Porte. *J. Phys. II (France)*, **1** :1121, 1991.

[76] T. Tate. *Phil. Mag.*, **27** :1761, 1864.

[77] Lord Rayleigh. *Phil. Mag.*, **48** :321, 1899.

[78] W. D. Harkins and F. E. Brown. *J. Am. Chem. Soc.*, **41** :499, 1919.

[79] A. W. Adamson. *Physical Chemistry of Surfaces.* John Wiley and sons, New York, 1976.

[80] S. Cribier, A. Gulik, P. Fellman, R. Vargas, P. F. Devaux, and V. Luzzati. *J. Mol. Biol.*, **229** :517–525, 1993.

[81] J. Davoust, P. F. Devaux, and L. Léger. *EMBO J.*, **10** :1233, 1982.

[82] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox. *Principes de biochimie.* Médecine -Sciences, Flammarion, Paris, 1995.

[83] J. P. Greenstein and M. Minitz. *Chemistry of the amino acids.* John Wiley and sons, New York, London, 1961.

[84] P. Crabbé. *In Optical rotatory dispersion and circular dichroism in organic chemistry*, page 1, 1965.

[85] J.T. Yang, C. S. C. Wu, and H. Martinez. *Methods in Enzymology*, **130** :208, 1986.

[86] N. Greenfield and G. D. Fasman. *Biochemistry*, **8** :4108, 1969.

[87] C. P. Slichter. *Principle of Magnetism resonance.* Springer-Verlag, New York, 1980.

[88] J. Seelig. *Quart. Rev. Biophys.*, **10** :353, 1977.

[89] E. J. Dufourc, I. C. P. Smith, and H. C. Jarrel. *Chem. and Phys. of Lipids*, **33** :153, 1983.

[90] H. A. Barnes, J. F. Hutton, and K. Walters. *An introduction to rheology.* Elsevier, Amsterdam, 1989.

[91] C. Macosko. *Rheology : Principles, measurements and applications.* Wiley, New York, 1994.

[92] P. Coussot and C. Ancey. *Rhéophysique des pâtes et des suspensions.* EDP Sciences, Paris, 1999.

[93] M. Jonstroemer and R. Strey. *J. Phys. Chem*, **96** :5993, 1992.

[94] R. Schomaecker and R. Strey. *J. Phys. Chem*, **98** :3908, 1994.

[95] G. Salamat, R. de Vries, E. W. Kaler, S. Satija, and L. Sung. *Langmuir*, **16** :102, 2000.

[96] H. von Berlepsch and R. de Vries. *Eur. Phys. J. E*, **1** :141, 2000.

[97] K. Fukuda, U. Olsson, and U. Wuerz. *Langmuir*, **10** :3222, 1994.

[98] V. Rajagopalan, H. Bagger-Joergensen, K. Fukuda, U. Olsson, and B. Joensson. *Langmuir*, **12** :2939, 1996.

[99] J. L. Harden, C. M. Marques, J. F. Joanny, and D. Andelman. *Langmuir*, **8** :1170, 1992.

[100] M. Wintherhalter and W. Helfrich. *J. Phys. Chem*, **92** :6865, 1988.

[101] H. N. W. Lekkerkerker. *Physica A*, **159** :319, 1989.

[102] P. Pincus, J. F. Joanny, and D. Andelman. *Europhys. Lett.*, **11** :763, 1990.

[103] P. G. Higgs and J. F. Joanny. *J. Phys. (Paris)*, **51** :2307, 1990.

[104] A. Fogden and B. W. Ninham. *Langmuir*, **3** :590, 1991.

[105] M. Wintherhalter and W. Helfrich. *J. Phys. Chem*, **96** :327, 1992.

[106] P. A. Pincus and S. A. Safran. *Europhys. Lett.*, **42** :103, 1998.

[107] D. B. Lukatsky and S. A. Safran. *Phys. Rev. E*, **60** :5848, 1999.

