

CEASCRIBE : 97002161

FRCEA-TH--618



Geotli
no. enreg. n°
: FR9802618
action : I.I+D.L.

FR9802618

THESE de DOCTORAT de L'UNIVERSITE PARIS VI

Spécialité : Chimie-Physique

Présentée par

Florence RICOUL

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

**Addition d'oligosaccharides et de glycolipides
dans des phases lamellaires chargées**

Soutenue le 26 Septembre 1997 devant le jury composé de :

M. Pierre TURQ
Mme Claudine WILLIAMS
M. Grégoire PORTE
M. Noël CAMARCAT
M. Ilias ILIOPOULOS
M. Barry NINHAM
M. Thomas ZEMB

Président
Rapporteur
Rapporteur

D.S.M.
CENTRE DE RECHERCHES
Bibliothèque

THESE de DOCTORAT de L'UNIVERSITE PARIS VI

Spécialité : Chimie-Physique

Présentée par

Florence RICOUL

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

**Addition d'oligosaccharides et de glycolipides
dans des phases lamellaires chargées**

Soutenue le 26 Septembre 1997 devant le jury composé de :

M. Pierre TURQ
Mme Claudine WILLIAMS
M. Grégoire PORTE
M. Noël CAMARCAT
M. Ilias ILIOPOULOS
M. Barry NINHAM
M. Thomas ZEMB

Président
Rapporteur
Rapporteur

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au Service de Chimie Moléculaire du CEA de Saclay, dirigé par M. Maurice Drifford, puis par M. Jean-Claude Petit. Je les remercie vivement de m'y avoir accueillie.

Monique Dubois et Thomas Zemb ont dirigé cette thèse. Durant ces années j'ai eu ainsi le privilège de bénéficier quotidiennement du savoir-faire et de l'expérience de Monique. Grâce à elle, les déterminations de phases et les mesures de pressions osmotiques sont devenues transparentes pour moi. Je la remercie aussi pour sa grande disponibilité, sa bonne humeur et sa patience (devant parfois mon incrédulité) et son dynamisme qui ont été une grande motivation pour moi. Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance à Thomas pour avoir orienté ce travail. Sa grande compétence scientifique fut un moteur essentiel à l'aboutissement de ce manuscrit. Son enthousiasme, ses conseils avisés et son soutien constant resteront un modèle pour mes futures recherches.

Je remercie vivement M. le Professeur Pierre Turq, responsable du DEA de Matière Condensée, d'avoir accepté la présidence du jury.

Je suis très honorée de la présence du Professeur Barry Ninham dans le jury. Je le remercie de l'intérêt particulier qu'il a manifesté pour ce travail et de m'avoir guidée dans les calculs complexes de forces de dispersion lors de ses visites au laboratoire.

Mme Claudine Williams et M. Grégoire Porte ont accepté de lire ce document et de le juger en tant que rapporteurs. Je les remercie beaucoup de l'intérêt qu'ils lui ont porté et des discussions intéressantes que nous avons eues.

Ilias Iliopoulos a accepté d'être mon responsable de thèse universitaire à la suite de Roland Audebert. Je lui en suis très reconnaissante ainsi que pour les conseils pertinents qu'il m'a prodigués.

M. Noël Camarcot m'a fait l'honneur de participer au jugement de ce travail malgré ses nombreuses responsabilités et je l'en remercie sincèrement.

J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec Luc Belloni, dont la parfaite maîtrise de la Physique Statistique (et "Sportive") est reconnue de tous. Sa disponibilité et sa patience à me transmettre quelques bases de ces disciplines n'ont d'égales que sa grande rigueur. Il m'a ainsi éclairée dans les calculs délicats de la force électrostatique et aussi sur des théories plus "physiques" !

Ma gratitude va également à tous ceux qui m'ont permis de disposer des molécules sans lesquelles cette thèse n'aurait pu avoir lieu : Isabelle Rico-Lattes et Christiane André-Barrès du laboratoire IMRCP de l'Université P. Sabatier de Toulouse, Pr. Daniel Plusquellec et Martine Lefèvre de L'ENSC à Rennes. Je tiens également à remercier les chercheurs du Service des Molécules Marquées pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire quelques semaines et tout particulièrement Alain Vandais pour ses nombreux conseils et son aide inestimable dans la réalisation des échantillons isotopiques.

Olivier Diat m'a permis de mener à bien à l'ESRF les expériences de Diffusion de Rayons X nécessaires à l'établissement des diagrammes de phases. Je lui suis sincèrement reconnaissante pour les prouesses techniques qu'il a réalisées et son accueil très chaleureux.

Merci à Gisèle Derost pour sa gentillesse et son aide pour la reproduction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier très spécialement tous les membres du Laboratoire : Fabienne, Corinne, Isabelle et Annabelle et aussi Frédéric, Olivier et Emmanuel qui m'ont toujours assuré une aide technique et morale précieuse pour résoudre mes problèmes expérimentaux, informatiques... Tous ont contribué au fait que l'ambiance de ces années de recherche a toujours été chaleureuse, joyeuse et inoubliable. Je voudrais aussi remercier Bruno, maintenant à l'ILL, pour toutes les informations utiles et les discussions fructueuses qu'il m'a apportées.

Je n'oublie pas les chercheurs et thésards du Groupe Colloïde et de l'équipe mixte pour les courses à pied, les parties de golf, les goûters sympathiques... qui ont agrémenté ces journées de travail.

Enfin un grand merci à ma famille, et à tous mes amis qui m'ont soutenue et supportée au cours de ces années.

SOMMAIRE

Introduction générale	1
CHAPITRE I	
FORCES INTERLAMELLAIRES ET ÉQUILIBRES DE PHASES	5
I.A. Rappels sur les modes d'interactions entre bicouches	5
I.A.1. Une force attractive : la force de van der Waals	6
I.A.1.a. Modèle simple	6
I.A.1.b. Modèle triple film	8
I.A.2. La répulsion électrostatique	11
I.A.3. Force d'ondulation à grande distance	15
I.A.4. Répulsions à courte distance	15
I.A.4.a. Forces d'hydratation	16
I.A.4.b. Forces stériques (entropiques)	16
I.B. Application sur l'exemple du DDAB	17
I.C. Diagrammes de phases ternaires	24
CHAPITRE II	
CARACTÉRISATION DES COMPOSANTS MOLÉCULAIRES EN SOLUTION AQUEUSE	29
II.A. Grandeurs physiques caractéristiques	31
II.A.1. Le volume moléculaire	31
II.A.1.a. Mesures de densité	31
II.A.1.b. Estimation des volumes polaire et apolaire	31
II.A.2. La surface par tête polaire	32
II.A.2.a. Mesures de tension de surface	32
II.A.2.b. Isothermes de compression	34
II.A.3. Tableau récapitulatif et comparatif	35

II.B. Diagrammes de phases binaires	37
II.B.1. Rappels pour le DDAB et la DMPC	37
II.B.1.a. Diagramme de phases du DDAB	37
II.B.1.b. Diagramme de phases de la DMPC	40
II.B.2. Diagrammes de phases binaires des glycolipides modèles utilisés	42
II.B.2.a. Diagramme de phases du 2-O Lauroylsaccharose	42
II.B.2.b. Diagramme de phases du N-lauroyl, N-nonyl lactitol	44
II.C. Etude des têtes sucres seules	45
II.C.1. Localisation des oligosaccharides dans la phase lamellaire: étude par variation de contraste	49
II.C.1.a. Méthode expérimentale	49
II.C.1.b. Résultats	50
II.C.2. Diffusion centrale de rayons X sur l'équilibre L_{α} - L_{α}' du DDAB en présence de sucres	52
II.C.3. Mesures de tonométrie	53
II.C.3.a. Principe de la mesure	53
II.C.3.b. Résultats	54
II.C.4. Interprétation de l'effet des sucres sur l'équilibre L_{α} - L_{α}' du DDAB	57

CHAPITRE III

ETABLISSEMENT DES DIAGRAMMES DE PHASES TERNAIRES	65
III.A. Méthodes expérimentales	65
III.A.1. Méthode traditionnelle	65
III.A.2. Méthodes en gradient de concentration	66
III.A.2.a. Observation des phases sous microscope entre polariseurs	67
III.A.2.b. Méthode de gradient en capillaire avec marquage isotopique	68
III.B. Résultats	71
III.B.1. Analyse des gradients de concentration en capillaires	71
III.B.2. Diagramme de phases DDAB/LS	78
III.B.2.a. Allure du prisme	78
III.B.2.b. Point critique L_{α} - L_{α}'	81
III.B.2.c. Phase cubique	83
III.B.3. Diagramme de phases DDAB/LC ₁₁ C ₉	88

III.B.3.a. Diagramme à 25°C	88
III.B.3.b. Echantillon blanc monophasique	89
III.B.3.c. Deuxième point critique - Problème du facteur de forme	90
III.B.3.d. Allure du prisme en température	95
III.C. Discussion	97
III.C.1. Comparaison entre les deux glycolipides	97
III.C.2. Analyse des profils de raies	98
III.C.2.a. Résultats sur les spectres aux rayons X	101
III.C.2.b. Résultats de diffusion de neutrons aux petits angles sur des échantillons orientés	103
III.D. Conclusion	114

CHAPITRE IV

PRESSIONS OSMOTIQUES DANS LES SYSTÈMES MIXTES LAMELLAIRES 117

IV.A. Méthodes expérimentales	118
IV.A.1. Stress osmotique avec polymère	118
IV.A.2. Pression de vapeur saturante	120
IV.A.3. Thin Film Balance	123
IV.B. Résultats	124
IV.B.1. Système DDAB/LC ₁₁ C ₉	124
IV.B.1.a. Résultats dans la gamme des pressions élevées	124
IV.B.1.b. Résultats dans la gamme de pressions intermédiaires (10 ⁴ -10 ⁵ Pa)	126
IV.B.1.c. Résultats en régime dilué	127
IV.B.2. Système DDAB/LS	129
IV.C. Interprétation : bilan des forces	131
IV.C.1. Répulsion à courte distance - Premier point critique	131
IV.C.2. Bilan des forces pour le LC ₁₁ C ₉ - Deuxième point critique	135
IV.C.3. Prédiction théorique du diagramme de phases eau/DDAB/LC ₁₁ C ₉	139
IV.D. Conclusion	144

CHAPITRE V

EFFET DE L'ADDITION DE GLYCOLIPIDES SUR LE GONFLEMENT MAXIMUM DE LA PHASE LAMELLAIRE	149
V.A. Méthodes expérimentales	153
V.A.1. Préparation et analyse en composition des échantillons	153
V.A.2. Diffusion de neutrons et de rayons X aux petits angles (DNPA et DXPA)	149
V.A.2.a. Cas des micelles globulaires	154
V.A.2.b. Cas des vésicules	155
V.A.2.c. Analyse des micelles	155
V.A.2.d. Conditions expérimentales	156
V.B. Résultats	159
V.B.1. Système non chargé DMPC/LC ₁₁ C ₉	159
V.B.2. Système chargé DDAB/LC ₁₁ C ₉	161
V.B.2.a. Echantillons préparés dans les sacs de dialyse	162
V.B.2.b. Echantillons dilués	166
V.B.2.c. Echantillons préparés classiquement	169
V.B.3. Système chargé DDAB/LS	173
V.C. Discussion	178
V.D. Conclusion	183
Conclusion générale	187
Annexe 1 : Etude d'adsorption sur les bicouches de DDAB par variation de contraste en DNPA	191
Annexe 2 : Temps de vol en diffusion de neutron	203
Annexe 3 : Dosages des échantillons - Chromatographie Iatroscan	209

Introduction générale

Lorsque deux membranes biologiques viennent au contact l'une de l'autre, la première interaction ressentie est l'approche de deux surfaces portant des groupements sucres. Il peut s'agir des têtes polaires de glycolipides ou de glycoprotéines, molécules abondantes à l'interface de ces architectures moléculaires complexes que sont les membranes [1]. Il est souvent mis en avant que ces groupements externes doivent participer aux mécanismes de reconnaissance cellulaire, d'adhésion entre cellules, de réactions immunitaires... [2, 3]. La conformation de la tête sucre hydrophile semble en effet provoquer des interactions spécifiques de type ligand-récepteur, difficiles à analyser [4], et en même temps générer une barrière stérique [5].

Différents auteurs se sont déjà intéressés au problème de la caractérisation des interactions moléculaires introduites par des glycolipides associés aux bicouches. Marra, en 1985, a travaillé sur le digalactosyl-diglyceride (DGDG), un glycolipide dont la partie polaire est constituée par deux motifs galactosides [6]. Par SFA ("Surface Force Apparatus"), il a mesuré des énergies d'adhésion six fois plus fortes que dans le cas des phospholipides. Parker, en 1989, toujours par SFA, a mis en évidence une interaction répulsive à courte distance dans le cas du GM1, un glycolipide naturel chargé, qui contredit la possibilité de promouvoir une quelconque adhésion entre les membranes [7]. Récemment, McIntosh et Simon ont obtenu un résultat similaire par la technique de stress osmotique [8]. Seuls Luckham et coll. ont mesuré dans des systèmes mixtes GM1/phospholipides des énergies d'adhésion significatives [9]. Le débat reste donc ouvert quant à savoir si les motifs sucres induisent ou non une force attractive d'adhésion entre bicouches du seul fait de leur présence.

L'un des objectifs de notre travail est d'essayer d'isoler nous aussi les interactions spécifiques introduites par des glycolipides dans le cas de systèmes lamellaires, non seulement par des mesures de forces, mais également par l'exploitation thermodynamique des zones d'équilibre présentes dans les diagrammes de phases. Nous désignons par "glycolipide" toute molécule tensioactive dont la tête polaire est constituée

de motifs sucres, et par "oligosaccharide" une molécule carbohydratée simple, non tensioactive, tel que le glucose ou le saccharose.

Au laboratoire le système des phases lamellaires de DDAB (bromure de didodécyl diméthyl ammonium), un tensioactif cationique, a été l'objet d'études approfondies pour comprendre les mécanismes de stabilité des phases ordonnées et désordonnées de bicouches, c'est pourquoi nous l'avons choisi comme système-hôte [10]. Pour avoir une comparaison avec un système non chargé, nous avons aussi travaillé avec la phase lamellaire de DMPC, un phospholipide zwitterionique modèle, fréquemment utilisé [11].

Le choix de deux glycolipides synthétiques, 2-O Lauroyl Saccharose (LS) [12] et N-lauroyl, N-nonyl Lactitol (LC₁₁C₉) [13], a été guidé par la collaboration avec deux laboratoires de chimie des systèmes moléculaires organisés (ENSC Rennes et UPS Toulouse) au sein du GDR "Systèmes Colloïdaux Mixtes". Sur la Figure 1 nous avons représenté schématiquement ces molécules en respectant les ordres de grandeur des volumes des têtes polaires et des chaînes alkyles.

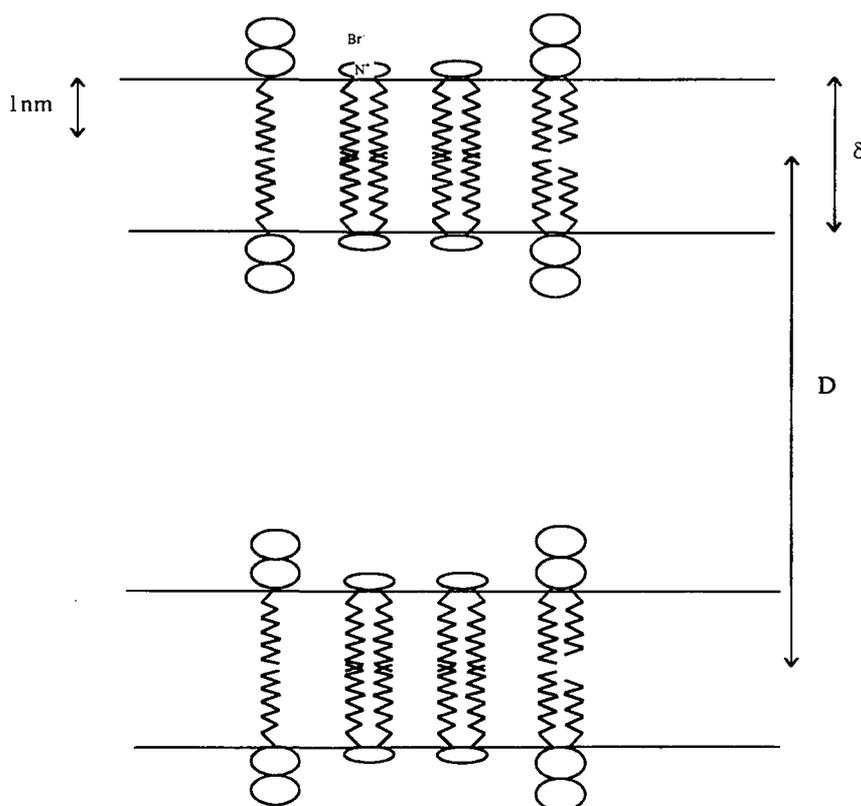


Figure 1 : Représentation schématique à l'échelle des molécules étudiées : le DDAB chargé et les deux glycolipides dont les têtes polaires sont plus volumineuses, le 2-O Lauroyl Saccharose monochaine et le N-lauroyl, N-nonyl Lactitol bichaine. D représente la période smectique et δ l'épaisseur des bicouches.

Ce mémoire débute, dans le chapitre I, par un rappel sur les modes d'interactions actuellement reconnus dans les systèmes de bicouches. Ces expressions explicites sont en effet nécessaires pour interpréter les mesures de pressions osmotiques et les comportements de phases de nos systèmes purs et mixtes. Une illustration est donnée avec la molécule de DDAB, en système binaire dans l'eau.

Dans le chapitre II, nous donnons les caractéristiques physico-chimiques des composants moléculaires utilisés : volumes moléculaires, surfaces par tête polaire, diagrammes binaires observés dans l'eau en fonction de la température. Nous nous intéressons également à l'effet de l'ajout de différents oligosaccharides dans la phase lamellaire de DDAB.

Une part essentielle de notre étude a consisté à obtenir des informations structurales sur les phases formées par les systèmes mixtes. Pour cela, nous avons mis au point une méthode d'obtention des diagrammes de phases en gradient de concentration en capillaire, que nous décrivons dans le chapitre III. Nous présentons ainsi les deux diagrammes ternaires des systèmes DDAB/LS/eau et DDAB/LC₁₁C₉/eau résultant de l'utilisation de notre méthode, de même qu'une étude de diffusion de neutron sur des échantillons orientés.

Le chapitre IV décrit les résultats de mesures de la pression osmotique dans les phases lamellaires, obtenus par la méthode de stress osmotique. A partir de ces résultats, nous modélisons, en fonction de la fraction molaire de glycolipide ajouté, les différentes forces qui interviennent dans le bilan total. Quelle combinaison d'interactions moléculaires permet une coexistence de deux phases lamellaires de périodicités différentes? Qu'est-ce qui favorise l'apparition de points critiques? Nous retrouvons, en évaluant les pressions et les énergies libres, l'allure des diagrammes de phases ternaires expérimentaux du chapitre III.

Après nous être intéressés essentiellement aux phases concentrées dans les précédents chapitres, nous cherchons, dans le chapitre V, quelle est la périodicité maximale, D_{\max} , pour laquelle la phase lamellaire mixte est stable. Qu'est-ce qui limite le gonflement maximum des bicouches? Que se passe-t-il lorsque nous mélangeons un système qui gonfle (DDAB) et un qui ne gonfle pas (glycolipide) ?

Références

- [1] Sackman E. in *Handbook of biological physics* 1A Lipowsky and Sackman Eds. Elsevier, Amsterdam (1995)
- [2] Sharon N. and Lis H. "Sucres et reconnaissance cellulaire" *Pour la science* (mars 1993)
- [3] Feizi T. and Bundle D. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6** (1996) 659-662 ; Crocker P. R. and Feizi T. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6** (1996) 679-691
- [4] Sears P. and Wong C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 12086-12093
- [5] Bianco I. D., Fidelio G. D. and Maggio B. *Biochim. Biophys. Acta* **1026** (1990) 179-185
- [6] Marra J. *J. Colloid Interface Sci.* **107** (1985) 446-458 et **109** (1986) 11-20
- [7] Parker J. L. *J. Colloid Interface Sci.* **137** (1990) 571-576
- [8] McIntosh T. J. and Simon S. A. *Biochemistry* **33** (1994) 10477-10486
- [9] Wood J., Luckham P. and Swart R. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **77** (1993) 179-189
- [10] Dubois M. and Zemb Th *Langmuir* **7** (1991) 1352-1360 ; Dubois M., Zemb T., Belloni L., Delville A., Levitz P. and Setton R. *J. Chem. Phys* **96** (1992) 2278-2286 ; Zemb T., Dubois M., Belloni L. and Marcelja S. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **89** (1992) 33
- [11] Janiak M. J., Small D. M. and Shipley G. G. *J. Biol. Chem.* **254** (1979) 6068
- [12] Chauvin C., Baczko K. and Plusquellec D. *J. Org. Chem.* **58** (1993) 2291-2295
- [13] Rico-Lattes I., Garrigues J-C., Perez E., André-Barrès C., Madelaine-Dupuich C., Lattes A., Linas M-D., and Aubertin A-M. *New J. Chem.* **19** (1995) 341-344; André-Barrès C., Madelaine-Dupuich C., Rico-Lattes I. *New J. Chem.* **19** (1995) 345-347

Chapitre I

Forces interlamellaires et équilibres de phases

I.A. Rappels sur les modes d'interactions entre bicouches

Le modèle classique DLVO [1] a été établi il y a plus de 50 ans pour rendre compte de la floculation de colloïdes inorganiques en présence de sels. Il fait intervenir séparément et de manière additive une force attractive, la force de van der Waals, et une force répulsive, la force électrostatique. Cette additivité est une approximation (cf. [2]) mais elle permet d'expliquer et de prédire de manière surprenante de nombreux équilibres observés, dans des systèmes eau/huile, huile/oxyde minéral... [3]

Cependant ce modèle est parfois pris en défaut. Par exemple, Wennerström et Jönsson ont montré que cette théorie induit des erreurs quantitatives sur l'estimation des forces entre surfaces chargées dans le cas de contre-ions divalents, si l'on ne tient pas compte de corrélations ions-ions [4]. La coalescence d'émulsions est aussi un cas où le modèle DLVO est mis complètement en défaut et ne donne pas les bons ordres de grandeur de la barrière cinétique gouvernant le phénomène [5].

D'autres forces doivent être prises en compte pour expliquer les phénomènes observés : dans les systèmes lamellaires peu chargés, Helfrich a montré théoriquement qu'il existe, à grande distance, une force répulsive d'origine entropique, associée à des fluctuations dans des structures à topologie réduite [6] ; de même, dans le cas qui nous intéresse de bicouches de lipides, Parsegian et coll. ont mis en évidence expérimentalement une force répulsive, prédominante à moins de 1nm, exponentielle à courte portée, dite "d'hydratation" [7].

Dans la partie qui suit, nous détaillons les mécanismes généralement reconnus dans les interactions entre films de tensioactifs en solution aqueuse, en reprenant les formules classiques et d'autres moins classiques : malgré une application parfois abusive, à la limite de leur domaine de validité que nous allons préciser, ces expressions analytiques explicites restent un outil utile. Par exemple, nous verrons leur utilisation

dans le Chapitre IV pour quantifier l'importance relative de ces forces les unes par rapport aux autres et leur évolution d'un système à l'autre.

I.A.1. Une force attractive : la force de van der Waals

L'origine de la force de van der Waals ou force de dispersion qui s'exerce entre deux corps à travers un milieu continu est liée aux propriétés de polarisabilité des atomes. Parsegian et Ninham ont développé la théorie de Lifshitz pour exprimer cette force dans les cas des systèmes lipide-eau (cf. [8] ou [9]).

I.A.1.a. Modèle simple

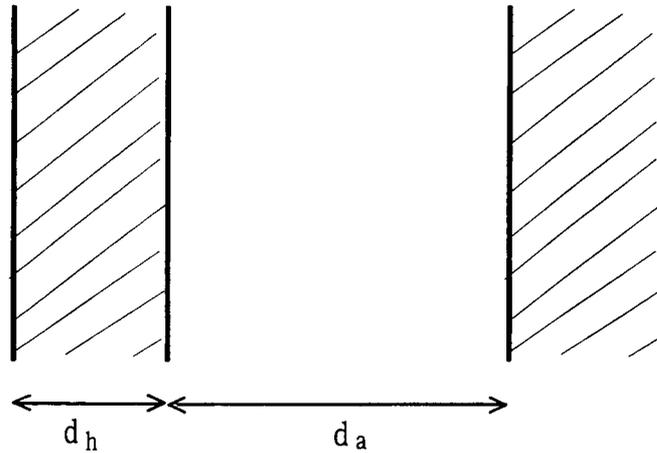


Figure I- 1: Schéma simplifié de deux bicouches d'épaisseur d_h séparées par une épaisseur d'eau d_a .

Si on schématise le système comme sur la Figure I-1, où les bicouches sont considérées comme des milieux continus d'épaisseur d_h , séparées par la phase aqueuse d'épaisseur d_a également prise comme un continuum, la théorie donne pour l'énergie libre d'interaction par unité d'aire, l'expression suivante [8, 9] :

$$E_{vdw} = -\frac{A}{12\pi} \left[\frac{1}{d_a^2} - \frac{2}{(d_a + d_h)^2} + \frac{1}{(d_a + 2d_h)^2} \right] \quad (\text{I- 1})$$

Comme la pression est égale à l'opposé de la dérivée de l'énergie on a encore :

$$\Pi_{vdw} = -\frac{A}{6\pi} \left[\frac{1}{d_a^3} - \frac{2}{(d_a + d_h)^3} + \frac{1}{(d_a + 2d_h)^3} \right] \quad (\text{I- 2})$$

A, la "constante" de Hamaker, se calcule à partir des permittivités diélectriques des phases et de leurs variations en fréquence [8, 9] :

$$A = \frac{3}{4} kT \left(\frac{\varepsilon_a - \varepsilon_h}{\varepsilon_a + \varepsilon_h} \right)^2 + \frac{3}{2} kT \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{\varepsilon_a(i\xi_n) - \varepsilon_h(i\xi_n)}{\varepsilon_a(i\xi_n) + \varepsilon_h(i\xi_n)} \right)^2 \quad (\text{I- 3})$$

$$= A_{v=0} + A_{v>0}$$

Le premier terme, à fréquence nulle, dépend des constantes diélectriques ε_a et ε_h de la phase aqueuse et de la bicouche hydrocarbonée : ces constantes valent respectivement 80 pour de l'eau pure et de l'ordre de 2 pour un quelconque hydrocarbure. A température ambiante on obtient donc $A_{v=0} \approx 2.8 \times 10^{-21} J$ ($1kT \sim 4.1 \times 10^{-21} J$).

Dans le deuxième terme, $\xi_n = \frac{2\pi kT}{h} n$, avec h la constante de Planck. Si on suppose que la permittivité diélectrique varie avec la fréquence comme la polarisabilité des molécules on a [9] :

$$\varepsilon(i\xi) = 1 + \sum \left\{ \frac{Cte}{\left(1 + \frac{\xi}{\omega_{rot}}\right)} \right\} + \sum \left\{ \frac{Cte}{\left(1 + \left(\frac{\xi}{\omega_c}\right)^2\right)} \right\} \quad (\text{I- 4})$$

avec ω_{rot} les fréquences de rotation des molécules (dans le domaine des micro-ondes) et ω_c les fréquences d'absorption (infrarouge ou ultraviolet). Ainsi à partir des données spectrales des composés on peut calculer numériquement $A_{v>0}$ comme l'ont fait par exemple Parsegian et Weiss dans [10].

Une méthode plus approchée pour calculer $A_{v>0}$ est de considérer seulement une absorption principale $\omega_c \sim 3 \times 10^{15} s^{-1}$ dans l'ultraviolet (cf. [11]) : l'équation (I- 4) devient alors

$$\varepsilon(i\xi) = 1 + \frac{n^2 - 1}{\xi^2 + \omega_c^2} \quad (\text{I- 5})$$

où n est l'indice de réfraction optique. (n vaut 1.33 pour l'eau pure et de l'ordre de 1.41 pour la bicouche). Après intégration sur la fréquence, on trouve $A_{v>0} \approx 1.7 \times 10^{-21} J$ d'où une valeur pour A totale égale à $4.5 \times 10^{-21} J$. En utilisant l'équation (I- 4) et toutes les fréquences connues d'absorption de l'eau, Parsegian obtient une valeur légèrement inférieure $A = 4.26 \times 10^{-21} J$ [12].

D'autre part, si la distance entre les deux objets en interaction est suffisamment grande, alors le temps mis par le champ électrique du premier objet pour aller jusqu'au deuxième et revenir devient comparable à la période de fluctuation des dipôles. Il y a un effet de retard qui a pour conséquence de diminuer la valeur de $A_{v>0}$ pour les distances de séparations supérieures à 30\AA . Ninham et Parsegian ont résolu l'équation de Lifshitz à toutes les distances et il est possible de corriger la valeur numérique $A_{v>0}$ avec leurs résultats (cf. [8]).

De plus ces ondes électromagnétiques à la base des forces de van der Waals sont aussi bien écrantées que les interactions électrostatiques, si l'on fait l'hypothèse que les charges localisées dans le solvant sont mobiles. Donc, si l'on travaille en présence de sel, il faut tenir compte de l'écrantage des charges pour $A_{v=0}$ qui devient [9] :

$$A_{v=0}^{sel} = A_{v=0} (2\kappa d_a) e^{-2\kappa d_a} \quad (\text{I-6})$$

avec κ l'inverse de la longueur d'écran de Debye. En pratique, cette correction de force ionique est importante dès que l'on est à des concentrations en sel supérieures à 0.1M , où des effets d'adsorption d'ions interviennent [13].

I.A.1.b. Modèle triple film

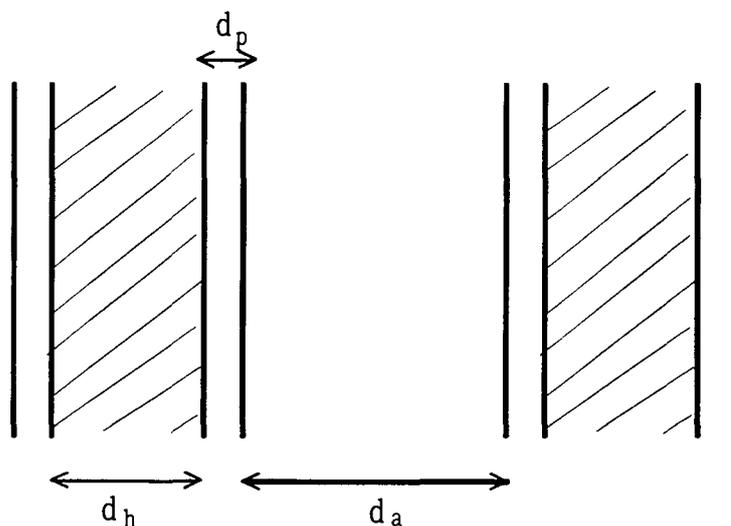


Figure I- 2 : Schéma simplifié de deux bicouches d'épaisseur apolaire d_h , possédant de part et d'autre une partie polaire d'épaisseur d_p et séparées d'une distance d_a .

Dans le cas de films de tensioactifs possédant une tête polaire volumineuse ou ayant des propriétés de polarisabilité spécifiques, il est nécessaire de ne pas s'en tenir au modèle simple précédent et d'utiliser un modèle "triple film" : dans ce cas, on

introduit pour la partie polaire une troisième phase d'épaisseur d_p , comme représentée sur la Figure I-2, et on a (cf. [7]) :

$$\begin{aligned} \Pi_{vdw} = & -\frac{A_1}{6\pi} \left[\frac{1}{d_a^3} - \frac{2}{(d_a + 2d_p + d_h)^3} + \frac{1}{(d_a + 4d_p + 2d_h)^3} \right] \\ & - \frac{2A_2}{6\pi} \left[\frac{1}{(d_a + d_p)^3} - \frac{1}{(d_a + d_p + d_h)^3} - \frac{1}{(d_a + 3d_p + d_h)^3} + \frac{1}{(d_a + 3d_p + 2d_h)^3} \right] \\ & - \frac{A_3}{6\pi} \left[\frac{1}{(d_a + 2d_p)^3} - \frac{1}{(d_a + 2d_p + d_h)^3} + \frac{1}{(d_a + 3d_p + d_h)^3} \right] \end{aligned} \quad (\text{I- 7})$$

avec

$$\begin{aligned} A_1 & \propto \left(\frac{\varepsilon_a - \varepsilon_p}{\varepsilon_a + \varepsilon_p} \right)^2 \\ A_2 & \propto \left(\frac{\varepsilon_a - \varepsilon_p}{\varepsilon_a + \varepsilon_p} \right) \left(\frac{\varepsilon_h - \varepsilon_p}{\varepsilon_h + \varepsilon_p} \right) \\ A_3 & \propto \left(\frac{\varepsilon_h - \varepsilon_p}{\varepsilon_h + \varepsilon_p} \right)^2 \end{aligned} \quad (\text{I- 8})$$

A_1 traduit les interactions entre la couche polaire et la phase aqueuse, A_3 entre les chaînes et la couche polaire et A_2 est un terme croisé.

Les propriétés diélectriques des têtes polaires sont mal connues. Cependant pour des glycolipides, on peut considérer qu'elles se rapprochent de celles d'une solution concentrée de sucrose : d'après [14], la constante diélectrique d'une solution aqueuse de sucrose 50% en poids vaut 63.4 ($\varepsilon=80$ pour l'eau pure, 2 pour les chaînes). D'autre part, d'après [7], la variation en fréquence de la permittivité diélectrique d'une telle solution concentrée de sucrose se rapproche de celle des chaînes. L'indice de réfraction d'une solution de sucrose à 50% vaut 1.42 [15] ($n=1.33$ pour l'eau, ~ 1.41 pour un hydrocarbure). Donc on peut dire que, à fréquence nulle, les têtes polaires se comportent plutôt comme l'eau, et plutôt comme les chaînes dans l'ultraviolet. Donc A_1 et A_3 doivent avoir une valeur plus faible que la constante de Hamaker A hydrocarbure/eau puisque l'un de leur deux termes, fréquence nulle ou fréquence variable, est quasi nul.

D'après Evans et Needham [16], A_1 varie entre 1.2 et 3×10^{-21} J selon la nature de la couche polaire (phospholipides ou glycolipides), A_3 reste constant ($\sim 3 \times 10^{-21}$ J) et A_2 est

un ordre de grandeur plus petit que A_1 et A_3 : 10^{-22} J comparé à 10^{-21} J. Donc le deuxième terme dans l'équation (I-7) peut être négligé.

Sur la Figure I-3, nous avons tracé la force de van der Waals calculée pour des bicouches de lipides avec trois hypothèses différentes. On a choisi $d_h=24.8\text{\AA}$, $d_p=10.9\text{\AA}$ (cf. [7]).

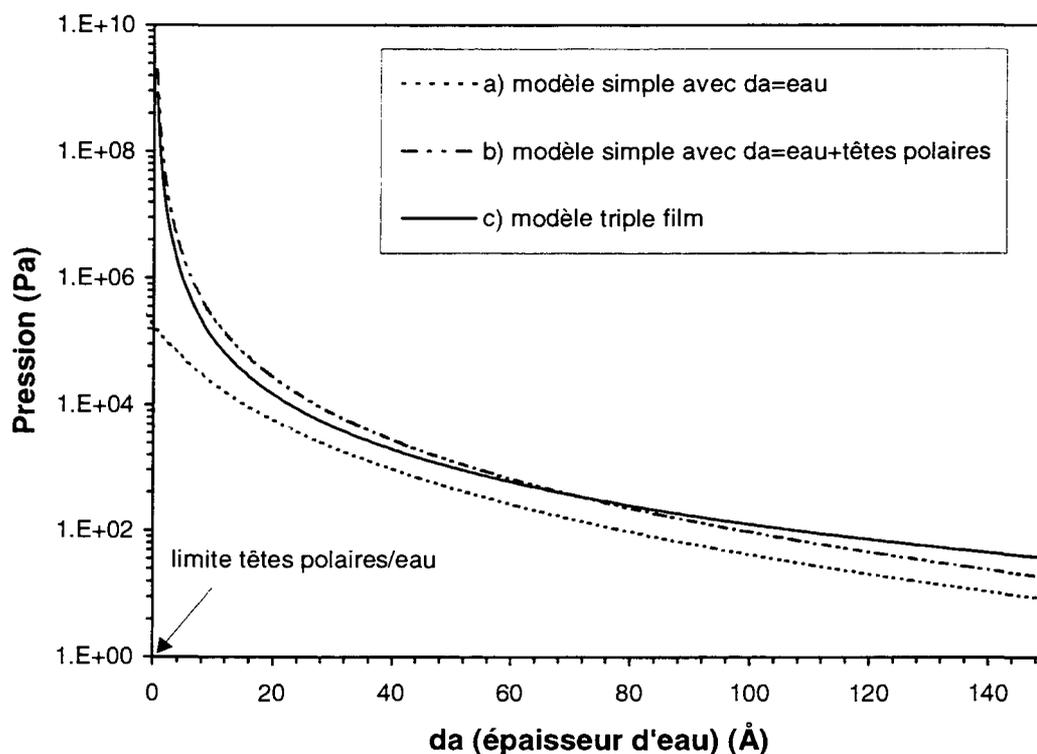


Figure I- 3 : Terme de pression dû aux interactions de van der Waals calculé pour des bicouches de phospholipides dans l'eau. Le détail des calculs et les valeurs des paramètres sont donnés dans le texte

Pour les cas a) et b) nous avons utilisé le modèle simple avec $A=4.5\times 10^{-21}$ J. Dans le cas a), les têtes polaires sont considérées comme l'eau : autrement dit, le plan d'origine de la force se trouve à la "frontière" chaînes-têtes polaires c'est à dire à $d_a=-d_p=-10.9\text{\AA}$. Pour le cas b), les têtes polaires sont incluses dans la bicouche ($d_h=24.8+10.9=35.7\text{\AA}$): le plan d'origine de la force est en $d_a=0$. On voit donc que la définition du plan d'origine de la force de van der Waals est très importante car quelques Angströms de décalage sur d_a donnent sur les 20 premiers Angströms une variation de l'intensité de la force d'un facteur 1000.

Pour le cas c) nous avons utilisé le modèle triple $A_1=2\times 10^{-21}$ J, $A_2=1\times 10^{-22}$ J et $A_3=3\times 10^{-21}$ J. On remarque que la forme de la courbe est différente de a) ou b). Sa valeur

est proche de b), et même plus grande après 80\AA , alors que les constantes de Hamaker A_1 et A_3 sont plus petites que A .

Attard [17] a montré que l'allure des courbes expérimentales d'attraction entre bicouches de lipides était mieux reproduite en utilisant un modèle triple-film qui tient compte des dipôles permanents des têtes polaires zwitterioniques qu'en utilisant la formule simplifiée (I-2). Cependant, le modèle proposé par Attard utilise deux paramètres, la susceptibilité électrique de la couche polaire et son épaisseur d_p , alors que dans le modèle simple, seule peut varier la constante de Hamaker si l'on fixe le plan d'origine.

Finalement, l'évaluation de la force de van der Waals dans le cas de bicouches en phase aqueuse reste délicate. Non seulement, elle dépend de la valeur de la constante de Hamaker (ou des constantes de Hamaker si on utilise un modèle triple film) qui est mal connue, mais aussi de la définition du plan d'origine de la force (ou de l'épaisseur de la partie polaire). Heureusement, à grande distance, les conséquences de ce type d'approximation sur la valeur de la force restent faibles. D'ailleurs il ne faut pas oublier que la théorie de Lifshitz traite les corps comme des milieux continus en ignorant la structure moléculaire et suppose que les interfaces sont parfaitement définies et lisses entre deux milieux homogènes. Donc les résultats analytiques pour des épaisseurs inférieures à 20\AA , c'est-à-dire à des distances qui sont du même ordre de grandeur que les distances intermoléculaires, ne sont que des évaluations qualitatives.

I.A.2. La répulsion électrostatique

L'interaction électrostatique entre deux surfaces chargées dans une solution aqueuse peut être calculée en utilisant la théorie classique basée sur l'équation de Poisson-Boltzmann à une dimension.

Si on travaille avec un système ouvert, en équilibre osmotique avec un réservoir dont la salinité c_s est fixée (cf. expériences de stress osmotique, Chapitre IV), alors l'équilibre thermodynamique impose l'égalité des potentiels chimiques de toutes les espèces entre le système et le réservoir [18]. Donc dans l'hypothèse champ moyen, avec un électrolyte 1:1, les profils de concentration des ions présents dans l'espace interlamellaire peuvent s'écrire :

$$c_{\pm}(x) = c_s \exp[\pm\phi(x)] \quad (\text{I-9})$$

avec x , la distance à partir de l'une des deux surfaces ($0 < x < d$ avec $2d = D - e_e$ la distance totale de séparation entre les surfaces, si D est la période smectique dans le cas d'une phase lamellaire et e_e est l'origine choisie pour la force électrostatique, c'est-à-dire en général $e_e = \delta$ l'épaisseur de la bicouche) et φ le potentiel électrostatique réduit ($\varphi = e\psi/kT$ avec e la charge de l'électron), pris à zéro dans le réservoir.

L'équation de Poisson à résoudre est alors de la forme :

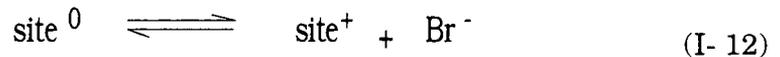
$$\frac{d^2\varphi(x)}{dx^2} = \kappa'^2 \sinh[\varphi(x)] \quad (\text{I- 10})$$

avec $\kappa' = (8\pi L_B c_s)^{1/2}$ la constante d'écrantage ou inverse de la longueur de Debye $L_B = e^2/4\pi\epsilon_0\epsilon kT$ est la longueur de Bjerrum qui vaut 7.2\AA pour les solutions aqueuses à température ambiante.

Pour résoudre l'équation (I-10), on a besoin de deux conditions aux limites: la première est donnée par la symétrie du système :

$$\left(\frac{d\varphi}{dx}\right)_{x=d} = 0 \quad (\text{I- 11})$$

Pour la deuxième, on a le choix d'imposer à la surface soit une charge constante, soit un potentiel constant [1]. Cependant ces deux hypothèses négligent le fait que lorsque les surfaces se rapprochent jusqu'à de faibles séparations, il peut s'exercer une forte pression sur les contre ions qui les plaquent sur les surfaces. Donc celles-ci n'auront pas le même état d'ionisation à courte distance. Pour rendre compte de ce phénomène dit de régulation de la charge, Ninham et Parsegian ont introduit un équilibre chimique entre les sites ionisables en surface et les contre ions, caractérisé par une constante K que l'on peut fixer [19]. Par exemple pour une bicouche de DDAB on peut écrire :



avec la constante d'équilibre K égale à :

$$K = \frac{|\text{Br}^-| |\text{site}^+|}{|\text{site}^0|} = \frac{c_s' e^{\Phi_s} \Sigma}{\Sigma_t - \Sigma} \quad (\text{I- 13})$$

où Σ est la densité surfacique de charge (électrons/ \AA^2) et Σ_t est la densité surfacique de sites ionisables (c'est-à-dire l'inverse de la surface par tête polaire s du tensioactif). Σ varie en fonction de d selon un profil schématisé sur la Figure I-4. Au delà d'une certaine distance critique d^* , Σ devient constante, égale à une valeur $\Sigma_\infty \leq \Sigma_t$. En

faisant varier K on fait varier d^* et Σ_∞ . Par contre pour $d < d^*$ la répulsion électrostatique est donc diminuée par rapport à l'hypothèse à charge constante. Ce modèle de répulsion est le plus général qu'il soit actuellement possible de tester : la partie chimique de l'interaction ion-tête polaire est incluse dans la constante K .

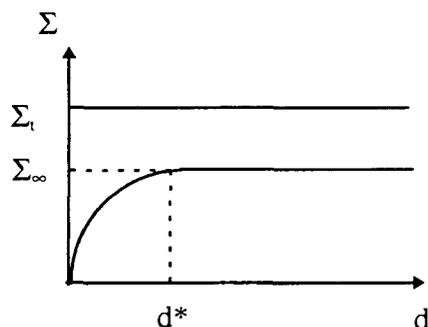


Figure I- 4 : Variation de la densité surfacique de charge en fonction de la distance de séparation dans l'hypothèse à équilibre constant.

Sur la Figure I- 5 nous avons tracé la force électrostatique calculée selon les trois hypothèses : a) à charge constante; b) à potentiel constant et c) à équilibre constant. Les différents paramètres de calcul ont été choisis de telle manière que les trois courbes coïncident à grande distance. Par contre pour les faibles séparations ($< 20 \text{ \AA}$) les différences dépassent une décade : on remarque que c) se place entre a) et b), ce qui est logique puisque analytiquement on trouve que quand d tend vers 0, φ_a1/d , φ_c) en $1/\sqrt{d}$ et φ_b) est constant par construction.

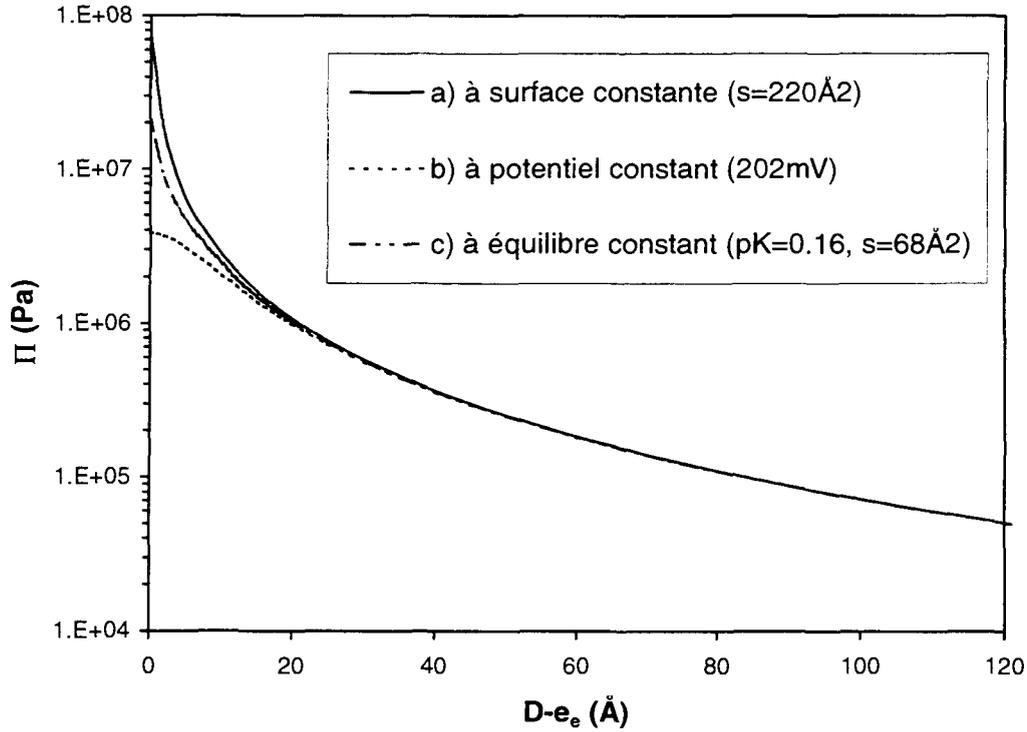


Figure I- 5 : Force électrostatique calculée avec trois hypothèses différentes de conditions aux limites et $c'_s=6 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$.

A grande distance ($d \gg 1/K'$) et dans l'approximation de faible recouvrement, on obtient l'expression classique asymptotique analytique de la décroissance de la force électrostatique [18] :

$$\Pi_{elec} \approx 64kTc'_s \gamma^2 e^{-\kappa'(D-e_e)} \quad (\text{I- 14})$$

avec $\gamma = \tanh(\Phi_1(0))/4$ où $\Phi_1(0)$ est la solution exacte de l'équation Poisson-Boltzmann pour une bicouche isolée. Dans le cas de surfaces très chargées $\gamma \approx 1$. Nous notons la longueur de Debye K' et non K car elle est toujours définie à partir de la concentration en sel c'_s dans un réservoir en équilibre osmotique avec l'échantillon et non pas à partir de la concentration réelle de sel dans l'échantillon.

Dans le cas où il n'y pas de sel ajouté dans la solution, la solution de l'équation de Poisson-Boltzmann se calcule analytiquement [18, 20] et est donnée par :

$$\exp[\varphi(d) - \varphi(x)] = \cos^2[U(d-x)/d] \quad (\text{I- 15})$$

avec $U \tan U = \pi L_B \Sigma (D-e_e)$. La pression est donnée par :

$$\Pi_{elec} = kT \frac{2U^2}{\pi L_B (D - e_c)^2} \quad (\text{I- 16})$$

A grande distance, comme le paramètre U tend vers $\pi/2$, la pression suit donc dans ce cas une loi de puissance en $1/D^2$ et non une loi exponentielle. Mais ceci n'a jamais été observé quantitativement dans un système moléculaire réel.

I.A.3. Force d'ondulation à grande distance

Helfrich a été le premier à montrer que les fluctuations d'origine thermique dans le cas de membranes fluides donnent lieu à une répulsion stérique à longue distance [6]. Cette force s'exprime en fonction du module de courbure élastique k_c de la membrane [21] :

$$\Pi_{ond} = \frac{3\pi^2 (kT)^2}{64 k_c} \frac{1}{\delta^3} \left(\frac{\phi}{1-\phi} \right)^2 \quad (\text{I- 17})$$

avec δ l'épaisseur de la membrane et ϕ la fraction volumique. Le facteur $(1-\phi)$ rend compte du volume non nul de la membrane.

La force est donc d'autant plus grande que k_c est petit, de l'ordre de $1kT$. Expérimentalement elle n'est observée que lorsque les membranes sont suffisamment fluides, c'est-à-dire par exemple avec des tensioactifs nonioniques [22] ou bien avec des co-tensioactifs ajoutés à des tensioactifs chargés [23]. Avec des membranes trop chargées, quelle que soit la distance de séparation, l'interaction électrostatique est toujours dominante d'autant plus que la double couche de contre-ions contribue à la rigidité des membranes [24].

I.A.4. Répulsions à courte distance

A courte distance, dans les systèmes biologiques notamment, il existe de fortes forces répulsives qui ne sont pas prises en compte dans le modèle DLVO. Ce sont ces forces qui permettent aux cellules d'exister puisqu'elles empêchent la fusion des bicouches. Leurs origines physiques sont encore mal définies. On distingue généralement deux classes : les forces d'hydratation et les forces stériques (entropiques) (cf. Israelachvili [11] et McIntosh [25]).

I.A.4.a. Forces d'hydratation

Ce sont les forces liées aux propriétés particulières des molécules d'eau près des surfaces. Expérimentalement, elles ont été beaucoup étudiées dans les films de lipides par Parsegian et collaborateurs [7], [26], McIntosh et Simon [27]. Pour des distances interlamellaires inférieures à 30Å, ils ont observé une variation exponentielle de la forme :

$$\Pi_{hyd} = \Pi_0 \exp\left(-\left(D - e_h\right) / \lambda\right) \quad (\text{I-18})$$

avec λ compris entre 1 et 3 Å (donc de l'ordre de grandeur de la taille d'une molécule d'eau) et Π_0 de l'ordre de 10^8 - 10^{10} Pa si $e_h \sim \delta$ l'épaisseur de la bicouche. Divers modèles ont été avancés pour expliquer ce comportement (cf. Macelja & Radic [28], Cevc & Marsh [29],) qui font intervenir une orientation et une polarisation partielles des molécules d'eau près de la surface des bicouches. Mais les confrontations avec les résultats expérimentaux sont restées ambiguës et de nouvelles théories sont encore développées [30], [31].

I.A.4.b. Forces stériques (entropiques)

Ces interactions stériques de courte portée sont dues à l'approche jusqu'au contact des bicouches et aux mouvements hors-plan des molécules et des bicouches. On distingue [11, 25] :

- une pression due au contact des têtes polaires qui perdent une partie de leur entropie de mouvement : cette force doit varier également exponentiellement avec une portée de l'ordre de deux fois la longueur des têtes polaires (cf. [11])

- une force de protusion qui traduit la rugosité dynamique de la surface et les fluctuations verticales des molécules. Israelachvili & Wennerström prévoient que la portée de cette force est inversement proportionnelle à la dimension latérale des molécules [32]

- une force d'ondulation induite par les fluctuations thermiques dont nous avons déjà parlé au paragraphe I-1-3. Parmi ces forces entropiques c'est celle qui a la portée la plus longue puisqu'elle varie en $1/D^3$.

Expérimentalement, comme toutes ces forces (hydratation, stériques) ont leur domaine d'application limité ($d_a < 30$ Å), il est souvent difficile d'en distinguer une parmi les autres. Cependant en jouant sur la température, l'état des chaînes, la nature des

têtes polaires, McIntosh et Simon ont pu caractériser ces forces à courte portée dans les systèmes de lipides [33]. En particulier sur la lécithine d'œuf, ils ont observé que la répulsion dite stérique augmente avec la température tandis qu'ils distinguent la force dite d'hydratation, entre 2 et 10Å, indépendante de la température [34]. Ils ont montré que l'incorporation de lipides à une seule chaîne alkyle, dans l'état cristal liquide, contribue aux forces d'ondulation et de protusion à courte distance [35].