[108] D. Andelman. *In Handbook of Physics of Biological Systems*, volume **1**. ed. R. Lipowsky, Elsevier Science, 1994.

[109] J. Daicic, A. Fogden, I. Carlsson, H. Wennerstroem, and B. Joensson. *Phys. Rev. E*, **54** :3984, 1996.

[110] A. Fogden, J. Daicic, and A. Kidane. *J. Phys. II (France)*, **7** :229, 1997.

[111] Lionel Porcar. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier II, 1997.

[112] T. Sottman, R. Strey, and S.-H. Chen. *J. Chem. Phys.*, **106** :6483, 1997.

[113] V. Luzzati, H. Mustacchi, and A. Skoulios. *Disc. Faraday Soc.*, **25** :43, 1958.

[114] N. Tsapis, R. Ober, and W. Urbach. *Langmuir*, **16** :2968–2974, 2000.

[115] P. Boltenhagen, O. Lavrentovitch, and M. Kléman. *J. Phys. II (France)*, **1** :1233, 1991.

[116] E. Freyssingeas, D. Roux, and F. Nallet. *J. Phys. : Condens. Matter*, **8** :2801, 1996.

[117] H.-J. Woo, C. Carraro, and D. Chandler. *Phys. Rev. E*, **53** :R41, 1996.

[118] G. Bouglet, C. Ligoure, A.-M. Bellocq, E. Dufourc, and G. Mosser. *Phys. Rev. E*, **57** :834, 1998.

[119] S. L. Keller, H. E. Warriner, C. R. Safinya, and J. A. Zasadzinski. *Phys. Rev. Lett.*, **78** :4781, 1997.

[120] L. P. Aggerbeck and T. Gulik-Krzywicki. *Methods in Enzymology*, **128** :457, 1986.

[121] A. W. Robards and U. B. Sleytr. *Low temperature methods in biological electron microscopy*. Elsevier, Amsterdam, 1985.

[122] J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J.-C. Homo, J. Leapult, A. W. McDowell, and P. Schultz. *Quart. Rev. Biophys.*, **21** :129, 1988.

[123] T. Kalyasundaram. *In Micellization, solubilization and microemulsions*. 1972.

[124] J. I. Escalante and H. Hoffmann. *J. Phys. Condens. Matter*, **12** :A483, 2000.

[125] D. Roux, F. Nallet, and O. Diat. *Europhys. Lett.*, **24** :53, 1993.

[126] P.-G. De Gennes. *J. Phys. Chem.*, **94** :8407, 1990.

[127] J. T. Brooks, C. Marques, and M. E. Cates. *Europhys. Lett.*, **14** :713, 1991.

[128] J. T. Brooks, C. Marques, and M. E. Cates. *J. Phys. II (France)*, **6** :673, 1991.

[129] F. Clément and J. F. Joanny. *J. Phys. II (France)*, **7** :973, 1997.

[130] R. Cantor. *Macromolecules*, **14** :1186, 1981.

[131] S. T. Milner, T. A. Witten, and M. E. Cates. *Macromolecules*, **22** :853, 1989.

[132] R. Lipowsky. *Europhys. Lett.*, **30** :197, 1995.

[133] C. Hiergeist and R. Lipowsky. *J. Phys. II (France)*, **6** :1465, 1996.

[134] T. Bickel, C. Marques, and C. Jeppesen. *Phys. Rev. E*, **62** :1124, 2000.

[135] G. Porte and C. Ligoure. *J. Chem. Phys.*, **102** :4290, 1995.

[136] C. Marques and J. B. Fournier. *Europhys. Lett.*, **35** :361, 1996.

[137] N. Dan, P. Pincus, and S. Safran. *Langmuir*, **9** :2768, 1993.

[138] R. R. Netz and P. Pincus. *Phys. Rev. E*, **52** :4114, 1995.

[139] H. Aranda-Espinoza, A. Berman, N. Dan, P. Pincus, and S. Safran. *Biophys. J.*, **71** :648, 1996.

[140] M. S. Turner and P. Sens. *Phys. Rev. E*, **57** :823, 1998.

[141] P. Sens and S.A. Safran. *Eur. Phys. J. E*, **1** :237, 2000.

[142] P. Sens and M. S. Turner. *Eur. Phys. J. E*, **4** :115–120, 2001.

[143] C.-M. Chen. *Physica A*, **281** :41, 2000.

[144] C. F. Schmidt, K. Svoboda, Ning Lei, I. Petsche, L. Berman, C. R. Safinya, and G. Grest. *Science*, **259** :952, 1993.

[145] Y.-H. Chen, J. T. Yang, and K. H. Chau. *Biochemistry*, **13** :3350–3359, 1974.

[146] R. B. Setlow and E. C. Pollard. *Molecular Biophysics.* Addison Wesley, 1962.

[147] A. Goebel and K. Lunkenheimer. *Langmuir*, **13** :369, 1997.

[148] A. Zilman and R. Granek. *Phys. Rev. Lett.*, **77** :4788, 1996.

[149] E. M. Landau and J. P. Rosenbuch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** :14532, 1996.

[150] E. Pebay-Peroula, G. Rummel, J. P. Rosenbuch, and E. M. Landau. *Science*, **277** :1676, 1997.

[151] H. Belrhali, P. Nollert, A. Royant, C. Menzel, J. P. Rosenbuch, E. M. Landau, and E. Pebay-Peroula. *Structure Fold Des.*, **7** :909, 1999.

[152] H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler, and J. K. Lanyi. *J. Mol. Biol.*, **291** :899, 1999.

[153] G. MacDermott, S. M. Price, A. A. Freer, A. M. Hawthornethwaite-Lawless, M. Z. Papiz, R. J. Cogdell, and N. W. Isaacs. *Nature*, **374** :517–521, 1995.

[154] J. Koepke, X. Hu, C. Muenke, K. Schulten, and H. Michel. *Structure*, **4** :581–597, 1996.

[155] H. Savage, M. Cyrclaff, G. Montoya, W. Huehlbrandt, and I. Sinning. *Structure*, **4** :243–252, 1996.

[156] T. Walz and R. Gosh. *J. Mol. Biol.*, **265** :107–111, 1997.

[157] K. Kameyama and T. Takagi. *J. Coll. Int. Sci.*, **137** :1, 1990.

[158] V. Jirsakova, F. Reiss-Husson, B. Vandijk, G. Owen, and A. J. Hoff. *Photo. Photobiol.*, **64** :363, 1996.

[159] R. A. Brunisholz, F. Suter, and H. Zuber. *Eur. J. Biochem.*, **222** :667, 1994.

[160] Vladimira Jirsakova. Thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud, Orsay, 1995.

[161] G. T. Evans and C. P. James. *J. Chem. Phys.*, **79** :5553, 1983.

[162] A. Einstein. *Investigations on the theory of Brownian movement.* Dover, New-York, 1956.

[163] F. Perrin. *J. de Phys. et Rad.*, **V** :497, 1934.

[164] F. Perrin. *J. de Phys. et Rad.*, **VII** :1, 1936.

[165] B. J. Berne and R. Pecora. *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology, and physics.* John Wiley and sons, New York, 1976.

[166] V. Jirsakova, F. Reiss-Husson, and J. L. Ranck. *Biochimica Biophysica Acta*, **1277** :150, 1996.

[167] V. Luzzati, A. Tardieu, T. Gulik-Krzywicki, E. Rivas, and F. Reiss-Husson. *Nature*, **220** :485, 1968.

[168] V. Luzzati, P. Mariani, and T. Gulik-Krzywicki. *In Physics of amphiphilic layers*, page 131, 1987.

[169] P. Mariani, V. Luzzati, and H. Delacroix. *J. Mol. Biol.*, **204** :165, 1988.

[170] J. M. Seddon. *Biochimica Biophysica Acta*, **1** :1031, 1990.

[171] E. S. Lutton. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42** :1068, 1965.