Sur un système très analogue au DDAB, le DHDA, (acetate de dihexadecyldimethyl ammonium) Parsegian et coll. ont montré que la très forte répulsion à courte distance ne pouvait pas avoir une origine ondulatoire dans ce cas-là [36] : en effet ils ont trouvé expérimentalement que la courbe pression-distance entre 0 et 8Å est exactement la même au-dessus et au-dessous de la température de fusion des chaînes. Comme lorsque les chaînes sont cristallisées, les forces d'Helfrich ainsi que les forces de protusion doivent disparaître, on en déduit qu'elles sont négligeables dans le système que nous étudions (DDAB) du moins en l'absence de molécules ajoutées.

I.B. Application sur l'exemple du DDAB

Pour illustrer les ordres de grandeurs et les portées des différentes forces évoquées dans la partie précédente, nous donnons ici des valeurs quantitatives dans le cas du DDAB pur et notamment à l'équilibre double-lamellaire L_{α} - L_{α}' (des précisions sur la molécule et son diagramme de phase seront données dans le Chapitre II).

Nous faisons l'hypothèse de découplage des mécanismes, donc que la pression totale est la somme de toutes les forces précédentes :

$$\Pi_{totale} = \Pi_{elec} + \Pi_{hyd} + \Pi_{hel} + \Pi_{vdw} \quad (I- 19)$$

Cette hypothèse n'est pas toujours bonne, notamment dans le cas des membranes fluides, chargées, cf. [2, 24].

Pour calculer la pression ou l'énergie du système pour toutes les valeurs de D , nous avons donc a priori six paramètres ajustables : le choix du plan d'origine de la force de van der Waals, de la valeur exacte de la constante de Hamaker, de la surface par site ionisable, si on travaille à charge constante, ou de la constante de dissociation, si on travaille à équilibre constant, de la valeur de k_c et enfin des valeurs de Π_0 et de λ pour la

répulsion à courte distance. Heureusement, les mesures de pression osmotique permettent d'évaluer séparément certains de ces paramètres.

Pour la force répulsive à courte distance, nous avons le résultat expérimental de stress osmotique qui sera détaillé au Chapitre IV :

$$\Pi_{hyd}(D) = 1.1 \times 10^8 \exp[-(D - e_h) / 0.57] \quad (\text{I- 20})$$

avec D la période smectique telle que l'on peut la mesurer en diffusion de rayons X et $e_h=28\text{\AA}$ qui est l'origine arbitrairement choisie.

De même pour la force électrostatique des mesures de stress osmotique réalisées au-delà de 78\AA confirment que cette force domine à grande distance (cf. Chapitre IV et [37]). Ainsi nous pouvons négliger la force d'ondulation dans le bilan des forces. Ceci est confirmé par l'allure des pics de diffraction, qui restent fins (cf. Chapitre III).

D'autre part, nous savons que le diagramme de phase du DDAB présente une zone d'équilibre entre deux phases lamellaires avec une pression d'équilibre mesurée à $2.5 \times 10^5 \text{Pa}$ et des périodes de 31\AA et 78\AA (cf. Chapitres II, IV de cette thèse et [37]).

Donc pour retrouver théoriquement un trou de miscibilité entre les deux phases lamellaires, nous avons maintenant besoin d'évaluer de manière cohérente la force attractive. En effet, en utilisant le groupe de renormalisation, Lipowsky et Leibler ont les premiers démontré théoriquement la possibilité d'obtenir une transition de phase entre deux phases lamellaires, en présence d'une force attractive [38]. D'après leurs calculs la transition est continue, du deuxième ordre. En faisant l'hypothèse de champ moyen, Wennerström a trouvé que la transition est une transition de type liquide-gaz, donc du premier ordre, avec un point critique en pression [39]. Par analogie avec les diagrammes isothermes pression-volume, on obtient une "boucle de van der Waals" sur les courbes pression-distance et il est alors possible d'effectuer la construction de Maxwell pour déterminer les différents paramètres de la pression totale qui donne la transition de phase. En effet l'intégration de l'aire sous la courbe de pression traduit l'égalité des potentiels chimiques dans les deux phases :

$$\mu_{L_\alpha} - \mu_{L_\alpha} = \int_{D_{L_\alpha}}^{D_{L_\alpha}'} (\Pi_{totale} - \Pi_{eq}) dD = 0 \quad (\text{I- 21})$$

Si on travaille avec l'énergie libre $V(D)$ plutôt qu'avec la pression (une simple intégration permet de passer de celle-ci à celle-là), comme représenté plus loin sur la

Figure I- 9, alors la coexistence entre les deux phases lamellaires se prédit par la construction de la double tangente : si l'énergie possède des points d'inflexion et ne prend pas de valeurs négatives, il est possible de tracer une et une seule tangente double, dont l'ordonnée à l'origine est égale au potentiel chimique des deux phases en équilibre, et la pente à moins la pression d'équilibre.

Une hypothèse importante de ce calcul est que l'on néglige l'entropie de mélange. Il est possible d'en tenir compte comme l'ont fait Jönsson et Persson pour déterminer l'existence des régions biphasiques lamellaires dans le cas de bicouches peu chargées [40]. Ils calculent les potentiels chimiques en considérant une contribution attractive dispersive, une énergie d'hydratation, une énergie électrostatique et des entropies de mélanges. Mais dans notre étude de bicouches de DDAB pure dans l'eau, sans sel ajouté, la question des entropies de mélange ne se pose pas et nous avons raisonné sur la pression à une dimension, en utilisant les relations (I-19) et (I-21). Nous faisons alors varier les paramètres restés libres, jusqu'à obtenir, pour la pression totale, une construction de Maxwell qui donne bien une pression et des distances d'équilibre en accord avec les valeurs déterminées expérimentalement.

En pratique nous utilisons un programme pour effectuer la construction de Maxwell sur la pression totale : après l'entrée des différents paramètres caractérisant chaque contribution de la pression totale, le programme recherche la présence d'une boucle de van der Waals sur la pression totale, c'est-à-dire d'un minimum local Π_{\min} , éventuellement négatif, à la distance D_{\min} (cf. Figure I- 6) : si tel est le cas, le programme trouve également le maximum local Π_{\max} à D_{\max} . On teste alors si une construction de Maxwell est possible en regardant le signe du potentiel d'interaction V à D_0 , lorsque la pression s'annule : V , égal à l'opposé de l'intégrale de la pression, doit être positif sinon cela signifie que le puits attractif est trop grand et qu'il n'y a pas de solution physique (en effet on ne peut pas alors trouver, comme sur la Figure I- 9, de double tangente à la courbe du potentiel, dont la pente, c'est-à-dire l'opposé de la pression totale, soit positive, et l'ordonnée à l'origine, le potentiel chimique soit également positif). Pour trouver la valeur du plateau d'équilibre, $\Pi_{\text{éq}}$, on doit trouver D_1 et D_2 tels que $\Pi(D_1)=\Pi(D_2)=\Pi_{\text{éq}}$ et $\mu_1=\mu_2$. On commence par faire une estimation de $\Pi_{\text{éq}}$, par exemple $\Pi_{\text{éq}}=(\Pi_{\min}+\Pi_{\max})/2$, ou $\Pi_{\max}/2$ si $\Pi_{\min}<0$. Puis on calcule les deux distances,

D_1 et D_2 , qui correspondent à cette pression, (on écarte bien sûr la troisième distance qui correspond à la solution instable $\frac{\partial \Pi}{\partial D} > 0$), ainsi que le potentiel chimique aux deux distances :

$$\mu_1 = V(D_1) + \Pi_{\acute{e}q} D_1$$

$$\mu_2 = V(D_2) + \Pi_{\acute{e}q} D_2 \tag{I- 22}$$

Si $\mu_1 = \mu_2$ à 10^{-3} près alors la solution est trouvée : $D_1 = D_{L'\alpha}$ et $D_2 = D_{L\alpha}$. Sinon, si $\mu_1 < \mu_2$ c'est que $\Pi_{\acute{e}q}$ choisi est trop grand, il faut reprendre le calcul avec une estimation plus faible, et si $\mu_1 > \mu_2$ c'est que $\Pi_{\acute{e}q}$ choisi est trop petit.

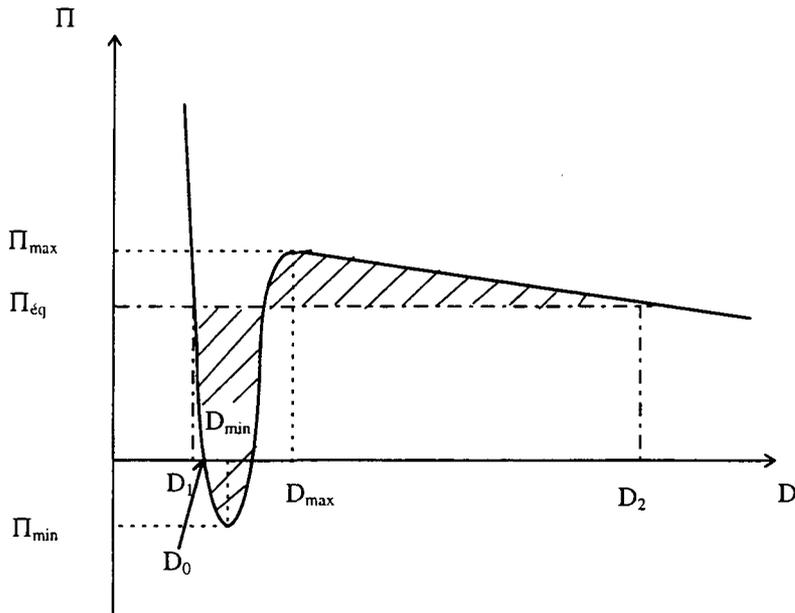


Figure I- 6 : Schéma de la construction de Maxwell sur la pression totale.

Sur la Figure I- 7 nous avons tracé en échelle semi-log les différents termes de pressions en fonction de la période smectique. Π_{hyd} est donnée par l'équation (I-20). Pour la force électrostatique, nous avons d'abord travaillé à charge constante avec, pour surface par site ionisé, $s=530\text{\AA}$. Quant à la force de van der Waals, nous avons utilisé le modèle simple. Mais en conservant une valeur raisonnable pour la constante de Hamaker, $8.3 \times 10^{-21}\text{J}$ c'est à dire $\sim 2kT$, nous avons trouvé qu'il est nécessaire de déplacer son plan d'origine à 26.4\AA , donc au-delà des têtes polaires. Ceci met en évidence l'importance de la contribution de la zone polaire dans la force attractive et est donc équivalent au modèle triple film décrit dans la partie précédente. La sommation des pressions est faite à partir de 28\AA , qui correspond à un mur stérique fictif qui permet d'éviter la divergence de la force de van der Waals.

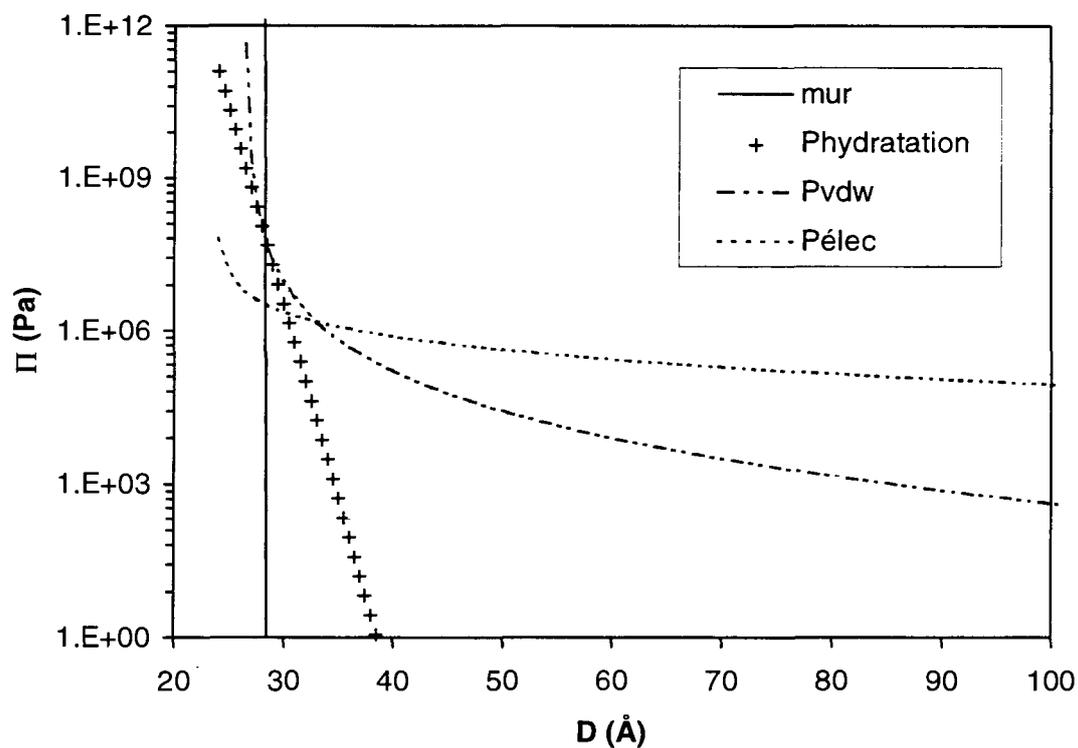


Figure I- 7 : Forces calculées dans le cas de bicouches de DDAB dans l'eau. La seule force attractive, la force de van der Waals, est portée en valeur absolue pour faciliter la comparaison avec les autres forces. La force électrostatique est calculée à charge constante ($s=530\text{\AA}^2$).

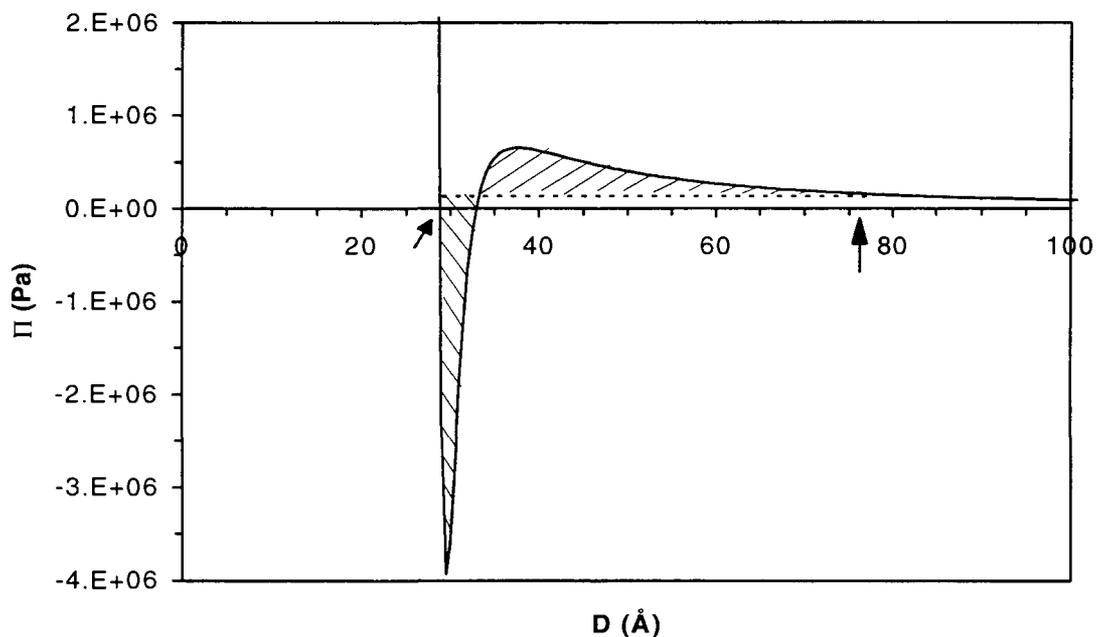


Figure I- 8 : Pression totale calculée dans le cas des bicouches de DDAB, à température ambiante, à partir des pressions de la figure précédente. La construction de Maxwell donne pour les deux phases lamellaires en coexistence une pression d'équilibre de 1.4×10^5 Pa et des périodes de 28.8Å et 79.5Å.

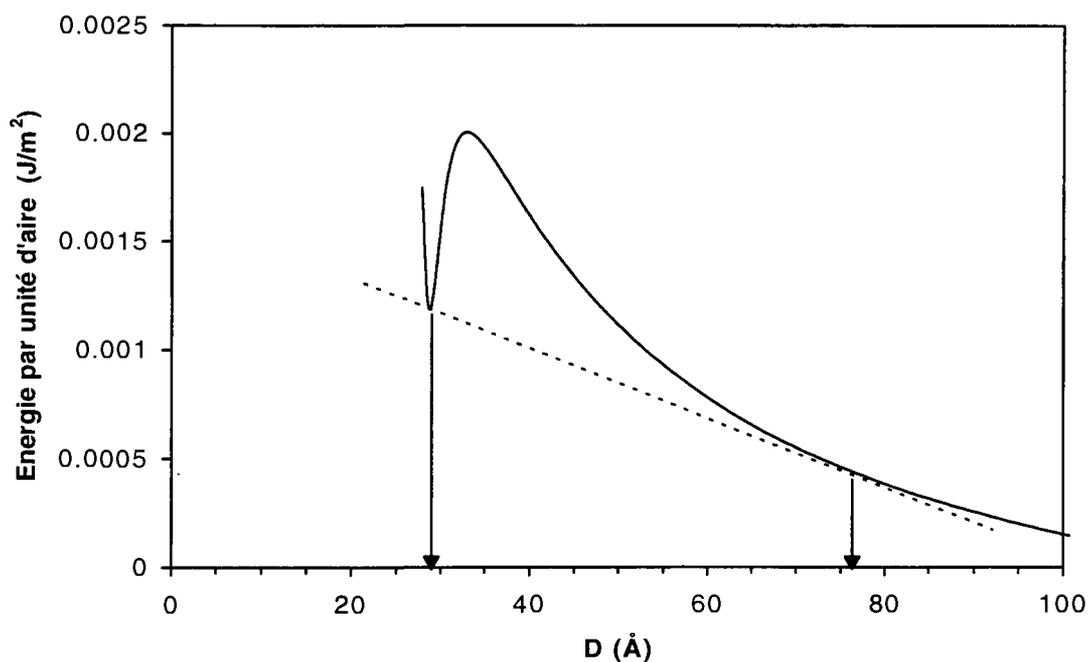


Figure I- 9 : Energie par unité d'aire calculée pour les bicouches de DDAB avec les mêmes paramètres que la pression de la figure précédente : cette énergie est l'opposé de l'intégrale de la pression. La coexistence de deux phases se retrouve alors par la méthode de la double tangente.

Le résultat de l'intégration sur la pression totale, représentée sur la Figure I-8, nous donne une pression d'équilibre de 1.4×10^5 Pa, et des périodes d'équilibre égales à 28.8Å et 79.5Å.

En travaillant à équilibre constant pour le calcul de la force électrostatique, et sans modifier les autres forces, nous obtenons le même résultat en prenant un $pK=0.95$ pour la constante d'équilibre définie par (I-13), et 65Å^2 pour la surface par tête polaire.

Une autre façon d'évaluer l'énergie attractive qui résulte des têtes polaires est de séparer la force attractive en une force de van der Waals liée aux chaînes alkyles, pour laquelle on a une constante de Hamaker de l'ordre de 6×10^{-21} J, et en un puits attractif modélisant l'adhésion, représenté par une fonction exponentielle. Sur la Figure I- 10, nous avons tracé l'ensemble de ces pressions (y compris Π_{hyd} et $\Pi_{\text{élec}}$ à équilibre constant). Nous trouvons alors que pour obtenir l'équilibre double lamellaire observé expérimentalement, cette exponentielle, de portée choisie arbitrairement égale à 3Å, vaut 1.1×10^7 Pa à 28Å :

$$\Pi_{\text{attrac}} = -1.1 \times 10^7 \exp[-(D-28)/3] \quad (\text{I- 23})$$

En intégrant sur D, cela donne, à 28Å, une énergie attractive équivalente, ou énergie d'adhésion, de -3.3mN/m :

$$E_{\text{attrac}} = -\int \Pi_{\text{attrac}} dD = -3.3 \times 10^{-3} \exp[-(D-28)/3] \quad (\text{I- 24})$$

En prenant une surface $s=65\text{Å}^2$ par tête polaire ceci correspond à une énergie attractive de 0.5kT/molécule ($E(kT/\text{molécule}) = (E(N/m) \times s) / kT$).

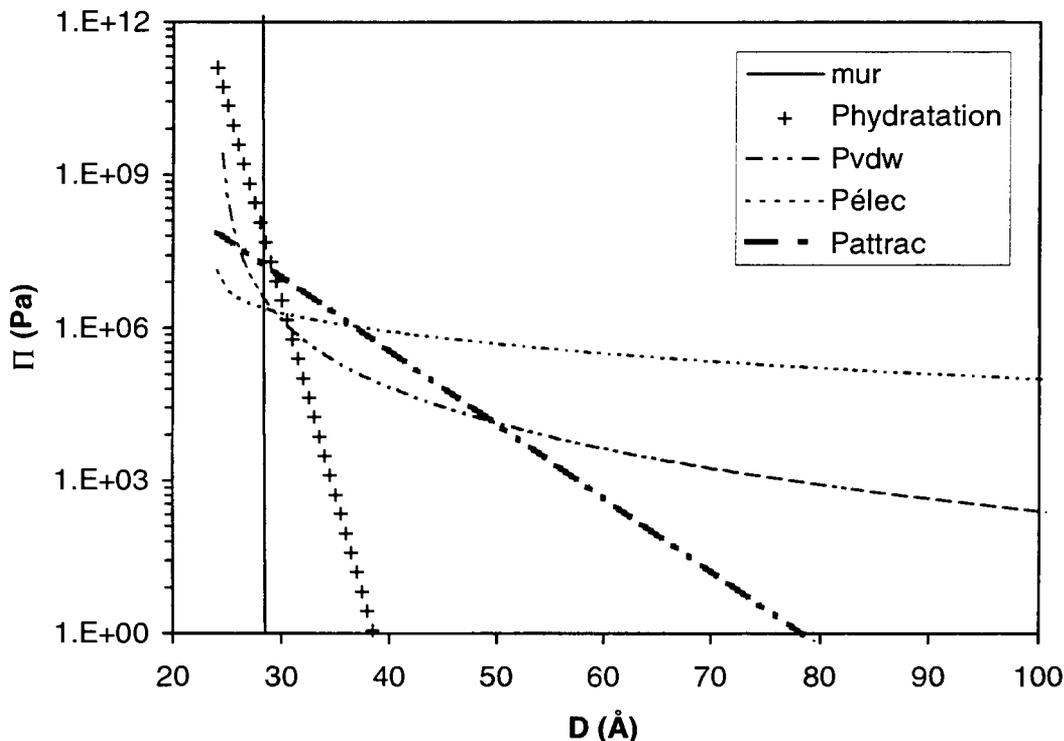


Figure I- 10 : Bilan des forces dans le cas du DDAB : la force d'hydratation est évaluée à partir des mesures expérimentales; la force électrostatique est calculée à équilibre constant ($pK=0.95$ et $s=65\text{\AA}^2$); la force de van der Waals est évaluée pour les chaînes alkyles en prenant l'origine à 24\AA et une constante de Hamaker de 6×10^{-21} J; une force attractive supplémentaire a été ajoutée pour rendre compte spécifiquement des têtes polaires, et qui est équivalente à une énergie de -3.3mN/m .

I.C. Diagrammes de phases ternaires

Nous pouvons également calculer théoriquement un diagramme de phase ternaire complet dans le cas de systèmes lamellaires. En effet, il suffit de reprendre la procédure précédente pour différentes droites de dilution, à fraction molaire constante x de molécule 2 ajoutée à une molécule 1. Pour chaque fraction molaire x , il faut d'abord déterminer les différents paramètres caractérisant chacune des contributions de la pression totale. Ensuite la construction de Maxwell sur la pression totale, est le critère qui permet de caractériser les zones biphasiques lamellaire-lamellaire : si la construction est possible, elle donne la pression et les compositions d'équilibre, en faisant l'hypothèse que la composition x est la même dans les deux phases en coexistence (donc en négligeant les entropies de mélange). Sinon soit la pression est

décroissante monotone et il y a un domaine monophasique tout le long de la dilution; soit il y a trop d'attraction et il y a équilibre entre une phase lamellaire et une phase très diluée de monomères. Donc en faisant varier x nous pouvons déterminer les limites de phases, comme illustré sur la Figure I- 11.

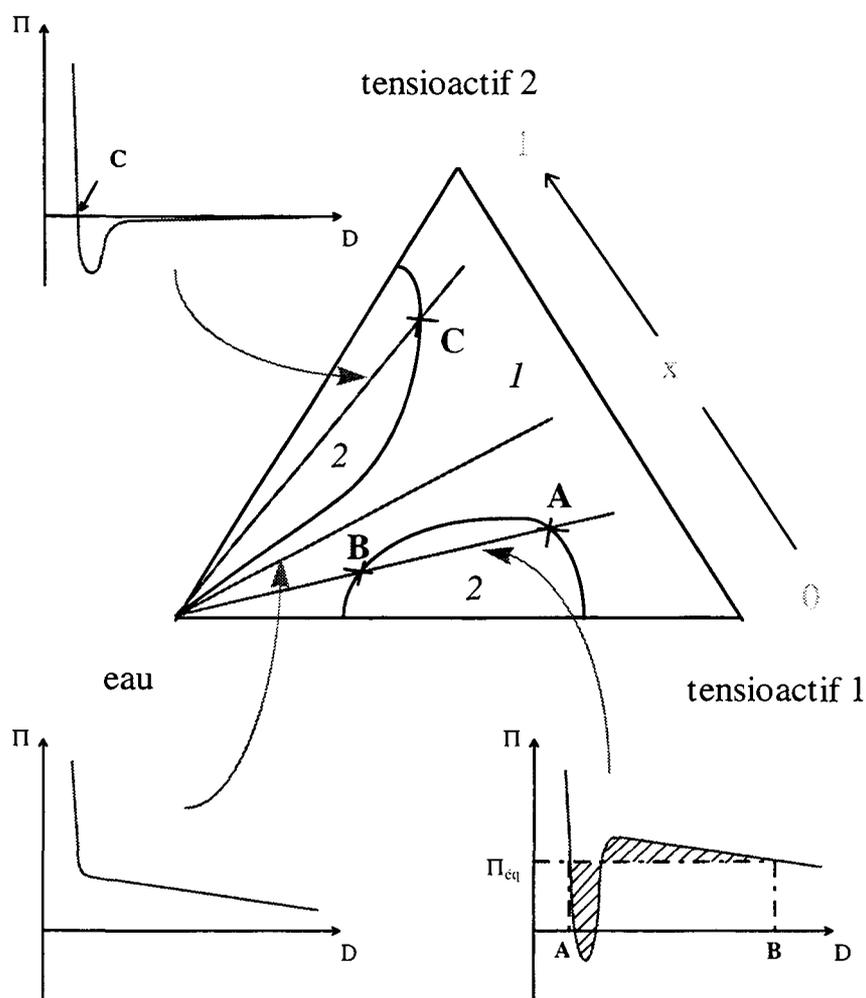


Figure I- 11 : Schéma du principe d'obtention des diagrammes de phases ternaires par le calcul de la pression totale le long des lignes de dilution et la construction de Maxwell pour obtenir les limites des domaines biphasiques.

Nous verrons dans le Chapitre II et dans le Chapitre IV de ce manuscrit l'application de cette méthode avec l'ajout, respectivement, de molécules d'oligosaccharides et de molécules de glycolipides sur les phases lamellaires de DDAB.

Références

- [1] Derjaguin B. V. and Landau L. *Acta Physicochim USSR* **14** (1941) 633-662 ; Verwey E. J. W. and Overbeek J. Th. G. *Theory of Stability of Lyophobic Colloids* Elsevier, Amsterdam (1948)
- [2] Podgornic R. and Parsegian V. A. *Langmuir* **8** (1992) 557-562
- [3] Hyde S., Anderson S., Larsson K., Blum Z., Landh T., Lidin S. and Ninham B. W. *The language of shape*, Chap. 3, Elsevier, Amsterdam (1997)
- [4] Wennerström H., Jönsson B. and Linse P. J. *J. Phys. Chem.* **70** (1982) 4665; Guldbbrand L., Jönsson B., Wennerström H and Linse P. J. *J. Phys. Chem.* **80** (1984) 2221
- [5] Desforge C. *Thèse de doctorat ParisVI* (1993)
- [6] Helfrich W. *Z. Naturforsch* **33a** (1978) 305-315
- [7] LeNeveu D. M., Rand R.P., Parsegian V.A. and Gingell D. *Biophys. J.* **18** (1976) 209-230
- [8] Ninham B. W. and Parsegian V. A. *Biophys. J.* **10** (1970) 646-674
- [9] Mahanty J. and Ninham B. W. *Dispersion forces*, Academic Press, New York, (1976)
- [10] Parsegian V. A. and Weiss G. H. *J. Colloid Interface Sci.* **81** (1981) 285-288
- [11] Israelachvili J. N. *Intermolecular and surface forces*, 2nd Edition, Academic Press, London, (1991)
- [12] Parsegian V. A. *Langmuir* **9** (1993) 3625-3628
- [13] Ninham B. W. and Yaminsky V. *Langmuir* **13** (1997) 2097-2108
- [14] Malberg C. G. and Maryott A.A. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **45** (1950) 299
- [15] *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, 72nd Edition (1991-1992)
- [16] Evans E. and Needham D. *J. Phys. Chem.* **91** (1987) 4219-4228
- [17] Attard P., Mitchell D. and Ninham B. W. *Biophys. J.* **53** (1988) 457-460; Attard P. and Mitchell D. *J. Chem. Phys. Lett.* **133** (1987) 347-352
- [18] Dubois M., Zemb T., Belloni L., Delville A., Levitz P. and Setton R. *J. Chem. Phys* **96** (1992) 2278-2286
- [19] Ninham B. W. and Parsegian V. A. *J. Theor. Biol.* **31** (1971) 405-428
- [20] Engström S. and Wennerström H. *J. Phys. Chem* **82** (1978) 2711
- [21] Helfrich W. Z. *J. Phys. : Condens. Matter* **23A** (1994) 6, 79
- [22] Bagger-Jørgensen H. and Olsson U. *Langmuir* **12** (1996) 4057-4059

- [23] Roux D. and Safinya C. R. *J. Phys. France* **49** (1988) 307-318
- [24] Fogden A., Mitchell D. J. and Ninham B. W. *Langmuir* **6** (1990) 159-162; Winterhalter M. and Helfrich W. *J. Phys. Chem.* **96** (1992) 327-330; Porte G. and Ligoure C. *J. Chem. Phys.* **102** (1995) 4290-4298; de Vries R. *J. Phys. II France* **4** (1994) 1541-1555; Fogden A., Daicic J. and Kidane A. *J. Phys. II France* **7** (1997) 229-248
- [25] McIntosh T. J. and Simon S. A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* **23** (1994) 27-51
- [26] Lis L. J., McAlister M., Fuller N., Rand R. P. and Parsegian V. A. *Biophys. J.* **37** (1982) 657-666; Rand R. P. and Parsegian V. A., *Biochim. Biophys. Acta* **988** (1989) 351-376
- [27] McIntosh T. J. and Simon S. A. *Biochemistry* **25** (1986) 4058-4066
- [28] Marcelja S. and Radic N. *Chem. Phys. Lett* **42** (1976) 129-130
- [29] Cevc G. and Marsh D. *Biophys. J.* **47** (1985) 21-32
- [30] Israelachvili J.N. and Wennerström H. *Nature* **379** (1996) 219-225
- [31] Marcelja S. *Nature* **385** (1997) 689-690; Marcelja S. *Colloids and Surfaces A* (1997) à paraître
- [32] Israelachvili J.N. and Wennerström H. *J. Phys. Chem* **96** (1992) 520-531
- [33] McIntosh T. J., Magid A. D. and Simon S. A. *Biochemistry* **26** (1987) 7325-7332; McIntosh T. J. and Simon S. A. *Biochemistry* **32** (1993) 8374-8384
- [34] McIntosh T. J., Advani S. and Simon S. A. *Biophys. J.* **69** (1995) 1473-1483
- [35] McIntosh T. J. and Simon S. A. *Biochemistry* **34** (1995) 8520-8532
- [36] Yi-hua Tsao, D. F. Evans, Rand R. P. and Parsegian V. A. *Langmuir* **9** (1993) 233
- [37] Zemb T., Dubois M., Belloni L. and Marcelja S. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **89** (1992) 33
- [38] Lipowsky R. and Leibler S. *Phys. Rev. Lett.* **56** (1986) 2541
- [39] Wennerström H. *Langmuir* **6** (1990) 834-838
- [40] Jönsson B. and Persson P. K. T. *J. Colloid Interface Sci.* **115** (1987) 507-512

Chapitre II

Caractérisation des composants moléculaires en solution aqueuse

Pour notre étude de l'effet de l'ajout de glycolipides dans les membranes, nous avons utilisé des molécules tensioactives synthétiques dérivées de sucres naturels. Cette famille de molécules forme maintenant une classe à part entière dans les tensioactifs nonioniques et est l'objet de nombreuses recherches en synthèse et sur leur caractérisation. En effet elles possèdent des propriétés intéressantes, comme d'excellentes biocompatibilité et biodégradabilité et on les retrouve dans un nombre croissant d'applications, comme l'extraction et la cristallisation de protéines membranaires, les synthèse chirales, les détergents etc.

Les deux molécules que nous avons utilisées, le 2-O Lauroylsaccharose (noté LS par la suite) et le N-lauroyl, N-nonyl Lactitol ($LC_{11}C_9$), sont représentées sur la Figure II-1. La molécule de LS a été synthétisée dans le Laboratoire de Synthèses et d'Activations de Biomolécules du Pr. D. Plusquellec à l'ENSC de Rennes [1]. Sa tête polaire est composée d'un motif saccharose sur lequel est greffée une chaîne alkyle à onze carbones. Le $LC_{11}C_9$ a été synthétisé au Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique dirigé par I. Rico-Lattes [2] et est dérivé du lactitol. La molécule possède deux chaînes alkyles, à onze et neuf carbones.

Avant de pouvoir étudier les effets de ces glycolipides dans nos systèmes hôtes, il est nécessaire de déterminer leurs grandeurs physiques caractéristiques ainsi que leurs comportements en phase aqueuse. Dans la première partie de ce chapitre, nous donnons donc les résultats de l'étude physico-chimique que nous avons réalisé sur le 2-O Lauroylsaccharose et sur le N-lauroyl, N-nonyl Lactitol. Ensuite nous décrivons les diagrammes binaires de chacune des molécules après un rappel pour le DDAB et la DMPC. Enfin en troisième partie nous avons étudié l'effet de l'addition d'oligosaccharides, c'est-à-dire des têtes polaires libres des glycolipides, dans les phases lamellaires hôtes.

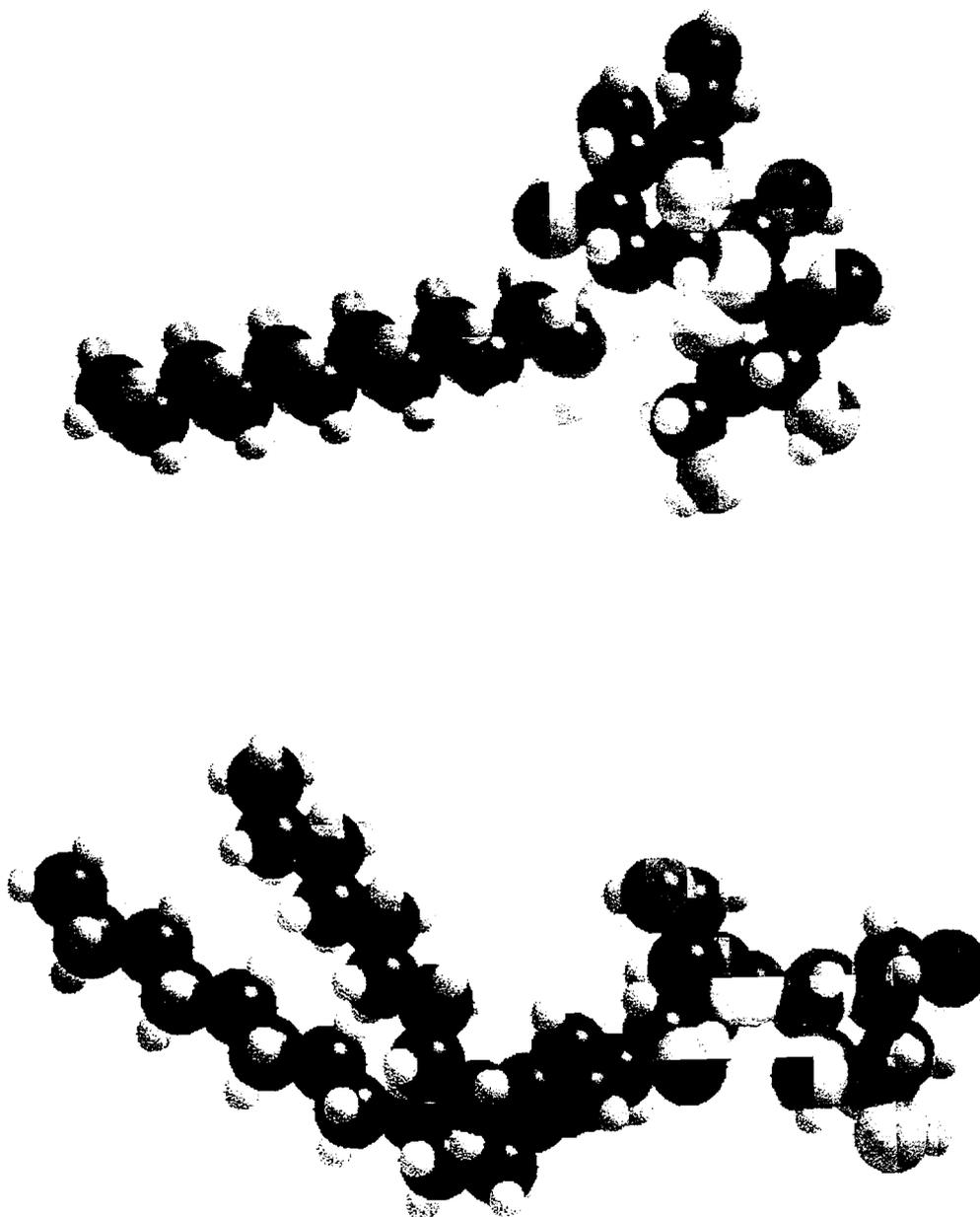


Figure II- 1 : Représentation schématique des deux glycolipides étudiés, le 2-O Lauroylsaccharose $[(C_{13}H_{21}O_{12})(C_{11}H_{23})]$ en haut et le N-Lauroyl, N-Nonyl Lactitol $[(C_{13}H_{23}O_{11}N)(C_{11}H_{23})(C_9H_{19})]$ en bas. Les conformations dessinées sont arbitraires mais donnent une bonne idée des volumes relatifs des têtes polaires et des chaînes alkyles. Les atomes de carbone sont noirs, ceux d'hydrogènes gris, d'oxygène rouges et celui d'azote bleu.

II.A. Grandeurs physiques caractéristiques

II.A.1. Le volume moléculaire

II.A.1.a. Mesures de densité

Une des techniques possibles pour avoir accès au volume moléculaire est d'effectuer des mesures très précises de densité de solutions. Nous avons utilisé un densimètre commercialisé par Anton Paar (Graz, Autriche) : à partir de la mesure des périodes d'oscillation d'un tube en quartz soumis à des vibrations mécaniques, on déduit la densité de la solution contenue dans le tube. Le volume moléculaire V_2 de la molécule dissoute se calcule par la formule suivante :

$$V_2 = M_2 \left[\frac{1}{\rho} - \frac{1-x}{x} \left(\frac{1}{\rho_0} - \frac{1}{\rho} \right) \right] \quad (\text{II- 1})$$

avec M_2 la masse moléculaire, ρ la densité mesurée, ρ_0 la densité du solvant et x la fraction massique de molécule dissoute, entre 0 et 2% en général. L'incertitude sur V_2 est de l'ordre de $\pm 0.5\%$.

Les résultats numériques sont donnés dans le paragraphe récapitulatif II.A.3

II.A.1.b. Estimation des volumes polaire et apolaire

Une fois que l'on connaît le volume total de la molécule amphiphile, on doit estimer la part de volume polaire et de volume apolaire.

Si l'on considère la partie apolaire formée par les chaînes alkyles, alors on peut estimer V_{apol} par la formule de Tanford qui donne le volume d'une chaîne hydrocarbonnée saturée de n atomes de carbones [3] :

$$V_{apol} = 27.4 + 26.9n \text{ (\AA}^3\text{)} \quad (\text{II- 2})$$

V_{pol} se déduit alors simplement par soustraction :

$$V_{pol} = V_{tot} - V_{apol} \quad (\text{II- 3})$$

Tanford a donné aussi une formule pour calculer la longueur d'extension maximale d'une chaîne alkyle à n atomes de carbone que nous utiliserons par la suite :

$$l_c = 1.5 + 1.265n \text{ (\AA)} \quad (\text{II- 4})$$

II.A.2. La surface par tête polaire

Une autre dimension caractéristique utile d'une molécule tensioactive est sa surface par tête polaire. Pour les molécules assez solubles dans l'eau elle peut se déduire des mesures de tension de surface, pour les molécules très peu solubles par des isothermes de compression.

II.A.2.a. Mesures de tension de surface

Nous avons mesuré la tension de surface de solutions aqueuses de LS en utilisant un "Digital-tensiometer K10" de chez Krüss avec la méthode de l'anneau de Du Nouy : l'anneau est descendu jusqu'au contact de la solution puis remonté automatiquement tout en mesurant la force nécessaire pour étirer la surface. La courbe des résultats de la tension de surface déduite est donnée en fonction de la concentration de LS sur la Figure II- 2.

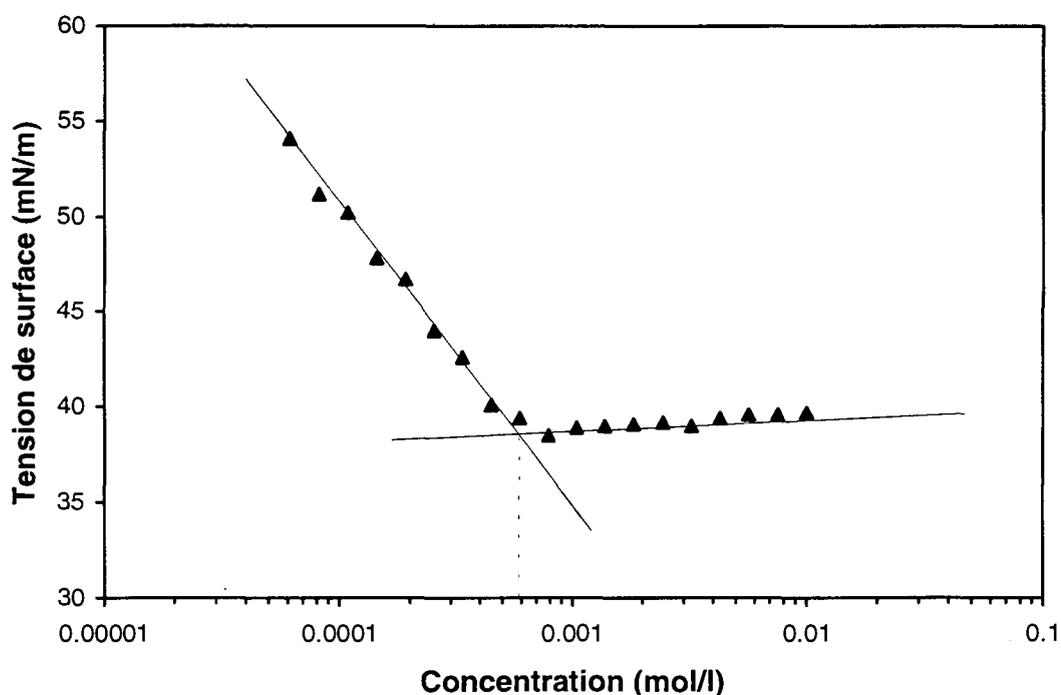


Figure II- 2 : Mesure de la tension de surface par la méthode Du Nouy de solutions aqueuses de LauroylSaccharose en fonction de la concentration.

La rupture de pente à $6 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ correspond à la concentration micellaire critique (c.m.c.), c'est-à-dire à l'apparition de micelles dans la solution et à la saturation de la surface en tensioactif.

D'autre part la pente de la 1^{ère} partie de la courbe, avant la c.m.c., permet d'accéder à la valeur de la surface par tête polaire. En effet dans cette partie de la courbe on peut appliquer le modèle d'adsorption de Gibbs :

$$d\gamma = -\Gamma RT.d \ln c \quad (\text{II- 5})$$

avec γ la tension de surface, c la concentration molaire et Γ l'excès de tensioactif en surface, inversement proportionnel à la surface par tête polaire s . Pour le LS nous avons calculé une surface égale à $65 \pm 1 \text{ \AA}^2$.

Pour les molécules cationiques comme le DDAB il peut apparaître des problèmes de mouillage du fait de l'affinité forte de ces molécules avec le métal (cf.[4]). Pour minimiser ces effets, plutôt que d'utiliser la méthode de l'anneau, nous avons mesuré la c.m.c. du DDAB avec la méthode du poids de goutte. Le principe consiste à mesurer le poids de la goutte, m , au sortir d'un capillaire vertical lorsque la tension de surface égale juste le poids de la goutte. On a alors :

$$\gamma \cdot 2\pi ar = mg \quad (\text{II- 6})$$

avec γ la tension de surface, r le rayon du capillaire, a un facteur correctif géométrique et g l'intensité de la pesanteur. La courbe est donnée sur la Figure II- 3. Nous observons une rupture de pente vers $8 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ qui correspond cette fois à l'apparition de vésicules dans la solution. En appliquant le modèle de Gibbs au DDAB (c'est-à-dire en multipliant Γ par un facteur 2 dans l'équation (II-5) pour tenir compte de la présence de la molécule de tensioactif et de son contre-ion à la surface, et en faisant donc ici l'hypothèse que tous les contre-ions Br^- sont dissociés) on trouve une surface par tête polaire de $65 \pm 1 \text{ \AA}^2$.

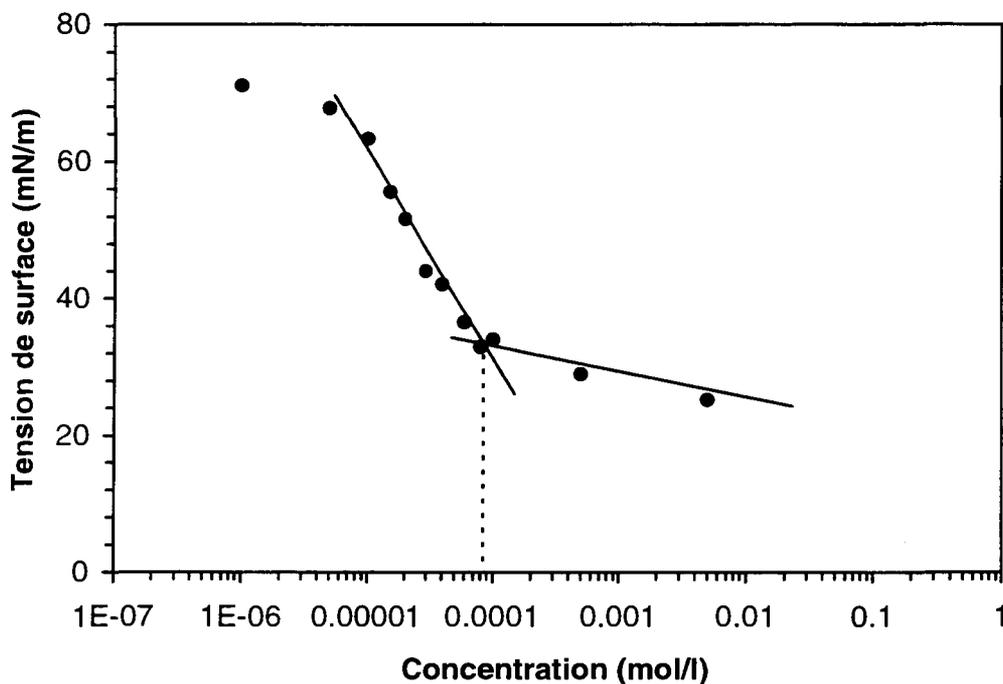


Figure II- 3 : Mesure de la tension de surface du DDAB par la méthode du poids de goutte.

II.A.2.b. Isothermes de compression

Pour mesurer la surface par tête polaire du N-lauroyl, N-nonyl Lactitol très peu soluble nous avons utilisé une cuve de Langmuir-Blodgett du laboratoire des Systèmes Moléculaires Organisés (SCM - Saclay). Le principe consiste d'abord à épandre grâce à un solvant volatil et insoluble dans l'eau, une solution de concentration connue qui va se disperser à l'interface eau-air. Ensuite, grâce à une barrière mobile, on réduit la surface de l'interface et on fait passer les molécules de l'état gazeux à deux dimensions (non organisé) à une phase solide où les molécules sont organisées et forment un film monomoléculaire. On peut alors tracer ce que l'on appelle une isotherme de compression, c'est-à-dire la pression de surface en fonction de l'aire disponible, ramenée à l'aire occupée par une molécule. A la limite du collapse du film cette aire doit correspondre à la surface par tête polaire de la molécule en bicouche en phase aqueuse.

La mesure effectuée sur la molécule de $LC_{11}C_9$ est portée sur la Figure II- 4. Nous avons trouvé une aire minimale par tête de $59 \pm 1.5 \text{ \AA}^2$.

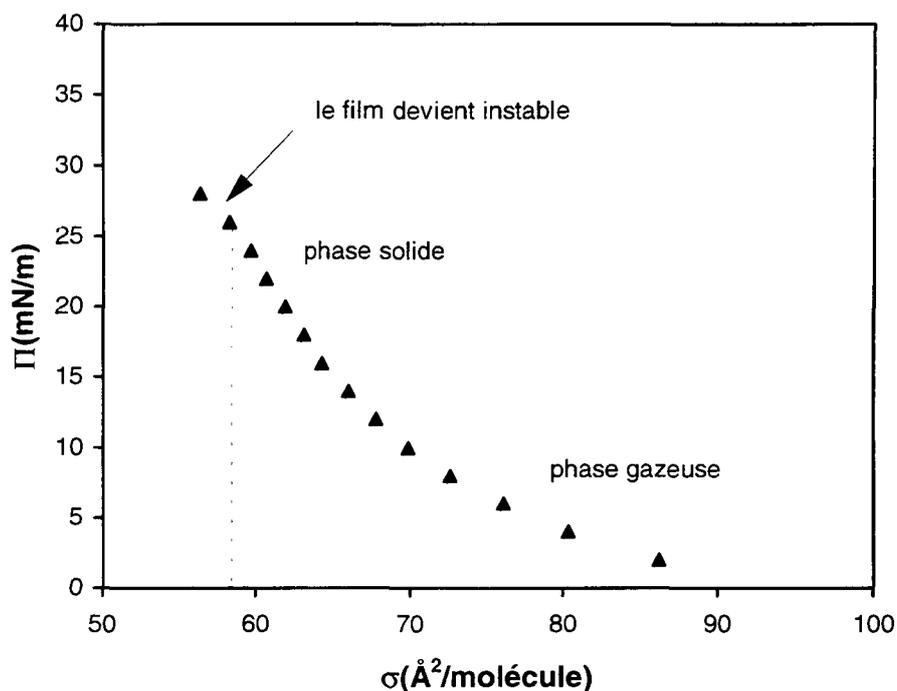


Figure II- 4 : Isotherme de compression du N-Lauroyl, N-Nonyl Lactitol

II.A.3. Tableau récapitulatif et comparatif

Les résultats numériques de cette partie A sont regroupés dans le Tableau II-1:

	<i>LS</i>	<i>LC₁₁C₉</i>	<i>DDAB</i>	<i>DMPC</i> [5]
Masse Moléculaire <i>M</i> (g/mol)	524	651	462	678
Volume Moléculaire <i>V</i> (\AA^3)	695	978	784	1095
Volume apolaire V_{apol} (\AA^3)	323	563	700	745
Volume polaire V_{pol} (\AA^3)	372	415	84	350
Longueur de chaîne l_c (\AA)	15.4	15.4	16.7	17.9
Surface par tête polaire s (\AA^2)	65	59	65	45.5
c.m.c. (mol/l)	6×10^{-4}	$< 10^{-8}$	8×10^{-5}	10^{-8}
$p = V_{\text{apol}}/sl_c$	0.32	0.61	0.64	0.91

Tableau II. 1 : Récapitulatif des grandeurs caractéristiques des molécules étudiées.

La dernière ligne du tableau donne les valeurs du paramètre géométrique d'empilement moléculaire, p , défini dans [6]. Pour chaque valeur de p , et suivant la fraction volumique de la sous phase apolaire ϕ_A , il est possible de prédire la structure de la première structure condensée formée, comme sur la Figure II- 5, extraite de la référence [7]. Lorsque $p=1$ il se forme une phase lamellaire, pour $1/2 < p < 2/3$ une phase cubique bicontinue, une phase hexagonale pour $p=1/2$ et une phase micellaire isotropes lorsque $1/3 < p < 1/2$.

Pour calculer p , nous avons pris l_c la longueur de la chaîne étirée au maximum qui n'est pas la valeur réelle; néanmoins en comparant les valeurs de p pour nos 4 molécules on peut prédire que la molécule de LS est celle qui introduira le plus de courbure vers l'eau et donc des défauts intralamellaires (comme des pores) ou interlamellaires (qui induisent la formation des phases cubiques bicontinues).

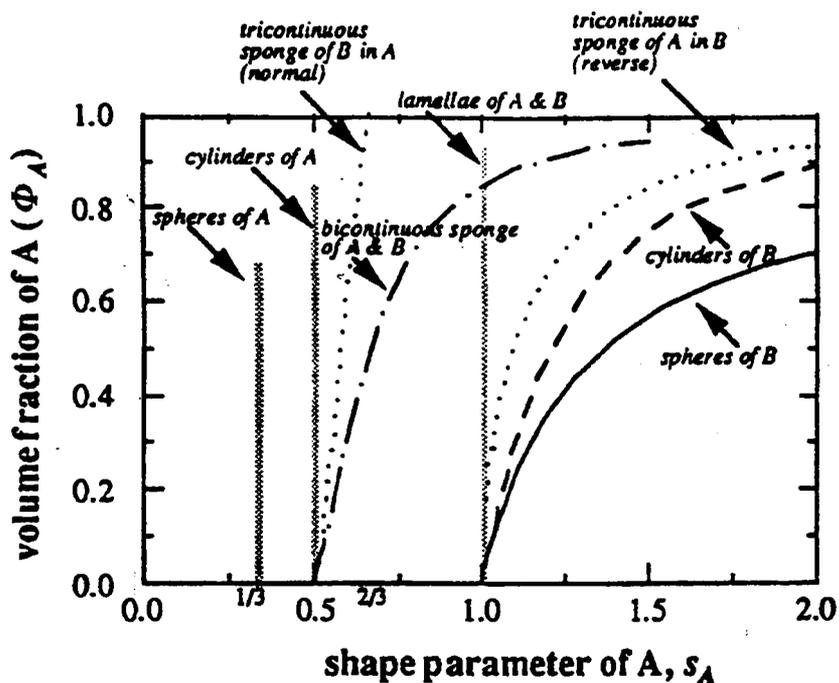


Figure II- 5 : Prédiction de la géométrie des agrégats en fonction du paramètre de forme $s_A=p$, et de la fraction de volume ϕ_A de la sous phase apolaire. D'après [7].

II.B. Diagrammes de phases binaires

II.B.1. Rappels pour le DDAB et la DMPC

II.B.1.a. Diagramme de phases du DDAB

Le comportement de phases du DDAB (bromure de didodécyltriméthyl ammonium : $(C_{12}H_{25})_2N^+(CH_3)_2Br^-$) en solution aqueuse est connu depuis une vingtaine d'années (Fontell [8]) et a été largement étudié dans notre laboratoire par M. Dubois [9]. Le diagramme de phase en échelle semi-logarithmique est reproduit sur la Figure II- 6. Sur un large domaine, entre 2.5 et 30% en poids, ce tensioactif cationique forme une phase lamellaire gonflée notée L_α en solution binaire dans l'eau pure. Au-delà de 30% et jusqu'à 75% il y a une coexistence entre deux structures lamellaires, la phase diluée L_α et une phase dite "collapsée" L'_α .

Sur la Figure II- 7, nous avons porté le spectre de diffusion centrale de rayons X d'un échantillon de DDAB à 50% en poids dans l'eau. Nous observons bien deux pics de Bragg caractéristiques de l'ordre lamellaire. La première période à 78\AA (avec son deuxième ordre) correspond à la phase gonflée, tandis que la deuxième à 31\AA correspond à la phase collapsée. Sur la même figure nous avons également tracé les spectres de chacune de ces deux phases obtenues après séparation par centrifugation de l'échantillon. Nous avons utilisé une centrifugeuse Sigma 3K30 avec un rotor pour tubes Ependorf qui permet de centrifuger à 25000 tr/min. La séparation obtenue après une nuit donne la preuve qu'il y a séparation macroscopique entre les phases lamellaires L_α - L'_α et qu'il y a une transition du premier ordre entre les deux phases.

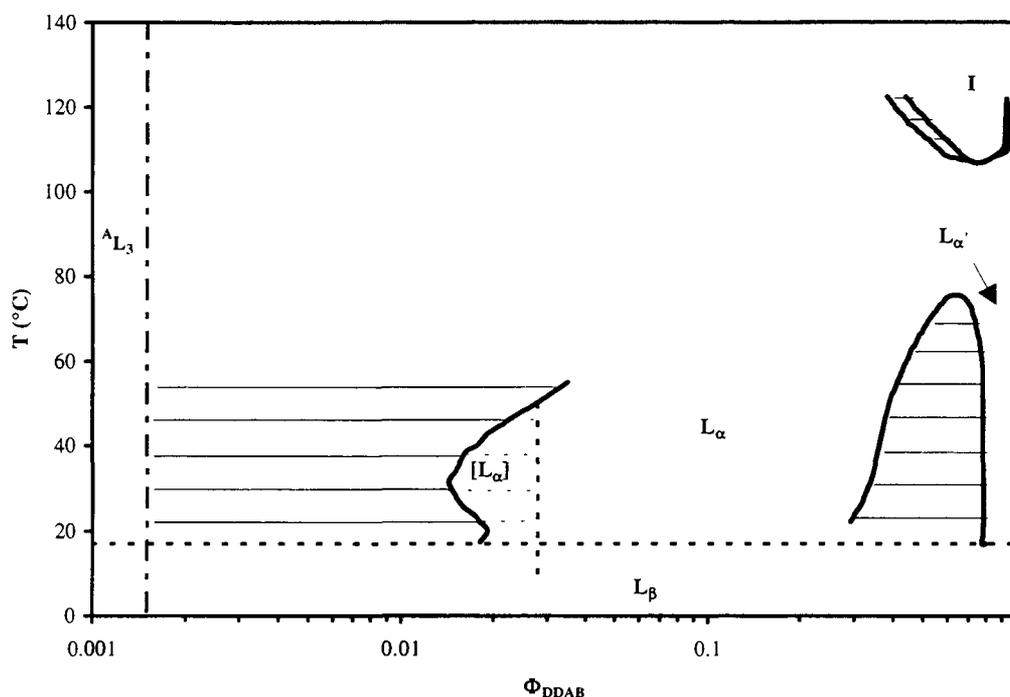


Figure II- 6 : Diagramme de phases du DDAB en fonction de la fraction de volume (portée en échelle logarithmique) et de la température, d'après [10].

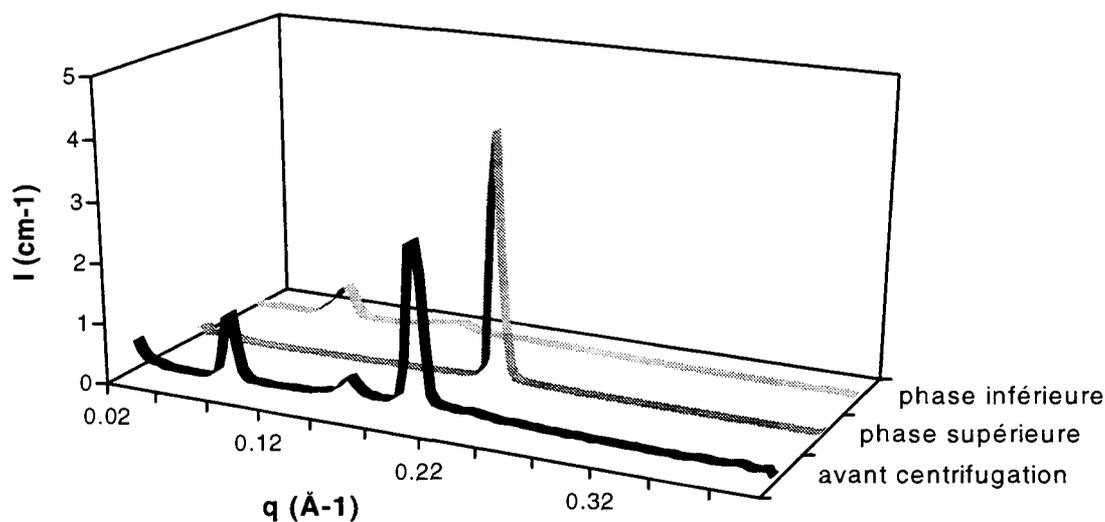


Figure II- 7 : Spectres de diffusion centrale de rayons X de DDAB à 50% en poids dans H_2O , avant et après centrifugation.

D'autre part, on remarque sur la Figure II- 6 qu'il existe un point critique en température ($T_c=76.2^\circ\text{C}$) entre ces deux phases lamellaires (cf. [11]). C'est-à-dire qu'au delà de la température critique on retrouve un domaine lamellaire monophasique. On prévoit que dans cette zone critique, le système va être très sensible aux additifs.

Dans la partie diluée du diagramme, on observe un gonflement maximum de la phase lamellaire pour 2.8% en poids de DDAB, ce qui correspond à un espace interlamellaire de plus de 1000Å. En présence d'excès d'eau, le système forme une phase notée $[L_\alpha]$, composée de cristallites de phase lamellaire gonflée au maximum en coexistence avec des domaines vésiculaires où l'eau est en excès. Il n'y a pas de séparation macroscopique même après centrifugation, seulement microscopique, c'est pourquoi les binodales sont tracées en pointillés dans cette région sur la Figure II- 6. Par contre entre 2.8 et 0.15%, la séparation est macroscopique (binodales tracées en trait plein).

Pour des concentrations inférieures à 0.15% et jusqu'à la c.m.c., des vésicules se forment spontanément dans ce système binaire chargé. La symétrie est brisée en raison de la forte concentration des contre-ions à l'intérieur des vésicules. La première preuve expérimentale a été apportée par Ninham et coll. en 1984 [12]. Le phénomène a été observé sur les sels d'ammonium quaternaire [13], avec des têtes carboxyliques [14] et généralisé aux systèmes ternaires dont l'un des deux composants de la membrane est chargé [15].

M. Dubois a également déterminé la pression osmotique en chaque point du diagramme binaire. Sur la Figure II- 8 nous avons tracé la variation de la pression en fonction de l'épaisseur d'eau interlamellaire. On se rend compte que ce système à l'avantage de présenter des structures lamellaires sur plusieurs décades de pressions. Cela justifie de l'avoir choisi comme hôte pour nos glycolipides. De plus il existe deux plateaux d'équilibre, correspondant à des transitions du 1^{er} ordre : le premier entre les phases L_α et L'_α a été interprété dans le chapitre I; le deuxième correspond à la zone de coexistence entre la phase lamellaire gonflée au maximum et les vésicules, c'est-à-dire lorsque la pression électrostatique entre les lamelles est du même ordre de grandeur que la pression osmotique imposée par les vésicules [16]. Là encore, on prévoit que la position de ce deuxième plateau, tout comme le premier, va être sensible à l'ajout d'additifs. L'étude détaillée de ce gonflement maximum sera le but du chapitre V.

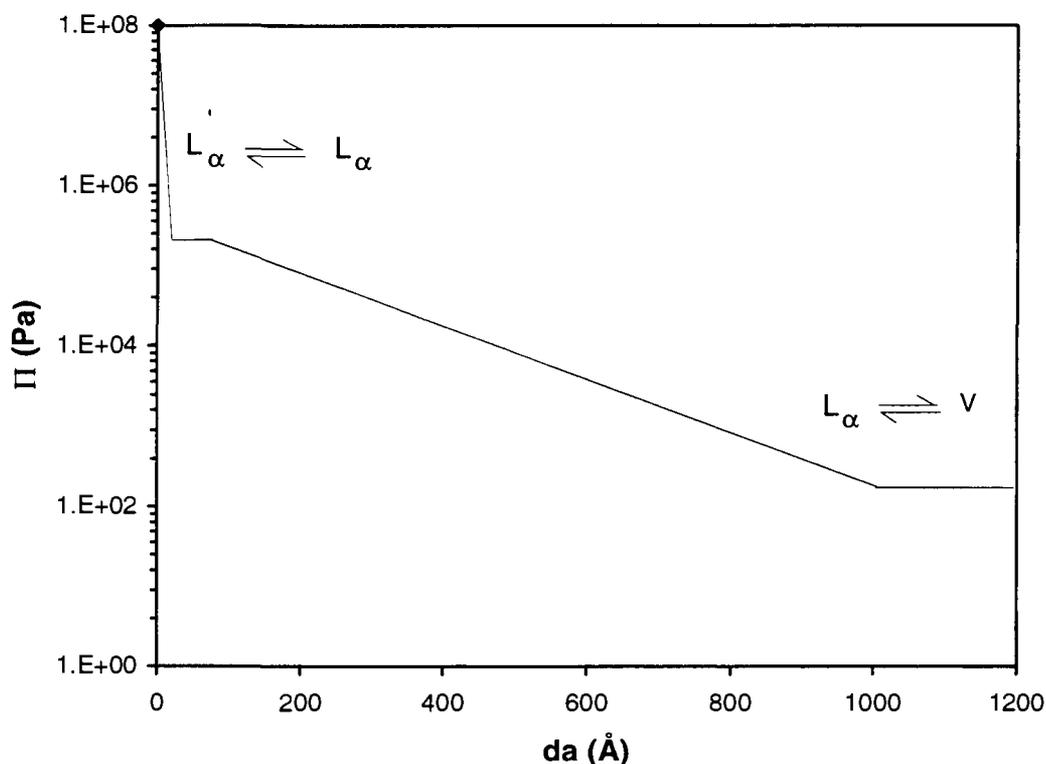


Figure II- 8 : Variation des phases de DDAB en fonction de la pression osmotique, d_a est l'épaisseur d'eau interlamellaire.

II.B.1.b. Diagramme de phases de la DMPC

La DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) est une lécithine de synthèse fréquemment utilisée comme modèle de lipides. Son diagramme de phases, reproduit sur la Figure II- 9, a été déterminé par Janiak il y a une quinzaine d'années [17].

La c.m.c. est très faible, 10^{-8} mol/l. Au-dessus de 23°C , les chaînes aliphatiques sont fluides et l'on a une phase L_α appelée cristalline liquide, d'après la nomenclature de Luzzati [18], par opposition aux phases gels P_β et L_β aux températures inférieures pour lesquelles les chaînes sont cristallisées. Au maximum, la phase L_α contient 40% d'eau c'est-à-dire présente un espace interlamellaire de 25.5Å . Au-delà de cette teneur en eau les échantillons sont biphasiques avec un excès d'eau en équilibre avec la phase L_α . En fait pour cette molécule zwitterionique, donc globalement non-chargée, il n'y a pas de force répulsive électrostatique à grande distance comme dans le cas précédent du DDAB. Au gonflement maximum de la DMPC l'interaction attractive de van der Waals compense juste la répulsion de courte portée et ainsi la pression osmotique totale

devient brusquement égale à zéro, c'est-à-dire égale à la pression osmotique de la phase d'eau en excès (cf. [19]). Sur la Figure II- 10 nous avons reproduit schématiquement la variation de la pression osmotique en fonction de l'épaisseur d'eau entre les bicouches, à partir des résultats de B. Demé [20].

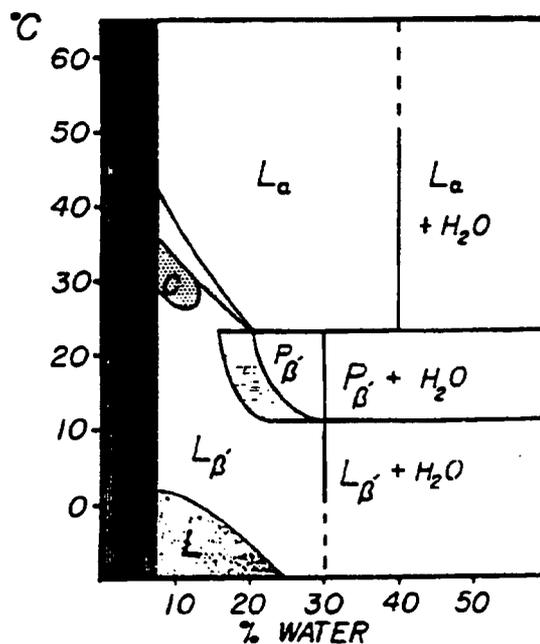


Figure II- 9 : Diagramme de phases de la DMPC en fonction de la composition et de la température, d'après Janiak [17].

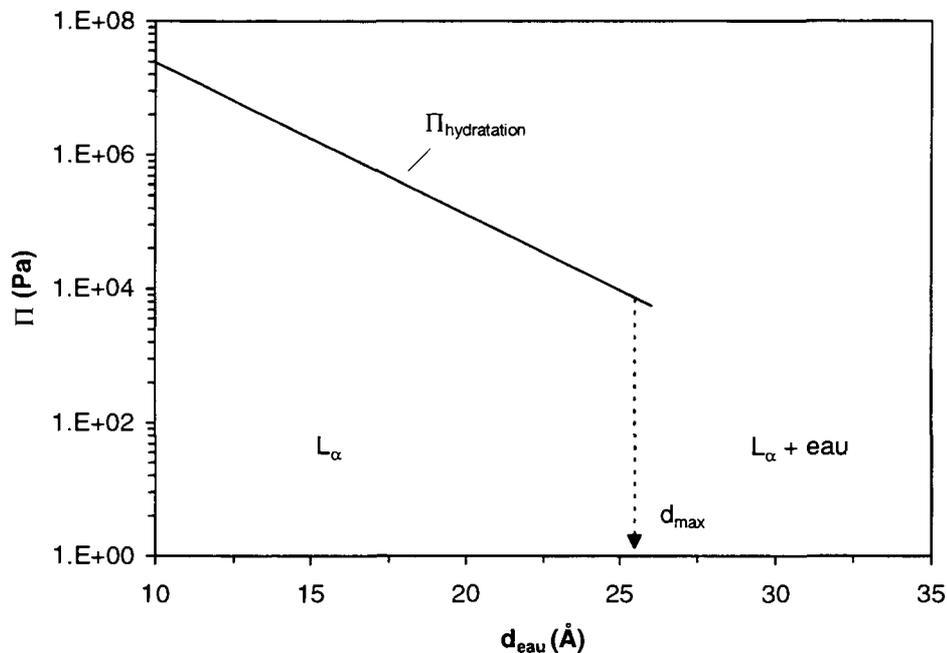


Figure II- 10 : Variation de la pression osmotique dans la phase lamellaire de DMPC en fonction de l'épaisseur d'eau, d'après [20]. Au-delà du gonflement maximum à 25.5Å, l'attraction de van der Waals domine la répulsion d'hydratation.

II.B.2. Diagrammes de phases binaires des glycolipides modèles utilisés

II.B.2.a. Diagramme de phases du 2-O Lauroylsaccharose

Au-delà de sa c.m.c., le 2-O Lauroylsaccharose $[(C_{13}H_{21}O_{12})(C_{11}H_{23})]$ (noté LS) forme en solution aqueuse des micelles légèrement allongées, dont nous précisons la structure au chapitre V. En régime concentré au-delà de 70% en poids, on observe une phase hexagonale, c'est-à-dire des micelles cylindriques infinies dans une direction, placées sur un réseau hexagonal. Le diagramme de phases est représenté schématiquement sur la Figure II- 11. Par rapport aux études faites sur d'autres tensioactifs monochânes à tête polaire sucre, comme les N-alkyl aminolactitol [21] ou l'octylglucoside [22], nous n'avons pas observé de phases cubiques entre la phase micellaire et la phase hexagonale ou au delà.

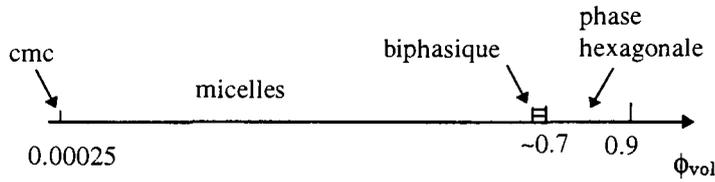


Figure II- 11 : Diagramme de phases schématisé du LS à température ambiante

Un spectre de diffusion de rayons X d'un échantillon à 80% est donné sur la Figure II- 12. On observe deux ordres de la structure hexagonale, avec le deuxième pic à $\sqrt{3} \times 1^{\text{er}}$ ordre, qui traduisent la réflexion sur les plans (10). Le paramètre de maille a est donné par la relation suivante :

$$D_{10} = \frac{2\pi}{q_{10}} = \frac{\sqrt{3}}{2} a \quad (\text{II- 7})$$

où D_{10} est la distance, dans l'espace réel, entre les plans (10). a vaut donc 41.5\AA . A partir de la fraction volumique apolaire de tensioactif et de ce paramètre de maille on peut calculer la surface s par tête polaire du LS dans la phase hexagonale en utilisant les relations géométriques suivantes :

$$\Phi_{\text{apol}} = \frac{\pi R^2}{\frac{\sqrt{3}a^2}{2}} \quad (\text{II- 8})$$

et

$$s \times c = \frac{2\pi R}{\frac{\sqrt{3}a^2}{2}} \quad (\text{II- 9})$$

avec R le rayon des cylindres apolaires et c la concentration en tensioactif. Nous trouvons $s=51.3\text{\AA}^2/\text{molécule}$ ce qui est plus faible que l'aire trouvée à l'interface air/eau (65\AA^2). Cette phase hexagonale disparaît au-dessus de 45°C .

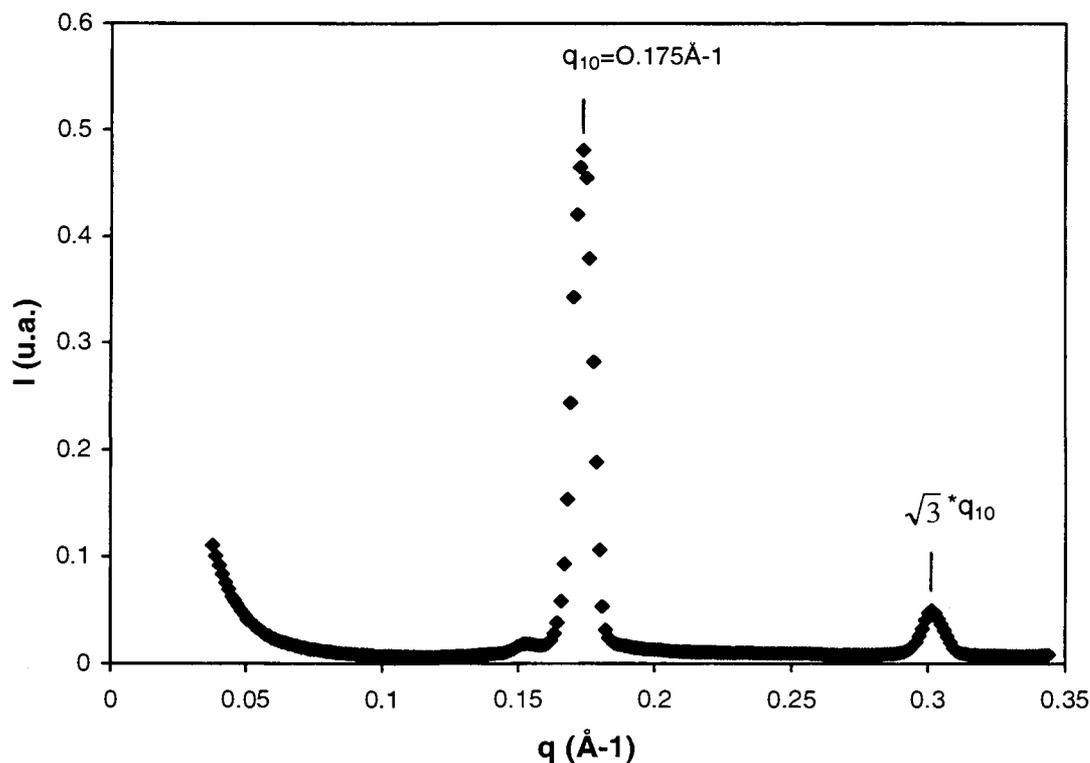


Figure II- 12 : Spectre de diffusion de rayons X d'un échantillon à 80% en poids de 2-O LauroylSaccharose, formant une phase hexagonale.

II.B.2.b. Diagramme de phases du N-lauroyl, N-nonyl lactitol

Le N-lauroyl, N-nonyl lactitol $[(C_{13}H_{23}O_{11}N)(C_{11}H_{23})(C_9H_{19})]$, que nous désignons aussi par $LC_{11}C_9$, est très peu soluble dans l'eau et son comportement est similaire à celui des phospholipides zwitterioniques. Il forme une phase lamellaire L_α qui gonfle très peu : 9.6Å d'eau au maximum entre les bicouches, c'est-à-dire 23% d'eau au total. Si on ajoute plus d'eau l'échantillon devient blanc, biphasique, avec de l'eau en excès. La valeur du gonflement maximum est insensible à une hausse de la température, du moins jusqu'à 65°C. Le diagramme binaire est représenté sur la Figure II- 13.

Par la mesure de la période de la phase lamellaire en fonction de la fraction volumique on en déduit une épaisseur de bicouche égale à $32.5 \pm 0.5 \text{Å}$.

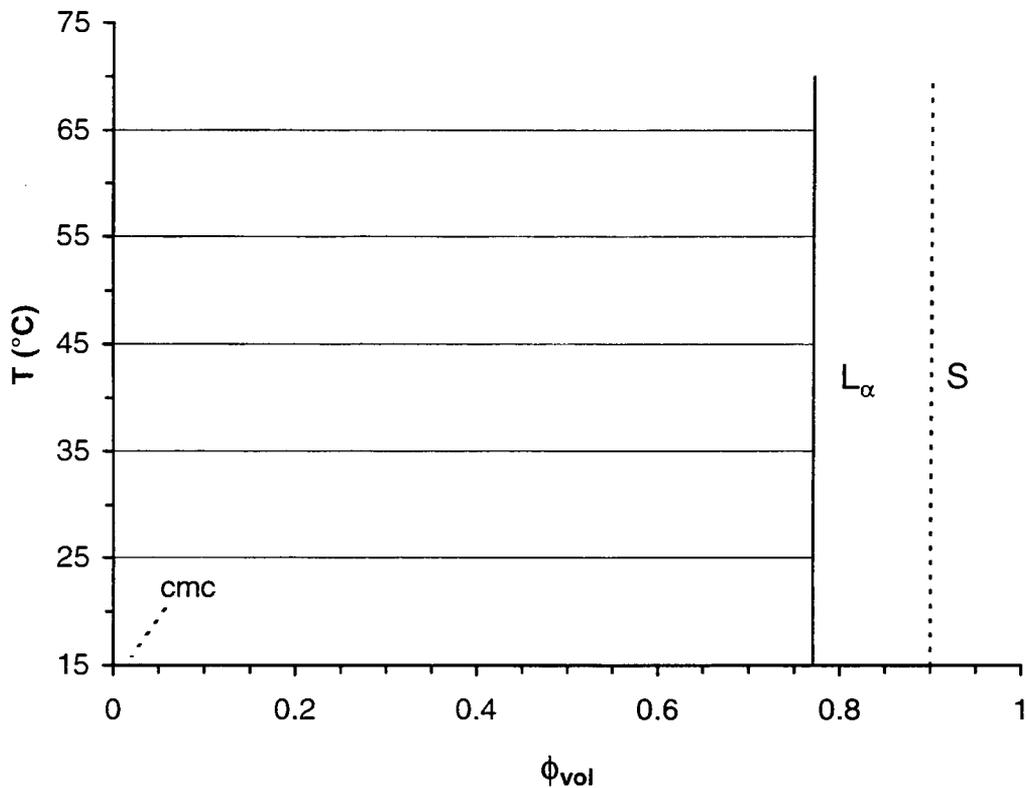


Figure II- 13 : Diagramme de phases du $LC_{11}C_9$ en fonction de la fraction volumique et de la température. La cmc est estimée à $10^{-8}M$, comme la DMPC.

II.C. Etude des têtes sucres seules

L'effet de l'ajout de petits carbohydrates dans une phase lamellaire a déjà été étudié dans le cas de la DMPC : LeNeveu et collaborateurs ont observé une augmentation puis une diminution du gonflement maximum, D_{max} , de la phase L_α en présence de glucose et de saccharose [19]. Ils ont interprété cette observation par une variation de la permittivité diélectrique du milieu aqueux en fonction de la concentration de sucre qui se répercute sur l'intensité de l'attraction de van der Waals via la constante de Hamaker (cf. chapitre I). En effet comme nous l'avons vu au paragraphe II.B.1.2 décrivant le comportement de la DMPC, au gonflement maximal, nous avons la relation :

$$\Pi_{hyd}(D_{max}) + \Pi_{vdw}(D_{max}) = 0 \quad (II- 10)$$

Donc toute variation de l'intensité de la force de van der Waals, se répercute sur la valeur de D_{max} .

Cependant récemment dans notre laboratoire, B. Demé a montré que la variation du gonflement maximum est en fait monotone, dans le sens d'une augmentation [20]. La différence entre les deux résultats serait due à une cinétique lente de la pénétration des sucres dans l'espace interlamellaire. Pour être sûr d'atteindre l'état d'équilibre du système, B. Demé a mis au point une méthode préparative qui fait d'abord passer le système dans une phase diluée de vésicules, avant d'être lyophilisé et remouillé avec la quantité d'eau nécessaire.

Dans le cas où la taille du sucre est inférieure à l'espace interlamellaire, B. Demé a toujours observé un gonflement de la phase lamellaire. Par contre si le sucre, de par sa taille, est exclu de la phase lamellaire alors il exerce une pression osmotique extérieure, Π_{ext} , qui comprime la phase L_{α} :

$$\Pi_{hyd}(D_{max}) + \Pi_{vdw}(D_{max}) = \Pi_{ext}(D_{max}) \quad (II- 11)$$

C'est d'ailleurs ce phénomène qui est à la base de la technique de stress osmotique dont nous reparlerons au chapitre IV.

En ce qui nous concerne, nous avons voulu étudier l'effet de l'ajout des mono- et disaccharides sur le diagramme de phase et les interactions du système chargé DDAB. Nous avons travaillé sur les molécules qui constituent les têtes polaires des glycolipides étudiés plus loin dans cette thèse, le saccharose et le lactitol, ainsi qu'avec le maltose, le glucose, qui est le carbohydrate le plus petit qui existe, et une série de dérivés de sucres qui se différencient par la configuration du carbone anomère et de l'un des carbones secondaires : α -D-glucoside de méthyle, α -D-mannoside de méthyle et β -D-galactoside de méthyl. Toutes ces molécules sont commerciales (Fluka). Elles sont représentées sur la Figure II- 14 et leurs grandeurs caractéristiques sont données dans le Tableau II-2.

Dans la partie qui suit, nous nous intéressons d'abord à localisation des sucres dans la phase lamellaire et à la question de savoir si les sucres s'adsorbent à la surface des bicouches, puis nous donnons les résultats de diffusion de rayons X dans le domaine biphasique L_{α} - L_{α}' et enfin des mesures de tonométrie.

	<i>Masse Moléculaire</i> <i>M (g/mol)</i>	<i>Densité</i> <i>(g/cm³)</i>	<i>Volume Moléculaire</i> <i>V (Å³)</i>	<i>Diamètre</i> <i>d (Å)</i>
Glucose	180	1.56	191	7.1
α -D-glucoside de méthyle	194	1.46	220	7.5
α -D-mannoside de méthyle	194	1.46	220	7.5
β -D-galactoside de méthyle	194	1.46	220	7.5
Saccharose	342	1.58	360	8.8
Lactitol	344	1.62	353	8.8
Maltose	342	1.58	360	8.8

Tableau II. 2 : Grandeurs caractéristiques des sucres étudiés. Les densités et volumes moléculaires sont tirés de [23] sauf pour le Lactitol où ils ont été mesurés au laboratoire par la technique décrite au paragraphe II.A.1.1. Le diamètre d est calculé en considérant la molécule sphérique.

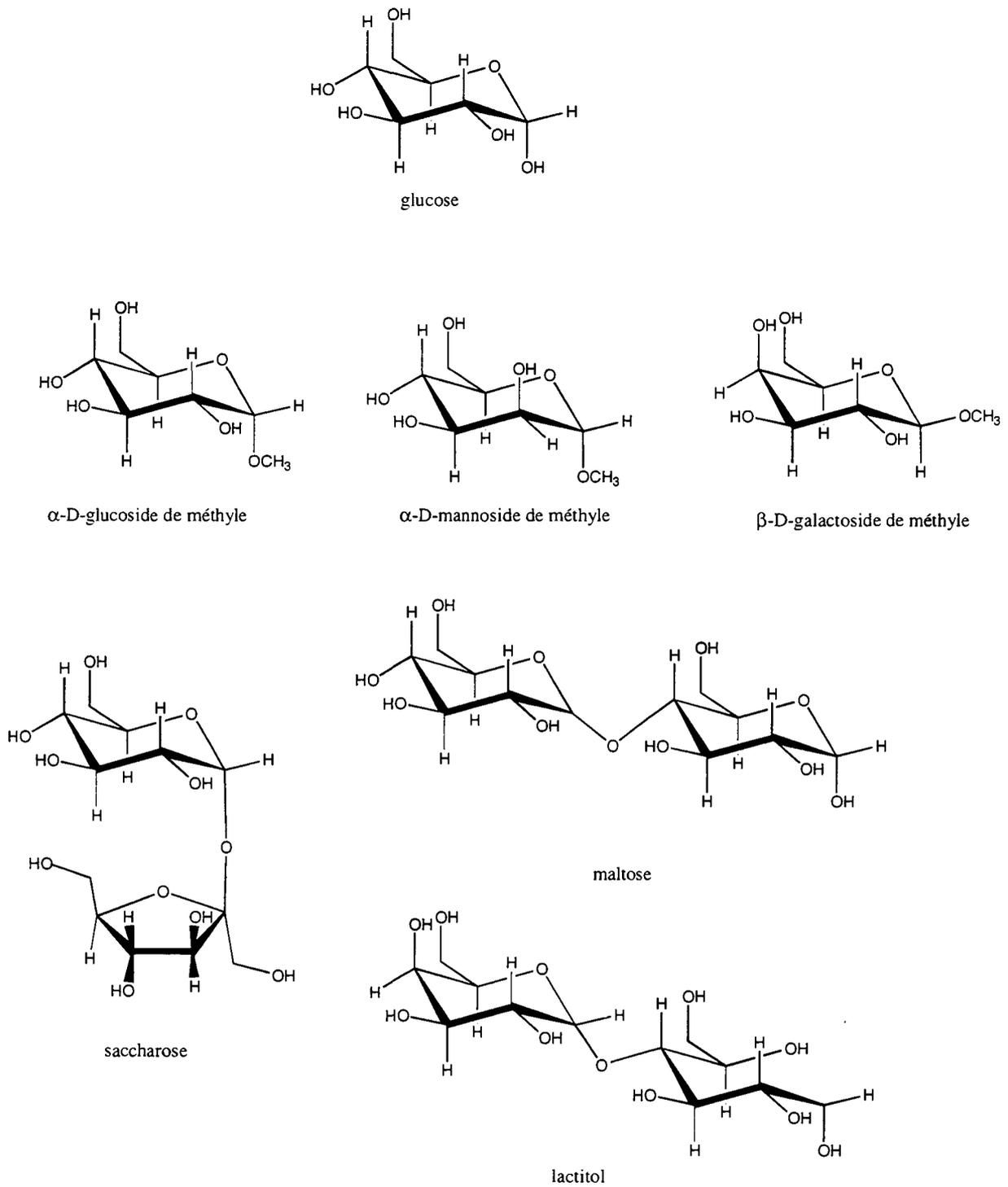


Figure II- 14 : Structure chimique des mono- et disaccharides étudiés.

II.C.1. Localisation des oligosaccharides dans la phase lamellaire: étude par variation de contraste

Pour déterminer si les sucres pouvaient s'adsorber en partie sur la surface des bicouches comme illustré sur la Figure II- 15, nous avons imaginé une méthode originale de variation de contraste en diffusion de neutrons aux petits angles.

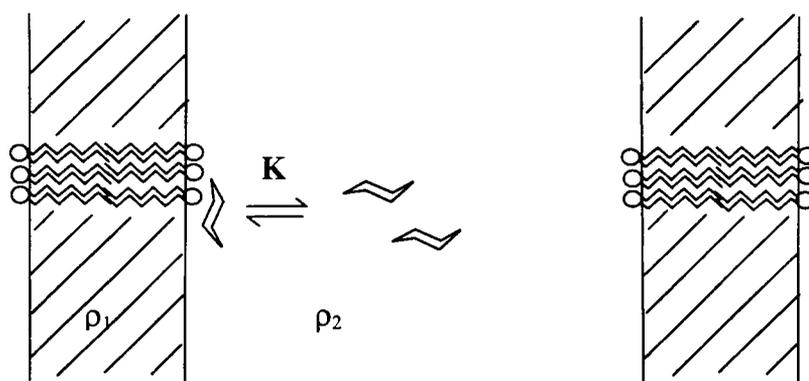


Figure II- 15 : Structure schématique de la phase lamellaire en présence de sucre : K est la constante d'équilibre entre la solution et l'interface, ρ_1 et ρ_2 sont les densités moyennes de diffusion respectivement de la bicouche et de la solution.

II.C.1.a. Méthode expérimentale

Le principe de la méthode repose sur le fait que l'intensité de neutrons diffusée par l'échantillon, intégrée sur le premier pic de Bragg, dépend du contraste entre les bicouches et le solvant :

$$I(q) = \Phi \cdot V \cdot (\rho_1 - \rho_2)^2 \quad (\text{II- 12})$$

avec Φ la fraction volumique d'objet diffusant, V le volume moléculaire d'objet diffusant et ρ_1 et ρ_2 sont les densités de diffusion respectivement de l'objet diffusant et du solvant.

Dans notre cas ρ_1 et ρ_2 sont les densités moyennes de diffusion respectivement de la bicouche et de la solution et dépendent de la composition interfaciale λ :

$$\lambda = n_s^{ads} / n_{dub}^0 \quad (\text{II- 13})$$

où n_s^{ads} est le nombre de molécules de sucre adsorbées sur la bicouche et n_{ddab}^0 le nombre de molécules de DDAB dans l'échantillon. Le contraste s'exprime alors en fonction de quatre grandeurs physiques :

$$\rho_1 - \rho_2 = f(\lambda, \Phi_{ddab}, \Phi_s, \Psi_{D_2O/H_2O}) \quad (\text{II- 14})$$

avec Φ_{ddab} la fraction volumique de DDAB, Φ_s la fraction volumique de sucre et Ψ_{D_2O/H_2O} la fraction volumique d'eau lourde dans l'eau. L'expression exacte de f est donnée dans [24], placé en Annexe 1. A λ fixé il est possible de calculer la variation du contraste en fonction de Ψ_{D_2O/H_2O} et donc de prédire la variation de l'intensité du pic de Bragg en fonction de la composition isotopique de l'eau. Notamment il est possible de prédire, suivant λ , la valeur de Ψ_{D_2O/H_2O} qui annule la contraste.

II.C.1.b. Résultats

Les expériences ont été réalisées au Laboratoire Léon Brillouin sur le spectromètre PAXE (longueur d'onde = 7Å, détecteur à 5m). Nous avons étudié des échantillons préparés avec 5% en volume de DDAB, 10% de lactitol et complétés par de l'eau à différents rapport D₂O/H₂O.

La Figure II- 16 rappelle les résultats obtenus pour du DDAB pur [25] : l'intensité du pic de Bragg s'annule pour une fraction d'eau lourde de 4.3%. La Figure II- 17 donne les résultats obtenus en présence de lactitol. L'intensité s'annule pour 2.3% d'eau lourde et les points expérimentaux s'alignent sur la courbe calculée en considérant que tout le sucre reste en solution. En effet comme le montrent les deux autres courbes tracées sur cette figure, si le sucre s'adsorbait à l'interface alors l'annulation du contraste serait décalée vers des fractions de D₂O plus grandes : 15% si 50% du sucre s'adsorbe, 22% si tout le sucre est adsorbé.

Ainsi cette expérience de variation de contraste du solvant nous a donné la preuve que les molécules de sucres ajoutées à la phase lamellaire de DDAB, restent libres dans la phase aqueuse et ne se lient pas à la surface des bicouches.

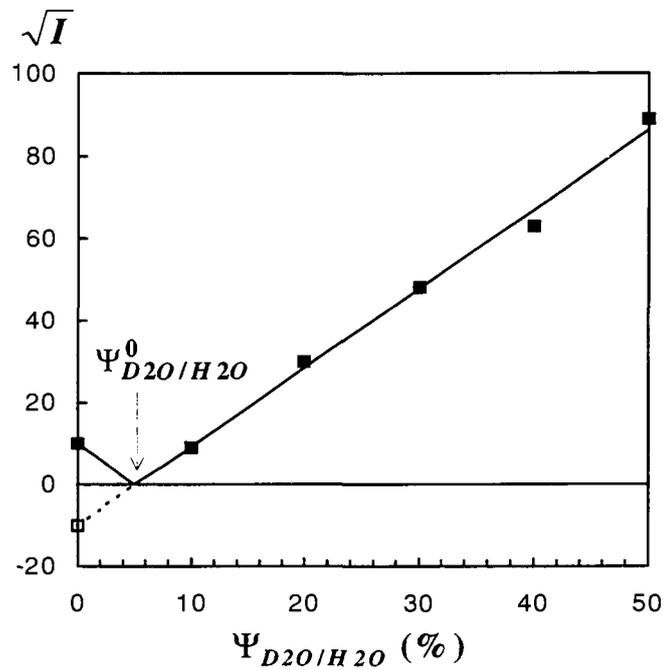


Figure II- 16 : Expérience de variation de contraste avec du DDAB 10% dans l'eau [25]. Les carrés sont les points expérimentaux et la ligne la meilleure approximation linéaire. Le dernier point dans H_2O pur est porté négativement pour faciliter la lecture. Le contraste est trouvé nul pour $\Psi_{D_2O/H_2O} = 4.3\%$

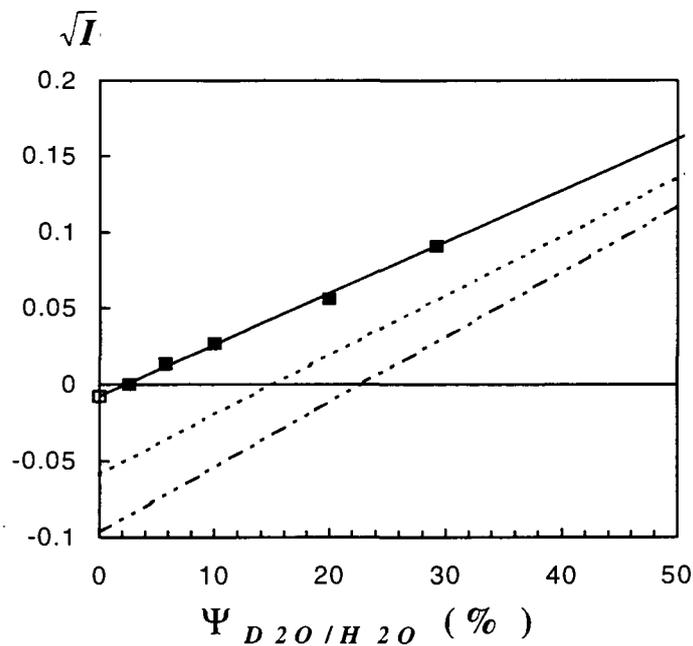


Figure II- 17 : Racine carrée de l'intensité diffusée en fonction de la fraction volumique d'eau lourde dans l'eau pour les échantillons de DDAB 5% + lactitol 10%. Les carrés sont les points expérimentaux Le dernier point dans H_2O pur est porté négativement pour faciliter la lecture. La ligne continue est la meilleure approximation linéaire et aussi la prédiction numérique obtenue avec 0% de sucre adsorbé; (---) avec 50% adsorbé et (-.-.-) avec 100%.

II.C.2. Diffusion centrale de rayons X sur l'équilibre L_α - L_α' du DDAB en présence de sucres

Nous avons préparé des séries d'échantillons dans le domaine de coexistence des phases L_α et L_α' en faisant varier la concentration en sucre dans l'eau et la nature du sucre. Pour exemple nous donnons sur la Figure II- 18 les spectres de diffusion centrale de rayons X avec le lactitol. Nous remarquons que par rapport à l'échantillon de DDAB pur, plus la concentration de sucre augmente plus la période de la phase L_α augmente, alors que la phase L_α' reste quasi-inchangée. Pour l'échantillon à 40% en lactitol, le pic de Bragg sort même de la gamme de vecteur d'onde étudiée.

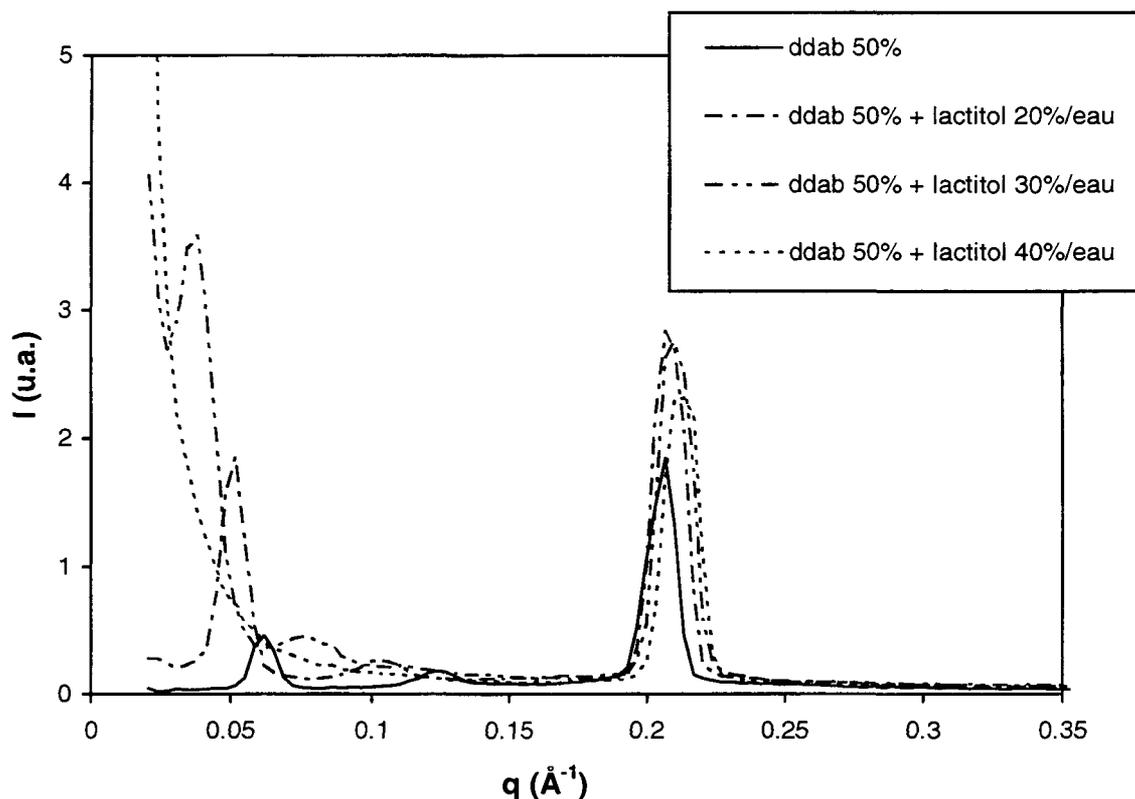


Figure II- 18 : Spectres de diffusion centrale de rayons X d'échantillons de DDAB à 50% dans des solutions de D₂O + lactitol.

Sur la Figure II- 19 nous avons regroupé les résultats obtenus avec tous les sucres en portant les périodes smectiques en fonction de la concentration initiale de sucre dans l'eau. Plusieurs remarques s'imposent : d'abord le glucose est le seul sucre qui ne modifie pas les périodes des deux phases en équilibre. Ensuite suivant les sucres, à

concentration molaire égales il y a des disparités. Notamment le lactitol est le sucre qui donne le plus grand gonflement de la phase L_α .

De manière à pouvoir interpréter ces observations nous avons réalisé des expériences de tension de vapeur, décrites dans le paragraphe suivant, pour essayer de mesurer la pression osmotique des échantillons ainsi que les volumes d'interactions des différents sucres.

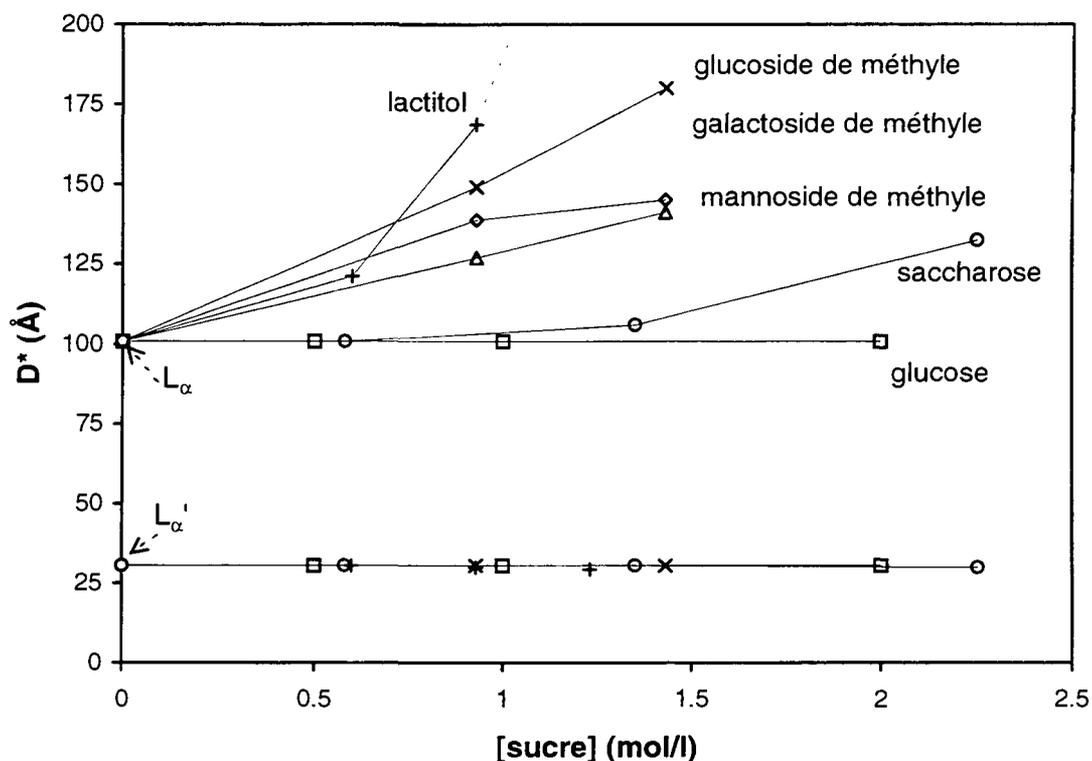


Figure II- 19 : Périodes smectiques des phases L_α et L_α' de DDAB en présence de sucres (les échantillons ont été préparés dans D_2O).

II.C.3. Mesures de tonométrie

II.C.3.a. Principe de la mesure

L'appareil utilisé est un osmomètre à tension de vapeur. Il possède deux thermistances, plongées dans une cellule de mesure où un peu de solvant se trouve à une tension de vapeur constante P_0 . A l'aide de seringues on dépose une goutte de solvant sur chacune des thermistances. Puis on remplace une des gouttes par une goutte de solution. D'après la loi de Raoult, les solutions de solutés ont une tension de vapeur plus faible que celle du solvant pur. Donc pour compenser cet effet une quantité de

solvant va se condenser sur la goutte, jusqu'à ce que, par la chaleur dégagée par cette condensation, la température de la goutte atteigne la valeur qui redonne P_0 . C'est cette différence de température entre les gouttes, c'est-à-dire entre les thermistances, que l'on mesure avec un pont de Wheatstone.

Grâce à une calibration avec des solutions étalons, on détermine la relation linéaire qui existe entre cette déviation en température et l'osmolalité de la solution. Le calcul final de la pression se fait à partir de la loi de Van't Hoff :

$$\Pi = c_{os} \cdot R \cdot T \quad (\text{II- 15})$$

Généralement cette technique est utilisée avec des solvant organiques, volatiles, pour la détermination de masses moléculaires.

Par ces mesures de pressions osmotiques, on peut également déduire le volume moléculaire, ou plutôt le volume d'interaction. En effet pour les solutions non idéales on peut développer l'équation des gaz parfait de la manière suivante :

$$\frac{\Pi}{ckT} = \frac{1}{M} + \left(\frac{A_2}{M^2} \right) c + \dots \quad (\text{II- 16})$$

avec c la concentration du soluté (g/l), M la masse moléculaire (kg) et A_2 le second coefficient du Viriel qui est proportionnel au volume exclu v de la molécule. On peut montrer que $A_2=4v$. Donc si on trace Π/ckT en fonction de c , par l'ordonnée à l'origine on déduit M et par la pente v .

L'expression précédente n'est valable que pour les concentrations faibles. Pour les concentrations élevées, toujours dans l'hypothèse de sphère dures, il existe une formule empirique, de Carnahan-Starling [26] :

$$\frac{\Pi}{ckT} = \frac{1 + \phi + \phi^2 - \phi^3}{(1 - \phi)^3} \quad (\text{II- 17})$$

avec ϕ la fraction volumique.

II.C.3.b. Résultats

Les mesures ont été faites sur un tensiomètre à tension de vapeur Knauer, à l'I.F.P. à Rueil-Malmaison et au Collège de France dans le laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires. Nous avons travaillé à 37°C pour avoir une vapeur d'eau suffisante. La calibration a été faite avec des solutions de NaCl et de Saccharose en utilisant les tables d'osmolalité connues [23].