[172] K. Larsson. *Nature*, **304** :664, 1983.

[173] H. Qiu and M. Caffrey. *Biomaterials*, **21** :223, 2000.

[174] J. Charvolin and J. F. Sadoc. *J. Phys.*, **48** :1559, 1987.

[175] J. Engblom and S. T. Hyde. *J. Phys. II (France).*, **5** :171, 1995.

[176] H. Gutman, G. Arvidson, K. Fontell, and G. Lindblom. *In Surfactants in solution*, **1** :143, 1984.

[177] A. Cheng, B. Hummel, H. Qiu, and M. Caffrey. *Chemistry and Physics of Lipids*, **95** :11–21, 1998.

[178] A. Guinier. *X-ray crystallographic technology.* Hilger and Watts Ltd (Hilger division), London, 1952.

[179] E. M. Landau, G. Rummel, S. Cowan-Jacob, and J. P. Rosenbuch. *J. Phys. Chem. B*, **101** :1935, 1997.

[180] X. Ai and M. Caffrey. *Biophys. J.*, **79** :394, 2000.

[181] W. Rowe, S. Fuller, A. Mustafa, R. Ford, and G. Tiddy. communication privée.

[182] M. Bandilla, B. Ucker, M. Ram, I. Simonin, E. Gelhaye, G. MacDermott, R. J. Cogdell, and H. Scheer. *BBA-Bioenergetics*, **1364** :390, 1998.

[183] N. J. Fraser, P. J. Dominy, B. Ucker, I. Simonin, H. Scheer, and R. J. Cogdell. *Biochemistry USA*, **38** :9684, 1999.

[184] A. Gall, N. J. Fraser, M. C. Bellisent-Funel, H. Scheer, B. Robert, and R. J. Cogdell. *FEBS Letters*, **449** :269, 1999.

[185] N. Tsapis, F. Reiss-Husson, R. Ober, and W. Urbach. à publier.

[186] A. A. Adoberin, E. Boedefeld, and P.L. Luisi. *Biochimica Biophysica Acta*, **328** :20–30, 1973.

[187] D. M. Anderson and H. Wennerstroem. *J. Phys. Chem.*, **94** :8683, 1990.

[188] M. H. Cohen and D. Turnbul. *J. Chem. Phys.*, **31** :1164, 1959.

[189] P. G. Saffman and M. Delbrueck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72** :3111, 1975.

[190] W. L. C. Vaz, M. Criado, V. M. C. Madeia, G. Schoellmann, and T. M. Jovin. *Biochemistry*, **21** :5608, 1982.

[191] L. K. Tamm. *Biochimica Biophysica Acta*, **1071** :123, 1991.

[192] M. Fragata, S. Ohnishi, K. Asada, T. Ito, and M. Takahashi. *Biochemistry*, **23** :4044, 1984.

[193] M. L. Lynch, K. A. Kochvar, J. L. Burns, and R. G. Laughlin. *Langmuir*, **16** :3537, 2000.

[194] P. Sakya, J. M. Seddon, and R. H. Templer. *J. Phys.II (France)*, **4** :1311, 1994.

[195] C. R. Cantor and P. R. Schimmel. *Biophysical chemistry.* W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1980.

[196] H. J. Galla, W. Hartmann, U. Theilen, and E. Sackmann. *J. Membrane Biol.*, **48** :215, 1979.

[197] S. Kim and H. J. Yu. *J. Phys. Chem.*, **96** :4034, 1992.

[198] I. E. Dzyaloshinskii, E. M. Lifshitz, and L. P. Pitaevskii. *Adv. Phys.*, **10** :165, 1961.

[199] W. H. Keesom. *Physikalische Zeit.*, **22** :129, 1921.

[200] P. Debye. *Physikalische Zeit.*, **22** :302, 1921.

[201] F. London. *Trans. Faraday Soc.*, **33** :8, 1937.

[202] Emanuel Bertrand. Thèse de doctorat de l'Université Paris VI, 2000.