Nous avons d'abord étudié les solutions aqueuses de sucres pour essayer de retrouver les différences de comportements observées au paragraphe II.C.2. Les résultats sont donnés sur la Figure II- 20 où Π/ckT est tracé en fonction de la concentration c en sucre. On remarque surtout la différence entre les sucres à un cycle - glucose, glucoside, mannoside et galactoside- et ceux à deux cycles - saccharose, maltose, lactitol. Par contre il est difficile de voir une différence dans chacune des familles du fait des barres d'erreurs. Les calculs de la masse et du volume moléculaires par le développement du Viriel sont donnés dans le Tableau II. 3 et on trouve un très bon accord avec les valeurs connues. Nous avons également tracé en pointillé les courbes théoriques calculées à partir de la formule de Carnahan-Starling (II-17) et de la masse moléculaire déterminée par le développement du Viriel : on remarque que les points expérimentaux se trouvent toujours sous ces courbes.

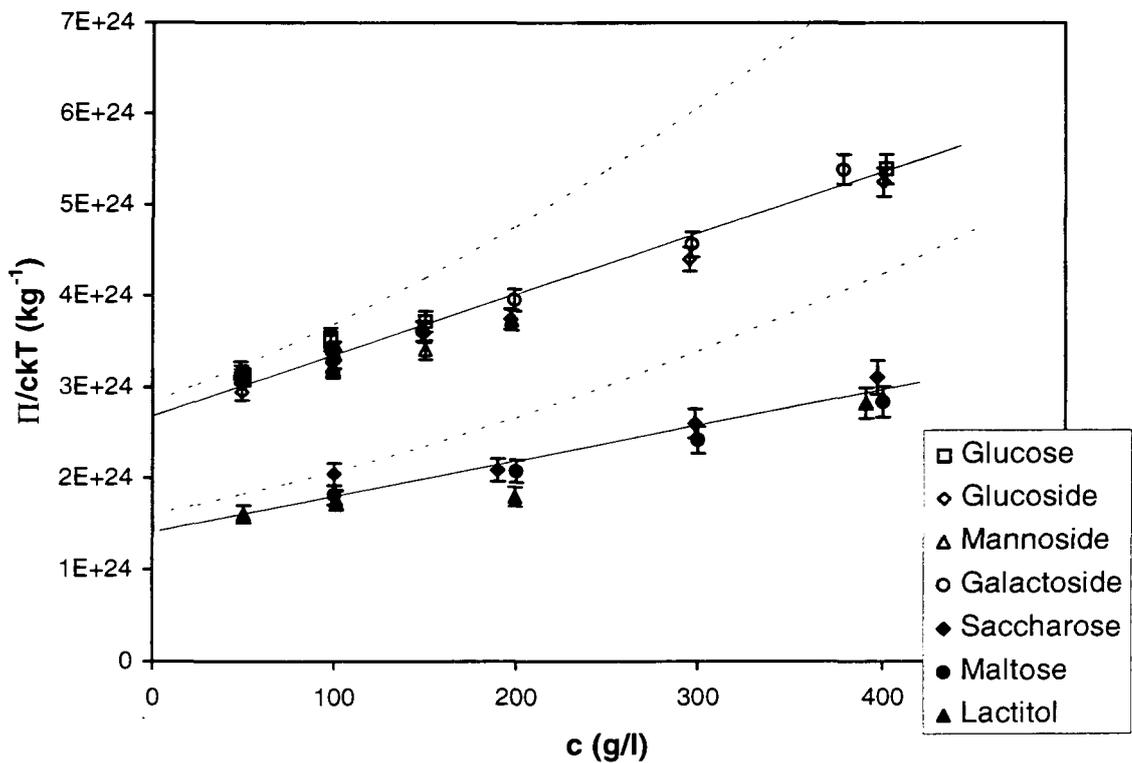


Figure II- 20 : Résultats de tension de vapeur des solutions aqueuses de sucres.

	Masse Moléculaire M (g/mol)		Volume Moléculaire V (Å ³)	
	Tables	Mesure osmotique	Tables	Mesure osmotique
Glucose	180	212	191	197
α-D-glucoside de méthyle	194	228	220	225
α-D-mannoside de méthyle	194	209	220	117
β-D-galactoside de méthyle	194	225	220	235
Saccharose	342	360	360	310
Lactitol	344	376	353	342
Maltose	342	404	360	345

Tableau II. 3 : Comparaison des masses et volumes moléculaires des sucres donnés dans [23] et mesurés par tension de vapeur.

Nous avons également mesuré la pression de quelques échantillons lamellaires. Les échantillons étant visqueux et pauvres en eau, les retours à l'équilibre thermique ont été plus longs et les réponses parfois trop faibles ou peu fiables. Les résultats que nous avons gardés sont donnés dans le Tableau II. 4. On remarque que le DDAB pur a une pression osmotique beaucoup plus faible que lorsque l'on a ajouté du sucre en solution et qu'en fait la pression avec le sucre est quasiment égale à celle de la solution équivalente de sucre dans l'eau. Ceci est très bien vérifié pour le maltose, moins bien pour le glucose. C'est donc le sucre dans l'espace interlamellaire qui donne le terme dominant de la pression totale.

<i>fraction massique de sucre dans l'eau</i>	0%	10%	20%	30%	40%
DDAB pur 50%	1.43				
maltose dans l'eau		7.74	17.8	31.1	48.64
maltose avec DDAB 50%			17.8		
glucose dans l'eau		15.92	35.85		
glucose avec DDAB 50%			18.45		

Tableau II. 4 : Mesures des pressions osmotiques ($\times 10^{-5}$ Pa) des échantillons lamellaires de DDAB en présence de sucres.

II.C.4. Interprétation de l'effet des sucres sur l'équilibre L_α - L_α' du DDAB

Nous avons observé que les sucres augmentent le trou de miscibilité entre les phases L_α et L_α' . Seul un sucre fait exception et ne donne aucun effet, le glucose; c'est aussi le sucre le plus petit. Comme l'espace interlamellaire maximal de la phase collapsée L_α' est de 7.8Å [10] c'est-à-dire juste de l'ordre de grandeur de sa taille caractéristique, on peut penser que le glucose est le seul sucre qui arrive à pénétrer dans la phase collapsée. Par contre les autres sucres, légèrement plus gros, notamment si on tient compte du volume de l'eau d'hydratation, doivent être exclus. (Des dosages resteraient à faire pour confirmer cette hypothèse). Les sucres imposent alors une force de compression ou de déplétion comme B. Demé a pu l'observer dans le cas de dérivés de maltose avec la DMPC [20].

En effet si l'on considère un système composé de deux populations de sphères dures de diamètres différents σ_1 et σ_2 , on peut montrer [27] que les petites billes exercent sur les grosses billes une force attractive dite de déplétion dont l'allure est donnée sur la Figure II. 21. En utilisant l'approximation de Derjaguin [28], on revient à notre cas de bicouches planes infinies en présence de petites billes (les sucres), en sachant que l'énergie entre les bicouches vaut : $E = 2F_{sp} / \pi\sigma_1$ et que la pression est égale à l'opposée de la dérivée de cette énergie. D'où

$$\begin{array}{ll} \text{si } \sigma_1 < D < \sigma_1 + \sigma_2 \text{ alors} & \Pi_{\text{sucres}} = -\rho_{\text{sucres}} \cdot kT \\ \text{sinon} & \Pi_{\text{sucres}} = 0 \end{array}$$

avec D la période lamellaire, ρ_{sucres} la concentration en sucre. C'est-à-dire que la pression de déplétion est égale à la pression "gaz parfait" du sucre, avec une portée égale à la taille caractéristique du sucre. Aux concentrations auxquelles nous travaillons, de l'ordre de 1mol/l, on trouve que $\Pi_{\text{sucres}} \sim 2.5 \times 10^6 \text{Pa}$.

La situation est en fait analogue au cas des phases lamellaires à "solvant dopé" définies par F. Nallet et coll. et décrites pour des suspensions colloïdales de ferrosmectiques incluses dans une structure lamellaire [29]. De même, récemment, pour des polymères non-adsorbants incorporés dans des phases lamellaires, Ligoure et coll. ont trouvé que les polymères induisent une interaction attractive sur les bicouches qui dépend du régime de confinement du polymère, et qui peut induire une séparation de phases lamellaire-lamellaire [30]. Cette interaction, qu'ils calculent en terme de module de compression B , est équivalente à la pression de déplétion que nous introduisons dans notre système sucre/DDAB.

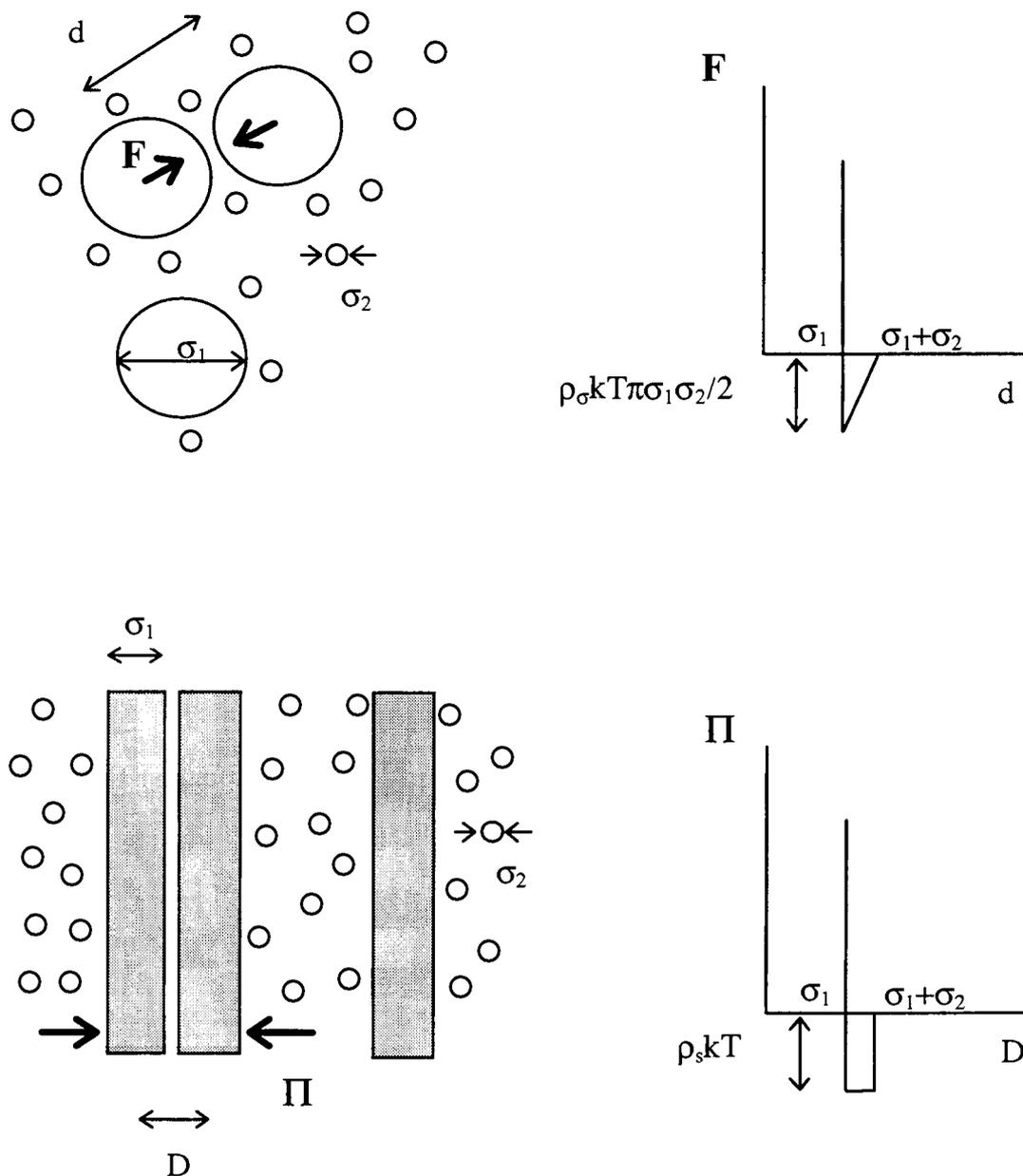


Figure II- 21 : Illustration de la force de déplétion dans le cas de sphères dures et de bicouches + sphères.

Dans le bilan des forces du DDAB pur, détaillé dans le chapitre I, cette force attractive supplémentaire n'est pas donc pas négligeable. Nous pouvons la modéliser par une force exponentielle de pression au contact $-\rho_{sucre} \cdot kT$ et de portée σ_2 . Sur la Figure II- 22 nous avons tracé en même temps que cette force, les forces d'hydratation, électrostatique (à équilibre constant) et de van der Waals (origine à 26.4\AA et $A = 8.3 \times 10^{-21} \text{ J} = 2kT$), déterminées pour le DDAB dans le chapitre I.

La présence des sucres dans la solution aqueuse modifie a priori la permittivité diélectrique ϵ . D'après le chapitre I, la différence de ϵ entre la solution aqueuse et la bicouche intervient au carré dans le calcul de la constante de Hamaker. Si on écrit $\epsilon_a \rightarrow \epsilon_{a+s} = \epsilon_a + \delta$ alors on a

$$A_{v=0} = \frac{3}{4} kT \left(\frac{\epsilon_{a+s} - \epsilon_h}{\epsilon_{a+s} + \epsilon_h} \right)^2 \text{ et } A_{v>0} = \frac{3h}{4\pi} \int_{v_1}^{\infty} d\xi \left(\frac{(\epsilon_a + \delta) - \epsilon_h}{\epsilon_a + \delta + \epsilon_h} \right)^2 \quad (\text{II- 18})$$

et en faisant un développement limité

$$A_{v>0} \approx \frac{3h}{4\pi} \int_{v_1}^{\infty} d\xi \left(\frac{\epsilon_a - \epsilon_h}{\epsilon_a + \epsilon_h} \right)^2 + \frac{3h}{4\pi} \int_{v_1}^{\infty} d\xi \frac{2\delta(\epsilon_a - \epsilon_h)}{(\epsilon_a + \epsilon_h)^2} \quad (\text{II- 19})$$

Le premier terme redonne la contribution sans sucre ajouté. D'après l'équation (I-5) du

chapitre I, on peut écrire $\delta = \frac{n_s^2 - n_a^2}{1 + \frac{\xi^2}{\omega_e^2}}$ d'où :

$$\frac{3h\omega_e}{8\pi\sqrt{2}} \frac{(n_s^2 - n_a^2)(n_a^2 - n_h^2)}{(n_a^2 + n_h^2)^3} \approx -0.683 \times 10^{-21} (n_s^2 - n_a^2) \text{ en J} \quad (\text{II- 20})$$

Les indices optiques des solutions de sucres ont été mesurées sur un réfractomètre :

concentration Maltose (% en poids)	0%	10%	20%	30%	40%
n_s	1.333	1.347	1.362	1.393	1.42
ϵ	78.5	76.2	73.7	70.9	67.7

Tableau I. 5 : Valeurs de l'indice optique des solutions aqueuses contenant du sucre, mesurées avec un réfractomètre, et de la permittivité diélectrique [31].

La fin du calcul montre que les termes correctifs, qui d'ailleurs seraient les mêmes pour le glucose et le maltose, n'induisent en fait qu'une variation inférieure au pourcent sur la valeur de la constante de Hamaker, et nous les avons donc négligés.

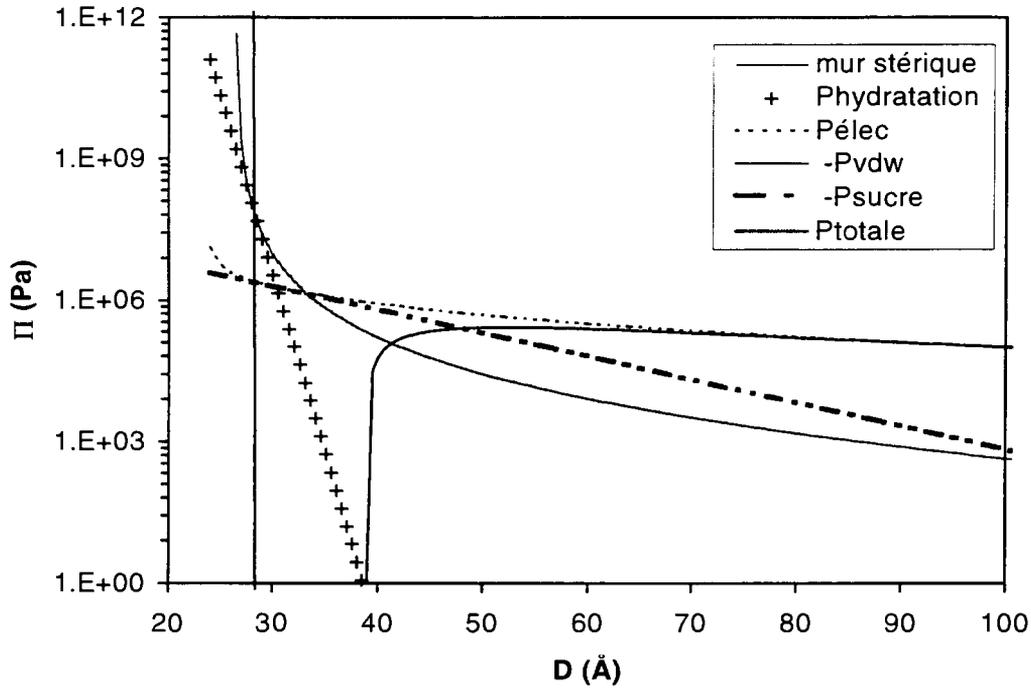


Figure II- 22 : Bilan des forces dans le cas des bicouches de DDAB en présence de sucres exclus de la phase L_{α}' .

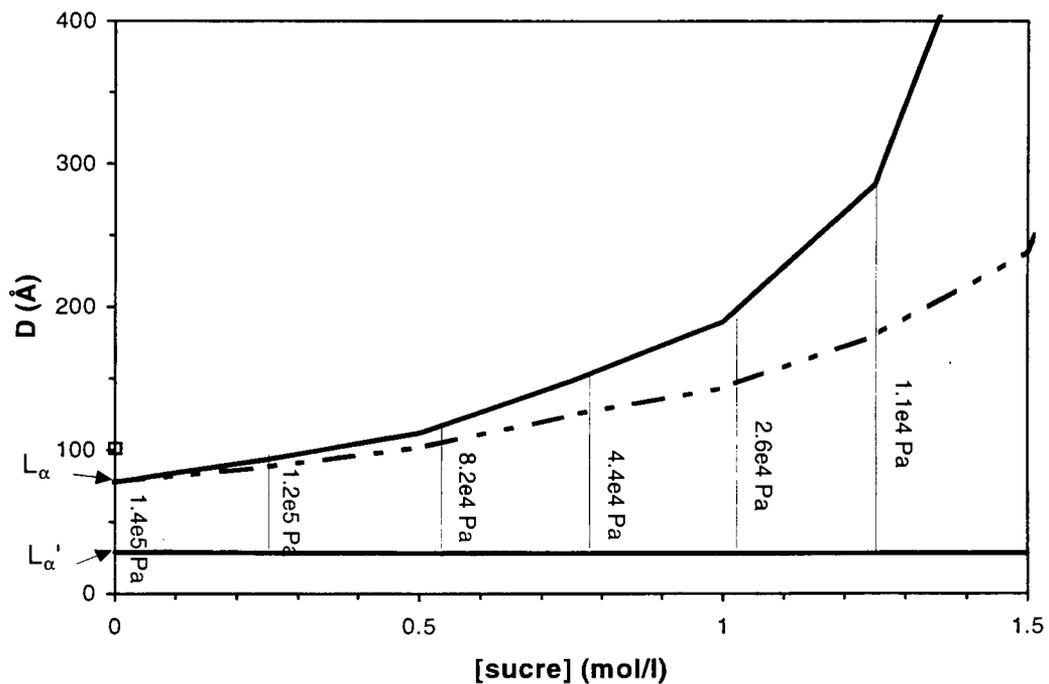


Figure II- 23 : Prédiction théorique, par construction de Maxwell sur la pression, de l'ouverture du trou de miscibilité $L_{\alpha}-L_{\alpha}'$ du DDAB en présence de sucres exclus de la phase L_{α}' . La force de déplétion induite est modélisée par une exponentielle comme décrit dans le texte. En trait plein et pour les valeurs de la pression d'équilibre, nous avons utilisé un diamètre de 8.8\AA et en pointillés un diamètre de 7.5\AA .

En utilisant la construction de Maxwell sur la pression totale, il est possible de déterminer la pression du plateau et les périodes des phases lamellaires à l'équilibre en fonction de la concentration de sucre ajouté (cf. Chapitre I). Sur la Figure II- 23 nous avons tracé les valeurs obtenues, avec $\sigma_2=7.5$ et 8.8\AA , diamètres respectivement des dérivés de glucose et des disaccharides, considérés comme des sphères dures. Nous remarquons que l'allure de la variation des périodes est tout à fait analogue aux résultats expérimentaux de la Figure II- 19 : il y a un décalage d'une dizaine d'Angstroems sur la période de la L_α , car les expériences ont été faites dans D_2O , alors que les calculs sont dans H_2O , mais on retrouve que le trou de miscibilité entre les deux phases lamellaires augmente quand on ajoute du sucre, et que les sucres plus petits, comme les dérivés de glucose, ont un effet plus faible.

On note aussi que ce modèle prédit que la pression du plateau d'équilibre, celle que l'on mesurerait avec des membranes perméables aux sucres et imperméable au DDAB, diminue en ajoutant du sucre, ce qui serait intéressant à vérifier expérimentalement.

Cependant ce modèle n'explique pas pourquoi il y a des différences entre les sucres de tailles a priori identiques et pourquoi le saccharose, pourtant beaucoup plus gros que les dérivés méthylés, a un effet moins important. Evidemment nous avons beaucoup simplifié le problème en considérant les sucres comme des sphères dures sans tenir compte de la géométrie réelle des molécules et de leur conformation. Malheureusement les mesures de volumes exclus par tonométrie ne sont pas assez précises pour évaluer directement σ_2 .

Dans la suite de cette thèse nous allons maintenant étudier l'effet des glycolipides sur les phases lamellaires, c'est-à-dire des sucres ancrés à la surface des bicouches et non plus libres en solution.

Références

- [1] Chauvin C., Baczko K. and Plusquellec D. *J. Org. Chem.* **58** (1993) 2291-2295
- [2] Rico-Lattes I. Garrigues J-C., Perez E., André-Barrès C., Madelaine-Dupuich C., Lattes A., Linas M-D., and Aubertin A-M. *New J. Chem.* **19** (1995) 341-344; André-Barrès C., Madelaine-Dupuich C., Rico-Lattes I. *New J. Chem.* **19** (1995) 345-347
- [3] Tanford C. *J. Phys. Chem.* **76** (1972) 3020
- [4] Bergeron V. *à paraître dans Langmuir*; Simister E. A., Thomas R. K., Penfold J., Aveyard R., Binks B. P., Cooper P., Fletcher P. D. I., Lu J. R. and Sokolowski A. *J. Phys. Chem.* **96** (1992) 1383-1388
- [5] Demé B. *Thèse de doctorat* Université Paris-Sud (1995)
- [6] Israelachvili J. N., Mitchell D. J. and Ninham B. W. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **72** (1976) 1525-1568
- [7] Hyde S. T. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **103** (1995) 227-247
- [8] Fontell K., Ceglie A., Lindman B. and Ninham B.W. *Acta Chem. Scan.* **A40** (1986), 247-256
- [9] Dubois M. and Zemb Th *Langmuir* **7** (1991) 1352-1360
- [10] Dubois M. résultats à paraître
- [11] Zemb Th., Gazeau D., Dubois M. and Gulik-Krzywicki T. *Europhys. Lett.* **21** (1993) 759-766
- [12] Brady J. E., Evans D. F., Kachar B. and Ninham B. W. *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 4279-4280
- [13] Radlinska E. Z., Ninham B. W., Dalbiez J-P. and Zemb T. *Colloids and Surfaces* **46** (1990) 213-230; Radlinska E. Z., Zemb T., Dalbiez J-P. and Ninham B. W *Langmuir* **9** (1993) 2844-2850
- [14] Cantù L., Corti M., Musolino M. and Salina P. *Europhys. Lett.* **13** (1990) 561; Cantù L., Corti M., Del Favero E. and Raudino A. *J. Phys. II France* **4** (1994) 1585-1604
- [15] Oberdisse J. and Porte G. *à paraître*
- [16] Zemb T., Dubois M., Belloni L. and Marcelja S. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **89** (1992) 33
- [17] Janiak M. J., Small D. M. and Shipley G. G. *J. Biol. Chem.* **254** (1979) 6068
- [18] Luzzati V. in *Biological Membranes*, ed by D. Chapman, Academic Press, London (1968)

- [19] LeNeveu D. M., Rand R.P., Parsegian V.A. and Gingell D. *Biophys. J.* **18** (1976) 209-230
- [20] Demé B., Dubois M., Zemb T. and Cabane B. *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 3828-3838
- [21] Auvray X, Petipas C, Anthore R, Rico-Lattes I and Lattes A. *Langmuir* **11** (1995) 433-439
- [22] Nilsson F, Söderman O, Johansson I *Langmuir* **12** (1996) 902-908
- [23] *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, 72nd Edition (1991-1992)
- [24] Ricoul F., Dubois M. and Zemb T. *J. Phys. II France* **7** (1997) 69-77
- [25] Dubois M., Gulik-Krzywicki T. and Cabane B., *Langmuir*, **9** (1993) 673
- [26] Hansen J. P. and MacDonald I. R. *Theory of simple liquids* Academic Press, London (1986)
- [27] Belloni L. cours de DEA
- [28] Derjaguin B. V. *Kolloid-Z.* **69** (1934) 155
- [29] Nallet F., Roux D., Quilliet C., Fabre P. and Milner S. T. *J. Phys. II France* **4** (1994) 1477-1499
- [30] Ligoure C., Bouglet G., Porte G. and Diat O. *J. Phys. II France* **7** (1997) 473-491;
Porcar L., Ligoure C. and Marignan J. *J. Phys. II France* **7** (1997) 493-502
- [31] Malberg C. G. and Maryott A.A. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **45** (1950) 299

Chapitre III

Etablissement des diagrammes de phases ternaires

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à l'étude structurale des phases que forment le mélange du glycolipide avec son hôte : la connaissance des limites de phases en fonction de la température et des compositions est un moyen de caractériser les interactions spécifiques de chacune des molécules. Dans une première partie nous décrivons la préparation des échantillons et notamment la mise au point de la technique originale en gradient de concentration en capillaire, qui nous a permis d'obtenir l'allure des diagrammes DDAB/glycolipides avec le minimum de produit. En deuxième partie, nous donnons les résultats obtenus pour les deux systèmes moléculaires DDAB/LS et DDAB/LC₁₁C₉. En dernière partie, nous comparons les deux comportements obtenus et nous nous intéressons qualitativement aux propriétés thermodynamiques des phases lamellaires via une étude des profils des raies de Bragg.

III.A. Méthodes expérimentales

III.A.1. Méthode traditionnelle

Généralement, les diagrammes de phases de systèmes lyotropes s'obtiennent en préparant un très grand nombre d'échantillons à des compositions données, souvent en suivant des lignes de dilution, puis en les observant à l'œil, ou entre polariseur croisés ou par des techniques de diffusion de rayonnement. Pour détecter avec une bonne probabilité la succession des phases, par exemple avec un pas de concentration de 2%, il faut préparer plus de 50 échantillons, c'est à dire disposer d'au moins 25g de produit pour préparer des volumes de 1ml maximum.

Au cours de notre étude, l'essentiel des résultats ayant été obtenu par la méthode de gradient décrite plus loin, nous n'avons eu à préparer qu'un petit nombre d'échantillons à une composition donnée, pour confirmer ou préciser certains points des

diagrammes de phases. Pour ces échantillons classiques, les poudres et le solvant ont été pesés, puis le mélange homogénéisé en effectuant des cycles en température (de 25 à 70°C) ou par centrifugation répétée (à 5000 tr/min) ou bien encore par sonication. Pour les échantillons concentrés, nous sommes d'abord passés par une étape de phase diluée de vésicules, en suivant la méthode préparative décrite par B. Demé [1]. Cette phase diluée assure qu'il y a un mélange homogène au niveau moléculaire. Les solutions sont ensuite lyophilisées puis réhydratées avec la quantité d'eau voulue. Dans le cas du LC₁₁C₉ peu soluble dans l'eau, nous avons même préféré parfois dissoudre les poudres dans un mélange méthanol/chloroforme, évaporer le solvant avec un évaporateur rotatif avant de dissoudre dans un excès d'eau, de lyophiliser puis de réhydrater.

Dans le cas de certains échantillons biphasiques que nous avons pu séparer, nous avons réalisé le dosage des compositions : d'une part la teneur en eau a été déduite par pesée de l'échantillon, avant et après lyophilisation, et d'autre part les concentrations en DDAB et en glycolipides ont été déterminées par chromatographie Iatroscan. Le principe de cette technique et les conditions expérimentales sont données en annexe.

III.A.2. Méthodes en gradient de concentration

Pour obtenir toute une ligne de composition dans un seul capillaire, avec le minimum de produit et de manière continue, il est astucieux de travailler en gradient de concentration. Le principe le plus simple pour établir un gradient consiste à obtenir un gonflement progressif des phases par pénétration de l'eau [2]. Contrairement à la méthode précédente pour laquelle il est essentiel d'atteindre l'équilibre thermodynamique, la détermination des phases peut se faire alors très rapidement.

Une première méthode qualitative existe depuis longtemps et s'effectue sous microscope polarisant [3]. Nous en parlerons dans le paragraphe suivant.

Depuis d'autres méthodes plus raffinées ont été développées pour améliorer l'étude des structures. Par exemple Caffrey [4] a travaillé sur des systèmes lyotropes binaires et ternaires en utilisant la diffusion centrale de rayons X pour étudier les phases. Il crée les gradients de concentrations dans des tubes capillaires pour rayons X avant de les balayer par les rayons X. Les capillaires étant scellés, l'étude peut se faire à différentes températures.

D'autres méthodes plus quantitatives quant à la détermination des compositions en limite de phases, et utilisant le même principe de gonflement par l'eau, ont également été mises au point [2]. L'une d'entre elles ("Diffusive Interfacial Transport")

utilise une interférométrie quantitative en transmission pour établir les concentrations à partir de la mesure de l'indice optique [5] Cependant des problèmes liés à l'orientation des phases à l'intérieur des capillaires empêchent une bonne précision. Des développements sont aussi en cours pour obtenir la détection micrométrique de l'eau le long des capillaires par spectrométrie infrarouge ou Raman.

Dans notre étude qui va être développée par la suite nous avons mis au point une méthode quantitative de gradient en capillaire grâce à un marquage au carbone 14 et à une analyse par diffusion centrale de rayons X.

III.A.2.a. Observation des phases sous microscope entre polariseurs

Nous avons travaillé sur un microscope optique Axioplan Universal, au laboratoire de Physical Chemistry, à l'Université de Lund, Suède.

Les échantillons ont été préparés selon le principe de méthode de pénétration d'eau, sur une plaque de verre recouverte d'une lamelle fine : des bris de verre permettent d'obtenir sur un côté, un coin, comme représenté sur la Figure III-1. De l'autre côté, la poudre, à la composition en glycolipide voulue, est fondue avec une flamme. Par capillarité une goutte d'eau déposée vers le coin va aller hydrater la poudre et former une zone de gradient de concentration.

Vue de dessus:

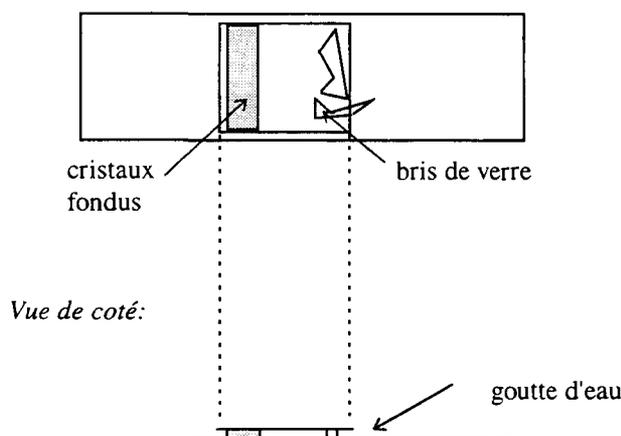


Figure III- 1 : Schéma de la préparation des échantillons pour les expériences sous microscope optique avec pénétration d'eau.

III.A.2.b. Méthode de gradient en capillaire avec marquage isotopique

Cette technique de gradient en capillaire est hors équilibre thermodynamique mais elle nous a cependant donné des résultats en total accord avec les observations faites par la méthode conventionnelle décrite au paragraphe précédent III.A.1. Elle a l'avantage de balayer continûment les lignes de dilution et donc d'éviter de manquer une phase, d'utiliser très peu de produit par capillaire, d'être rapide pour le dosage des concentrations et l'identification structurale des phases.

L'amélioration que nous avons apportée à la technique déjà mise au point par Caffey, [4], est la détermination directe et quantitative de la composition le long du capillaire, grâce à un marquage isotopique et à la mesure de la transmission aux rayons X. Par rapport aux autres méthodes, ceci nous a permis d'étendre la technique du gradient aux systèmes ternaires.

III.A.2.b.1. Préparation des capillaires

Pour pouvoir mesurer la composition en glycolipide directement dans les capillaires nous avons utilisé un marquage isotopique de nos molécules. C'est-à-dire que les synthèses du 2-O Lauroylsaccharose et du N-lauroyl, N-nonyl Lactitol ont été refaites en utilisant de l'acide laurique marqué au carbone 14 durant l'étape d'alkylation. Ces synthèses ont été réalisées par Alain Vandais au sein du Service des Molécules Marquées, à Saclay. Nous avons obtenu des solutions mères méthanoliques à 0.5 mCurie/ml pour le LS et 0.62 mCurie/ml pour le LC₁₁C₉. L'activité intrinsèque du carbone 14 étant de 54 mCurie/mmol, nous avons dilué la molécule marquée avec la molécule "froide" de manière à obtenir, dans chaque capillaire, quelque soit la fraction x_{GL} de glycolipide par rapport au DDAB, la même activité totale : 1.64 mCurie/ml. Ce choix a été fait de manière à garder la meilleure précision de détection de la concentration en glycolipide tout en manipulant le moins possible de radioactivité.

Les échantillons sont préparés en remplissant d'abord, sur environ 1.5cm, les capillaires avec des solutions concentrées (20% d'eau seulement) DDAB+glycolipide, à des fractions molaires x_{GL} données de glycolipide par rapport au DDAB. Ces solutions concentrées sont elles-mêmes préparées en dissolvant les quantités voulues de DDAB et de glycolipide "froid" à la solution de glycolipide marqué dans le méthanol, puis en évaporant le solvant sur un évaporateur rotatif avant d'ajouter une quantité d'eau équivalente à 20% massique. Le remplissage des capillaires est alors complété avec de

l'eau pure et les capillaires sont scellés à la flamme. Les capillaires utilisés sont des capillaires standards pour rayons X, en borosilicate, de 2 mm de diamètre et de 2/100^e mm d'épaisseur.

III.A.2.b.2. Principe de l'analyse en composition des capillaires

Le dosage en glycolipide se fait en dosant la radioactivité le long du capillaire. En fait, le rayonnement beta se transforme en partie en rayons X de freinage à travers le verre. C'est pourquoi nous pouvons détecter un signal par les plaques photosensibles couramment utilisées en détection de diffusion de rayons X, en posant les capillaires à plat, 15 minutes environ, sur les plaques. Le système de détection Phosphorimager de Molecular Dynamics permet une résolution spatiale de 88 microns.

La détermination des deux autres concentrations, en DDAB et en eau, se déduit de la mesure de la transmission aux rayons X. En effet la transmission T de l'échantillon dépend des fractions massiques y_{eau} , y_{DDAB} et y_{GL} des trois composés, de leurs densités d_{eau} , d_{DDAB} et d_{GL} et de leurs coefficients massiques d'adsorption μ_{eau} , μ_{DDAB} et μ_{GL} selon :

$$\ln(T) = -t \times \mu_{ech} \times d_{ech} \quad (\text{III- 1})$$

avec t l'épaisseur de l'échantillon, $\mu_{ech} = y_{eau} \cdot \mu_{eau} + y_{DDAB} \cdot \mu_{DDAB} + y_{GL} \cdot \mu_{GL}$ et $d_{ech} = 1 / (y_{eau} / d_{eau} + y_{DDAB} / d_{DDAB} + y_{GL} / d_{GL})$. Les valeurs des coefficients massiques des molécules, données dans le Tableau III-1, ont été calculées pour une longueur d'onde de 1Å à partir des coefficients atomiques pris dans [6]. L'évolution de la transmission en fonction des compositions y_{eau} , y_{ddab} et y_{GL} qui se déduit de l'équation III-1 est représentée sur la Figure III- 2.

Expérimentalement la transmission est mesurée grâce à une photodiode sur laquelle est envoyée une fraction déviée du faisceau direct de rayons X. L'erreur la plus grande sur la détermination de y_{eau} et y_{DDAB} vient de l'erreur sur t , l'épaisseur du capillaire. On trouve numériquement que 5% d'incertitude sur t , donne une incertitude de l'ordre de 10% sur y_{eau} et y_{DDAB} . C'est pourquoi nous avons pris soin de mesurer au microscope l'épaisseur réelle le long de nos capillaires.

	Eau	DDAB	LS	LC ₁₁ C ₉
Coefficient d'adsorption massique (cm ² /g)	2.99	6.01	2.01	1.83

Tableau III- 1 : Coefficients massiques d'adsorption aux rayons X à 1Å.

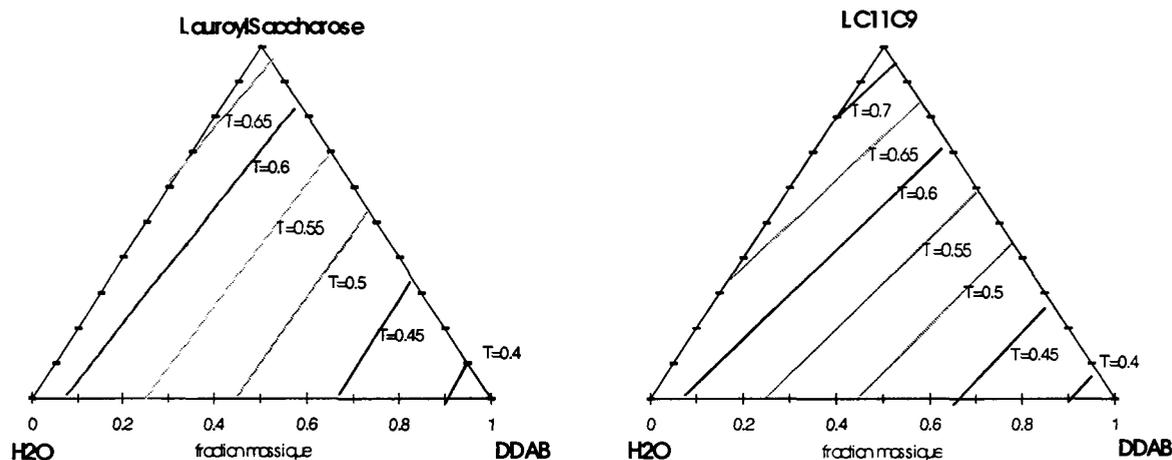


Figure III- 2 : Courbes d'isotransmission en rayons X (longueur d'onde 1 \AA) pour les systèmes DDAD/LS/eau et DDAB/LC₁₁C₉/eau avec une épaisseur d'échantillon prise égale à 0.16cm. Dans cette représentation, les lignes d'égale radioactivité sont horizontales.

III.A.2.b.3. Analyse par diffusion centrale de rayons X

L'identification et l'étude structurale des phases rencontrées successivement le long des capillaires se fait grâce à la diffusion centrale de rayons X. Les mesures ont été réalisées à l'ESRF sur la ligne Haute Brilliance (BL4/ID2).

La Figure III- 3 montre schématiquement la géométrie du montage de la cellule thermostatée utilisée. Le détecteur est un détecteur à gaz bidimensionnel avec 512×512 cellules (1024×1024 en 1997 pour l'expérience sur le LC₁₁C₉). Nous avons travaillé à une longueur d'onde de 1 \AA , à une distance échantillon-détecteur de 1m et 1.8m pour le LS soit $0.025\text{-}0.6 \text{ \AA}^{-1}$ et $0.015\text{-}0.35 \text{ \AA}^{-1}$ comme gamme de vecteur d'onde (2.55m et 6m pour le LC₁₁C₉ soit $0.01\text{-}0.27 \text{ \AA}^{-1}$ et $0.005\text{-}0.115 \text{ \AA}^{-1}$ comme gamme de vecteur d'onde). La taille du faisceau a été fixée à $250 \times 250 \text{ \mu m}^2$ pour le LS ($500 \times 200 \text{ \mu m}^2$ pour le LC₁₁C₉).

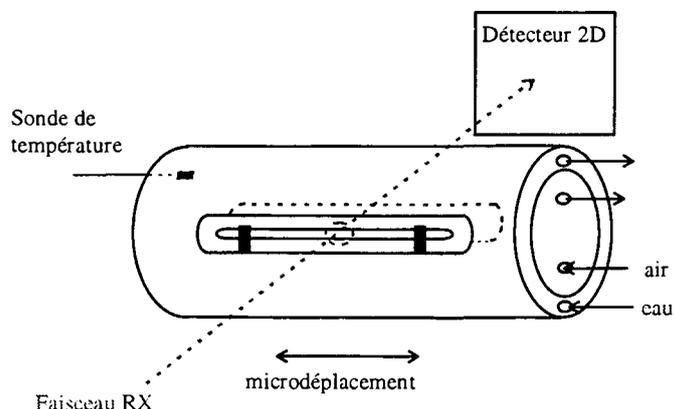


Figure III- 3 : Schéma de la cellule à capillaire thermostatée utilisée pour étudier les gradients de concentration par diffusion de rayons X.

III.B. Résultats

III.B.1. Analyse des gradients de concentration en capillaires

Les expériences en gradient de concentration ont été réalisées sur le système DDAB/LS d'une part et DDAB/LC₁₁C₉ d'autre part. Nous avons préparé des capillaires avec différentes fractions molaires x_{GL} de glycolipides. L'emplacement en composition de ces capillaires sur les triangles est représenté schématiquement sur la Figure III- 4.

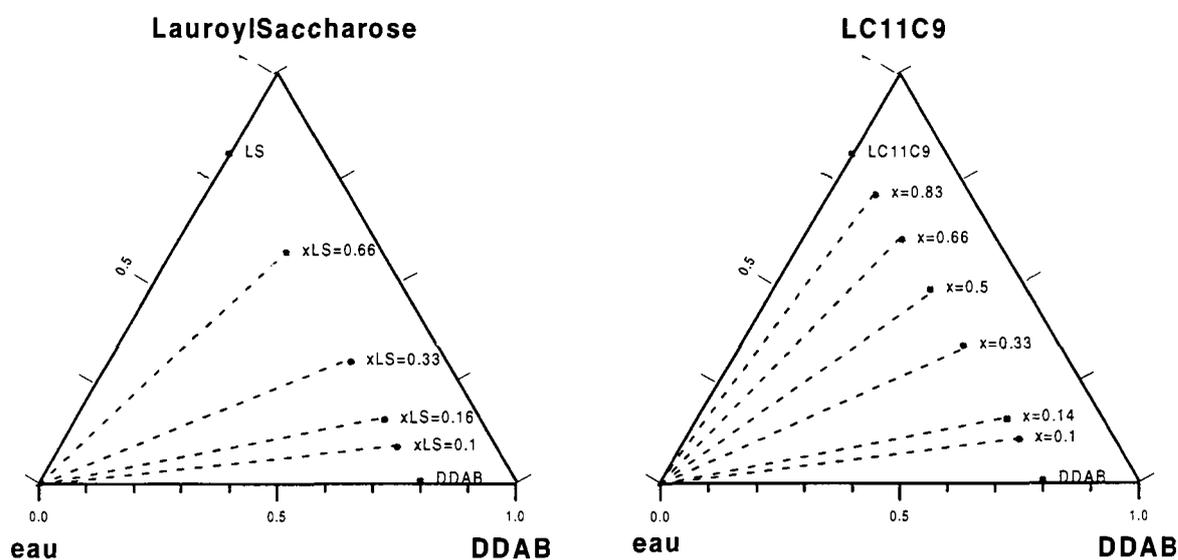


Figure III- 4 : Représentation des différents capillaires préparés avec des molécules marquées pour la détermination des diagrammes ternaires.

La Figure III- 5 donne l'image autoradiographique de la série de capillaires préparée avec le LS. Les capillaires ont été posés à plat sur la plaque pendant environ 15 minutes. Sur cette image enregistrée 24h après la préparation des capillaires on observe déjà les gradients de concentration.

Des coupes le long de l'axe des capillaires sont données sur la Figure III- 6. Sur la première courbe $x_{LS} = 0.1$, les créneaux entre $x=10$ et 20mm sont dus à des bulles d'air formées lors du remplissage et du transport des capillaires. A partir de $x=20\text{mm}$, on observe une diminution de la radioactivité émise donc dans la concentration en LS. Pour la courbe à $x_{LS} = 0.33$, le gradient est également bien marqué. Par contre on remarque que pour la molécule LS pure (courbe du bas) le gradient de concentration n'existe plus et donc la composition est uniforme dans tout le capillaire. En fait, plus il y a de DDAB plus la migration est lente, ce qui est a posteriori logique puisque que le DDAB a deux chaînes alkyles tandis que la molécules de LS n'en a qu'une.



Figure III- 5 : Image obtenue sur une plaque photosimulable des capillaires de la série préparée sur le système DDAB/LS. L'acquisition qui dure 15 minutes a été prise 24 heures après la préparation des capillaires. De haut en bas on a $x_{LS}=0.1, 0.16, 0.33, 0.66$ et 1.

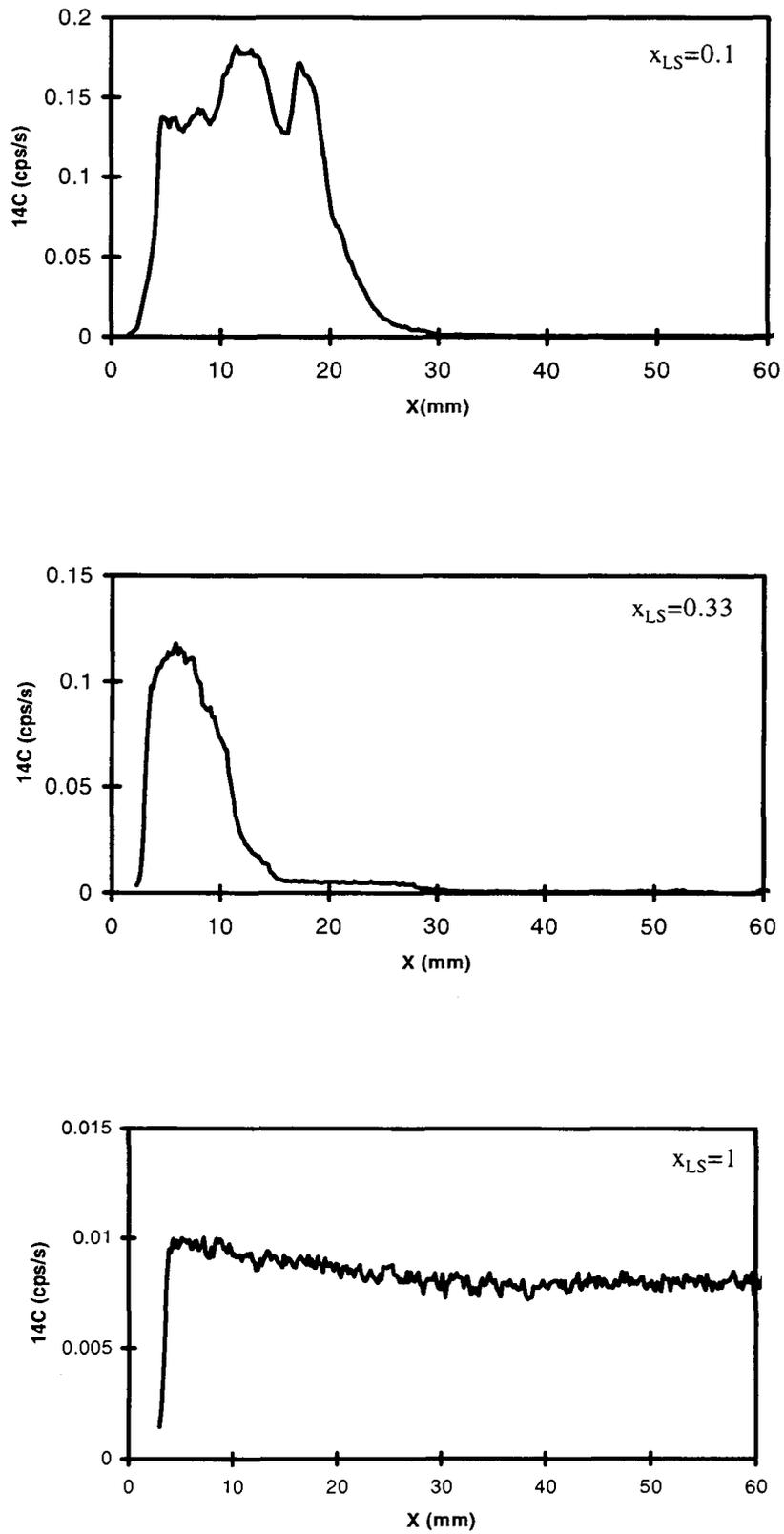


Figure III- 6 : Radioactivité le long des capillaires de mélange DDAB/LS préparés à fractions molaires différentes après 24 heures d'équilibre.

Dans le système DDAB/LC₁₁C₉ la cinétique de migration des gradients a été plus lente. La formation du gradient est de l'ordre de quelques jours mais ensuite nous avons pu observer à l'œil que la migration se stabilise. Il est possible de garder un gradient sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois. Sur la Figure III- 7 nous avons tracé l'évolution du gradient au cours du temps sur les premiers jours pour un mélange initial à $x_{LC_{11}C_9}=0.1$. Sur ce capillaire on observe en fait deux gradients en concentration avec des variations en concentrations assez brutales. On verra plus loin que ces pentes raides coïncident avec les zones de transitions de phases observées par rayons X.

Nous avons également travaillé en température (jusqu'à 65°C) pour observer le comportement des phases avec la température. Sur la Figure III- 8 on remarque que la température n'a pas d'effet important sur les profils en radioactivité. Donc nous avons pu faire l'hypothèse que la composition sur un point du capillaire ne bouge pas même si on chauffe l'échantillon. Seule la structure de la phase peut changer comme c'est le cas pour des échantillons préparés à une composition donnée par la méthode classique.

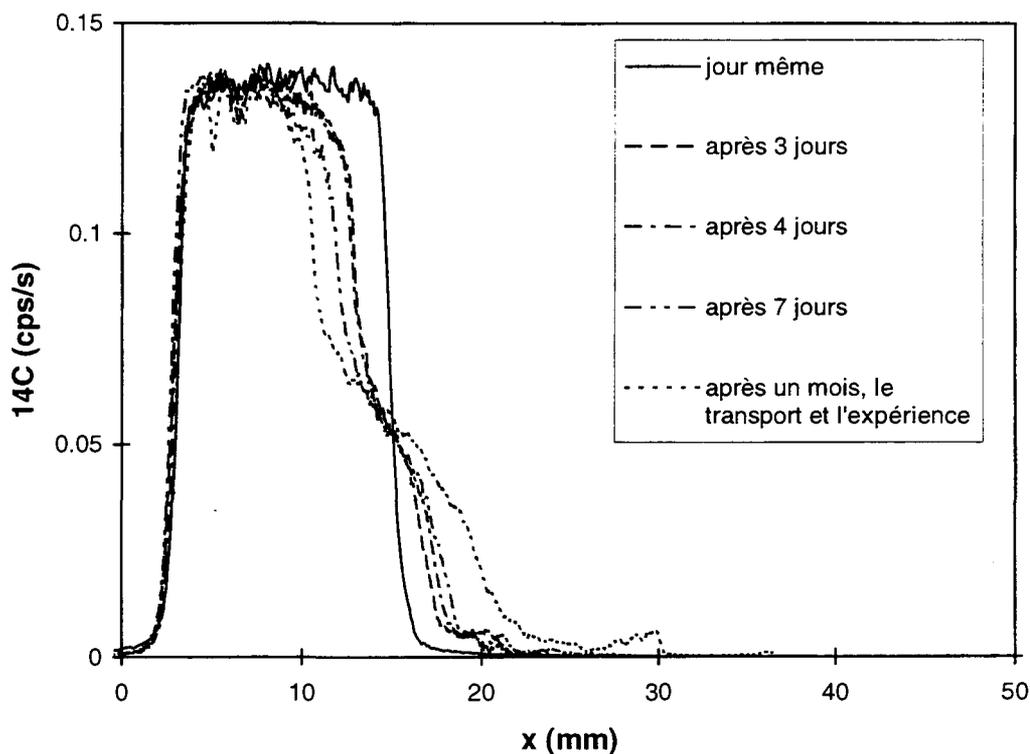


Figure III- 7 : Evolution du gradient de concentration au cours du temps pour un capillaire préparé avec un mélange initial DDAB/LC₁₁C₉ à $x_{LC_{11}C_9}=0.1$.

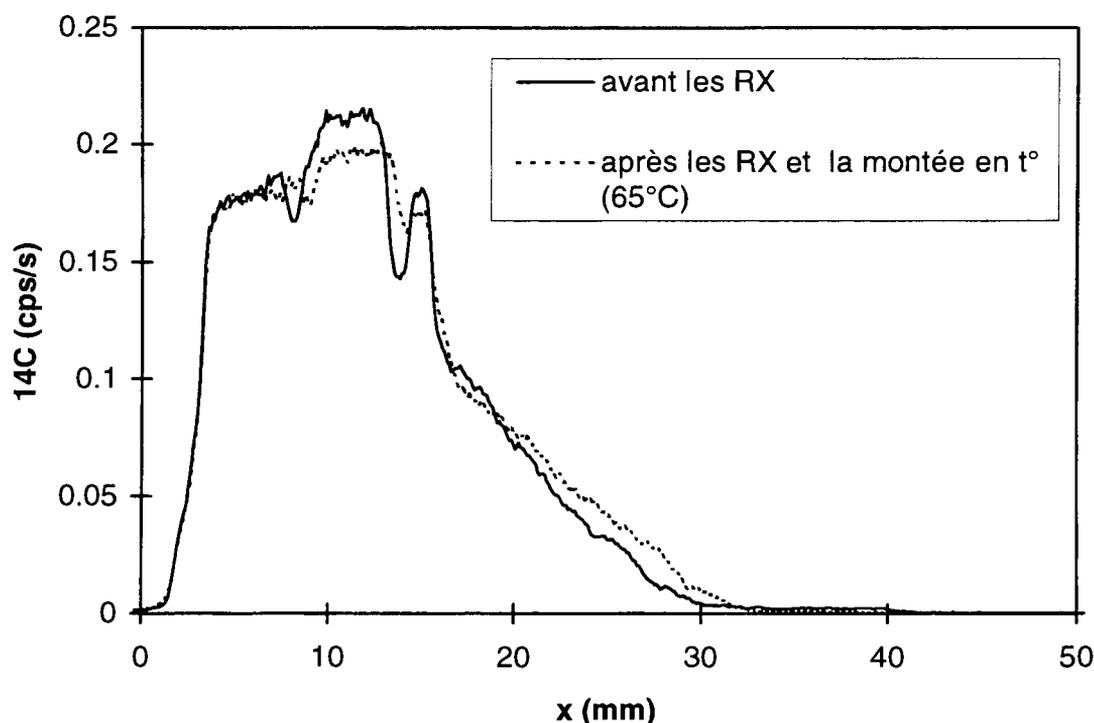


Figure III- 8 : Comportement du gradient de concentration avec la température. Courbes données pour le capillaire DDAB/LS à $x_{LS}=0.1$ juste avant et juste après l'expérience.

Complétées par les mesures de transmission, ces analyses du signal radioactif permettent de déterminer le long du capillaire la composition en chacun des trois composants, eau, DDAB et glycolipide. Sur la Figure III- 9 nous donnons pour un capillaire le résultat des mesures de ^{14}C et de transmission (graphique du haut) et les valeurs déduites des concentrations massiques suivant x (graphique du bas). En regroupant les courbes obtenues pour tous les capillaires il est possible de visualiser sur le diagramme ternaire la position réelle en composition des capillaires. C'est ce que nous avons représenté sur la Figure III- 10 pour le système DDAB/LC₁₁C₉ pour lequel nous avons pu observer des gradients de concentration pour tous les capillaires préparés. Sur cette figure on observe encore que les gradients ne sont pas uniformes : en fait les zones où les points sont plus espacés correspondent aux zones de transition de phases.

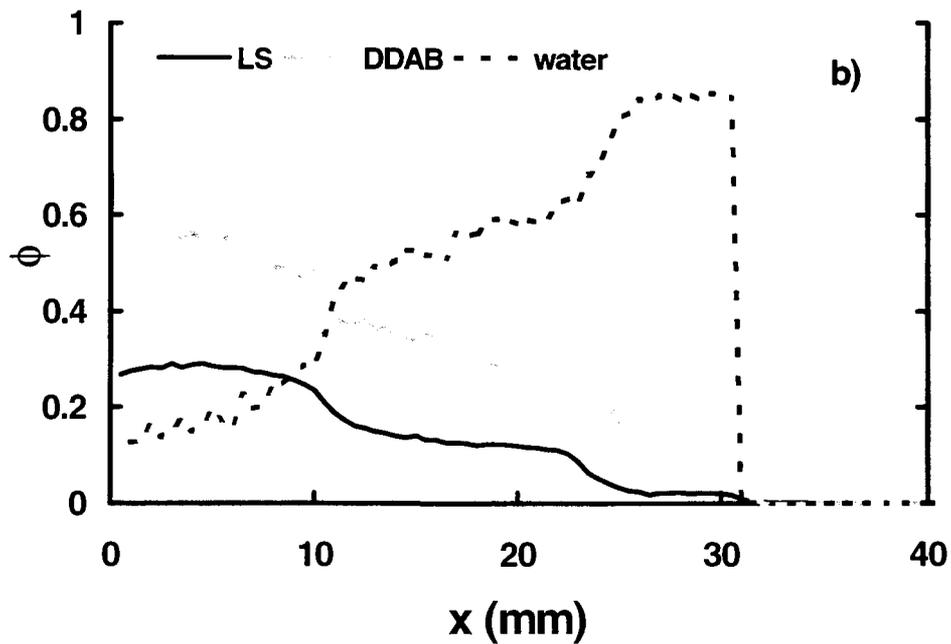
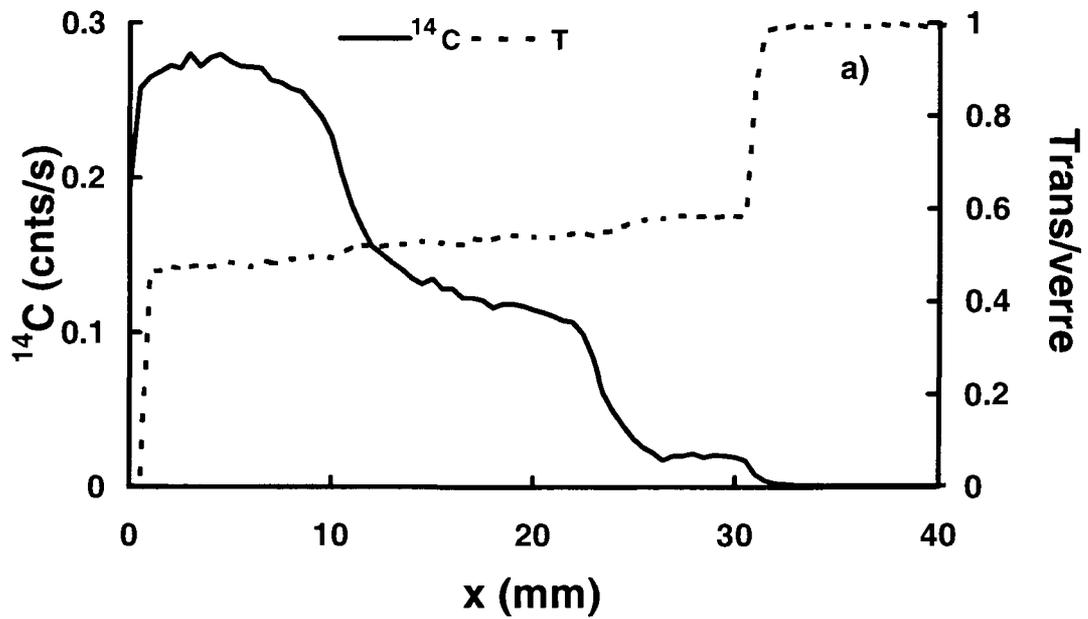


Figure III- 9 : analyse en composition d'un capillaire préparé avec un mélange initial DDAB/LS $x_{LS}=0.33$ en contact avec de l'eau pure. En haut, le signal radioactif et la transmission par rapport à un capillaire vide. En bas, les fractions massiques déduites.

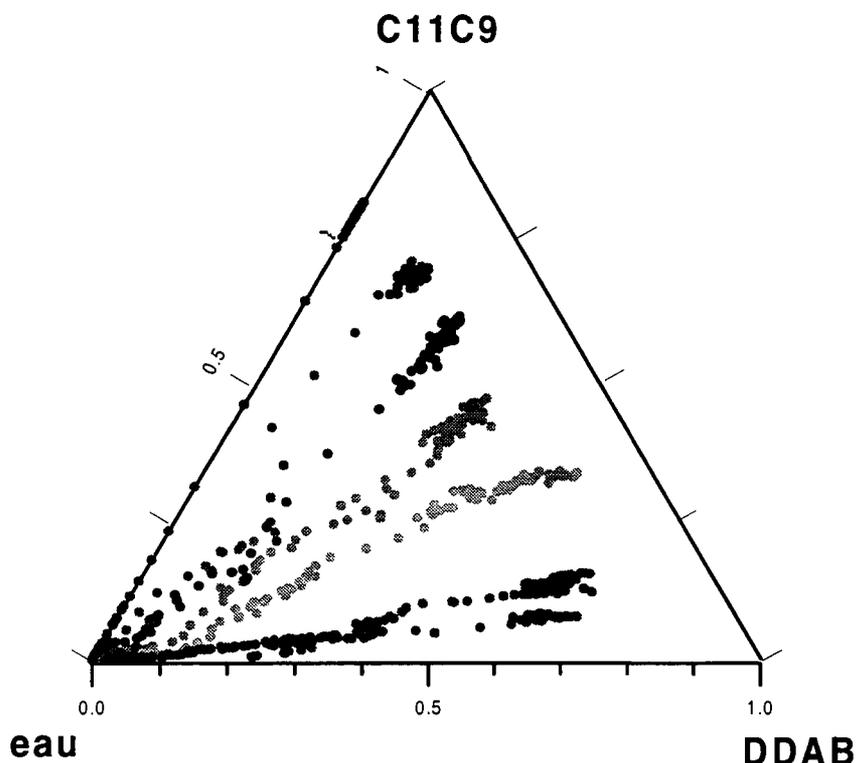


Figure III- 10 : Positionnement sur le diagramme ternaire des capillaires du système DDAB/LC₁₁C₉ après diffusion de l'eau, d'après l'analyse faite en ¹⁴C et en transmission,. Deux points consécutifs sur un capillaire sont séparés par 200μm.

Connaissant la composition en tout point des capillaires, nous avons pu établir les diagrammes de phases grâce à l'analyse structurale par diffusion centrale de rayons X le long des capillaires. De plus nous avons complété notre étude par des résultats obtenus avec les autres méthodes plus conventionnelles.

III.B.2. Diagramme de phase DDAB/LS

III.B.2.a. Allure du prisme

Les six capillaires préparés avec des fractions molaires de LS allant de 0 à 1 ont été balayés à différentes températures (25, 45 et 65°C) avec un pas de 250μm (égal à la taille du faisceau) ou plus quand moins de précision était nécessaire. Sur la Figure III-11 nous donnons les spectres 2D obtenus à 25°C sur le capillaire préparé avec $x_{LS}=0.1$. Les images vont de $x=12\text{mm}$ à 13.5mm tous les 0.25mm depuis l'image en bas à gauche jusqu'à celle à haut à droite. Sur les deux premières images on observe un anneau de Bragg qui correspond à une période lamellaire de 32.2Å donc à la phase concentrée L_{α}' .

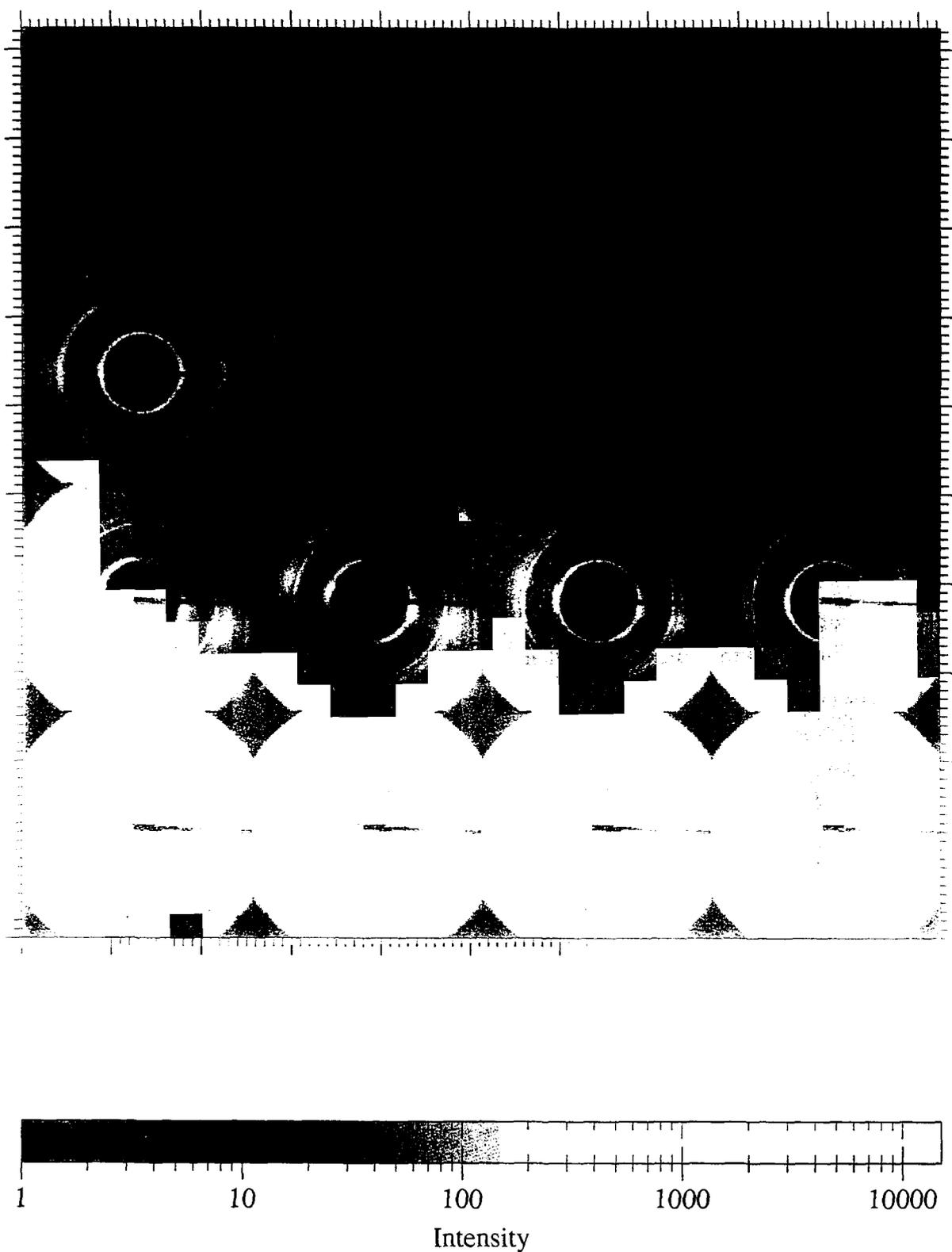


Figure III- 11 : Spectres 2D de diffusion centrale de rayons X obtenus à 25°C le long du capillaire préparé avec $x_{LS}=0.1$. Les images vont de $x=12\text{mm}$ à 13.5mm tous les 0.25mm depuis l'image en bas à gauche jusqu'à celle en haut à droite.

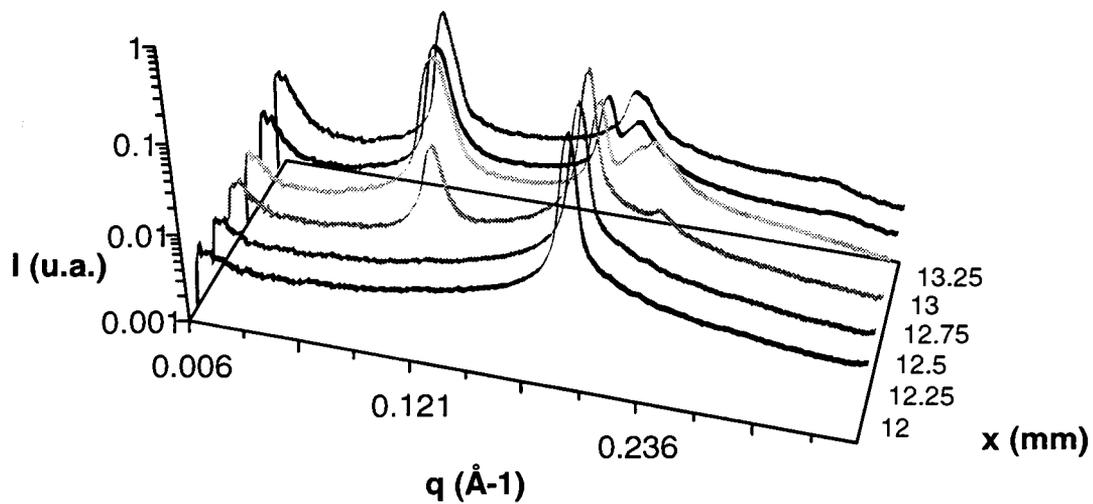


Figure III- 12 : Spectres regroupés radialement des images de la figure précédente III-11

Sur la troisième image on voit apparaître un deuxième ordre lamellaire aux plus petits angles qui correspond à une période plus gonflée (57 Å). Sur les images suivantes on observe que le pic de la phase L_{α}' diminue jusqu'à disparaître complètement sur la dernière image. Les spectres regroupés radialement de cette série sont tracés sur la Figure III- 12. Ceci démontre la présence d'une région biphasique lamellaire-lamellaire avec des lignes binodales.

L'analyse des données de tous les capillaires nous a permis de construire le prisme représenté sur la Figure III- 13 qui donne la nature des phases observées, leurs limites d'existence en fonction des concentrations et de la température. Dans la partie riche en DDAB nous observons la zone de coexistence des deux phases lamellaires L_{α} - L_{α}' qui disparaît au delà d'une fraction de LS supérieure à 20% ou lorsque l'on chauffe au dessus d'une température critique qui dépend de x_{LS} . Nous allons détailler cette zone dans le paragraphe suivant. Dans le coin riche en LS, nous avons une phase cubique sur laquelle nous allons aussi revenir par la suite. Lorsque l'on chauffe c'est d'abord la phase hexagonale très riche en LS qui disparaît (avant 45°C) puis la phase cubique. Comme nous n'avons pas chauffé nos capillaires au-delà de 65°C nous avons toujours conservé les phases lamellaires, dont l'ordre à une dimension supporte des fluctuations thermiques plus élevées.

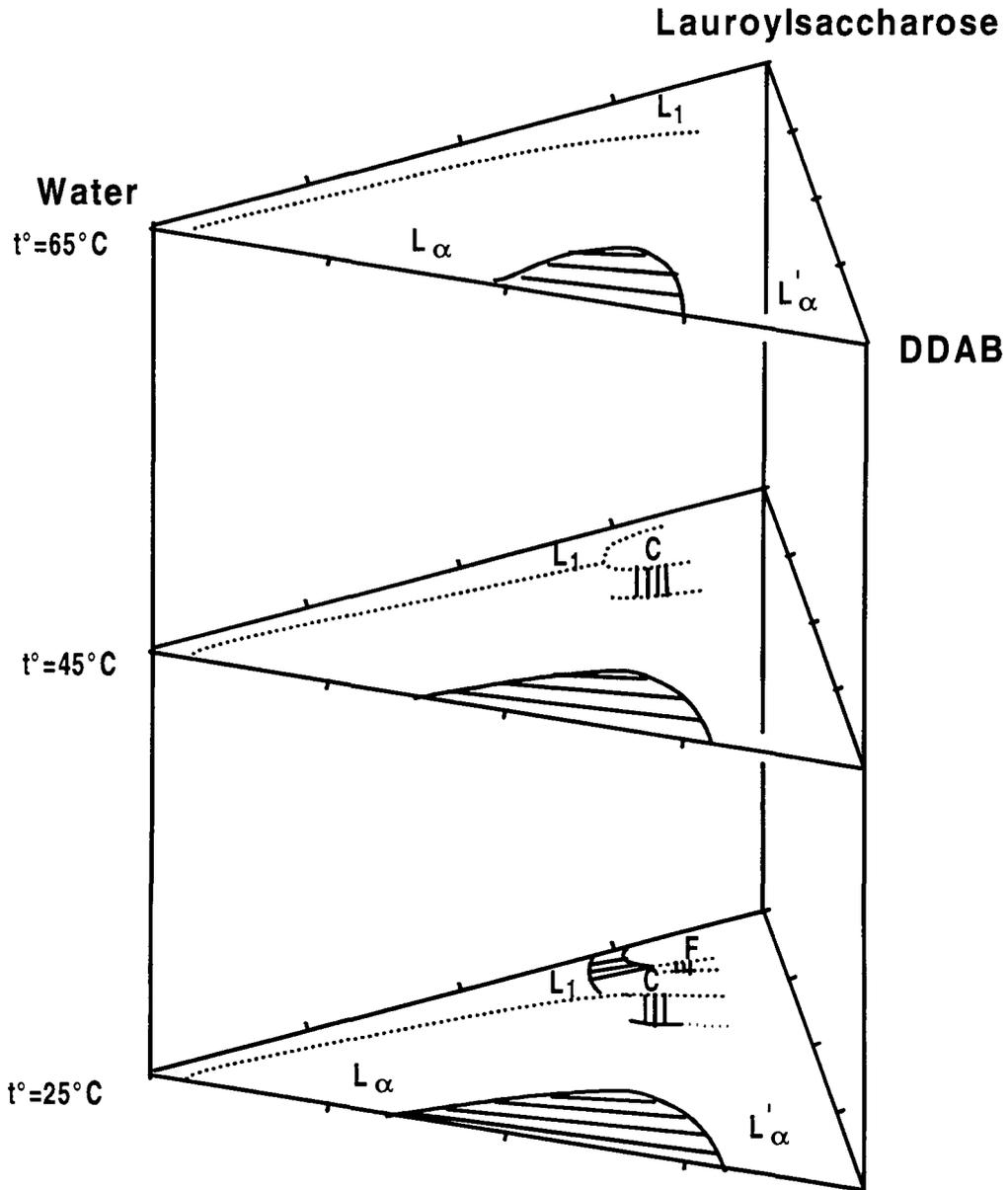


Figure III- 13 : Allure du prisme des phases du système DDAB/LS. F symbolise la phase hexagonale, C la phase cubique, L_1 la phase micellaire et L_α , L'_α les phases lamellaires.

III.B.2.b. Point critique L_α - L'_α '

La Figure III- 14 représente le comportement de phase déduit des résultats de diffusion centrale de rayons X : le graphique du haut en fonction de x_{LS} et de la température est déduit des résultats obtenu à l'ESRF (cf fig précédentes) tandis que la projection dans la partie inférieure est déduite de résultats obtenus à température ambiante sur notre montage au laboratoire avec anode tournante sur des échantillons préparés avec D_2O . Les deux lignes de démixtion ont été déterminées en séparant les deux phases en coexistence par centrifugation (15 heures à 25000 tr/min) puis en dosant

les composés par chromatographie Iatroscan. Ces lignes montrent qu'il y a plus de LS relativement au DDAB dans la phase L_{α} gonflée que dans la phase collapsée L_{α}' . Sur cette figure on remarque également que le trou de miscibilité entre les deux phases lamellaires diminue quand x_{LS} augmente. Cet effet est similaire à l'effet de la température. A température ambiante nous observons un point critique pour $x_{LS}=0.2\pm 0.02$. C'est-à-dire que au-dessus de cette composition il n'y a plus qu'une seule phase lamellaire. Nous avons tracé sur la figure une extrapolation de tous les points critiques en température, la ligne notée ℓ , qui montre comment la température T_c diminue quand x_{LS} augmente.

Une interprétation de ce comportement de phases en terme d'interactions sera donnée au chapitre IV à l'issue des mesures de pressions osmotiques du système.

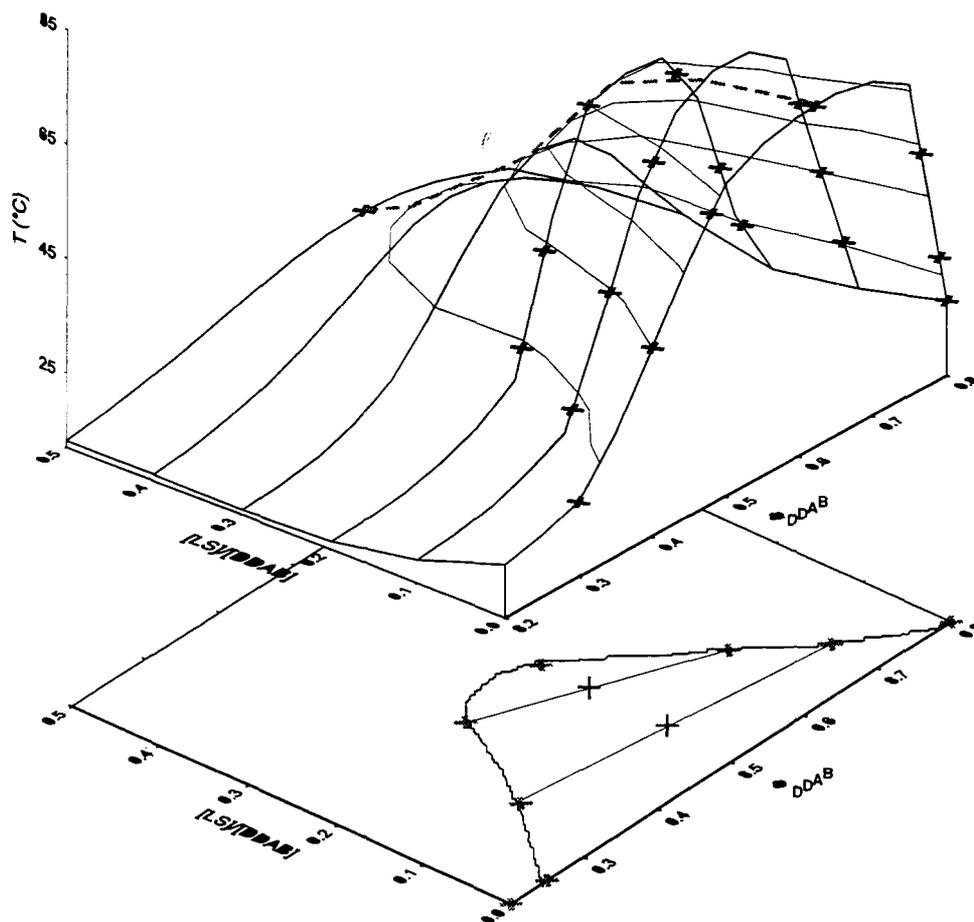


Figure III- 14 : Représentation 3D de la zone de coexistence L_{α} - L_{α}' en fonction de la fraction volumique de DDAB, du rapport molaire LS/DDAB et de la température. La partie supérieure est déduite de résultats de l'ESRF, la partie inférieure de résultats dans D_2O obtenus sur la camera haut-flux du laboratoire avec les lignes binodales déterminées par dosage au Iatroscan. La ligne ℓ joint les points critiques.

III.B.2.c. Phase cubique

Sur la Figure III- 15 sont donnés les spectres 2D obtenus à l'ESRF à 25°C sur le capillaire préparé avec $x_{LS}=0.66$. Sur les premières images on reconnaît en plus des anneaux de Bragg d'une phase lamellaire les taches caractéristiques d'une phase cubique. Un spectre regroupé (enregistré à 1m) est donné sur la Figure III- 16 et l'on reconnaît trois ordres de pics de Bragg de phase L_α en plus des pics liés à la phase cubique. Aucune symétrie n'a pu être attribuée de manière satisfaisante sur cette phase cubique, mais du fait de la coexistence cubique/lamellaire nous pouvons penser qu'il s'agit d'une structure bicontinue. D'ailleurs un échantillon préparé à $x_{LS}=0.75$ c'est-à-dire encore plus riche en LS, nous a donné, sur le montage RX du laboratoire, le spectre présenté sur la Figure III- 17. Ici la phase cubique est pure et contrairement à l'échantillon préparé à $x_{LS}=0.66$, l'échantillon est complètement isotrope. Sur ce spectre nous avons pu indexer les sept pics visibles sur une symétrie cubique primitive, de groupe d'espace $Pn3m$. Ce groupe d'espace est l'un des groupes ($Ia3d$, $Pn3m$ et $Im3m$) communément rencontrés dans les systèmes lyotropes, entre les phases hexagonales et les phases lamellaires. Par exemple il a été observé par Longley et McIntosh avec du glycerol monooleate [7]. De plus il s'agit de l'une des deux symétries cubiques observées par Barois et coll. dans le système ternaire DDAB/cyclohexane/eau [8]. Le film de tensioactifs forme une bicouche, continue dans les trois dimensions, séparant deux réseaux continus et entrecroisés de structure diamant remplis par l'eau.

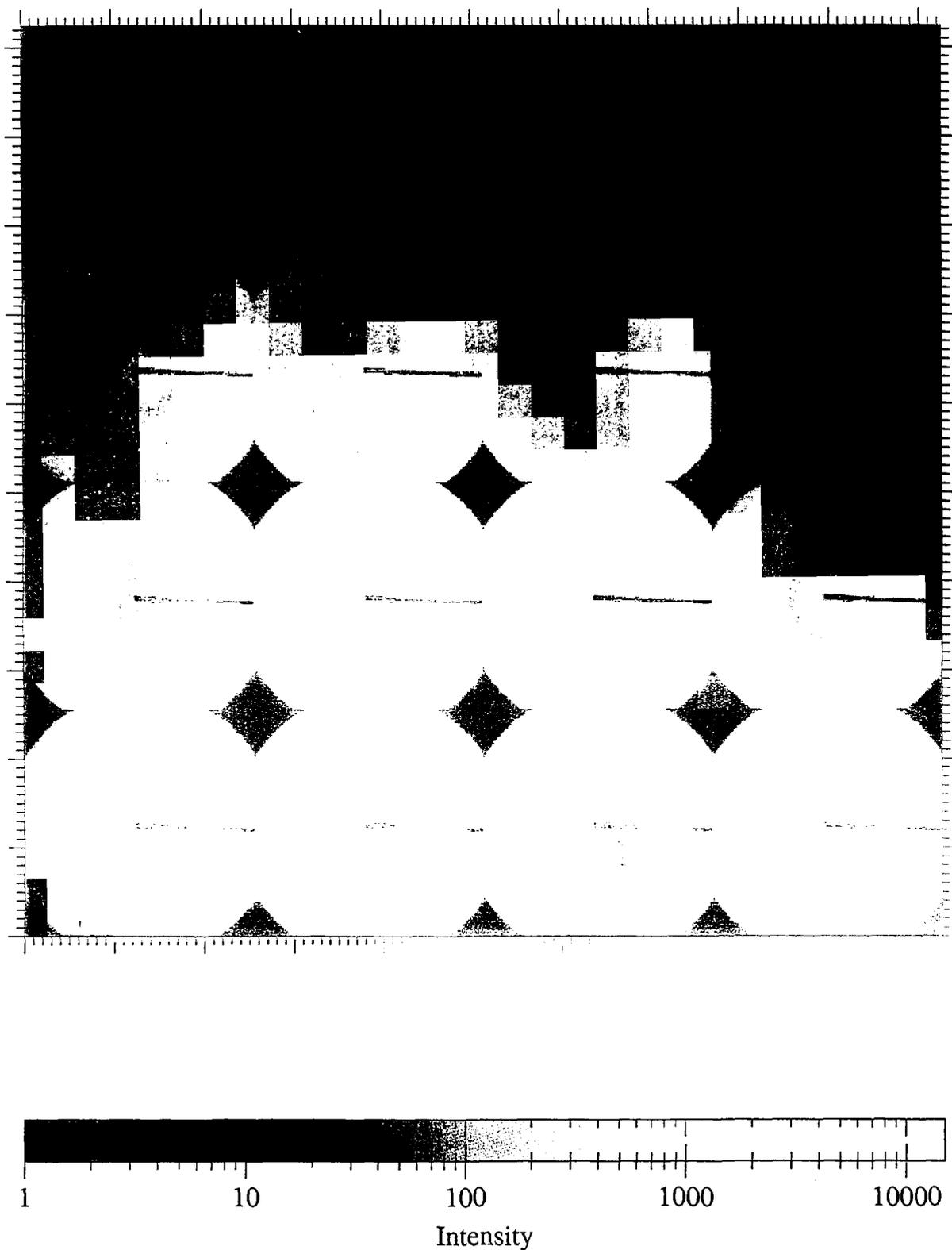


Figure III- 15 : Spectres 2D de diffusion centrale de rayons X obtenus à 15°C le long du capillaire préparé avec $x_{LS}=0.66$. Les images vont de $x=8\text{mm}$ à 20mm tous les 1mm depuis l'image en bas à gauche jusqu'à celle en haut à droite.

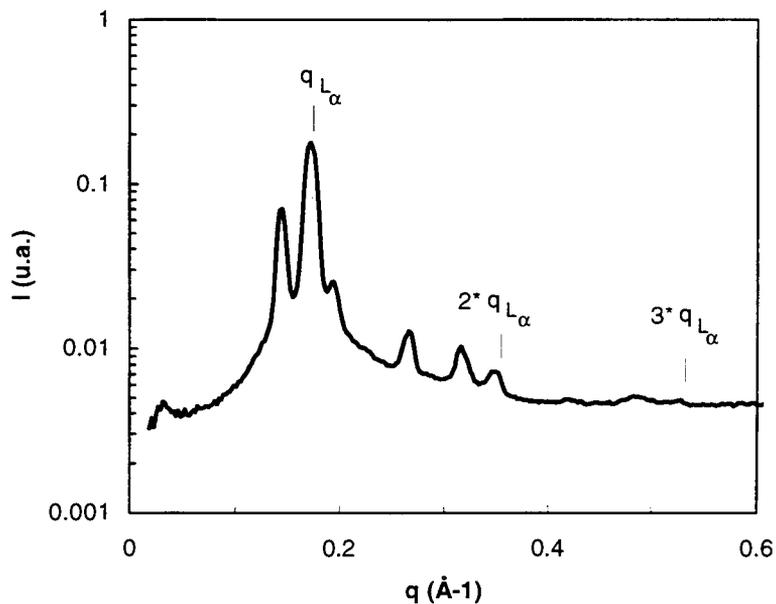


Figure III- 16 : Spectre regroupé de diffusion centrale de rayons X sur lequel on observe le premier, second et troisième ordre de pics de Bragg de phase lamellaire en plus des ordres d'une phase cubique (la composition est 20% d'eau, 24% DDAB et 56% LS , i.e. $x_{LS}=0.66$)

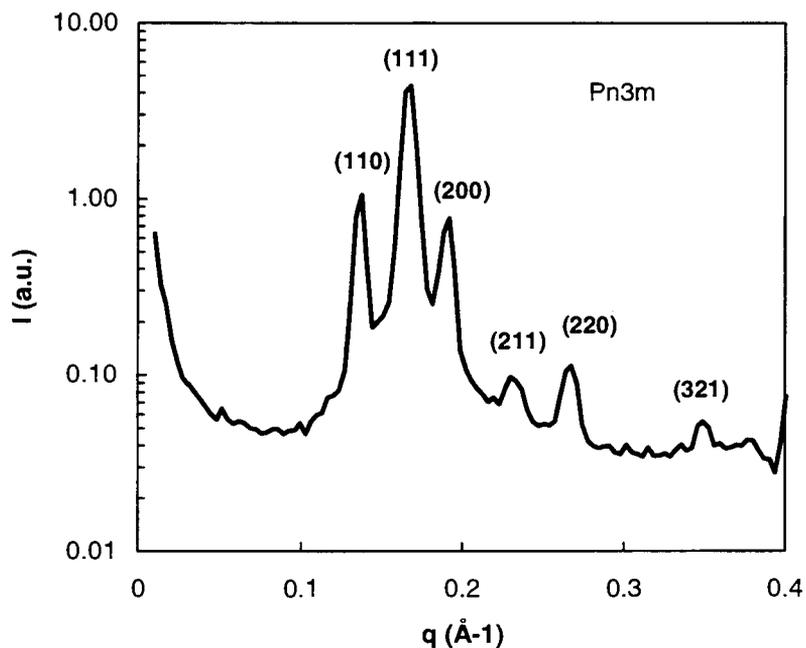


Figure III- 17 : Spectre de diffusion centrale de rayons X d'un échantillon préparé dans le domaine cubique monophasique (LS 64%, DDAB 18% et eau 17% en poids). Les pics ont été indexés sur un réseau cubique primitif de l'espace de symétrie Pn3m.

Les observations sous microscope optique, entre polariseurs croisés, ont d'ailleurs confirmé la présence de cette phase cubique. Un exemple d'observation est donnée sur la photo 1 Figure III- 18, prise à 25°C: le cristal, à gauche, est composé d'un mélange à 75% de LS et 25% de DDAB. On observe qu'entre cette phase cristalline et la phase complètement isotrope à droite (qui correspond à l'eau pure) on a une succession de plusieurs phases : on reconnaît une phase lamellaire avec des défauts caractéristiques en croix de malte, une phase isotrope, une deuxième phase lamellaire et enfin une phase hexagonale. Sur la photo 2, prise à 45°C, la phase hexagonale et la phase lamellaire intermédiaires sont réduites, tandis que sur la photo 3, à 80°C, elles ont complètement disparues. D'autre part sur la photo 2 on peut remarquer que la bulle d'air coincée dans la phase isotrope centrale est déformée alors que les bulles sur la droite sont parfaitement rondes : ceci est caractéristique d'une phase cubique, très visqueuse.

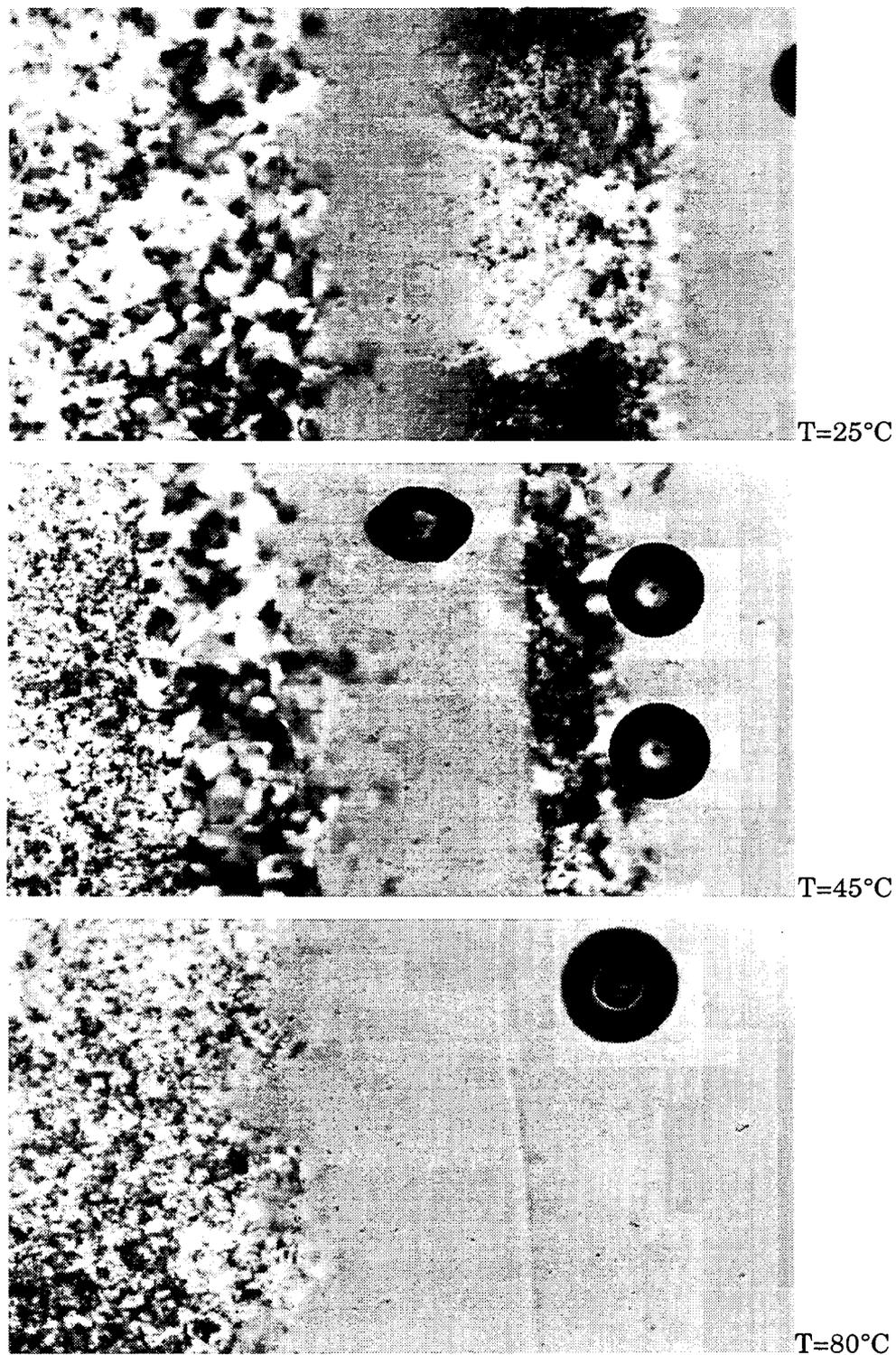


Figure III- 18 : Photographies à différentes températures de microscopie entre polariseurs croisés d'un échantillon DDAB+LS à $x_{LS}=0.75$ préparé par la technique de pénétration d'eau.

III.B.3. Diagramme de phase DDAB/LC₁₁C₉

III.B.3.a. Diagramme à 25°C

L'analyse des sept capillaires préparés avec le LC₁₁C₉ nous a permis de construire le diagramme ternaire à 25°C présenté sur la Figure III- 19. On retrouve ainsi la zone de coexistence L_{α} - L_{α}' qui aboutit à un point critique, c_1 , au-delà duquel il y a une phase lamellaire monophasique. Dans le coin riche en LC₁₁C₉ nous avons une zone de démixtion entre une phase lamellaire concentrée et une phase très diluée. Dans la zone intermédiaire nous avons retrouvé une zone de démixtion entre deux phases lamellaires fermée par un deuxième point critique, noté c_2 . La règle des phases et l'orientation des binodales imposent l'existence d'une zone triphasique que nous avons représentée par des pointillés. Malheureusement nous n'avons jamais réussi à isoler ni observer d'échantillons triphasiques dans cette région. Dans les deux paragraphes suivants, nous allons détailler ces observations et notamment les difficultés d'analyse rencontrées sur ce système pour lequel tous les échantillons apparaissant blancs à l'œil ne sont pas forcément biphasiques et pour lequel tous les échantillons qui donnent un seul réseau de pics de Bragg ne sont pas forcément monophasiques.

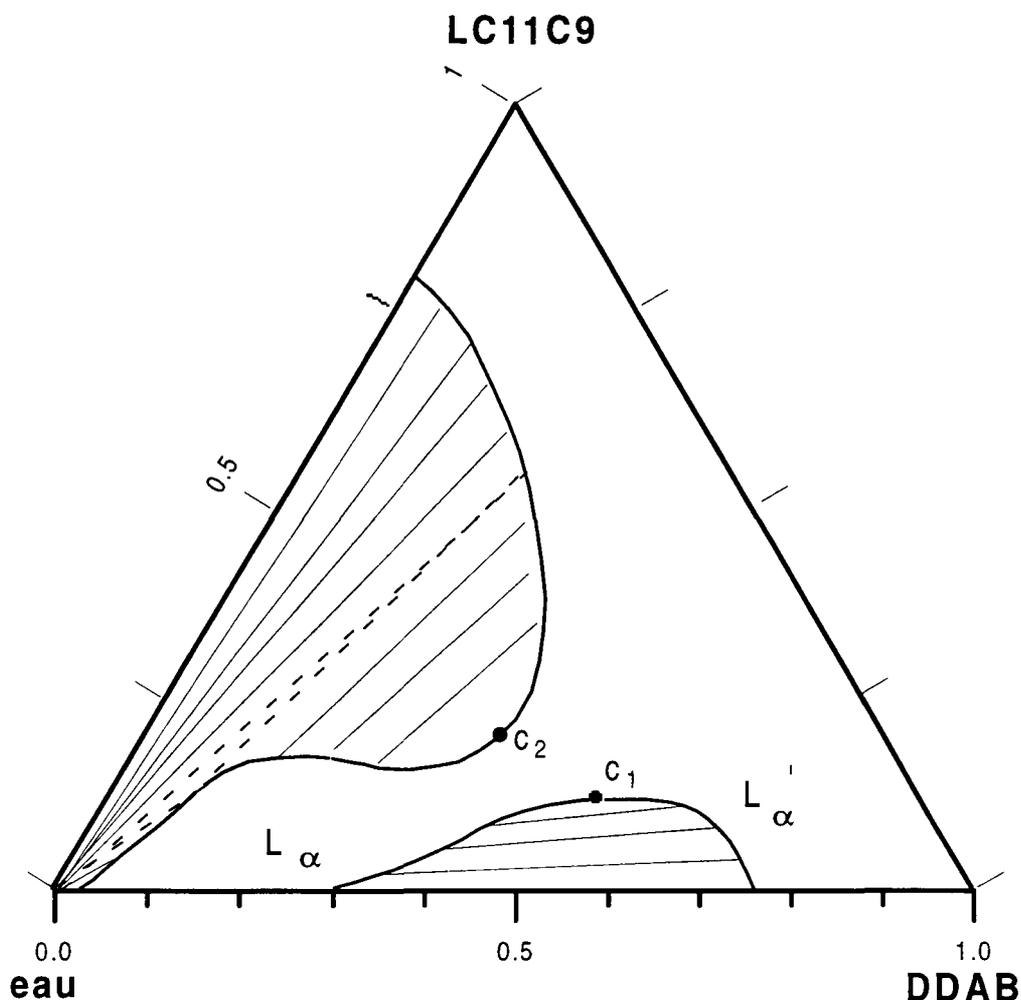


Figure III- 19 : Allure du diagramme de phase ternaire à 25°C pour le système DDAB/LC₁₁C₉. c_1 et c_2 sont les deux points critiques fermant les zones biphasiques lamellaire-lamellaire. Les pointillés indiquent l'existence de la zone triphasique prévue par la règle des phases.

III.B.3.b. Echantillon blanc monophasique

Pour pouvoir affirmer que nous retrouvons un point critique à température ambiante sur l'équilibre L_{α} - L_{α}' nous avons préparé avec la méthode conventionnelle des échantillons à des compositions intermédiaires entre les capillaires à $x_{LC_{11}C_9}=0.14$ et 0.33 . En effet les seuls résultats de l'expérience à l'ESRF ne suffisaient pas à trancher puisque le long de ces deux capillaires nous avons observé des équilibres double-lamellaires. Nous avons eu la surprise d'obtenir des échantillons d'aspect blanc donc apparemment biphasiques mais qui en diffusion centrale de rayons X donnent un spectre caractéristique d'une phase lamellaire monophasique. Sur Figure III- 20 nous avons tracé le spectre à 25°C d'un échantillon à $x_{LC_{11}C_9}=0.2$ et avec 35% en poids d'eau pour lequel on reconnaît deux ordres de raies de Bragg. La période de la phase

lamellaire déduite de la mesure sur le spectre ($D=2\pi/q=39.0\text{\AA}$) correspond à la valeur calculée à partir de la composition initiale ($D=\delta/\phi_{\text{DDAB}+\text{LC11C9}}=39.7\text{\AA}$). Sur la même figure nous avons également tracé le spectre obtenu avec le même échantillon à 58°C . Nous remarquons que la position du pic de Bragg n'a pas bougé alors qu'à l'œil nous avons observé que cet échantillon est complètement translucide à cette température. Nous avons vérifié, en refroidissant et en chauffant plusieurs fois, que ce phénomène est réversible. Une explication possible à ces observations est la présence de défauts dans la phase lamellaire qui rendent l'échantillon blanc à température ambiante (peut être un excès d'eau autour d'oignons multilamellaires ou même l'ouverture des oignons) et qui disparaissent lorsque l'on chauffe sans que cela modifie notablement la période smectique.

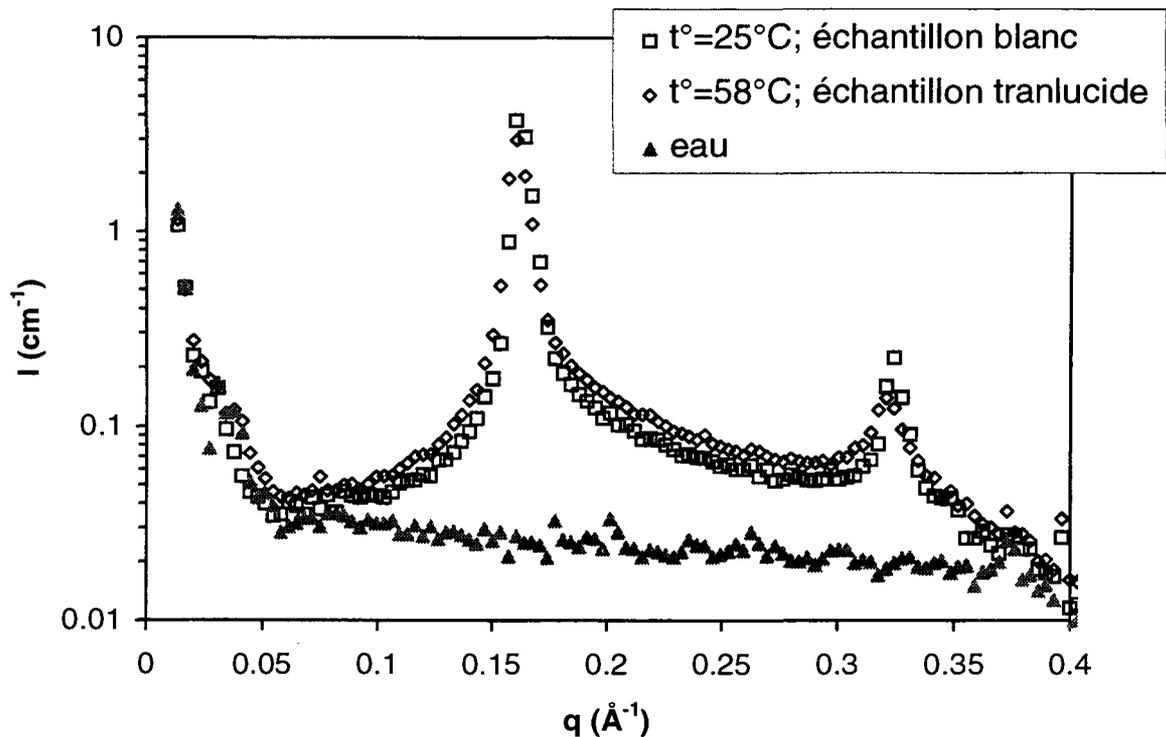


Figure III- 20 : Spectre de diffusion centrale de rayons X à 25 et 58°C d'un échantillon préparé à $x_{\text{LC11C9}}=0.2$ et 35% d'eau en poids. Le spectre de l'eau tracé sur le même graphique démontre que la remontée aux petits angles n'est pas due à l'échantillon.

III.B.3.c. Deuxième point critique - Problème du facteur de forme

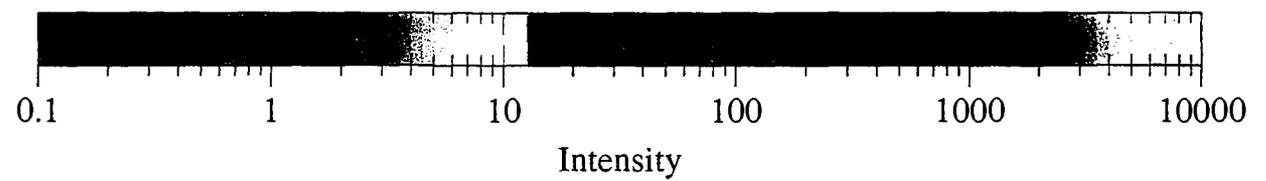
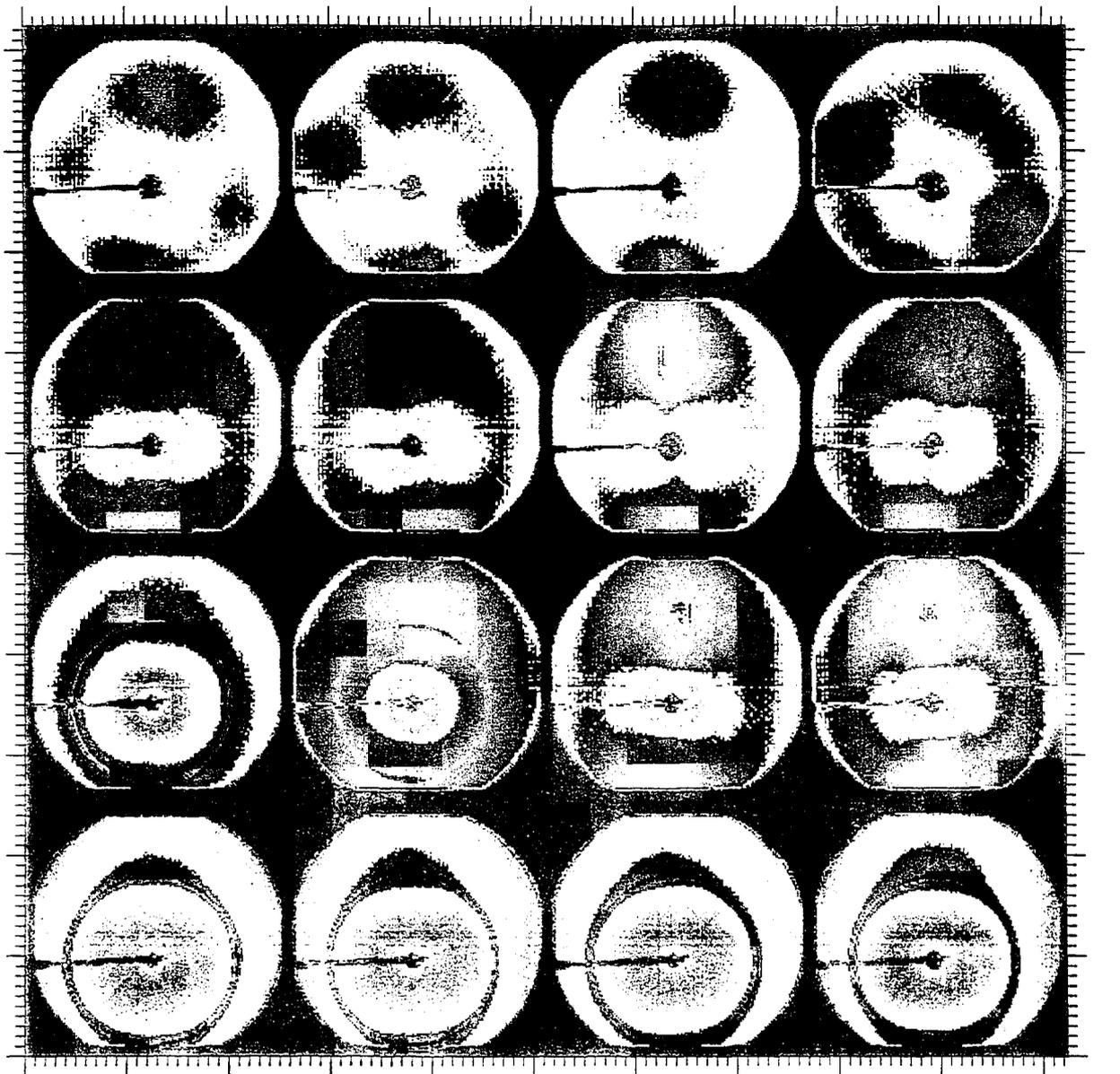


Figure III- 21 : Spectres 2D de diffusion centrale de rayons X obtenu à 25°C le long du capillaire $x_{LC11C9}=0.5$. x varie de 12 à 19.5 mm tous les 0.5mm depuis l'image en bas à gauche jusqu'à celle en haut à droite.

Sur la Figure III- 21 nous présentons la série de spectres obtenus tous les 500 μm à 25°C le long du capillaire préparé à $x_{LC11C9}=0.5$. Sur les cinq premières images nous observons le gonflement de la phase lamellaire concentrée L_{α}' . Sur la sixième image on note l'apparition d'une bosse intense sous le pic de Bragg de la phase L_{α}' . Sur les images suivantes cette bosse devient plus intense que le pic de Bragg qui disparaît complètement. En fait cette bosse de diffusion est due au facteur de forme des bicouches. En effet dans le cas des molécules de glycolipides avec une tête polaire volumineuse le contraste en rayons X a le profil représenté sur la figure suivante d'après [9].

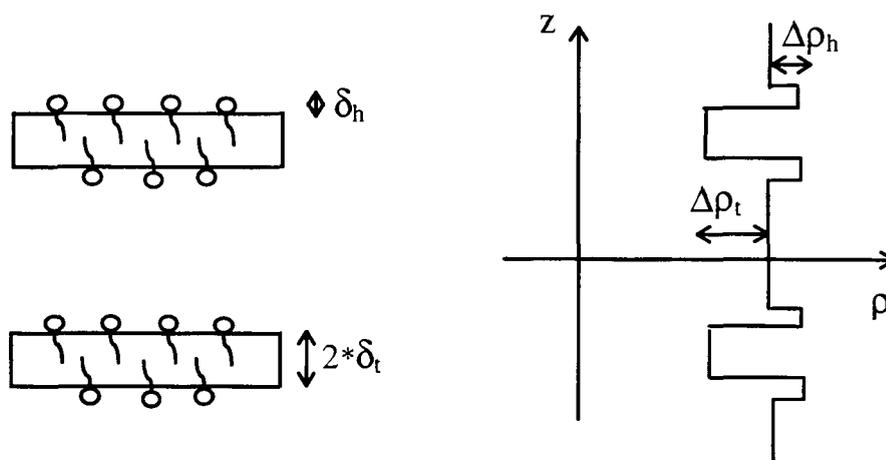


Figure III- 22 : Dessin schématique du profil de densité de longueur de diffusion d'une bicouche en rayons X (d'après [9])

δ_h et δ_t sont respectivement l'épaisseur des têtes polaires et l'épaisseur des chaînes alkyles, $\Delta\rho_h$ et $\Delta\rho_t$ les différences de densité de longueur de diffusion par rapport à H_2O des têtes polaires et des chaînes. Le facteur de forme s'écrit alors:

$$P(q) = \frac{4}{q^2} \left\{ \Delta\rho_h \left[\sin[q(\delta_h + \delta_t)] - \sin(q\delta_t) \right] + \Delta\rho_t \sin(q\delta_t) \right\}^2 \quad (\text{III- 1})$$

Dans le Tableau III- 2 nous avons rassemblé les valeurs numériques pour nos molécules.

	<i>eau</i>	<i>DDAB</i>	<i>LS</i>	<i>LC11C9</i>
$\rho_{\text{head}} (\times 10^{10} \text{ cm}^{-2})$	9.4	20.64	14.77	13.32
$\Delta\rho_{\text{h}} (\times 10^{10} \text{ cm}^{-2})$	0	10.84	5.37	3.92
$\rho_{\text{tail}} (\times 10^{10} \text{ cm}^{-2})$	9.4	7.81	7.76	8.11
$\Delta\rho_{\text{t}} (\times 10^{10} \text{ cm}^{-2})$	0	-1.59	-1.64	-1.29
$\delta_{\text{h}} (\text{\AA})$		1.2	5.4	7
$\delta_{\text{t}} (\text{\AA})$		10.3	4.8	9.5

Tableau III- 2 : Densités de longueur de diffusion en rayons X calculées en utilisant les volumes polaires et apolaires définis au Chapitre II et les épaisseurs calculées en utilisant les surfaces mesurées aussi au Chapitre II.

Toujours d'après le modèle de Nallet et coll. [9] il est possible de calculer théoriquement l'intensité diffusée par une phase lamellaire en tenant compte du facteur de forme $P(q)$ et du facteur de structure $S(q)$. Nous avons repris l'expression donnée dans [9] pour $S(q)$ et calculé ainsi l'intensité diffusée par une phase lamellaire mixte DDAB/LC₁₁C₉ avec $x_{\text{LC11C9}}=0.5$. En plus des paramètres δ_{h} , δ_{t} , $\Delta\rho_{\text{h}}$ et $\Delta\rho_{\text{t}}$ pour $P(q)$, il faut introduire une constante η et D (la période smectique) dans le calcul de $S(q)$. Le résultat de ce paramétrage est tracé en Figure III- 23 pour deux spectres expérimentaux. Il s'agit de bicouches mixtes et les valeurs optimales trouvées pour les différents paramètres sont donnés dans le Tableau III- 3.

	η	$D (\text{\AA})$	$\delta_{\text{h}} (\text{\AA})$	$\delta_{\text{t}} (\text{\AA})$	$\Delta\rho_{\text{h}} (\text{cm}^{-2})$	$\Delta\rho_{\text{t}} (\text{cm}^{-2})$
$x=12\text{mm}$	0.1	42.5	2.3	12	9.7	-1.44
$x=15.5\text{mm}$	0.4	87	2.3	12	9.7	-1.44

Tableau III- 3 : Résultats du paramétrage avec le modèle de Nallet et al. [9] des spectres expérimentaux de la Figure III- 22.

Nous reviendrons plus loin dans la fin de ce chapitre sur la signification et les valeurs trouvées de η . Pour le moment le résultat que nous tirons de cette simulation numérique est qu'avec notre système il est possible que lorsque les pics de Bragg d'une phase lamellaire tombent dans le zéro du facteur de forme et ils ne peuvent plus être observés aux rayons X.

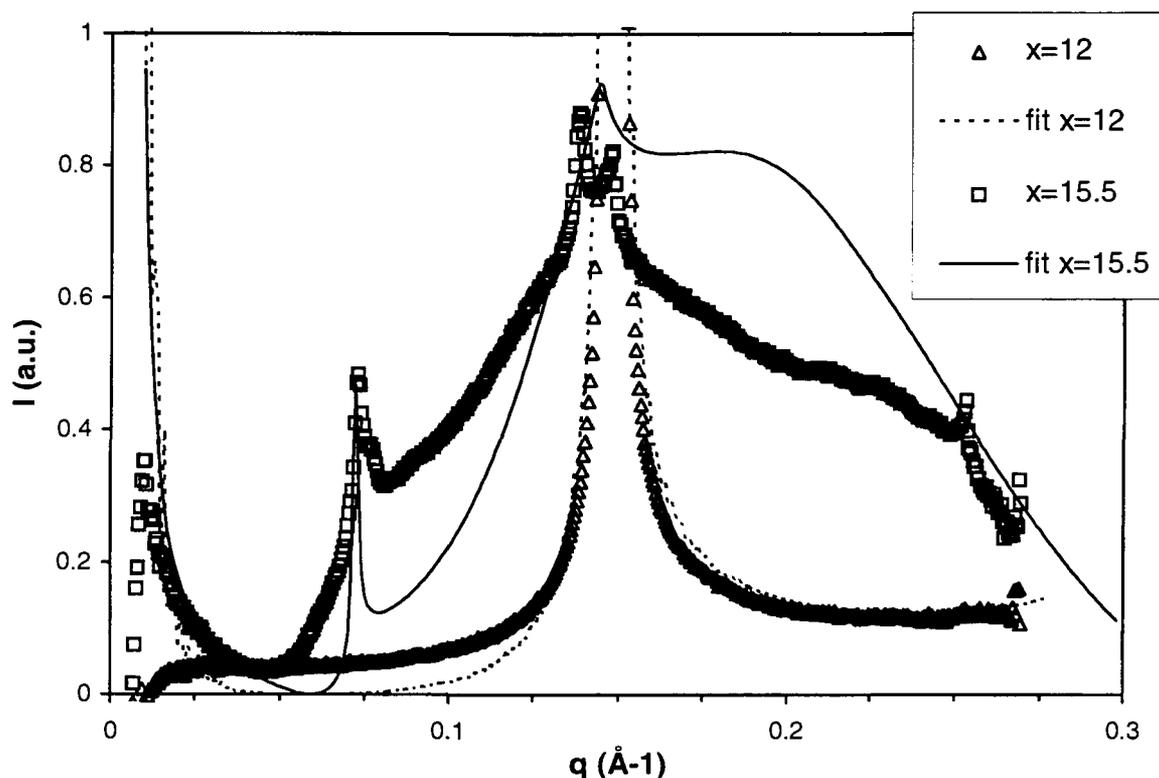


Figure III- 23 : Spectres regroupés obtenus avec le capillaire $x_{LC11C9}=0.5$ à $x=12\text{mm}$ (phase lamellaire collapsée) et à $x=15.5\text{mm}$ (phase lamellaire diluée). Les lignes sont les paramétrages obtenus avec le modèle de Nallet et al. [9]. Les valeurs des paramètres sont données dans le texte.

Pour éclaircir la transition de phase décrite plus haut (cf. Figure III- 20) nous avons préparé un échantillon à $x_{LC11C9}=0.4$ et 54% en poids d'eau. L'échantillon est blanc à température ambiante, mais comme nous l'avons vu au paragraphe précédent nous ne pouvons pas affirmer si l'échantillon est monophasique ou biphasique. Une analyse par diffusion centrale de rayons X au laboratoire et en température a donné les spectres de la Figure III- 24. A 25°C on n'observe qu'un seul pic de Bragg mais la période smectique mesurée, 43.7\AA , est inférieure à celle que donne le calcul à partir des fractions volumiques de tensioactifs, 59.5\AA . Lorsque l'on chauffe on remarque cette fois que le pic se déplace vers les petits angles et à 73°C l'échantillon est transparent biréfringent donc monophasique. La période de cette phase lamellaire correspond alors bien à la fraction volumique initiale de tensioactifs. Ainsi nous avons la preuve que nous avons une zone biphasique de deux phases lamellaires avec certainement une ligne de points critiques en fonction de la température. Mais l'étude de cette coexistence en diffusion de rayons X est rendue difficile par le fait que le pic de Bragg de la phase diluée est annulé par son facteur de forme, comme expliqué théoriquement plus haut.

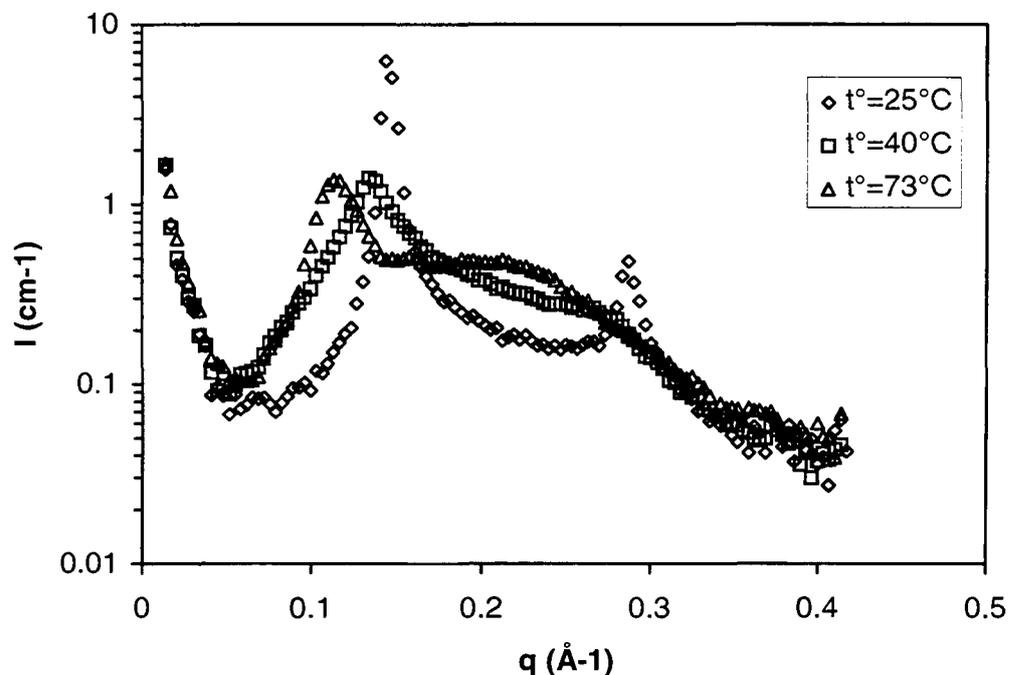


Figure III- 24 : Spectres de diffusion centrale de rayons X d'un échantillon préparé à $x_{LC11C9}=0.4$ et 56% d'eau en poids. A 25°C on n'observe qu'une série de pics de Bragg alors que l'échantillon est biphasique double-lamellaire : c'est le facteur de forme qui annule la deuxième série, plus diluée.

III.B.3.d. Allure du prisme en température

A partir des résultats en température obtenus à l'ESRF et sur le banc de rayons X du laboratoire, ainsi que des résultats de diffusion de neutrons que nous détaillerons au paragraphe III.C.2.b, il nous est possible de tracer l'allure du diagramme de phases en température, pour la partie concentrée. Au paragraphe précédent, III.B.3.c, nous avons vu qu'un échantillon préparé dans la deuxième zone de démixtion devient monophasique vers 73°C. De même nous verrons au paragraphe III.C.2.b qu'un échantillon dans la première zone de démixtion a sa transition de phase biphasique-monophasique vers 61°C. Par contre à l'ESRF nous n'avons pas dépassé 65°C et nous n'avons pas observé de grandes différences par rapport à 25°C. Sur la Figure III- 25 nous avons tracé le prisme en température entre 25 et 65°C. L'effet de la température est donc de refermer les deux zones de démixtion entre deux phases lamellaires, comme dans le cas du DDAB pur [10] ou du système DDAB/LS vu au paragraphe III.B.2.b . Il faudrait sans doute chauffer

plus pour faire disparaître complètement ces zones et faire apparaître des points critiques à haute température.

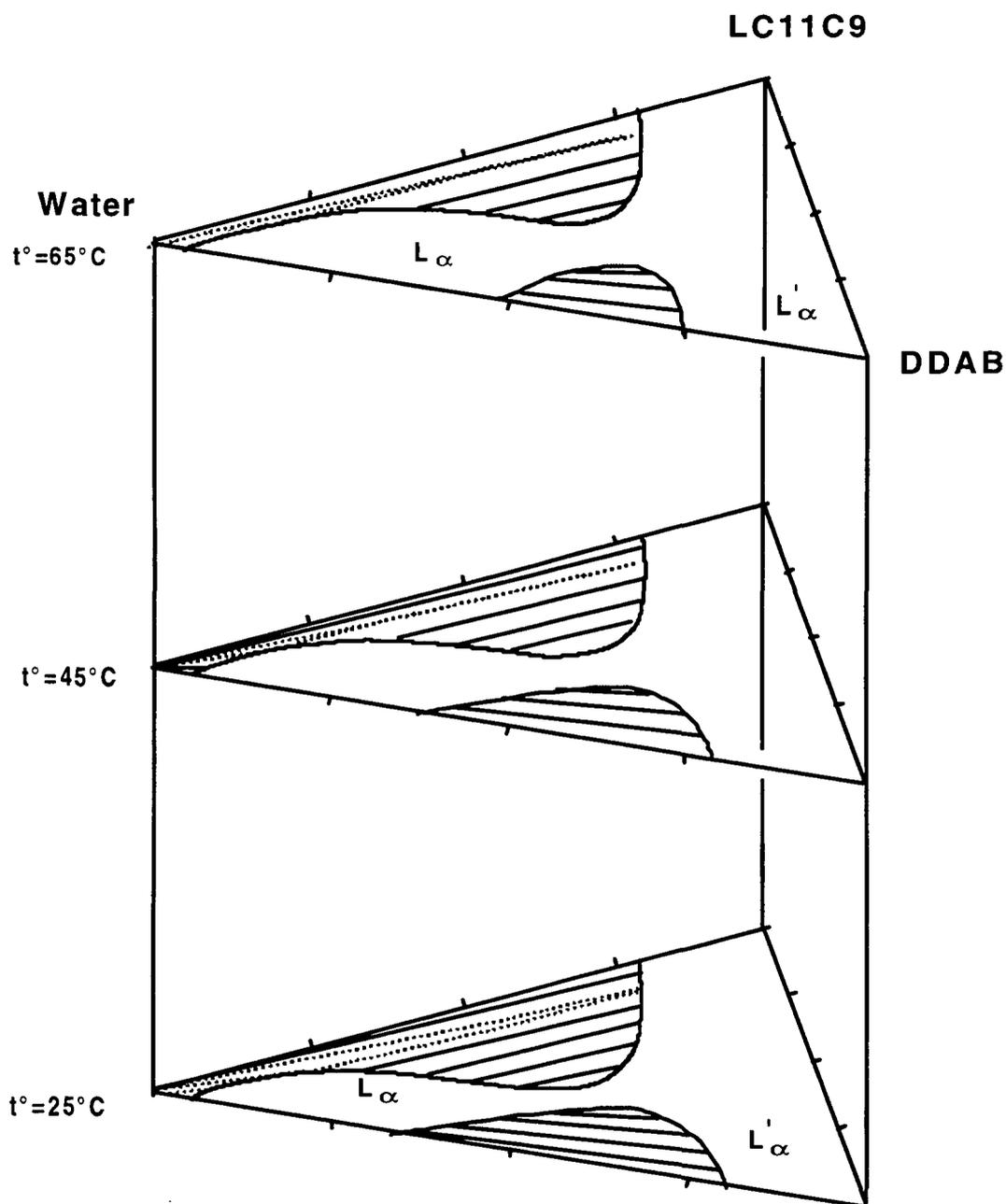


Figure III- 25 : Allure du prisme des phases du système DDAB/LC₁₁C₉.

III.C. Discussion

III.C.1. Comparaison entre les deux glycolipides

A partir des résultats des deux diagrammes de phases précédents, il est possible d'établir une comparaison sur les effets du LS et du LC₁₁C₉ sur les phases de DDAB.

Tout d'abord, dans la partie riche en DDAB, nous constatons que l'addition des deux molécules a le même effet : celui de fermer le trou de miscibilité entre les phases L_α et L_α'. Dans les deux cas nous observons un point critique autour d'une fraction molaire de 0.18±0.02. De même, la température de la transition du régime biphasique au régime monophasique diminue en présence des deux glycolipides avec des ordres de grandeurs comparables. Ceci prouve qu'à faible fraction molaire, l'effet du glycolipide est lié à sa tête polaire et non pas aux chaînes hydrophobes ou au volume total qui sont différents pour les deux molécules étudiées. Dans le chapitre suivant, nous détaillerons les interactions possibles mises en jeu pour expliquer ce comportement de phases.

Par contre au delà de $x_{GL}=0.33$, les comportements sont différents. Dans le cas du LS la géométrie de la molécule induit une succession de phases pour lesquelles la courbure spontanée du film de tensioactif passe de zéro (dans la phase lamellaire) à une courbure vers l'huile (phase hexagonale). En effet, si l'on reprend la théorie géométrique déjà discutée au chapitre II [11] et que l'on suppose que les tensioactifs DDAB et LS sont mélangés de manière homogène, on trouve par exemple qu'à 50% de DDAB et 50% de LS le paramètre géométrique vaut 0.6. Donc à cette fraction molaire de LS, le système va plutôt former une phase cubique bicontinue qu'une phase lamellaire, comme cela a été observé sur le diagramme de phase. De même à 80% de LS, $p \sim 0.4$ donc on se rapproche de la géométrie hexagonale. Sur la Figure III- 26 nous avons tracé l'évolution de p en fonction de la fraction molaire de glycolipide en faisant la moyenne algébrique des volumes apolaires, des surfaces et des longueurs de chaînes des deux molécules DDAB et glycolipide en supposant que le mélange est homogène. Pour les longueurs de chaînes, plutôt que de prendre la valeur maximale de Tanford, nous avons utilisé les valeurs expérimentales de diffusion de rayons X : $l_c=11\text{Å}$ pour le DDAB ; $l_c=15.4\text{Å}$ pour le LS et $l_c=9.5\text{Å}$ pour le LC₁₁C₉. Ainsi on trouve que dans le cas DDAB/LS p varie continûment de

1 à 0.33 tandis que pour le cas $LC_{11}C_9$ il n'y a pas de variation. Il n'est donc pas étonnant de n'avoir sur le diagramme de phase $DDAB/LC_{11}C_9$ que des phases lamellaires, tandis que la présence du LS induit une structure cubique.

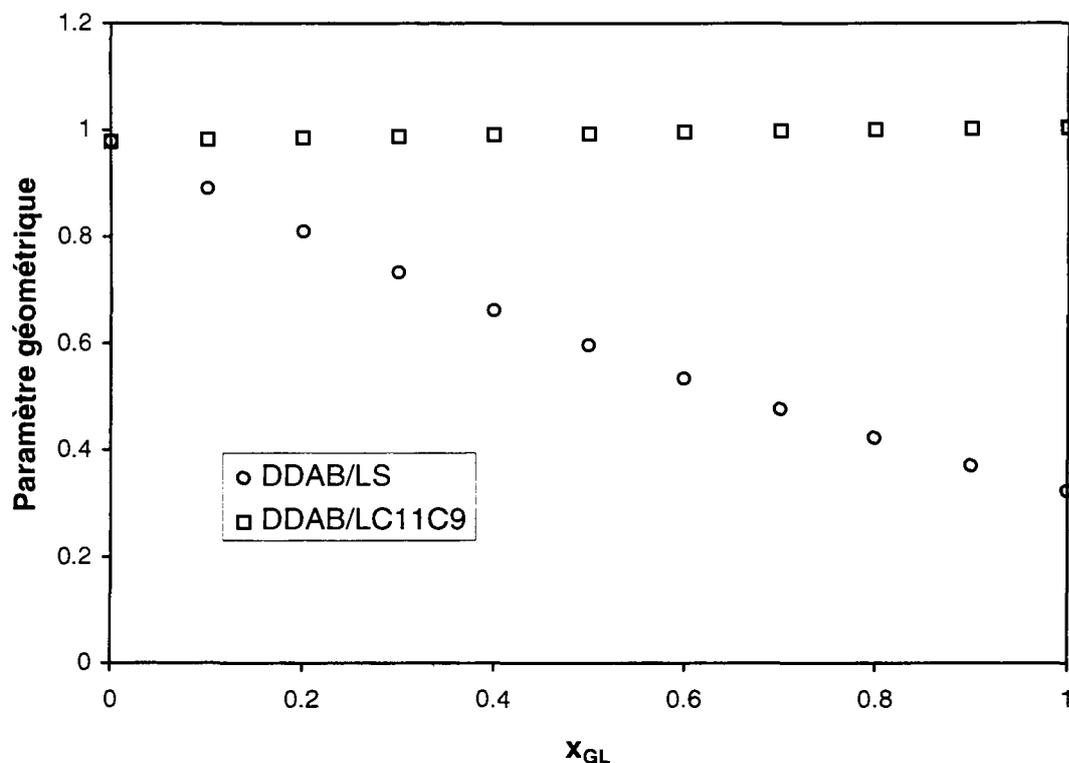


Figure III- 26 : Evolution du paramètre géométrique $p=V_{apol}/sl_c$ en fonction de la fraction molaire de glycolipide dans les systèmes $DDAB/LS$ et $DDAB/LC_{11}C_9$.

III.C.2. Analyse des profils de raies

D'autre part, nous nous sommes intéressés aux profils des spectres obtenus par les techniques de diffusion aux petits angles. Il est théoriquement possible d'obtenir, en plus des informations structurales que nous avons utilisées pour construire les diagrammes de phases, des informations thermodynamiques sur les phases lamellaires [12].

En effet l'origine du signal de diffusion est liée aux fluctuations de concentrations et aux fluctuations de déplacement des couches induites thermiquement. Comme il existe un couplage entre ces deux fluctuations, la densité d'énergie libre d'une phase L_α

peut s'écrire par analogie avec un smectique A incompressible et d'après la théorie de Landau- de Gennes [13] :

$$f = f_{\text{eq}} + \frac{1}{2} \left[\bar{B} \left(\frac{\partial u}{\partial z} \right)^2 + K \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} \right)^2 \right] \quad (\text{III- 3})$$

f_{eq} est la densité d'énergie libre du système à l'équilibre, c'est à dire $f_{\text{eq}} = V(D)/D$ où D est la période smectique et $V(D)$ le potentiel d'interaction entre les membranes. u représente le déplacement des bicouches par rapport à leur position d'équilibre. \bar{B} et K sont respectivement le module de compression des couches à potentiel chimique du tensioactif constant et le module d'élasticité de courbure. \bar{B} rend compte d'une déformation perpendiculairement aux bicouches (suivant z) en faisant l'hypothèse de bicouches incompressibles i.e. dont l'épaisseur ne varie pas pendant la déformation. Sachant que la pression osmotique s'exprime selon :

$$\Pi = - \frac{\partial f}{\partial D} \quad (\text{III- 4})$$

on peut écrire :

$$\bar{B} = -D^2 \frac{\partial^2 f}{\partial D^2} = -D \frac{\partial \Pi}{\partial D} \quad (\text{III- 5})$$

c'est-à-dire \bar{B} est l'inverse de la compressibilité osmotique.

Dans l'hypothèse de fluctuations harmoniques ($u \ll D$) et en appliquant le théorème d'équipartition, la moyenne thermodynamique de ces fluctuations s'exprime selon

$$\langle u(q)u(q)^* \rangle = \frac{kT}{Bq_z^2 + Kq_{\perp}^4} \quad (\text{III- 6})$$

q_z est la projection du vecteur d'onde q selon l'axe normal aux bicouches et q_{\perp} la projection sur le plan des bicouches.

A partir de l'expression ci-dessus, il est possible d'exprimer la densité de longueur de diffusion $\rho(r)$ qui intervient dans le calcul de l'intensité diffusée par la phase lamellaire :

$$I(q) = V \int e^{iq \cdot r} \cdot \rho(r) \cdot d^3r \quad (\text{III- 7})$$

Caillé [14] a le premier effectué ces calculs en considérant des fluctuations u gaussiennes, fonctions des coordonnées transverses x, y , et en négligeant l'épaisseur des membranes. Il a ainsi pu rendre compte de la diffusion autour des pics de Bragg et de

celle anisotrope aux petits angles. Notamment pour une phase smectique orientée, l'intensité autour de la position de Bragg q_0 s'exprime sous la forme de lois de puissance et non plus seulement d'une fonction de Dirac :

$$I(q_z, q_{\perp} = 0) \propto |q_z - q_0|^{-2+\eta} \quad (\text{III- 8})$$

$$I(q_z = q_0, q_{\perp}) \propto |q_{\perp} - q_0|^{-4+2\eta} \quad (\text{III- 9})$$

La constante η , appelée aussi constante de Caillé, s'exprime en fonction des constantes élastiques des bicouches [14] :

$$\eta = \frac{m^2 q_0^2 kT}{8\pi\sqrt{KB}} \quad (\text{III- 10})$$

avec m l'ordre du pic.

Expérimentalement, le profil longitudinal a été vérifié par Als-Nielsen *et al.* [15] sur la phase smectique A de l'octyloxy-cyanobiphényle. Roux et Safinya ont également observé par une analyse en haute résolution de rayons X le comportement en loi de puissance du facteur de structure d'une phase lamellaire de SDS/eau/pentanol/dodécane [16]. Ils ont prouvé que l'exposant η est bien lié aux interactions entre les membranes [16, 17]. Ainsi dans le cas où les interactions d'ondulations sont dominantes, ils ont vérifié la relation prédite par Helfrich :

$$\eta = 1.33 \left(1 - \frac{\delta}{D} \right)^2 \quad (\text{III- 11})$$

avec δ l'épaisseur de bicouche.

Le modèle plus complet proposé par Nallet *et al.* [9] tient compte également du facteur de forme tout en ne considérant que des fluctuations thermiques indépendantes des coordonnées transverses x, y . Il tient compte aussi de la résolution d'appareil et de la moyenne de poudre à effectuer pour reproduire des expériences sur des échantillons non orientés. C'est avec ce modèle que nous avons paramétré nos spectres au paragraphe III-B-3-c. La constante η qui intervient dans les équations est aussi la constante de Caillé définie par l'équation III-10. En fait ce modèle prédit une diffusion autour du pic de Bragg de la forme

$$I(q) \propto |q - q_0|^{-1+\eta} \quad (\text{III- 12})$$

qui correspond à la moyenne de poudre des expressions trouvées par Caillé, moyennant certaines approximations [18].

Récemment Lei *et al.* [19] ont proposé un modèle harmonique discret qui considère la phase lamellaire non plus comme un milieu continu mais bien comme l'alternance de

membranes et de solvant et qui tient compte des corrélations d'une bicouche à l'autre pour les fluctuations. Ils prédisent en plus de la diffusion trouvée par Caillé une diffusion en q_z^{-2} autour du pic de Bragg et aux petits angles.

III.C.2.a. Résultats sur les spectres aux rayons X

En analysant les spectres obtenus à l'ESRF, nous avons cherché si l'ajout des glycolipides dans la membrane de DDAB modifiait ses paramètres élastiques, ce qui dans tous les cas doit se traduire par un élargissement des pics quand les fluctuations augmentent.

Sur la Figure III- 27 nous avons tracé trois profils de raies de Bragg à des gonflements identiques ($\sim 100\text{\AA}$) pour trois fractions molaires x_{LS} différentes : 0, 0.1 et 0.33. Les spectres sont tracés en coordonnées réduites I/I_{bragg} en fonction de $q-q_{Bragg}$. En fait nous n'observons aucun élargissement des pics qui serait lié à l'augmentation de η avec l'ajout du glycolipide. Pour $x_{LS}=0.33$ nous commençons à observer le facteur de forme qui apparaît sous le facteur de structure. Cet effet empêche de faire une analyse correcte du profil de raie pour des fractions plus grande de LS car un éventuel élargissement peut être dû aussi bien à une diminution de la rigidité des membranes qu'à une variation du facteur de forme.

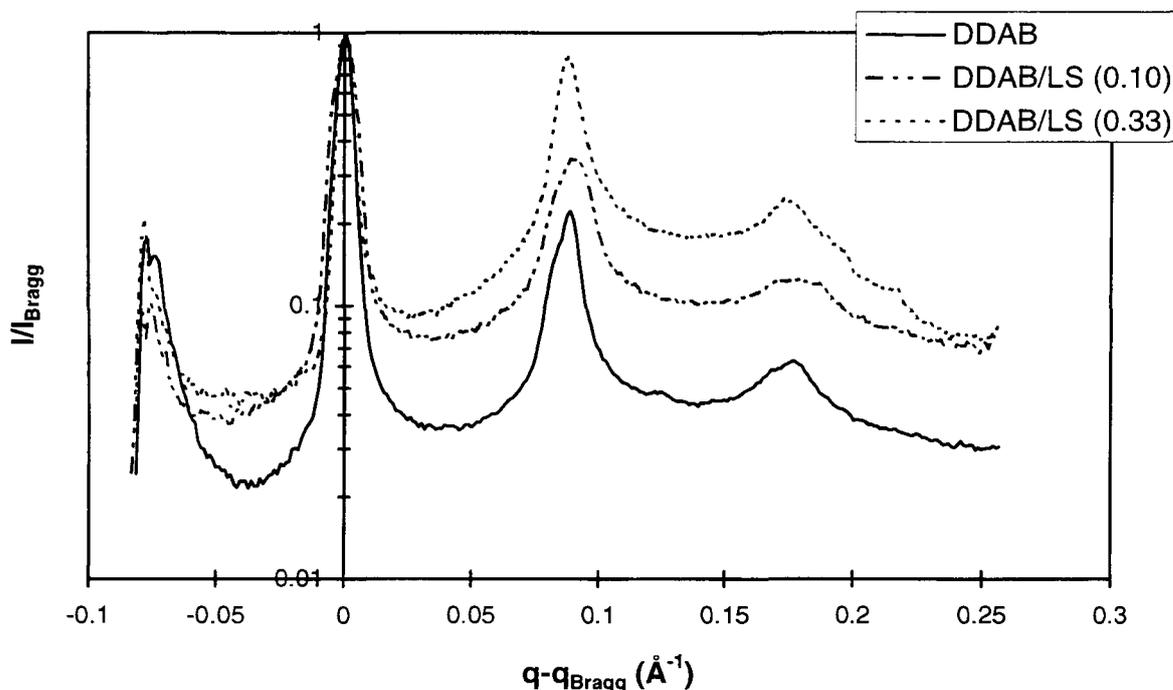


Figure III- 27 : Profils de raies de Bragg d'échantillons à différentes fractions molaires de LS. Les spectres sont tirés de l'expérience réalisée à l'ESRF.

De même, avec le N-lauroyl N-nonyl Lactitol, nous avons tracé sur la Figure III- 28 les profils de Bragg pour les phases lamellaires concentrées (80% en poids) à toutes les fractions de LC₁₁C₉. Là non plus, à dilution égale, nous n'observons pas d'élargissement systématique des raies en fonction de l'ajout de LC₁₁C₉. Donc, dans la partie théorique, nous négligerons les forces de type Helfrich dans les systèmes ternaires comme nous l'avons fait pour le système binaire DDAB/eau.

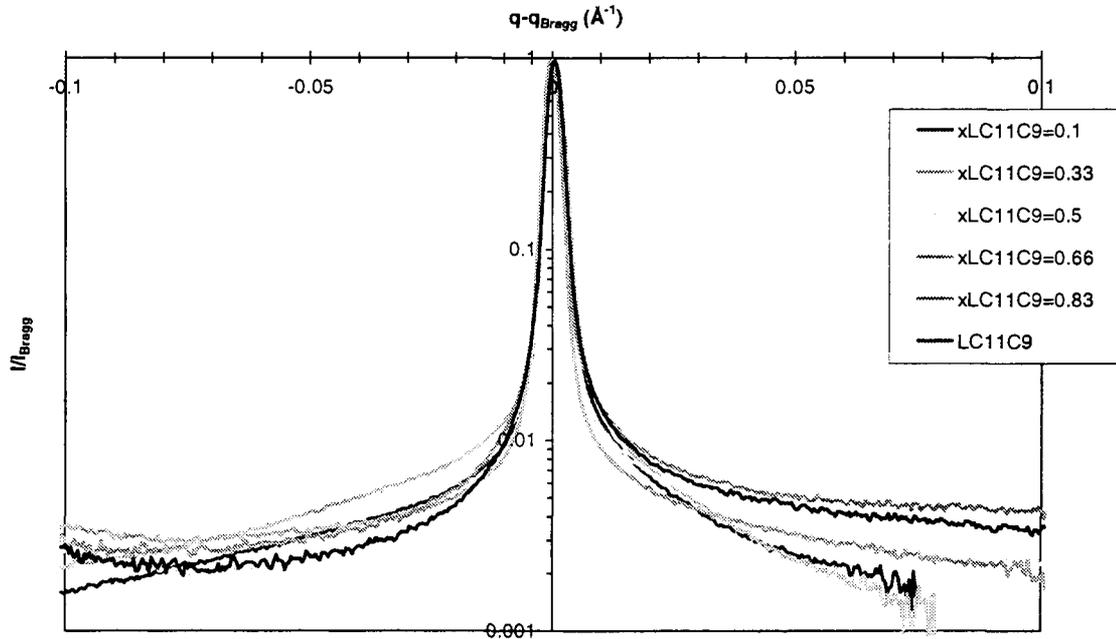


Figure III- 28 : Profil de raies de Bragg d'échantillons à différentes fractions molaires de $LC_{11}C_9$. Les spectres sont tirés de l'expérience réalisée à l'ESRF

III.C.2.b. Résultats de diffusion de neutrons aux petits angles sur des échantillons orientés

Pour caractériser l'effet du glycolipide sur les phases lamellaires de DDAB nous avons également réalisé des expériences d'analyse de raies de Bragg par diffusion de neutrons aux petits angles sur des échantillons orientés au voisinage du point critique $L_{\alpha}-L_{\alpha}'$.

Les expériences ont été réalisées sur le spectromètre PAXE au Laboratoire Léon Brillouin à Saclay. Nous avons travaillé à une longueur d'onde de 4.5\AA et à une distance échantillon-détecteur de 1.80m. La gamme de vecteur d'onde est donc $0.03-0.25\text{\AA}^{-1}$ avec une incertitude mesurée Δq de $8 \times 10^{-3}\text{\AA}^{-1}$ entre chaque pixel. La résolution pour les pics de Bragg autour de 0.16\AA^{-1} est donc de 5%.

Pour essayer d'améliorer cette résolution d'appareil qui est donc beaucoup moins grande qu'en rayons X ($\Delta q=3.5 \times 10^{-3}\text{\AA}^{-1}$ sur le montage haut-flux au laboratoire, $\Delta q=4.5 \times 10^{-4}\text{\AA}^{-1}$ à l'ESRF sur ID2) nous avons essayé de travailler en temps de vol pour notre analyse de raie. Le principe consiste à utiliser le faisceau blanc de neutrons, c'est-à-dire avec toutes les longueurs d'onde. On enlève le sélecteur de longueur de d'onde et

on place juste avant l'échantillon un "chopper" (un disque métallique percé d'une fente) qui permet d'envoyer des "paquets" de neutrons à un temps t donné. La détection est synchronisée sur le top du chopper pour n'enregistrer que les neutrons d'un paquet à la fois et faire une analyse dans l'espace et dans le temps. Plus de détails expérimentaux sont donnés dans l'Annexe 2.

Sur la Figure III- 29, nous comparons les spectres de phase lamellaire L_α de DDAB obtenus en temps de vol et en détection XY classique : la technique temps de vol permet d'obtenir beaucoup plus de points sur le pic et on remarque que les formes des deux pics sont différentes. Cependant la largeur à mi-hauteur est la même dans les deux cas, égale à 20%. Par la suite nous avons travaillé en XY, sachant que l'acquisition en temps de vol nécessite de l'ordre de 50 fois plus de temps qu'en XY pour obtenir un spectre.

Avec le sélecteur et le chopper utilisés en même temps, nous avons pu mesurer la distribution exacte en longueur d'onde autour de 4.5\AA . Le résultat est tracé sur la Figure III- 30. Pour paramétrer la courbe nous avons utilisé une distribution gaussienne de la forme

$$F = A_0 \exp\left[\frac{-(\lambda - \lambda_0)^2}{2(2\sigma)^2}\right] \quad (\text{III- 13})$$

avec $\lambda_0=4.65\text{\AA}$ et $\sigma=0.117$ ce qui correspond à un $\Delta\lambda/\lambda_0$ de 11.7%. Ramenée au vecteur d'onde, on obtient une incertitude de 1% qui s'ajoute au 3% d'incertitude lié à la taille des cellules du détecteur.

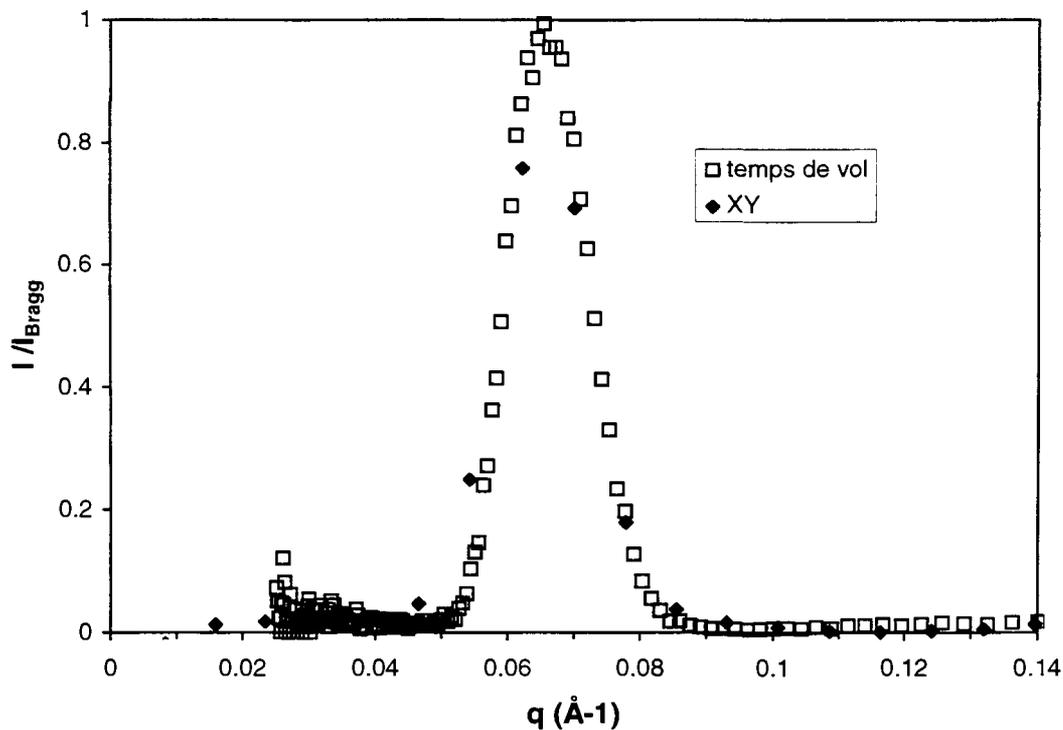


Figure III- 29 : Spectres de diffusion de neutrons aux petits angles de DDAB dans la phase L_α mesurés d'une part en temps de vol et d'autre part en détection XY.

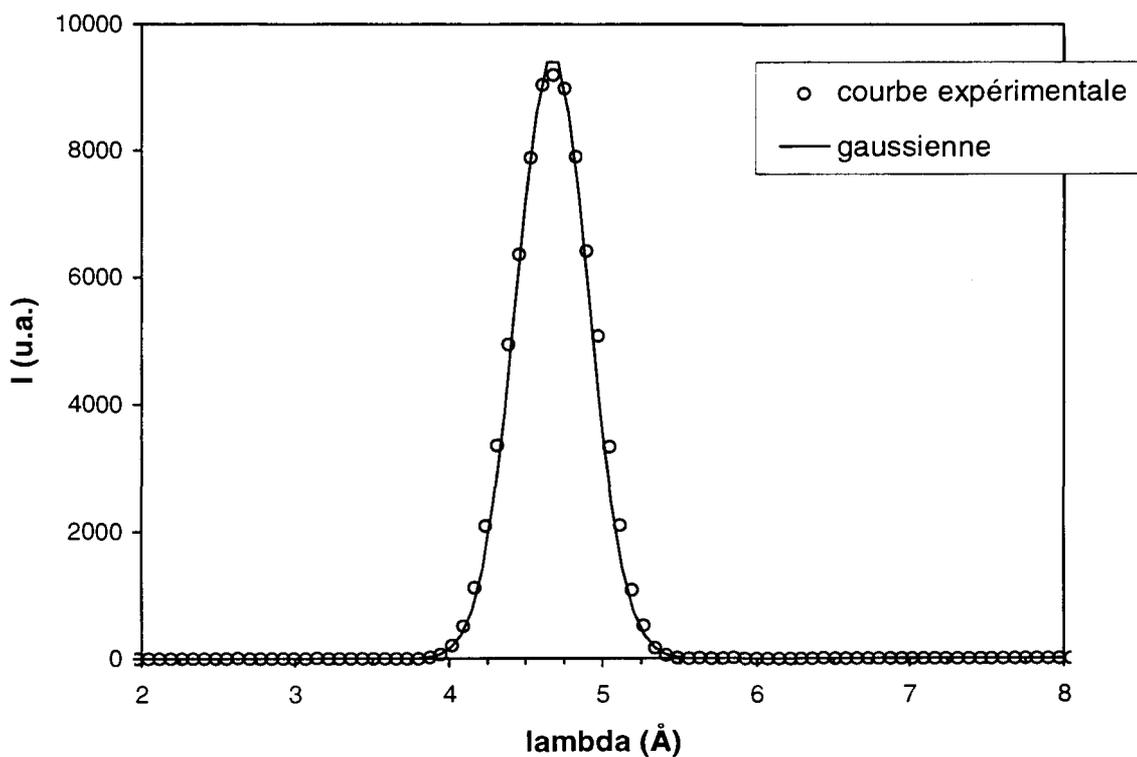


Figure III- 30 : Distribution de la longueur d'onde, sortant du sélecteur, autour de la valeur 4.5\AA sur le spectromètre PAXE mesurée en temps de vol. L'élargissement à mi-hauteur vaut 11.7%.

Pour orienter les phases lamellaires de DDAB nous avons utilisé une cellule thermostatée particulière représentée sur la Figure III- 31. La cellule est composée de deux compartiments : l'un est muni d'un réseau d'une dizaine de lamelles de quartz parallèles les unes aux autres et distantes de 200 μ m environ; l'autre est un réservoir où l'on place la solution au départ. L'échantillon est orienté en chauffant suffisamment la cellule pour faire passer l'échantillon de la phase lamellaire à la phase isotrope liquide puis en basculant la cellule pour faire couler l'échantillon du réservoir au réseau de lamelles de quartz. Cette technique a déjà été utilisée dans la littérature [20]. Comme pour le DDAB, la phase isotrope n'apparaît qu'à 115°C la cellule a été construite en métal avec seulement les fenêtres en quartz pour pouvoir résister à la pression interne due au solvant qui règne à cette température. Pour pouvoir chauffer au dessus de 100°C, cette cellule est mise en contact direct avec des pièces en cuivre parcourues par un circuit d'huile thermostaté tandis que le tout est placé dans une enceinte métallique possédant deux fenêtres de quartz et thermostatée par un circuit d'eau. Ce double thermostat est absolument nécessaire pour pouvoir assurer une précision de $\pm 0.5^\circ\text{C}$ sur tout le volume de l'échantillon.

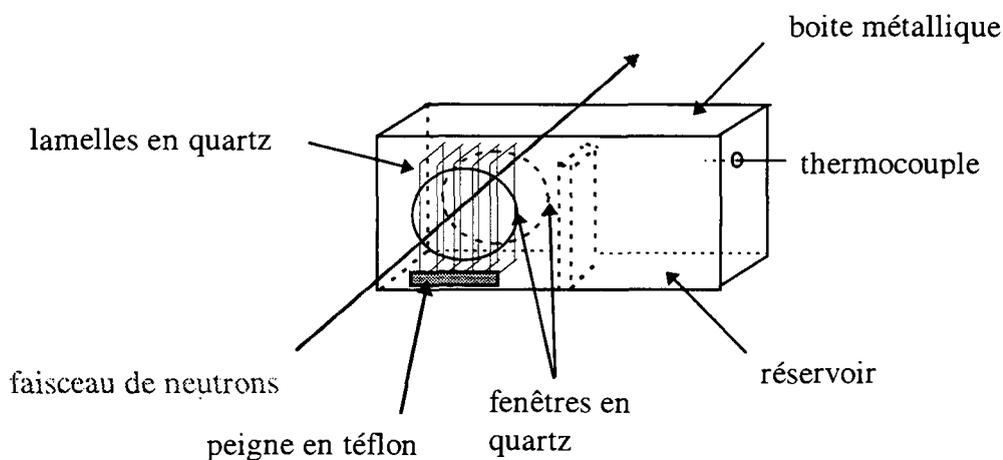


Figure III- 31 : Schéma de la cellule utilisée pour orienter les échantillons en diffusion de neutrons.

Nous avons travaillé sur deux échantillons préparés à 62.2% en poids dans D_2O , l'un de DDAB pur, l'autre contenant 10% de $LC_{11}C_9$ et 90% de DDAB en moles. Ces deux échantillons sont biphasiques "double-lamellaires" à température ambiante. Nous avons pu déterminer avec précision la température de transition entre deux phases lamellaires : nous avons trouvé $T_c=76.2\pm 0.1^\circ C$ pour le DDAB seul et $T_c=61\pm 0.5^\circ C$ pour le mélange à 10% en $LC_{11}C_9$. Nous avons ainsi la confirmation que l'ajout du glycolipide diminue de façon notable cette température de transition. De plus sur la Figure III- 32 nous vérifions que comme pour le DDAB (cf. [10]) nous avons un comportement critique avec une augmentation de la remontée aux petits angles (anisotrope selon q_z) près de la température de transition. Ce signal aux petit angles est dû aux fluctuations de position des bicouches qui augmentent près de la transition de phase.

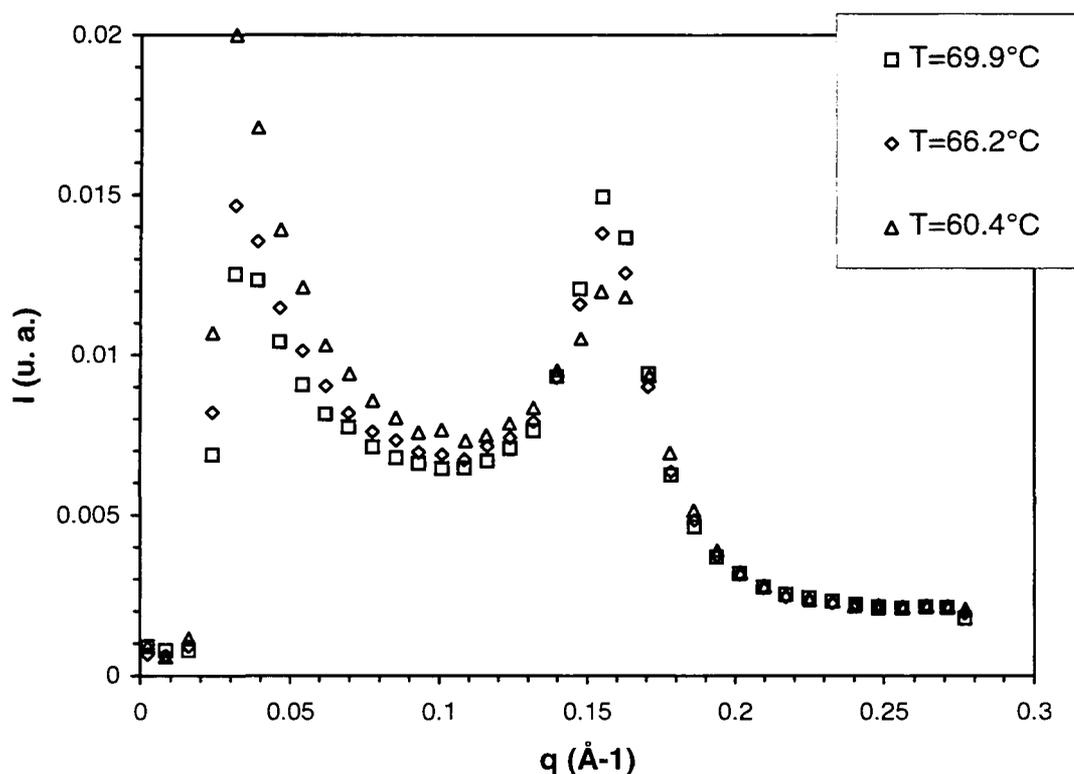


Figure III- 32 : Spectres de diffusion de neutrons à différentes températures d'un échantillon préparé à 62.2% en poids dans D_2O d'un mélange DDAB: $LC_{11}C_9$ avec $x_{LC_{11}C_9}=0.1$. On remarque que l'on s'approche par le haut de la température critique ($61^\circ C$) la remontée aux petits angles augmente.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés au profil des pics avec ou sans glycolipide. Sur la Figure III- 33 sont présentés en trois dimensions les spectres obtenus dans le domaine lamellaire monophasique (vers 95°C) pour le DDAB et le mélange DDAB+LC₁₁C₉. On remarque que l'orientation est bien meilleure pour le DDAB pur, le signal étant 100 fois plus intense selon z que selon x. Nous avons pu faire varier l'intensité relative des deux pics symétriques par rapport au piège en jouant sur l'orientation de la cellule, jusqu'à pratiquement annuler l'un des deux pics. Nous en concluons que la distribution des normales aux plans des bicouches doit être de l'ordre de grandeur de l'angle d'incidence θ , i.e. 6°. Pour le mélange DDAB/LC₁₁C₉ l'orientation est moins bonne, il n'y a qu'un facteur 7 entre les intensités suivant z et x et les deux pics ont toujours été quasi symétriques : la distribution des normales aux plans des bicouches doit être dans ce cas-là supérieure à 6°C.

Sur les Figure III- 34 et III- 35 nous avons tracé en échelle log-log l'allure des ailes des pics de Bragg selon la direction q_z , perpendiculaire aux bicouches et selon q_{\perp} dans le plan des bicouches. La fonction de résolution d'appareil a été tracée en utilisant une distribution gaussienne telle que donnée dans l'équation (III- 13) avec $q_0=0$, $\sigma=0.004$ et $A_0=1$. On remarque qu'elle contribue à la forme du pic en q_z pour les premiers points.

Sur Figure III- 36 nous avons tracé les lignes de niveaux de l'intensité autour du pic de Bragg pour les deux spectres expérimentaux et, à gauche, l'allure que donne les équations asymptotiques de Caillé (III-8) et (III-9).

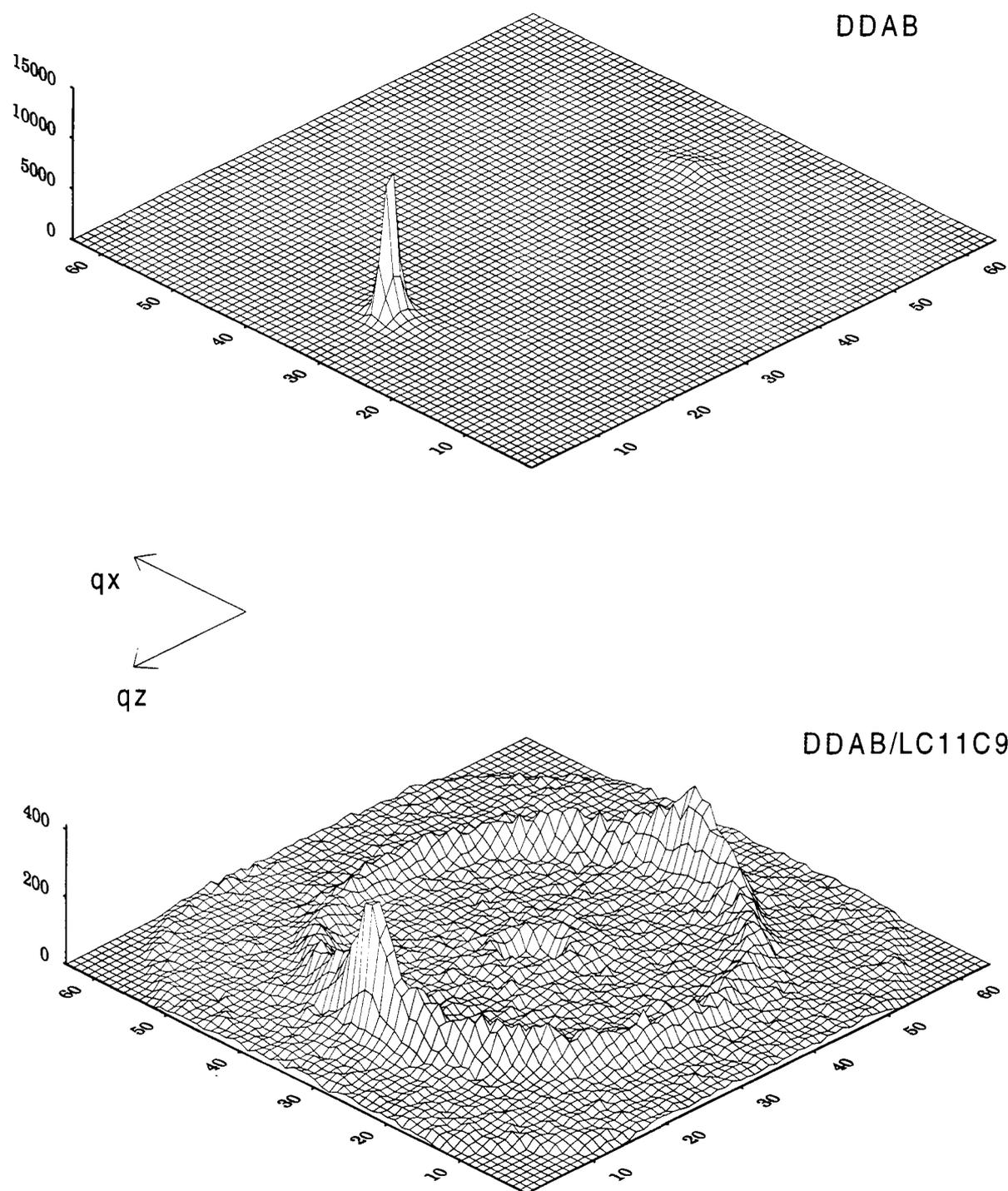


Figure III- 33 : Spectres en 2 dimensions de diffusion de neutrons aux petits angles d'échantillons orientés de DDAB et de DDAB+LC₁₁C₉.

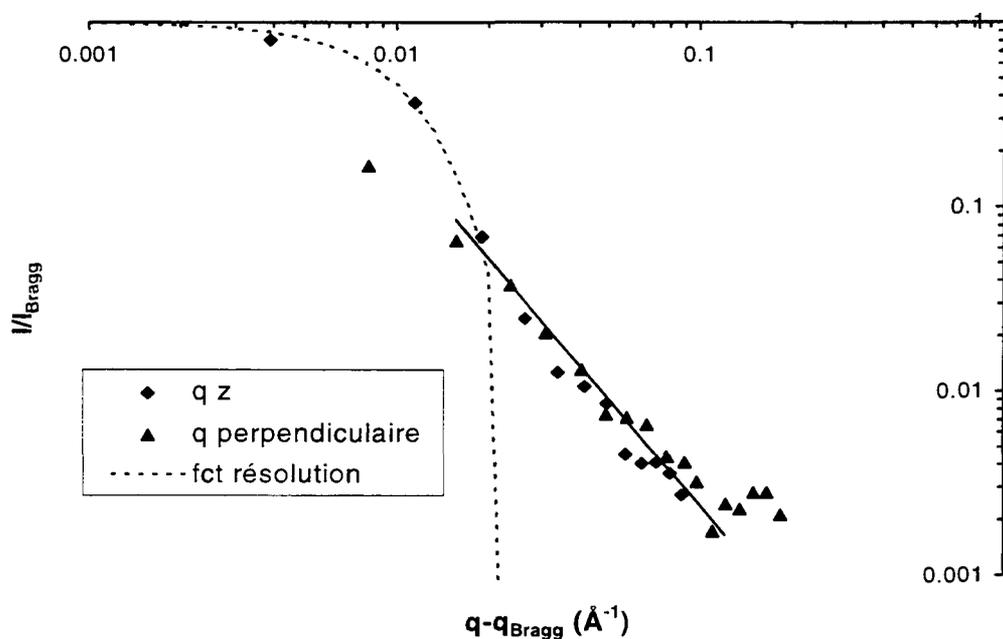


Figure III- 34 : Profils en échelle log-log du pic de Bragg de l'échantillon orienté de DDAB à 62.2% dans D_2O à $96^{\circ}C$. La courbe en pointillé est la fonction de résolution gaussienne. La droite donne la pente asymptotique des profils que l'on trouve égaux en q_z et en q_{\perp} .

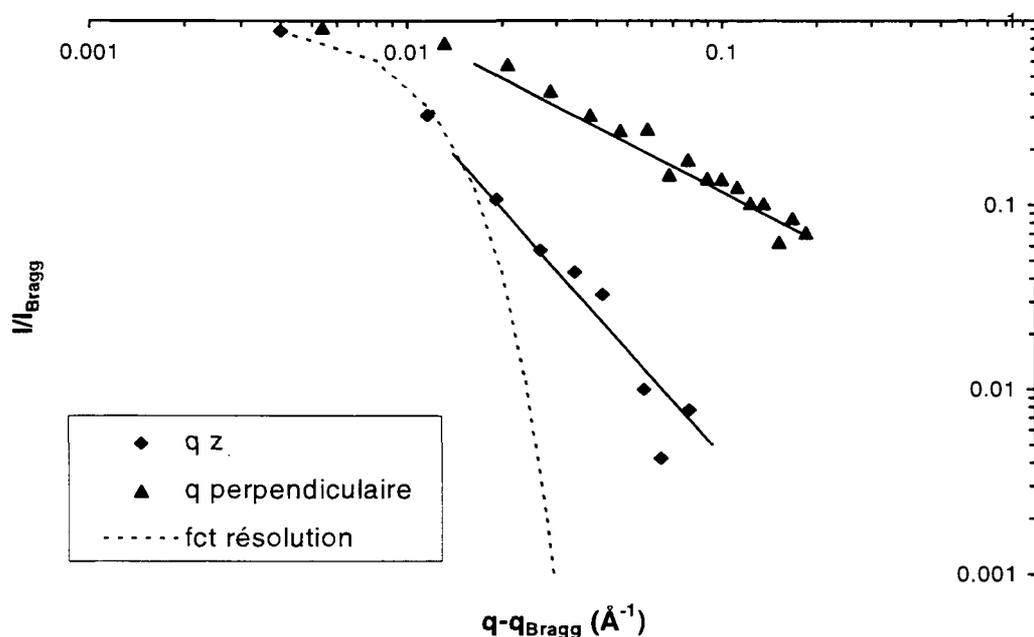


Figure III- 35 : Profils en échelle log-log du pic de Bragg de l'échantillon orienté de DDAB+LC₁₁C₉ à 62.2% dans D_2O à $99^{\circ}C$. La courbe en pointillé est la fonction de résolution gaussienne. Les droites donnent les pentes asymptotiques des profils en q_z et en q_{\perp} .

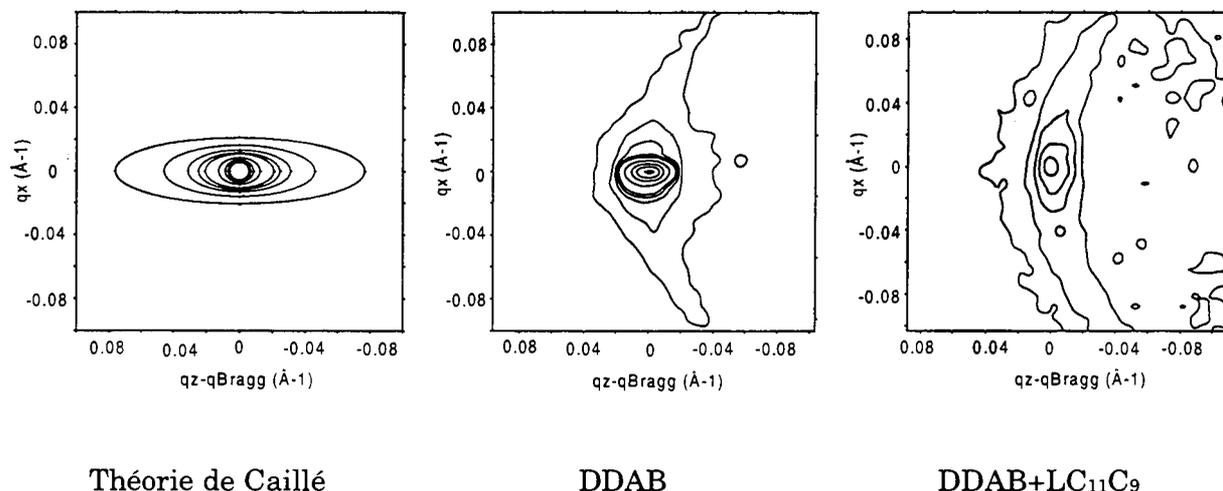


Figure III- 36 : Tracés, à la même échelle en q , des lignes de niveaux du pic de Bragg de la phase lamellaire orientée. Les contours théoriques ont été obtenus en joignant par une ellipse les points obtenus par les lois de puissance (III-8) et (III-9) sur les axes q_x et q_z . Les contours expérimentaux DDAB et DDAB+LC₁₁C₉ sont ceux des spectres de la Figure III-33 après avoir normalisé l'intensité maximale du pic à un. Pour le DDAB et le calcul selon Caillé les lignes sont tracées sur deux décades (1-0.75-0.5-0.25-0.1-0.075-0.05-0.025-0.01) ; pour le mélange DDAB+LC₁₁C₉ sur la première décade seulement (1-0.75-0.5-0.25-0.1)

Pour le DDAB, d'après Figure III- 34, nous trouvons qu'il n'y a pas de différence entre le signal selon q_{\perp} ou selon q_z . Or si on suppose que nous sommes dans la zone du pic de Bragg où les calculs de Caillé sont valides, le pic devrait donc être plus large selon z que selon le plan des bicouches d'après les équations (III-8) et (III-9) et la Figure III-36. La valeur que nous trouvons pour la pente, -1.66 (cf. Tableau III- 4), est plus petite que -1. Donc on ne peut pas non plus appliquer la formule de moyenne de poudre (III-9) en $-1+\eta$: elle donnerait une valeur négative pour η . Finalement, avec la formule (III-8) en $-2+\eta$, η vaudrait donc 0.33, c'est-à-dire correspondant à une bicouche assez "dure".

En fait la théorie de Caillé, ou encore le calcul de la force stérique par Helfrich, suppose que les fluctuations des bicouches ne sont pas corrélées d'une bicouche à l'autre comme représenté sur la Figure III- 37 a). Intuitivement, on comprend que la diffusion due aux fluctuations est principale dans la direction q_z et est liée à \bar{B} . Par contre comme il n'y a pas de domaines corrélés dans les directions autres que q_z ,

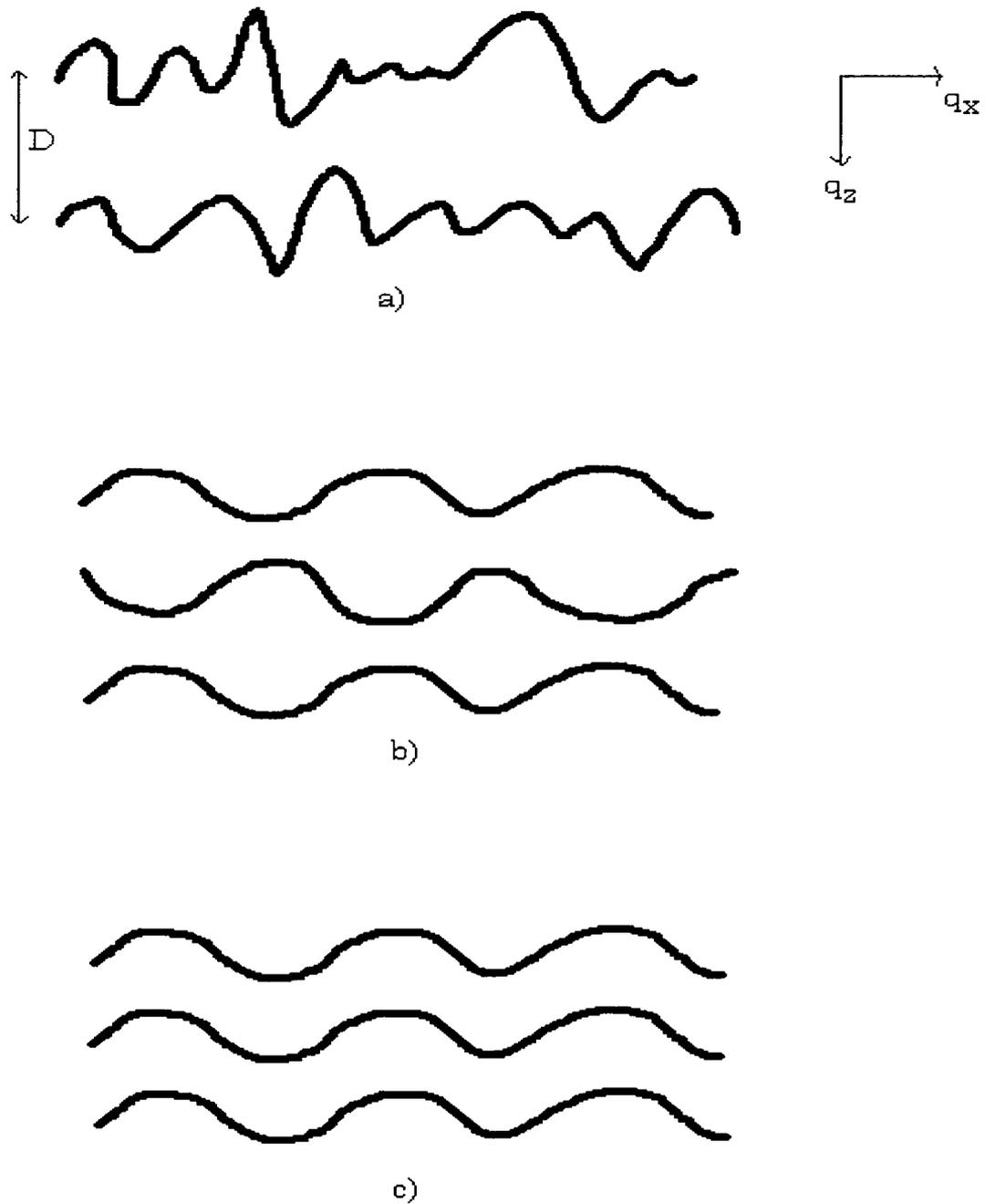


Figure III- 37 : Schématisation des fluctuations de concentration d'un smectique A à deux composants dont l'épaisseur des membranes est constante. a) fluctuations sans corrélations entre les membranes; b) et c) deux modes hydrodynamiques corrélés (d'après [21]): b) le mode barocline; c) le mode d'ondulation.

l'élargissement du signal diffusé est moins grand en q_{\perp} qu'en q_z . Maintenant si on considère qu'il y a des corrélations des oscillations d'une bicouche à l'autre, alors deux cas limites peuvent être envisagés, toujours dans l'hypothèse où l'épaisseur des bicouches reste constante : le premier, Figure III- 37 b) correspond au mode hydrodynamique barocline [21] : les membranes fluctuent en opposition de phase et il n'apparaît toujours pas de domaines corrélés qui puissent donner de la diffusion en dehors de q_z (d'ailleurs dans notre cas de bicouches chargées, ces fluctuations en opposition de phase doivent être négligeables car elles vont coûter trop d'énergie du fait de la répulsion électrostatique). Le deuxième cas, correspond au mode d'ondulation, et fait apparaître dans les directions transverses des domaines corrélés qui donneront lieu à un signal de diffusion donc à une augmentation de la diffusion selon q_{\perp} . Ainsi peut s'expliquer notre observation pour le DDAB d'un profil quasi-symétrique en q_z et en q_{\perp} , lié à la répulsion électrostatique, forte à longue distance.

Pour l'échantillon de DDAB+LC₁₁C₉, nous avons obtenu les profils tracés sur la Figure III- 35. Nous remarquons cette fois qu'il y a une différence entre les deux orientations et que la pente en q_{\perp} est plus grande que celle en q_z . Ceci va dans le sens contraire de la prédiction de Caillé. Nous interprétons cette observation par le fait que le glycolipide augmente les fluctuations des bicouches selon q_{\perp} et pas du tout selon q_z ce qui correspondrait, d'après ce qui a été expliqué plus haut, aux fluctuations du mode d'ondulation sur la Figure III- 37 c). On peut imaginer que les molécules de glycolipides ne sont pas réparties uniformément en surface mais forment des îlots qui donnent ces ondulations aux bicouches. Des études plus précises restent cependant à faire pour confirmer cette hypothèse.

	p (regroupement radial)	$p(q_z)$	$p(q_{\perp})$	η si $p(q_z) = -2 + \eta$
DDAB	-1.57	-1.66	-1.66	0.33
DDAB+LC ₁₁ C ₉	-1.90	-1.74	-0.93	0.25

Tableau III- 4 : Valeurs numériques des coefficients des lois de puissance trouvées pour les profils de pics de Bragg.

III.D. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons établi les diagrammes de phases ternaires des deux systèmes DDAB/LS/eau et DDAB/LC₁₁C₉/eau, en fonction de la température. Pour cela nous avons mis au point et utilisé une méthode en gradient de concentration en capillaire avec marquage au carbone 14 du glycolipide. Nous avons observé que les deux systèmes ont un comportement analogue dans la partie riche en DDAB ($x_{GL} < 0.4$) : dans les deux cas, il y a apparition d'un point critique à température ordinaire, pour une fraction critique $x_{GL} \sim 0.2$, c'est-à-dire la disparition du trou de miscibilité entre les deux phases lamellaires L_{α} et L_{α}' . Lorsque l'on ajoute plus de glycolipide, les deux molécules induisent alors des effets différents : le LS, de part sa courbure spontanée marquée vers l'huile, induit la formation de structures présentant plus de courbure (phases cubiques et hexagonales) ; le LC₁₁C₉, lui, conserve la topologie en bicouches planes. Cependant, l'étude en DNPA sur des échantillons orientés indique qu'il existerait en présence de LC₁₁C₉ des mécanismes d'ondulations dans le plan des membranes plus grands que dans le cas du DDAB pur.

Dans le chapitre suivant, nous allons maintenant nous intéresser plus quantitativement aux interactions liées à la présence des glycolipides dans les membranes. Pour cela nous avons travaillé dans les domaines lamellaires pour lesquels on sait mesurer expérimentalement les pressions osmotiques et donc pour lesquels le bilan des forces en présence est accessible expérimentalement.

Références

- [1] Demé B., Dubois M., Zemb T. and Cabane B. *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 3828-3838
- [2] Laughlin R. G. in *The aqueous phase behavior of surfactants* (1994) Academic Press Inc. Ed.
- [3] Laurence A.S.C. in *Liquids Crystals 2* Ed. G.H. Brown (Gordon&Breach London 1969) vol. 1
- [4] Caffrey M. *Biophys. J.* **55** (1989) 47-52
- [5] Laughlin R. G. and Munyon R. L. *J. Phys. Chem.* **91** (1987) 3299-3305
- [6] Guinier A. in *Théorie et technique de la radiocristallographie* 3^e Ed. (1964) Dunod-Paris
- [7] Longley W. and McIntosh T.J. *Nature* **303** (1983) 612-614
- [8] Barois P., Hyde S., Ninham B. and Dowling T. *Langmuir* **6** (1990) 1136-1140
- [9] Nallet F., Laversanne R. and Roux D. *J. Phys. II France* **3** (1993) 487-502
- [10] Zemb Th., Gazeau D., Dubois M. and Gulik-Krzywicki *Europhysics Letters* **21** (1993) 759-766
- [11] Hyde S.T. *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects* **103** (1995) 227-247
- [12] Roux D., Safinya C. R. and Nallet F. in *Micelles, Membranes, Microemulsions and Monolayers*, chap. 6, Gelbart, Ben-Shaul and Roux Eds. (Springer, 1994)
- [13] de Gennes P.G. *The Physics of Liquids crystals* (1974) Clarendon Oxford Ed.
- [14] Caillé A. *C. R. Hebdo. Acad. Sci. Paris* **B 274** (1972) 891
- [15] Als-Nielsen J., Litster J. D., Birgeneau R. J., Kaplan M., Safinya C. R., Lindegaard-Andersen A. and Mathiesen S. *Phys. Rev.* **B 22** (1980) 312-320
- [16] Safinya C. R., Roux D., Smith G. S., Sinha S. K., Dimon P., Clark N. A. and Bellocq A.M. *Phys. Rev. Lett.* **57** (1986) 2718-2721
- [17] Roux D. and Safinya C. R. *J. Phys. France* **49** (1988) 307-318
- [18] Zhang R., Suter R. M. and Nagle J. F. *Phys Rev E* **50** (1994) 5047-5060
- [19] Lei N., Safinya C. R. and Bruinsma R.F. *J. Phys. II France* **5** (1995) 1155-1163
- [20] Nallet F., Roux D. and Milner S. T. *J. Phys. France* **51** (1990) 2333-2346
- [21] Nallet F., Roux D. and Prost J. *J. Phys. France* **50** (1989) 3147-3165

Chapitre IV

Pressions osmotiques dans les systèmes mixtes lamellaires

Pour obtenir des informations quantitatives sur les interactions spécifiques introduites par les glycolipides dans les membranes, nous avons cherché à mesurer la force agissant entre les membranes, et en particulier dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux équilibres présents en régime concentré.

Plusieurs méthodes expérimentales sont connues pour obtenir cette mesure en fonction des distances de séparation des films moléculaires [1], [2].

Une méthode "directe" est le SFA (Surface Force Apparatus) pour lequel les tensioactifs sont adsorbés sur des feuilles de mica, elles-mêmes collées sur des surfaces cylindriques. Les distances sont déduites, avec une précision de l'ordre de l'Angstroem, par des mesures de franges d'interférence, et les forces par la déflexion d'un système de ressorts. Pour traduire les mesures en géométrie plane il faut utiliser l'approximation de Derjaguin (cf. [2]). Cette technique n'est pas suffisamment précise pour évaluer les pressions à courtes distances ($<10\text{\AA}$). De plus comme les membranes sont immobilisées sur un support, il faut tenir compte, dans le bilan des forces, du fait que l'adsorption des monocouches inhibe leurs ondulations, par rapport à la situation des bicouches libres en solution [3]. Une autre correction à apporter, mais qui ne fait pas l'unanimité, est l'éventuelle contribution du mica sous-jacent dans l'évaluation de l'attraction de van der Waals [4].

L'aspiration par pipette [5], est une autre technique qui permet de déterminer l'élasticité des membranes en mesurant la taille et la forme des vésicules au bout d'une pipette, en fonction de la pression de succion. En mettant au contact deux vésicules ainsi formées on peut également déduire l'énergie d'adhésion.

Pour notre étude nous avons utilisé la méthode de stress osmotique [6] qui permet de mesurer les forces dans les phases lamellaires mais aussi dans d'autres assemblages macromoléculaires. La pression osmotique imposée par l'échantillon sur les molécules d'eau est égale à celle connue d'un réservoir en équilibre thermodynamique avec l'échantillon. Contrairement au SFA, cette méthode permet de mesurer les forces

répulsives à très courte distance. Mais elle ne donne pas d'information directe sur les mécanismes induisant une interaction attractive, car les échantillons sont intrinsèquement instables dès que l'attractif domine. Dans la première partie de ce chapitre nous allons détailler les deux techniques utilisées, avec polymère stressé et avec pression de vapeur, qui n'ont pas les mêmes gammes de mesures utilisables. De plus nous parlerons de la technique de balance de film mince (TFB [7]) qui permet également de mesurer, à l'interface eau-air, la pression de disjonction en fonction de l'épaisseur de film. Les résultats expérimentaux sont ensuite donnés pour le système DDAB/LC₁₁C₉ pour lequel les trois méthodes ont été appliquées. Enfin, en reprenant les calculs déjà développés dans le chapitre I de cette thèse, nous faisons une interprétation théorique de ces résultats de pression ainsi que des diagrammes de phases du chapitre précédent.

IV.A. Méthodes expérimentales

IV.A.1. Stress osmotique avec polymère

Le principe de cette méthode consiste à imposer le potentiel chimique de l'eau dans l'échantillon, via une solution plus ou moins concentrée d'un polymère non-ionique. Pour isoler l'échantillon on utilise une membrane de dialyse semi-perméable, c'est-à-dire qui laisse passer les molécules d'eau mais pas celles du polymère. Si l'espace interlamellaire est prévu d'être, à la pression recherchée, plus petit que le rayon de giration du polymère alors la présence de la membrane de dialyse n'est pas nécessaire. Pour nous il est possible de travailler sans membrane dans la phase L_α' du DDAB. De même, récemment, dans le système C₁₂E₅/hexanol/eau, en compression avec du dextran, Bagger-Jørgensen et Olsson n'ont pas utilisé de membrane semi-perméable pour leur étude [8].

Le montage expérimental est schématisé sur la Figure IV-1. Les membranes de dialyse sont fermées en bas en faisant un noeud, en haut en plaçant un embout ouvert en téflon. Cette ouverture permet d'assurer qu'il n'y a pas de surpression à l'intérieur du sac due à un trop grand gonflement, et permet de prélever une partie de l'échantillon à tout moment.

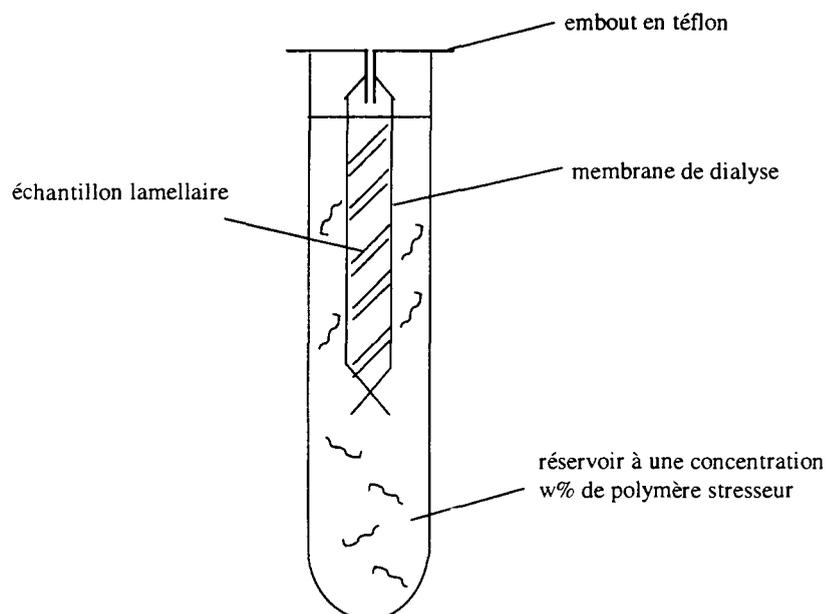


Figure IV- 1 : Schéma du dispositif de stress osmotique.

La valeur de la pression que l'on impose est donnée par des courbes de calibration de la pression osmotique des solutions de polymères. La distance interlamellaire est mesurée par diffusion de rayonnement aux petits angles : les rayons X pour les pressions élevées car les échantillons sont concentrés et la période lamellaire D tombe dans le domaine de vecteur d'onde disponible (pratiquement pour le montage au laboratoire il faut $D < 200 \text{ \AA}$); les neutrons pour les pressions faibles et les échantillons dilués.

Nous avons travaillé avec deux polymères, le dextran 110000 et le PEG 8000. Le premier, un polysaccharide, du fait de son plus gros poids moléculaire permet une meilleure précision sur les pressions faibles tandis que le deuxième a été utilisé pour limiter la viscosité du réservoir, donc la durée d'équilibration, pour les pressions élevées. Cependant avec le PEG nous avons remarqué qu'après plus de deux semaines d'équilibre, le polymère arrive à traverser les membranes, probablement par un phénomène de reptation. Les deux polymères ont été utilisés tels que nous les avons reçus (Fluka), après avoir vérifié au préalable, pour chaque nouveau lot, la distribution en masse par chromatographie GPC.

Avec le dextran nous avons utilisé des membranes Visking (Roth) avec un seuil de coupure à 12000-14000 daltons. Ces membranes se conservent à température ambiante tandis que pour le PEG, nous avons utilisé des membranes Spectra/Por de coupure 1000

daltons qui se conservent au froid. Dans les deux cas, il est nécessaire avant utilisation de mettre à tremper les membranes au moins 48h, dans de l'eau "Millipore" renouvelée plusieurs fois, pour les assouplir et éliminer les impuretés salines (et les agents conservateurs).

Pour le dextran 110000 nous avons utilisé la courbe de calibration déterminée par Cécile Bonnet-Gonnet [9] :

$$w < 10\% \quad \log \Pi(Pa) = 0.385 + 2.185 * w^{0.2436} \quad (IV- 1)$$

$$w > 10\% \quad \log \Pi(Pa) = 0.872 + 1.657 * w^{0.3048} \quad (IV- 2)$$

avec w la fraction massique du polymère en pourcent.

Pour le PEG 8000 nous avons pris [10] :

$$w > 1\% \quad \log \Pi(Pa) = 2.1498 + 1.601 * w^{0.2823} \quad (IV- 3)$$

Avec le dextran, en travaillant entre 1 et 40% en poids, nous avons donc exploré une gamme de pressions comprise entre 300 et 10^6 Pa. Avec le PEG nous sommes montés jusqu'à 50% en poids c'est à dire 10^7 Pa.

IV.A.2. Pression de vapeur saturante

Cette deuxième méthode de stress osmotique consiste à imposer le potentiel de l'eau via des pressions de vapeur variables, imposées par des solutions saturées en sel. En effet une humidité relative p/p_0 imposée au dessus de l'échantillon va créer une pression osmotique effective Π dans l'échantillon égale à :

$$\Pi = \frac{kT}{v_w} \ln \left(\frac{p}{p_0} \right) \quad (IV- 4)$$

avec v_w le volume moléculaire de l'eau, pris égal à $30 \times 10^{-30} \text{ m}^3$.

La valeur de l'humidité relative imposée par une solution saturée en sel est tabulée pour un grand nombre de sels [11]. Nous avons choisi de travailler avec cinq d'entre eux dont la liste et les valeurs de p/p_0 sont données dans le Tableau IV-1. La gamme de pressions étudiée recouvre donc sur deux points les données en stress osmotique avec polymères. Cependant, plus l'humidité relative augmente, plus l'erreur sur Π est grande et devient sensible aux gradients de température. Nous estimons l'erreur maximale sur Π égale à $\pm 1.5 \times 10^6 \text{ Pa}$.

	<i>NaCl</i>	<i>KCl</i>	<i>BaCl₂</i>	<i>K₂SO₄</i>	<i>K₂Cr₂O₇</i>
p/p ₀	0.75	0.85	0.90	0.95	0.98
Π (Pa)	3.94E+07	2.23E+07	1.44E+07	7.03E+06	2.77E+06

Tableau IV- 1 : Valeurs de l'humidité relative et de la pression osmotique imposées par des solutions saturées en différents sels.

Pour mesurer la distance interlamellaire de l'échantillon en même temps qu'est imposée la pression, nous avons utilisé la technique de réflectivité de rayons X à humidité contrôlée décrite dans [12] ou [13]. L'échantillon lamellaire est orienté en déposant, sur une lame de verre pour microscopie, une goutte contenant le mélange de tensioactifs dissout dans un solvant volatil. Après quelques minute, le solvant s'évapore et est remplacé par de l'eau provenant de l'air environnant. Pour avoir une solubilisation totale, nous avons préparé les solutions initiales à 10% en poids de tensioactifs dans l'éthanol, le chloroforme ou un mélange des deux solvants suivant les rapports étudiés en DDAB, LS et LC₁₁C₉.

La Figure IV- 2 donne la photo de la cellule utilisée au laboratoire et conçue par Valentin Gordeliy. Cette cellule possède un goniomètre pour positionner correctement, par rapport au trajet du faisceau, la lame de verre recouverte par l'échantillon. Le socle et le couvercle sont thermostatés par une circulation d'eau commune. Le couvercle est percé de deux fenêtres fermées par deux parois de Mylar entre lesquelles on fait le vide pour améliorer l'isolation thermique. Comme cette isolation n'est pas parfaite et l'équilibre thermodynamique lent, nous avons ajouté à l'intérieur de la boîte un capteur pour contrôler la pression et la température au cours de l'expérience. Le capteur (Novasina, Suisse) est une membrane dopée de polyélectrolyte dont la conductivité dépend de l'humidité. Grâce à une calibration avec des solutions de référence et dans des conditions parfaites d'équilibre et de régulation de température, on peut mesurer une humidité relative de 11% à 98%.

La mesure des périodes lamellaires se fait sur les plaques photosensibles lues avec une résolution spatiale de 88µm sur le dispositif de numérisation "PhosphorImager" (Molecular Dynamics). Un exemple de spectre est donné sur la Figure IV- 3. La mesure de D peut se faire directement par la lecture du nombre de pixels, sans regroupement radial ni correction géométrique. Nous estimons l'incertitude sur D égale à ±0.2Å.

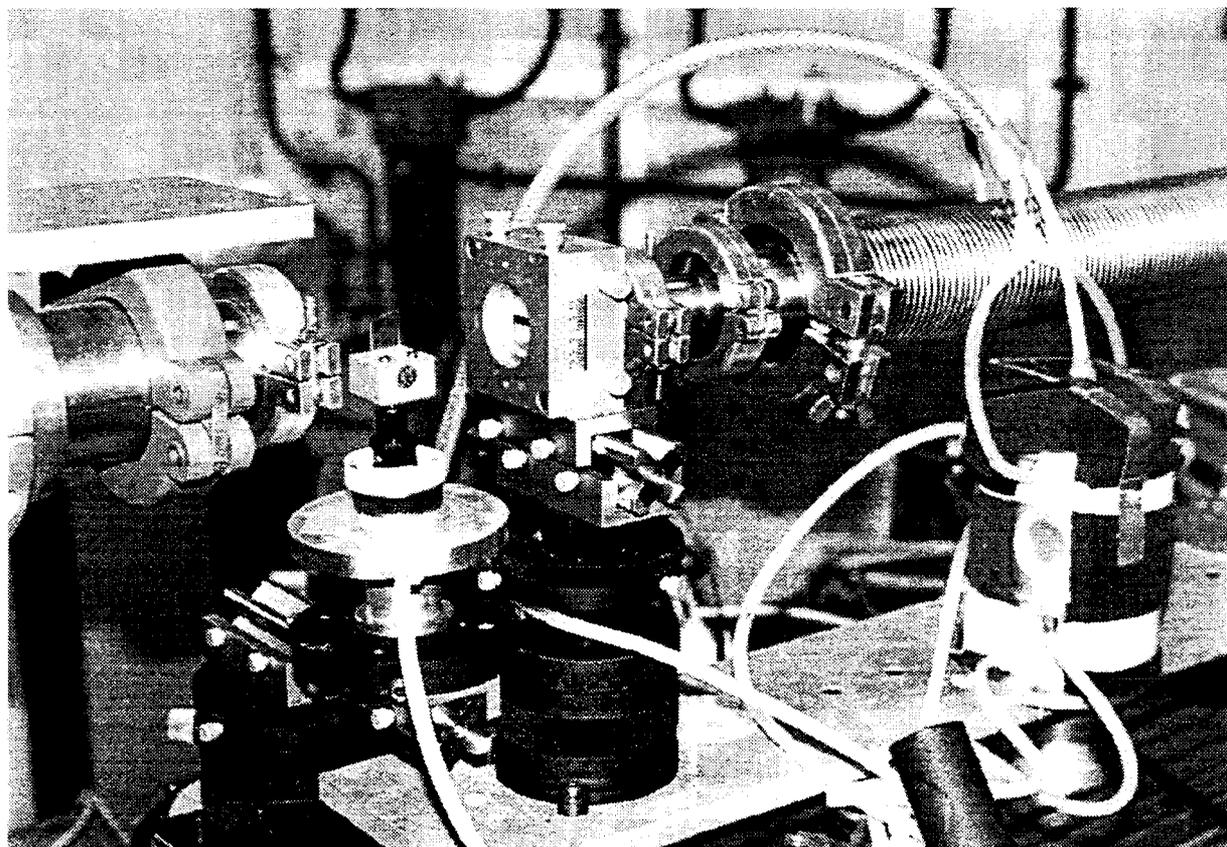


Figure IV- 2 : Photo du montage de réflectivité de rayons X à humidité contrôlée. Le couvercle à droite, muni de deux fenêtres à double paroi de Mylar, est placé pendant l'expérience à gauche, au-dessus de la lame de verre recouverte par l'échantillon et du réservoir circulaire de la solution de sel saturée.

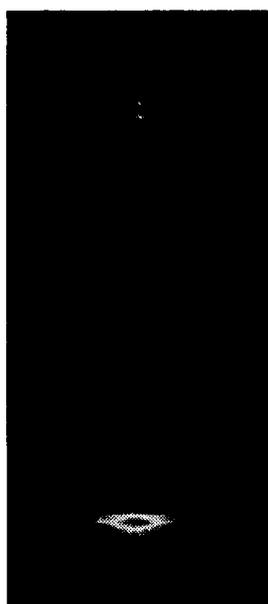


Figure IV- 3 : Spectre de réflectivité de rayons X d'un échantillon orienté de DDAB pur en équilibre avec une solution saturée de K_2SO_4 , c'est-à-dire à 95% d'humidité relative. En haut de l'image on voit le piège avec l'ombre portée de la lame de verre.

IV.A.3. Thin Film Balance

Le principe de cette méthode consiste à mesurer l'épaisseur de films minces à l'interface eau/air suivant la pression de disjonction imposée. Depuis la première expérience réalisée par Derjaguin et Obuchov sur des bulles d'air piégées entre des lames de verre immergées dans l'eau [14], différents auteurs ont contribué à améliorer cette autre technique de mesure de forces [15]. Le dispositif expérimental tel que nous avons pu l'utiliser a été réalisé au laboratoire par Vance Bergeron. Son principe est donné sur la Figure IV- 3. Le film mince liquide est formé en saturant avec la solution contenant les tensioactifs un disque en matériau poreux, percé d'un trou d'1mm environ de diamètre et soudé à un tube capillaire. Le tout est enfermé dans une cellule en Plexiglas hermétique avec seulement deux ouvertures, l'une pour le capillaire, l'autre pour le contrôle de la pression du gaz à l'intérieur. A l'équilibre et dans la partie plane du film, la pression de disjonction Π_d est égale à la pression capillaire P_c de telle façon que l'on a la relation suivante :

$$\Pi_d = P_c = P_g - P_l \quad (\text{IV- 5})$$

avec P_g la pression du gaz dans la cellule de mesure et P_l la pression du liquide dans la région de bordure de Plateau du film. P_l s'exprime en fonction de la pression de référence P_r d'où la formule :

$$\Pi_d = P_g - P_r + \frac{2\sigma}{r_{\text{tube}}} - \Delta\rho g h_c \quad (\text{IV- 6})$$

avec σ la tension superficielle du film, r_{tube} le rayon du tube capillaire, $\Delta\rho$ la différence de densité entre la solution et le gaz, g la constante de gravité et h_c la hauteur de solution dans le tube par rapport au film. Toutes ces constantes sont connues ou mesurables et $(P_g - P_r)$ est mesurée directement pendant l'expérience par un capteur différentiel de pression.

On montre, [7], que la pression minimale imposable dépend de la taille du trou foré dans le poreux ($P_{\text{min}} \sim 2\sigma/R_{\text{trou}}$) tandis que la pression maximale imposable dépend du choix de la taille des pores du matériau poreux ($P_{\text{max}} \sim 2\sigma/r_{\text{pore}}$).

D'autre part, pour obtenir les courbes de pression en fonction de la distance, l'épaisseur du film est mesurée par interférométrie sur la lumière réfléchiée par le film, en utilisant une lumière monochromatique (546nm) et un photomultiplicateur.

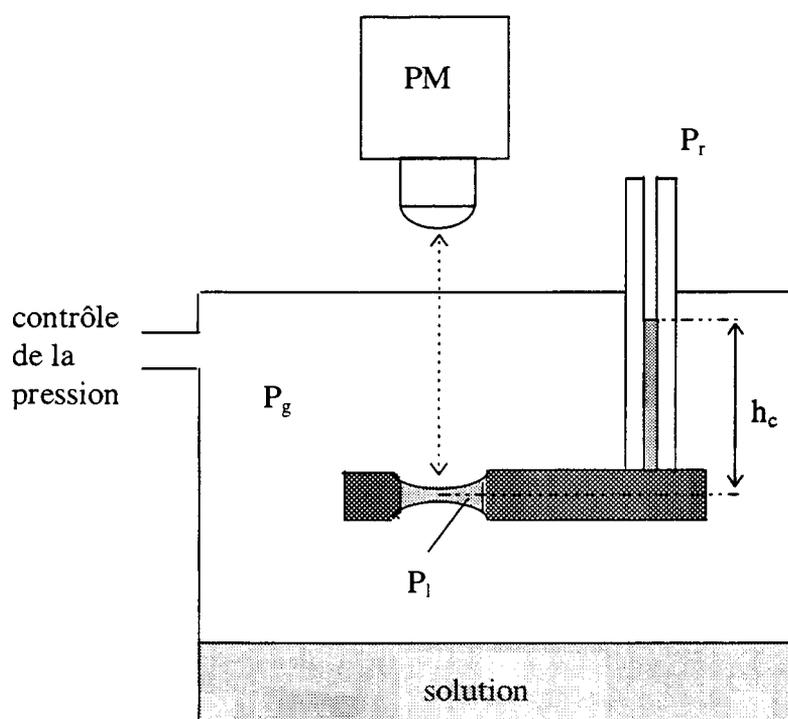


Figure IV- 4 : Schéma du dispositif expérimental pour la balance de film mince d'après [7]. P_g est la pression imposée, P_l la pression dans le film et P_r la pression de référence, ici la pression atmosphérique. Le photomultiplicateur (PM) permet de mesurer l'épaisseur du film mince par interférométrie.

IV.B. Résultats

IV.B.1. Système DDAB/LC₁₁C₉

IV.B.1.a. Résultats dans la gamme des pressions élevées

Par la technique de pression de vapeur saturante, nous avons pu mesurer les courbes pression-distance sur une gamme allant de 10^6 à 10^8 Pa pour des échantillons contenant différentes fractions molaires de LC₁₁C₉. Les résultats sont donnés sur la Figure IV- 5. On remarque que toutes ces courbes donnent une décroissance exponentielle de la pression en fonction de la distance. Le résultat du paramétrage avec une exponentielle dont l'origine est choisie à 28\AA , $\Pi_0 \exp(-(D-28)/\lambda)$, est donné dans le Tableau IV-2.

Les valeurs trouvées pour λ ($\sim 1\text{\AA}$) et Π_0 ($\sim 10^{8-12}$ Pa) sont bien de l'ordre de grandeur des valeurs mesurées par Rand et Parsegian dans les systèmes de lipides dans la même gamme de pression [2]. Cette répulsion à courte distance correspond à ce qu'ils ont appelé la force d'hydratation. Dans le paragraphe IV-C, nous discuterons de la variation de cette pression en fonction de la quantité de glycolipide introduite.

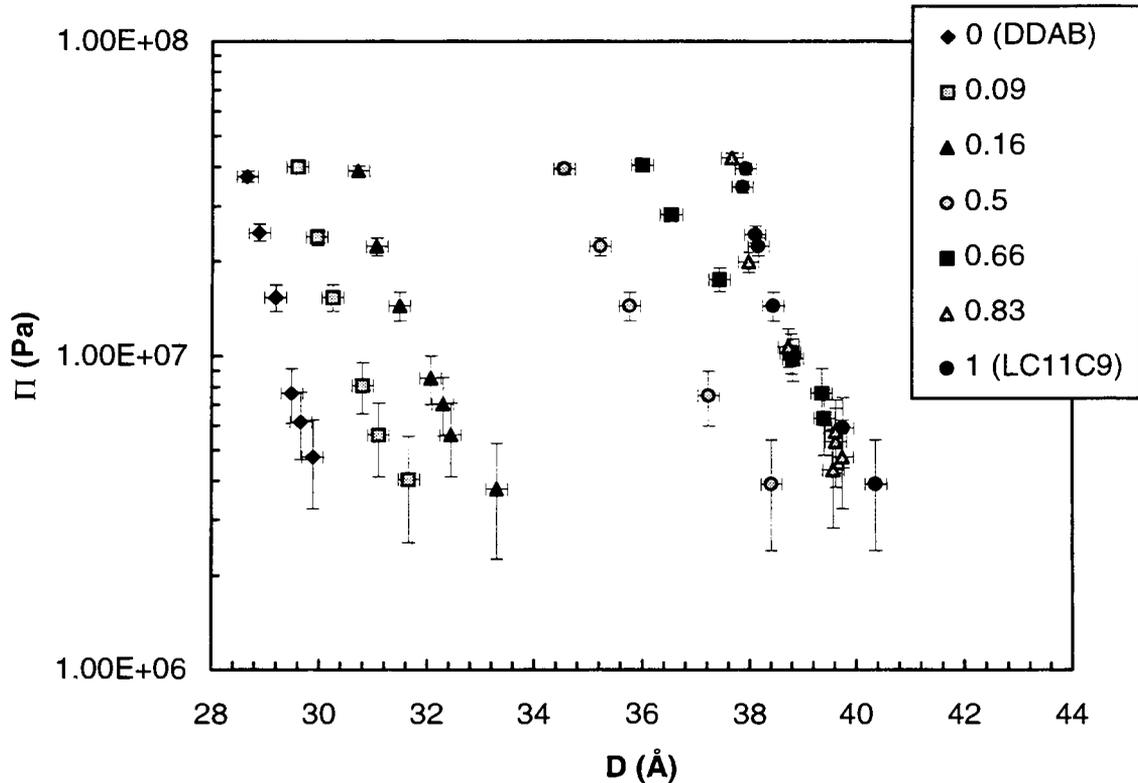


Figure IV- 5 : Pressions osmotiques imposées (par pression de vapeur saturante) en fonction de la période lamellaire en échelle semi-logarithmique, pour différentes fractions molaires x_{LC11C9} de $LC_{11}C_9$ allant de 0 (DDAB pur) à 1 ($LC_{11}C_9$ pur).

x_{LC11C9}	0	0.09	0.16	0.5	0.66	0.83	1
Π_0 (Pa)	1.14E8	2.12E8	3.73E8	1.48E9	2.11E9	3.2E11	1.67E11
λ (Å)	0.57	0.88	1.1	1.74	2.0	1.05	1.15
R^2	0.99	0.98	0.97	0.98	0.98	0.96	0.96

Tableau IV- 2 : Résultats du paramétrage des courbes pression-distance de la Figure IV-5 par la fonction $\Pi_0 \exp(-(D-28)/\lambda)$. R est le coefficient de régression linéaire.

IV.B.1.b. Résultats dans la gamme de pressions intermédiaires (10^4 - 10^5 Pa)

Sur la Figure IV- 6, nous avons tracé les résultats des mesures de la pression osmotique au voisinage de 10^5 Pa pour trois fractions molaires de $LC_{11}C_9$ ($x_{LC_{11}C_9} = 0, 0.09$ et 0.16). Les points les plus hauts sont tirés des résultats précédents en pression de vapeur. Les autres points ont été déterminés par stress osmotique avec du PEG 8000. On remarque qu'il y a un très bon raccord entre les deux techniques.

Pour le DDAB pur, nous retrouvons le trou de miscibilité, avec l'équilibre de deux phases lamellaires de périodes différentes (31 et 79\AA) à une pression d'équilibre égale à 2.5×10^5 Pa. Pour les deux autres fractions molaires en $LC_{11}C_9$, on observe également une brusque rupture de pente avec un saut dans la période lamellaire. Grâce aux mesures des périodes d'échantillons biphasiques, indiquées par des flèches sur la figure, il est possible de retrouver la valeur du plateau en pression qui correspond à l'équilibre double-lamellaire. On remarque que plus il y a de $LC_{11}C_9$ dans la membrane, plus la pression d'équilibre augmente : $\sim 5 \times 10^5$ Pa pour $x_{LC_{11}C_9} = 0.09$ et $\sim 7 \times 10^5$ Pa pour $x_{LC_{11}C_9} = 0.16$.

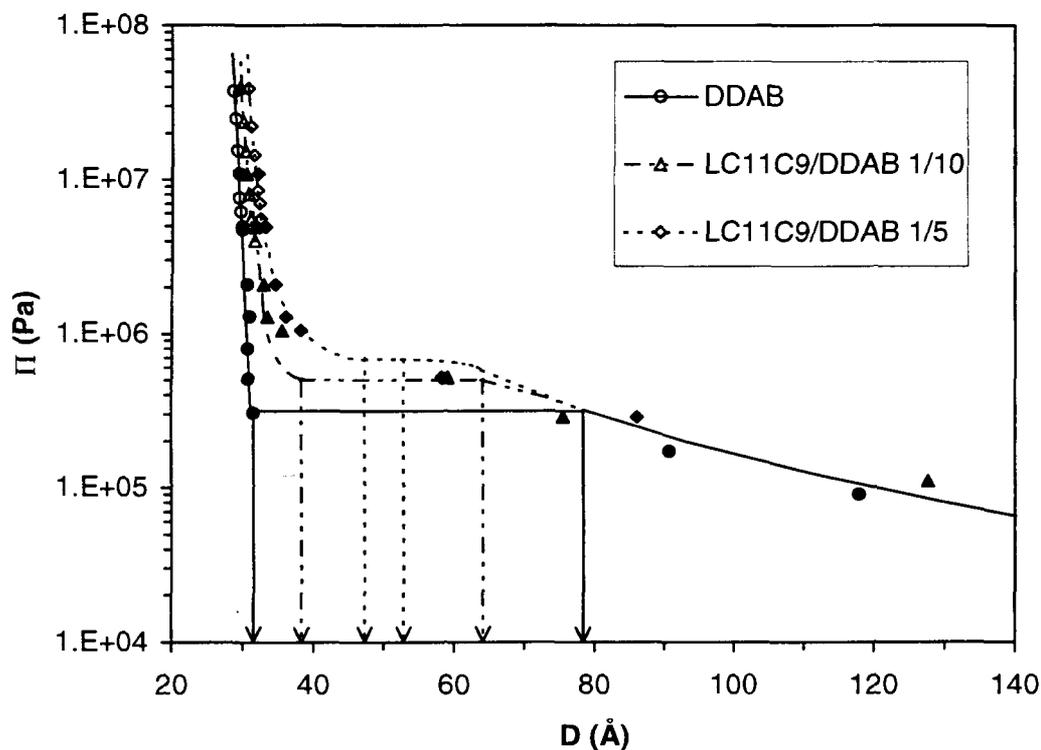


Figure IV- 6 : Variation de la pression osmotique dans la zone d'équilibre double lamellaire pour 3 fractions molaires de $LC_{11}C_9$ ($x_{LC_{11}C_9} = 0, 0.09$ et 0.16). Les symboles ouverts correspondent aux mesures en pression de vapeur saturante (cf. paragraphe précédent), tandis que les symboles pleins correspondent aux résultats en stress osmotiques avec du PEG 8000. Les flèches indiquent les périodes lamellaires mesurées dans la zone biphasique.

IV.B.1.c. Résultats en régime dilué

Pour imposer des pressions plus faibles ($<10^5$ Pa) nous avons utilisé le dextran 110000. Sur la Figure IV- 7 sont donnés les résultats pour le DDAB et trois fractions molaires de $LC_{11}C_9$ ($x_{LC_{11}C_9} = 0.04, 0.09$ et 0.16). Nous remarquons que toutes les courbes se superposent aux incertitudes expérimentales près. Donc à ces fractions molaires, il n'y a pas d'effet observable du glycolipide sur la loi de gonflement. Cette loi de gonflement reste dominée par la répulsion électrostatique. Sur la figure nous avons tracé le meilleur paramétrage par une fonction exponentielle pour la courbe du DDAB. Nous trouvons que la portée de l'exponentielle, i.e. la longueur de Debye associée, d'après la formule (I-14) du chapitre I, vaut 124\AA . Ceci correspond à une concentration en sel dans le réservoir c_s' de $6 \times 10^{-4} \text{mol/l}$. Cette valeur, légèrement supérieure à la cmc du DDAB ($8 \times 10^{-5} \text{mol/l}$) est probablement due à des impuretés résiduelles.

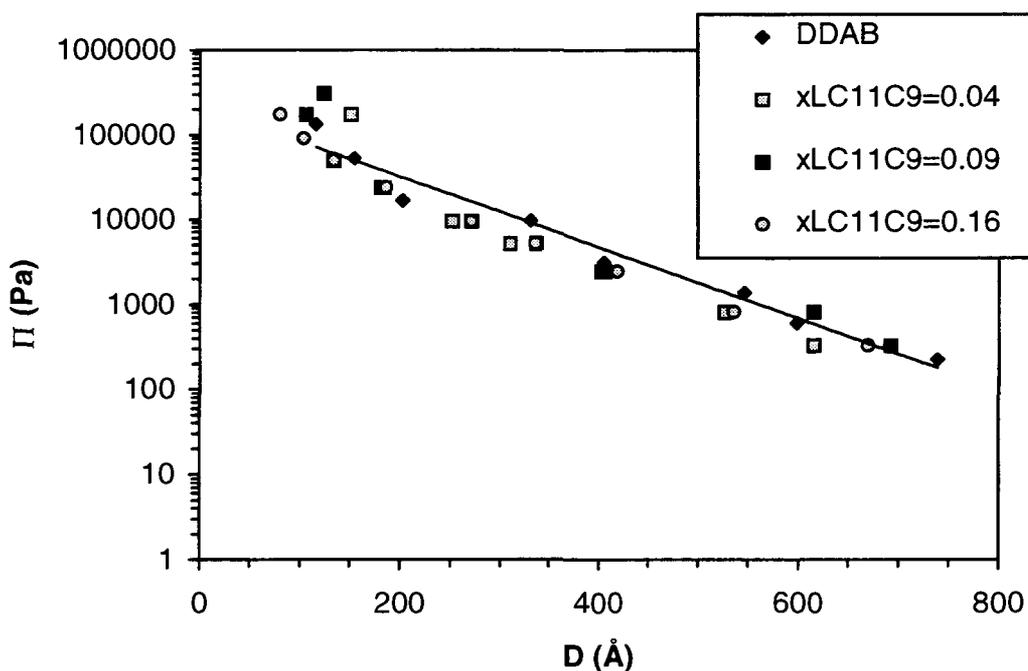


Figure IV- 7 : Variation en échelle semi-logarithmique de la pression osmotique imposée en fonction de la période lamellaire, pour différentes fractions molaires de $LC_{11}C_9$. La droite correspond au meilleur paramétrage par une fonction exponentielle de la courbe pour le DDAB.

Les courbes précédentes de stress osmotique avec membranes de dialyse n'ont pu être réalisées que sur des échantillons contenant peu de $LC_{11}C_9$. En effet l'établissement

de chaque courbe nécessite au moins sept échantillons de 2ml préparés à environ 10% en poids, donc plus de 1.4g de poudre sèche. Or nous ne disposons que de quantités limitées de LC₁₁C₉. Pour obtenir néanmoins des mesures de pressions avec des quantités plus importantes de glycolipides dans les bicouches, nous avons effectué quelques mesures préliminaires avec la technique de balance de film mince, en collaboration avec Vance Bergeron. Même si le volume de solution nécessaire est plus grand (50ml), les concentrations utilisées sont beaucoup plus faibles (~cmc) et donc la technique consomme beaucoup moins de produit (de l'ordre de quelques dizaines de mg). Cependant nous n'avons pas pu obtenir de films avec le LC₁₁C₉ pur, la molécule n'étant pas assez hydrophile pour produire des films stables.

Les résultats sont donnés sur Figure IV- 8. Nous remarquons que pour les deux courbes avec la concentration du DDAB à 1.5mM il y a un bon accord avec les résultats précédents de stress osmotique : ces courbes donnent une décroissance exponentielle interprétable toujours avec la loi limite de gonflement électrostatique dominante explicitée dans le chapitre I, équation (I-14). La longueur de Debye trouvée ici vaut 150Å. De plus il n'y pas de différence appréciable entre la courbe à $x_{LC_{11}C_9}=0$ et celle à $x_{LC_{11}C_9}=0.12$. Donc, si on suppose que la composition des bicouches est la même à l'interface eau/air et en solution, nous retrouvons qu'à faible quantité de LC₁₁C₉, la répulsion électrostatique domine et n'est pas perturbée par la présence des "têtes sucres".

Par contre pour les deux courbes obtenues à 0.1mM (c'est à dire très près de la cmc du DDAB) il apparaît des divergences avec les courbes précédentes. D'une part la courbe avec le DDAB pur à 0.1mM se trouve décalée vers les pressions plus faibles par rapport à celle à 1.5mM. D'autre part, la courbe obtenue avec $x_{LC_{11}C_9}=0.78$, se place bien au-dessus des autres. Le meilleur paramétrage est obtenu avec non plus une fonction exponentielle, mais une loi de puissance, en $1/D^3$. Ceci voudrait dire que, lorsque la membrane est peu chargée, c'est une répulsion entropique de type Helfrich qui l'emporterait sur la répulsion électrostatique. En reprenant la formule (I-17) du chapitre I, nous calculons une constante de rigidité k_c de l'ordre de 0.009 kT, a priori très faible par rapport aux valeurs habituellement mesurées (~1kT). L'interprétation de ces résultats préliminaires est délicate : il est possible que la structure de la phase diluée en équilibre et de la sous-phase sous l'interface jouent des rôles importants. Une étude précédente réalisée sur l'AOT, qui est un autre tensioactif bicaténaire, laisse à penser qu'il se forme une bicouche dans le film mince entre les interfaces [16]. Cela avait déjà été vu sur des bicouches de phospholipides [17]. Ainsi il serait intéressant de compléter

cette étude avec d'autres concentrations et par exemple d'étudier par réflectivité de rayons X la structure du film.

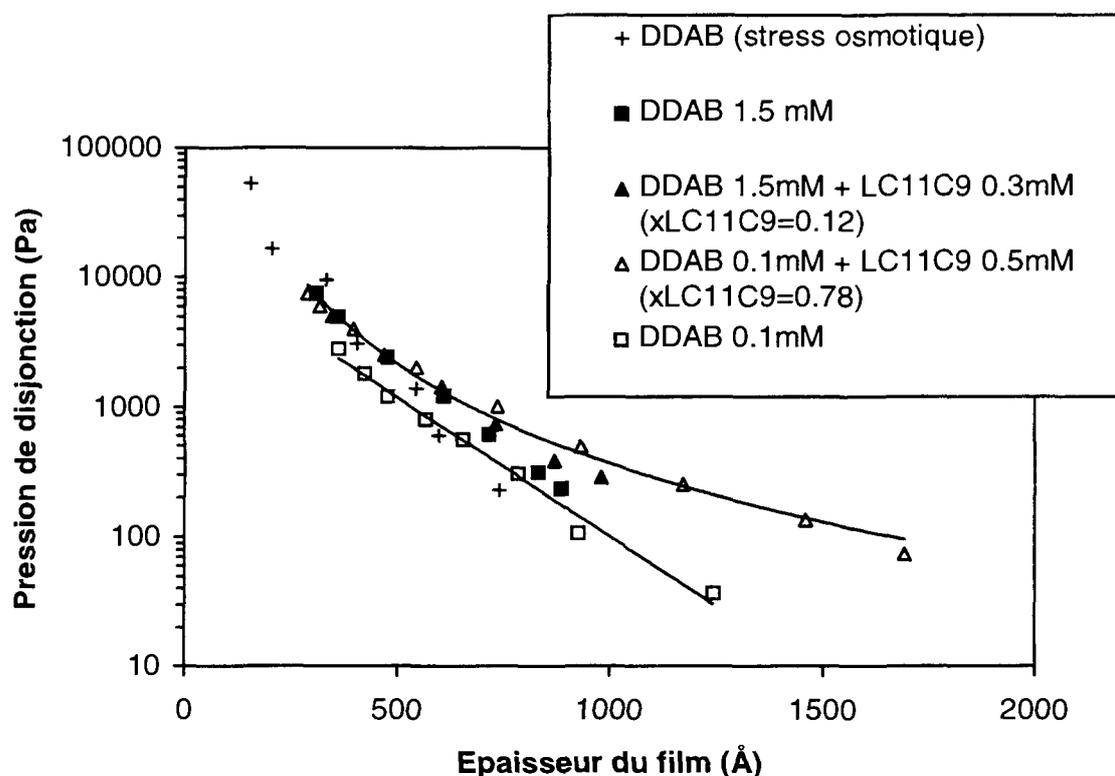


Figure IV- 8 : Mesure de la pression de disjonction en fonction de l'épaisseur de film, sur la balance de film mince, pour différentes concentrations initiales en DDAB et en LC₁₁C₉. Pour comparaison nous avons aussi tracé la courbe obtenue pour le DDAB pur par la technique de stress osmotique.

IV.B.2. Système DDAB/LS

Le 2-O LauroylSaccharose étant un glycolipide à une seule chaîne alkyle, nous n'avons pas réalisé sur ce système de mesures de stress osmotique avec polymères stresseurs et membranes de dialyse : nous avons en effet observé qu'une partie des molécules LS arrive à traverser la membrane pour former dans le réservoir de polymère une phase mixte à une concentration en LS de l'ordre de grandeur de sa cmc. Ceci fausse donc les calibrations de pressions osmotiques imposées et n'est pas exploitable.

Par contre, sur un échantillon contenant 9% en moles de LS par rapport au DDAB, nous avons mesuré la courbe pression-distance par équilibre de pression de vapeur avec un sel saturé. Le résultat ainsi que la courbe mesurée pour le DDAB pur est tracé sur la

Figure IV- 9. La grandeur caractéristique de la décroissance, 0.89\AA , est égale à celle mesurée dans le paragraphe précédent avec 0.9% de LC_{11}C_9 .

De plus, en extrapolant les fonctions exponentielles jusqu'aux valeurs de la période lamellaire de la phase L_α' mesurées aux rayons X sur des échantillons dans la zone biphasique, on obtient une estimation de la pression du plateau d'équilibre : pour le DDAB, $\Pi_{\text{équi}}=2.5\times 10^5\text{Pa}$ et pour $x_{\text{LS}}=0.09$, $\Pi_{\text{équi}}=5\times 10^5\text{Pa}$. Ces valeurs sont égales aux mesures directes en stress osmotique du paragraphe précédent avec le DDAB pur et $x_{\text{LC}_{11}\text{C}_9}=0.09$.

Donc l'addition des deux glycolipides, l'un monochaîne, l'autre bichaîne, induisent quantitativement la même répulsion stérique à courte distance et ont le même effet sur le plateau en pression de l'équilibre L_α - L_α' du DDAB.

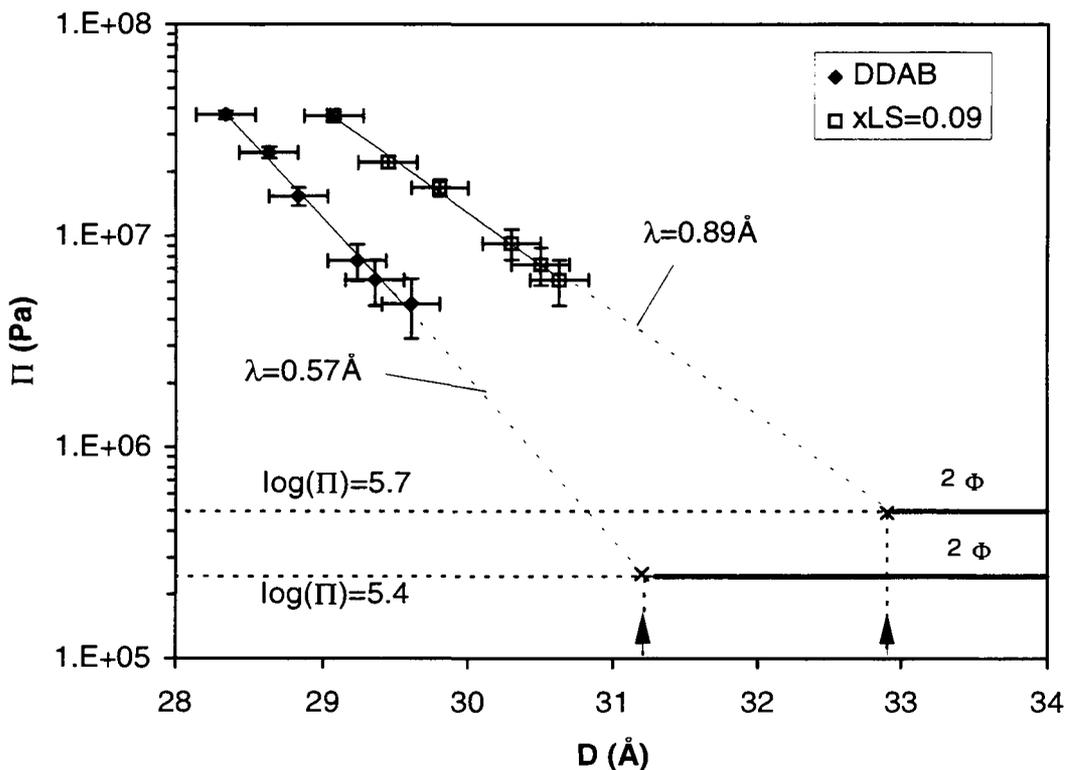


Figure IV- 9 : Pressions osmotiques imposées (par pression de vapeur saturante) en fonction de la période lamellaire en échelle semi-logarithmique. Les points au-dessous de 10^6 Pa ont été extrapolés en prenant un paramétrage exponentiel des données. Les flèches indiquent la période observée dans la phase L_α' dans le domaine de coexistence. Les lignes épaisses donnent une estimation de la pression d'équilibre : DDAB $2.5\times 10^5\text{Pa}$ et DDAB/LS $5\times 10^5\text{Pa}$.

IV.C. Interprétation : bilan des forces

IV.C.1. Répulsion à courte distance - Premier point critique

En reprenant les résultats du paragraphe IV-B-1 de mesures de la pression osmotique, il est possible de tracer la variation de la période lamellaire D en fonction de la fraction molaire de $LC_{11}C_9$ à pression osmotique imposée constante. Sur la Figure IV-10, nous donnons la courbe obtenue à $\Pi=4\times 10^7 Pa$. On remarque que D varie linéairement avec $x_{LC_{11}C_9}$ jusqu'à environ 0.75. Au-delà, D reste constant.

De même sur les Figures IV-11 et IV-12 nous avons tracé la portée (λ) et l'amplitude (Π_0) de la répulsion à courte distance en fonction de la fraction molaire de $LC_{11}C_9$. Là encore nous observons que λ varie linéairement avec $x_{LC_{11}C_9}$ jusqu'à environ 0.75 avant de diminuer et que la courbe de Π_0 fait un saut brusque vers $x_{LC_{11}C_9}=0.75$.

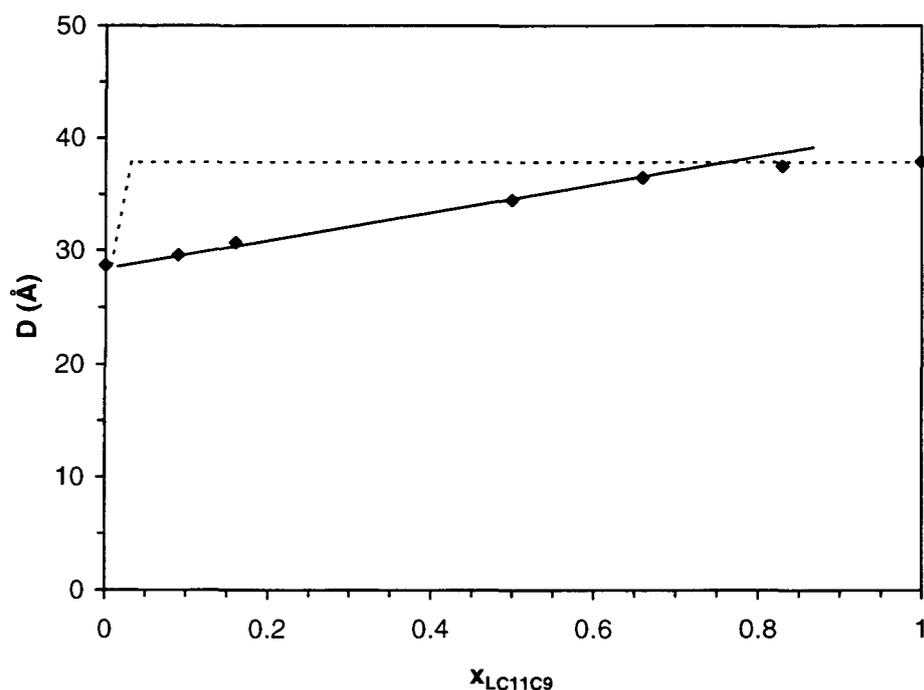


Figure IV- 10 : Variation de la période lamellaire en fonction de la fraction molaire de $LC_{11}C_9$, à pression constante égale à $4\times 10^7 Pa$. En pointillés nous avons tracé la variation discontinue attendue avec un modèle de "champignon dur".

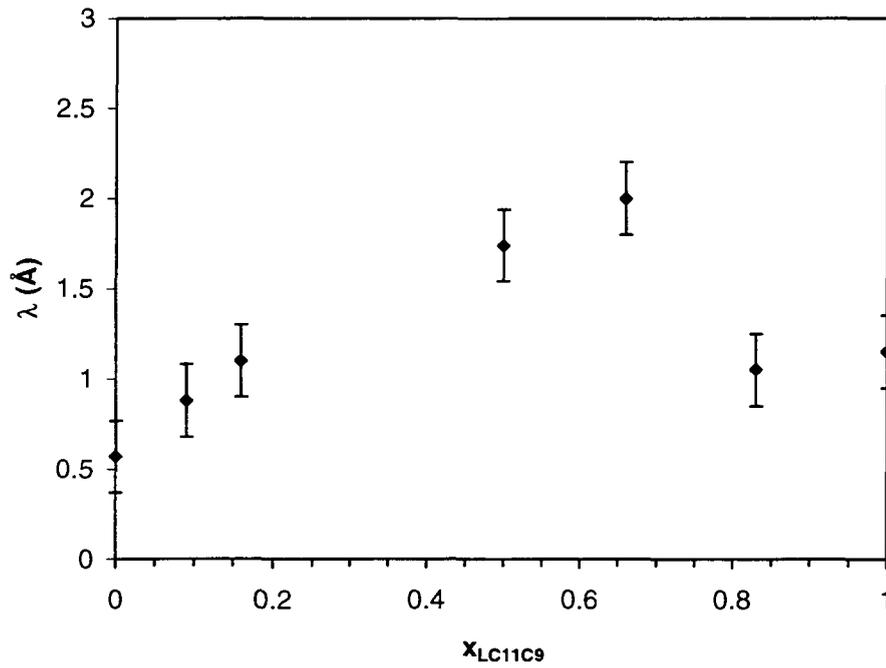


Figure IV- 11 : Variation de λ , la portée de la répulsion à courte distance, en fonction de la fraction molaire de $LC_{11}C_9$.

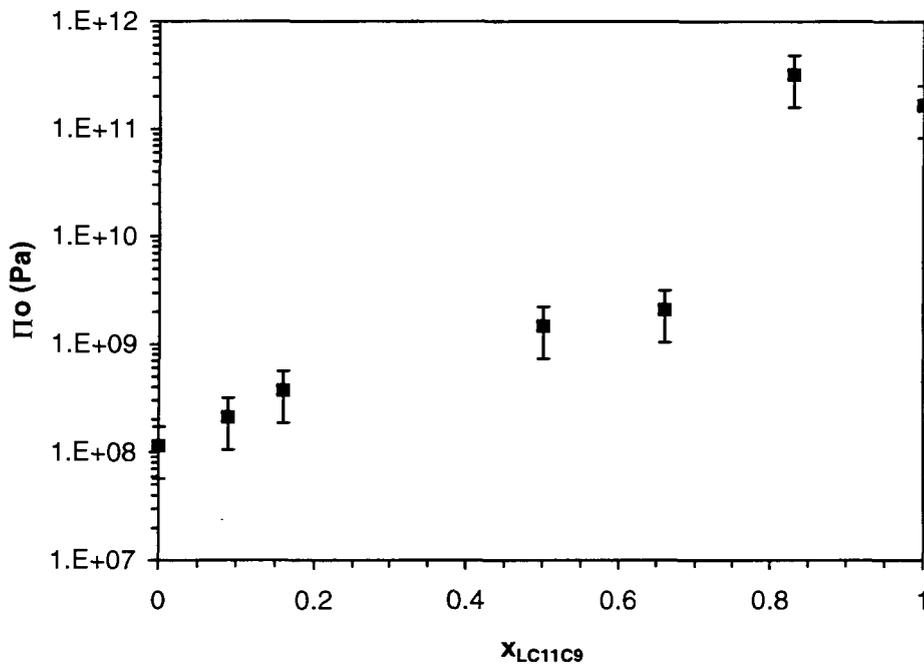


Figure IV- 12 : Variation de Π_0 , l'amplitude de la répulsion à courte portée à $D=28\text{\AA}$, en fonction de la fraction molaire de $LC_{11}C_9$.

Si on imaginait la membrane de DDAB comme un mur dur, l'ajout d'une faible fraction de $LC_{11}C_9$, comme un "champignon" qui dépasse en surface, empêcherait l'approche des bicouches à moins d'une longueur de tête polaire de $LC_{11}C_9$. Nous devrions alors observer une discontinuité dans le comportement de la répulsion à courte distance, comme représentée en pointillés pour la variation de D à pression constante sur la Figure IV- 10. En fait la variation continue de D et de λ nous indique qu'il y a une moyenne de l'effet du glycolipide sur toute la bicouche, probablement liée aux ondulations ou aux mouvements des têtes polaires, mis en évidence dans l'étude en DNPA des échantillons orientés décrite au chapitre III. Ce décalage linéaire de D en fonction de la quantité de glycolipide hôte, s'observe également sur les résultats de mesures de pressions de McIntosh et Simon dans le système GM1/lécithine [18]. Mais leurs résultats ne vont pas au-delà de 30% de GM1 incorporé.

Lorsque la bicouche arrive à saturation en glycolipide ($x_{LC_{11}C_9} > 0.75$), on note que la pression redevient équivalente à celle observée pour le DDAB, avec une translation en D de 9\AA , due au volume impénétrable des têtes polaires. Dans la description donnée au chapitre III, nous avons estimé la longueur des têtes à 7\AA , donc pour la bicouche nous devrions obtenir 14\AA de décalage. En fait les chaînes alkyles sont plus courtes que dans le cas du DDAB ($-2 \times 2.5\text{\AA}$) c'est pourquoi le décalage n'est que de 9\AA .

Par ailleurs nous remarquons que si nous extrapolons à des valeurs plus faibles, toujours avec une exponentielle, toutes les courbes de pressions mesurées de la Figure IV- 5, la courbe pour $x_{LC_{11}C_9} = 0.66$ va croiser, avant 10^6 Pa, la courbe du $LC_{11}C_9$ pur et passer au-dessus. Donc à distance égale, la répulsion serait plus forte avec $x_{LC_{11}C_9} = 0.66$ qu'avec le $LC_{11}C_9$ pur. Ceci signifierait que la répulsion est exaltée par le mélange des deux types de molécules. Ce résultat reste à vérifier expérimentalement.

Si l'on reprend le bilan des forces établi pour le DDAB pur dans le chapitre I de cette thèse, il est possible maintenant de tenir compte des forces introduites par des glycolipides. Ainsi sur la Figure IV- 13, nous avons tracé la pression totale obtenue en remplaçant la pression d'hydratation du DDAB par les pressions d'hydratation mesurées en présence de $LC_{11}C_9$ (cf. Tableau IV- 2). En première approximation, les deux autres forces prises en compte, force électrostatique et force de van der Waals, sont calculées avec les paramètres du DDAB pur (des calculs plus complets en faisant varier toutes les forces ainsi que la détermination du diagramme de phases seront explicités dans la dernière partie de ce chapitre). Nous remarquons que l'augmentation de la

répulsion à courte distance, avec le décalage du mur stérique lié aux têtes polaires du glycolipide, comble le puits attractif existant dans le DDAB pur.

A $x_{LC11C9}=0.09$, le calcul prédit une pression d'équilibre égale $6.4 \times 10^5 \text{ Pa}$ à et des périodes de 33.5 et 39.3 Å. C'est-à-dire que, comme cela a été observé par ailleurs expérimentalement, il y a bien un resserrement des périodes d'équilibre et une augmentation de la valeur du plateau en pression lorsque l'on ajoute le glycolipide.

Pour $x_{LC11C9} > 0.16$, il n'y a plus de boucle de van der Waals, donc plus d'équilibre possible entre deux phases. Ainsi ces calculs donnent une explication théorique de la disparition du trou de miscibilité $L_\alpha-L_\alpha'$ observé dans le chapitre III sur le diagramme de phase eau/DDAB/LC₁₁C₉ et du point critique pour une fraction molaire de LC₁₁C₉ au-delà de laquelle on passe à une phase lamellaire monophasique.

Comme nous avons mesuré une augmentation similaire de la pression d'hydratation avec le LS à 9%, cette explication est valable aussi pour le comportement, très analogue, du système eau/DDAB/LS dans la partie riche en DDAB.

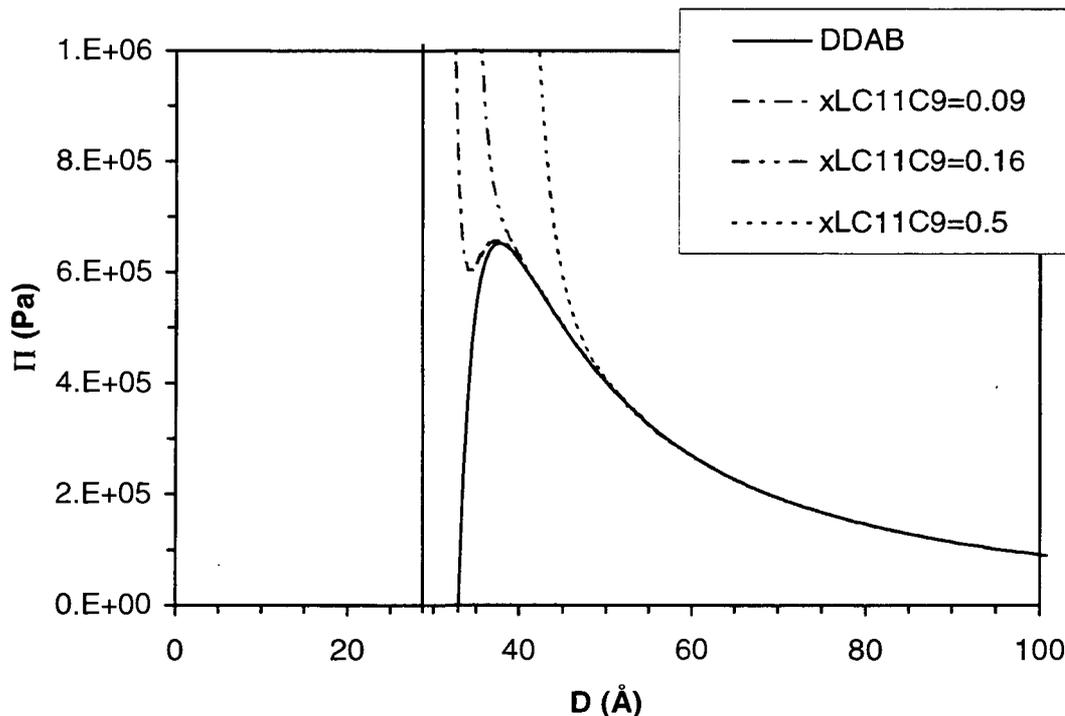


Figure IV- 13 : Pression totale théorique en fonction de la période lamellaire. Pour les quatre courbes, la force électrostatique est calculée à charge constante ($s=530 \text{ \AA}$) et la force de van der Waals a son origine à 26.4 \AA et une constante de Hamaker de $2kT$. Seule varie entre ces courbes la force d'hydratation, qui est calculée en utilisant les résultats expérimentaux en fonction de x_{LC11C9} du Tableau IV- 2.

IV.C.2. Bilan des forces pour le LC₁₁C₉ - Deuxième point critique

La molécule de LC₁₁C₉ n'est pas chargée donc dans le bilan des forces nous ne tenons compte que de la répulsion à courte distance et de la force de van der Waals. Les pics de Bragg mesurés par diffusion de rayons X ayant toujours été très fins (cf. chapitre III), nous supposons les membranes rigides et nous négligeons donc la force d'Helfrich. Par les résultats expérimentaux pour le LC₁₁C₉ pur dans l'eau, nous savons aussi qu'au-delà de 23% en volume d'eau, il y a démixtion entre la phase lamellaire gonflée à 41.8Å et une phase très diluée qui est quasiment de l'eau pure. Ceci signifie qu'à cette distance-là, la pression osmotique dans la phase lamellaire vaut quasiment zéro, donc qu'il y a égalité entre la force répulsive et la force attractive. Parsegian et coll. ont été les premiers à utiliser cette hypothèse pour estimer la valeur de la constante de Hamaker dans les systèmes de lipides à partir des données de stress osmotique [19].

Sur Figure IV- 14 nous avons tracé la pression d'hydratation expérimentale et la pression de van der Waals calculée avec un modèle simple en prenant son origine à 26.4Å comme pour le DDAB. Pour retrouver le gonflement maximum à 41.8Å, c'est-à-dire passer d'une pression totale positive à une pression totale négative à 41.8Å (cf. Figure IV- 15), il faut prendre une constante de Hamaker de 17kT (70×10⁻²¹J), c'est-à-dire au-delà des grandeurs raisonnables. Si nous choisissons l'origine de la force à 35Å, c'est-à-dire 2Å au-delà des têtes polaires, nous trouvons alors qu'une constante de Hamaker de 1.45kT (6×10⁻²¹J) permet aussi d'obtenir le gonflement maximum à 41.8Å. En fait, dans les deux cas, ces calculs mettent en évidence l'importance de la contribution des têtes polaires dans la force attractive.

Comme nous l'avons fait pour le DDAB, il est aussi possible de décomposer la force attractive en deux contributions : une force de van der Waals "classique" dont l'origine est prise à 24Å et la constante de Hamaker égale à 1.45kT, qui rend compte de la partie apolaire, et une contribution d'adhésion modélisée sous forme exponentielle, de portée 3Å (Figure IV- 16). Nous trouvons que cette exponentielle a l'expression suivante :

$$\Pi_{adh} = -9 \times 10^7 \exp[-(D - 28) / 3] \quad (\text{IV-7})$$

En intégrant sur D on calcule, à 28Å, une énergie attractive équivalente de -27mN/m. En prenant une surface par tête polaire de 59Å², ceci revient à 3.8kT/molécule. Pour le DDAB nous avons trouvé -3.3mN/m, toujours à 28Å (cf. chapitre I). Donc

l'énergie attractive, à distance égale de la partie apolaire, est plus forte dans le cas du glycolipide que dans celui du DDAB.

Même si la définition du plan d'origine de la force attractive est arbitraire, et dépend des auteurs, il est intéressant de noter que ces résultats sont analogues à ceux obtenus par Marra en SFA sur des bicouches de digalactosyl-diglyceride (DGDG), un lipide avec deux motifs sucres pour la tête polaire [20]. Marra a trouvé que l'interaction attractive du DGDG est entre 2 et 6 fois plus forte que pour le phospholipide DPPC. De même Evans et Needham ont trouvé que l'énergie d'adhésion au contact est deux fois plus forte pour le DGDG que pour le POPE, un phospholipide neutre [21]. McIntosh et Simon concluent également que, dans le cas de l'AGM1, un glycolipide non chargé, la présence des saccharides dans les têtes polaires augmente les interactions attractives par rapport au film de lécithine pure [13]. Dans notre cas nous avons trouvé une adhésion huit fois plus forte pour le glycolipide que pour le DDAB.

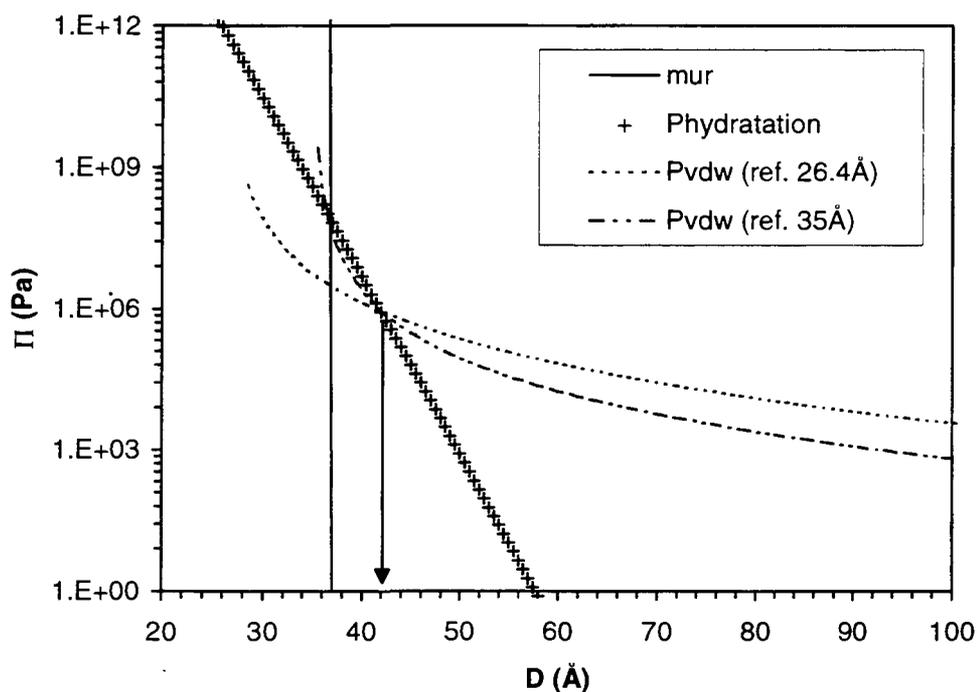


Figure IV- 14 : Bilan des forces pour les bicouches de $LC_{11}C_9$. La pression d'hydratation est celle mesurée expérimentalement dans ce chapitre. Pour la pression de van der Waals, deux calculs sont donnés : avec l'origine choisie comme pour le DDAB à 26.4Å et la constante de Hamaker $A=17kT$; ou avec l'origine à 35Å et $A=1.45kT$. (les forces attractives sont tracées en valeurs absolues pour plus de clarté)

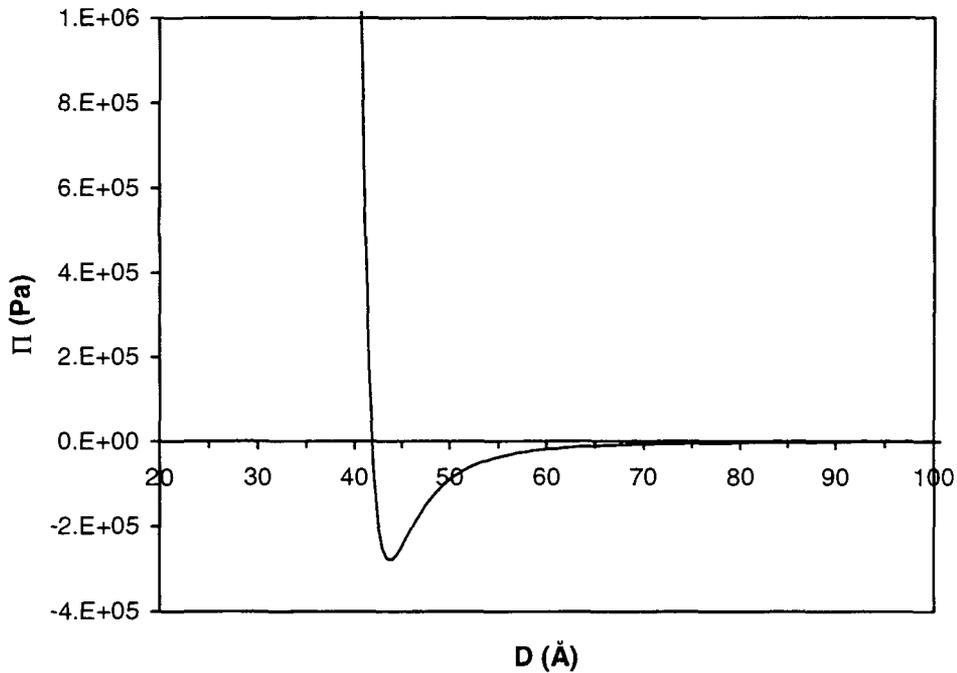


Figure IV- 15 : Pression totale, somme des forces d'hydratation et de van der Waals, explicitées sur la figure précédente, pour les bicouches de LC₁₁C₉.

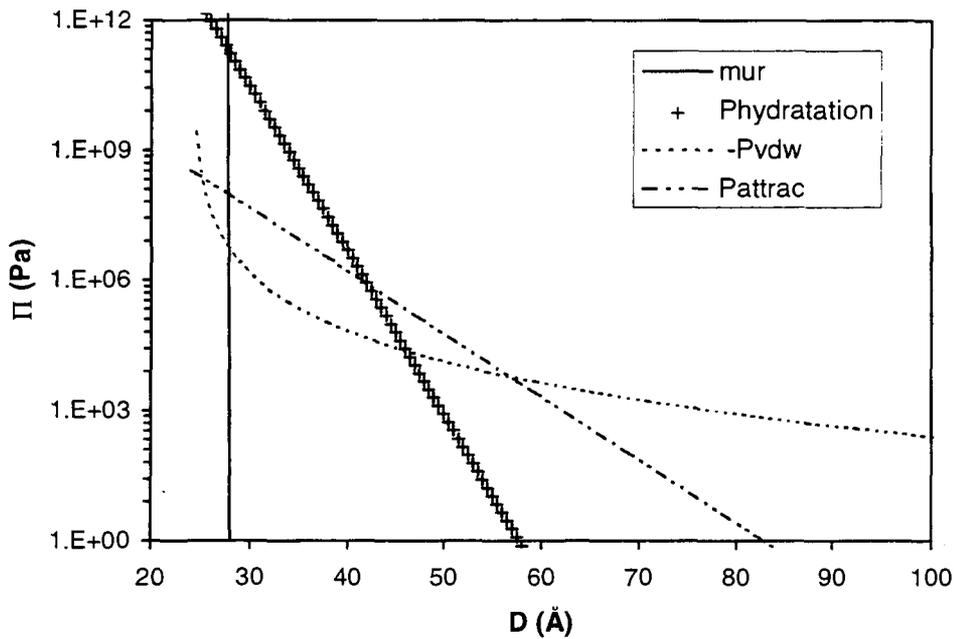


Figure IV- 16 : Introduction d'une courbe exponentielle comme force attractive spécifique des têtes polaires dans le bilan des forces des bicouches de LC₁₁C₉. La force d'hydratation est inchangée et la force de van der Waals pour les chaînes alkyles est calculée en prenant son origine à 24Å et la constante de Hamaker égale à 1.45kT

Maintenant que se passe-t-il si on ajoute le DDAB? Les bicouches vont se charger peu à peu. Sur la Figure IV- 17 nous avons introduit la répulsion électrostatique dans le calcul des interactions en gardant constantes les pressions d'hydratation et de van der Waals. Nous observons que l'effet de l'ajout de charge, donc d'une répulsion à longue distance, redonne une boucle de van der Waals. Ainsi on retrouve la deuxième zone de coexistence entre deux phases lamellaires du diagramme ternaire eau/DDAB/LC₁₁C₉ dans la partie riche en glycolipide (cf. chapitre III). On prédit la présence d'un point critique lorsque la surface par site ionisé devient inférieure à $s=280\text{\AA}^2$, mais qui est plus petite que la valeur déterminée pour le DDAB, 530\AA^2 (cf. chapitre I).

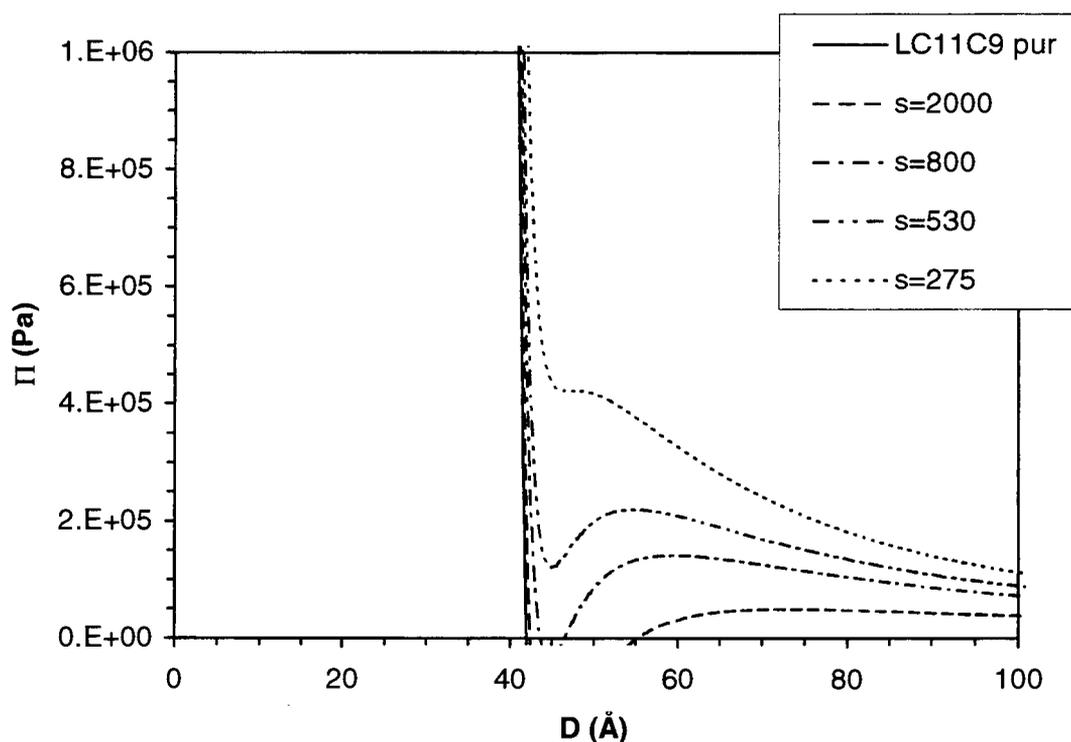


Figure IV- 17 : Variation de la pression totale en fonction de la quantité de DDAB introduite dans les bicouches de LC₁₁C₉ : la force d'hydratation est gardée constante pour les 4 courbes, égale à celle mesurée expérimentalement pour le LC₁₁C₉ pur, tout comme la force de van der Waals, calculée à partir de 26.4\AA , avec la constante de Hamaker égale à $17kT$. La force électrostatique est calculée à charge constante pour différentes valeurs de surface par tête polaire, s (\AA^2).

IV.C.3. Prédiction théorique du diagramme de phases eau/DDAB/LC₁₁C₉

Nous sommes maintenant en possession de tous les éléments permettant de prédire théoriquement l'allure générale du diagramme de phases ternaire eau/DDAB/LC₁₁C₉. Nous avons la possibilité de faire varier toutes les forces considérées, hydratation, van der Waals et électrostatique, en fonction de la fraction molaire de LC₁₁C₉. Ceci nous permet de faire différentes hypothèses physiques sur l'effet de l'ajout du LC₁₁C₉ dans la bicouche chargée de DDAB.

Comme nous l'avons vu au chapitre I, la construction de Maxwell sur la pression totale est notre critère de démixtion, qui permet de déterminer les limites des zones lamellaires biphasiques avec la pression et les compositions à l'équilibre. Pour cela nous supposons que $x_{LC_{11}C_9}$ est la même dans les deux phases lamellaires en équilibre. Par rapport aux calculs de Jönsson et de Persson sur l'addition de charges dans des phases lamellaires neutres [22], nous négligeons donc les entropies de mélanges.

En pratique, nous avons obtenu chaque diagramme de phases théorique en calculant la pression totale en fonction de $x_{LC_{11}C_9}$. Les paramètres nécessaires pour calculer chaque contribution, hydratation, van der Waals et électrostatique sont choisis selon les hypothèses voulues. La construction de Maxwell est ensuite effectuée, pour chaque $x_{LC_{11}C_9}$, par itérations successives, (cf. chapitre I) et nous donne, s'il y a lieu, la pression et les périodes des phases lamellaires en équilibre.

En supposant une moyenne pondérée de l'épaisseur $\langle \delta \rangle$ de la bicouche et une densité de 1 pour tous les composés, nous déduisons les compositions des deux phases lamellaires en coexistence par les deux relations suivantes :

$$\frac{\langle \delta \rangle}{D_{\text{équi}}} = 1 - \Phi_{\text{eau}} = \Phi_{\text{DDAB}} + \Phi_{\text{LC}_{11}\text{C}_9} \quad (\text{IV-8})$$

et

$$x_{\text{LC}_{11}\text{C}_9} = \frac{\Phi_{\text{LC}_{11}\text{C}_9}/651}{\Phi_{\text{LC}_{11}\text{C}_9}/651 + \Phi_{\text{DDAB}}/462} \quad (\text{IV-9})$$

Sur la Figure IV- 18, nous avons représenté en plus du diagramme de phases expérimental eau/DDAB/LC₁₁C₉ déterminé au chapitre III, cinq diagrammes de phases obtenus par les calculs en faisant cinq hypothèses distinctes :

H-1) la force attractive et la force d'hydratation sont constantes sur tout le diagramme et égales aux expressions trouvées pour le DDAB (cf. chapitre I). Nous avons seulement fait varier la pression électrostatique : nous travaillons à équilibre constant. Nous faisons l'hypothèse que la constante de dissociation K du DDAB ne varie pas avec x_{LC11C9} et nous supposons que la surface par site ionisable s'exprime en fonction de x_{LC11C9} selon :

$$s(\text{Å}^2) = \frac{65}{(1 - x_{LC11C9})} \quad (\text{IV-10})$$

Nous remarquons que le trou de miscibilité calculé du DDAB s'élargit au lieu de diminuer.

H-2) la force attractive et la force d'hydratation sont constantes sur tout le diagramme et égales aux expressions trouvées pour le LC₁₁C₉. Nous ne faisons varier que la force électrostatique selon (IV-10). L'apparition de la charge, dans le système LC₁₁C₉ initialement non chargé, permet de faire apparaître une zone de démixtion entre deux phases lamellaires, comme cela a déjà été vu au paragraphe IV-C-2. Mais même avec la charge du DDAB, il n'y a pas assez de répulsion électrostatique pour faire apparaître un point critique. Dans le système phosphatidylcholine/amphiphile chargé/eau, en prenant une force attractive de type van der Waals avec une constante de Hamaker de $6 \times 10^{-21} \text{J}$ et la même origine que pour la force électrostatique, Jönsson et Persson ont calculé que 0.6% en moles d'amphiphile chargé ajouté au lipide suffit pour faire disparaître la région biphasique [22]. Donc dans notre cas l'étendue de la zone de démixtion est une preuve de l'existence d'une forte attraction d'adhésion produite par l'introduction des glycolipides.

H-3) la force attractive est fixée, égale à celle du DDAB; la force d'hydratation varie avec x_{LC11C9} selon les résultats expérimentaux décrits au paragraphe IV.B.1.a et la force électrostatique varie selon (IV-10). Dans la partie inférieure du diagramme, on retrouve le résultat du paragraphe IV-C-1 : la répulsion à courte distance introduite par le glycolipide ferme le trou de miscibilité, contrairement au diagramme 1). Dans la partie supérieure, la zone de démixtion est trop réduite. Très peu de charge (<5%) suffit à fermer le trou de miscibilité, car la force attractive est ici faible, contrairement aux diagrammes précédent H-2 et suivant H-4.

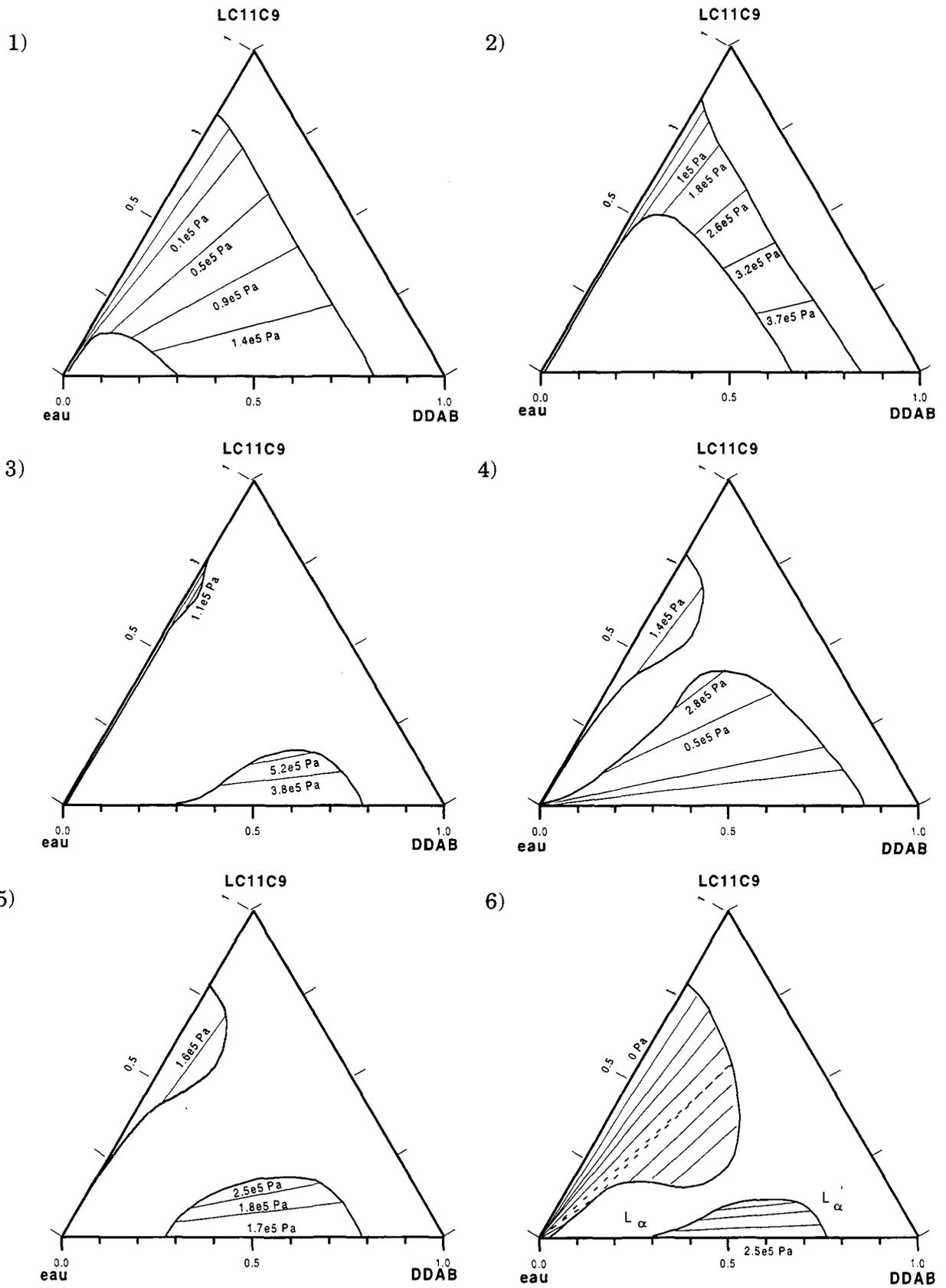


Figure IV- 18 : Diagrammes de phases théoriques (1-5) et diagramme expérimental (6) du système eau / DDAB / LC₁₁C₉. Les hypothèses de calculs sont données dans le texte.

H-4) la force attractive est fixée, égale à celle du LC₁₁C₉; la force d'hydratation et la force électrostatique varient comme pour H-3. La zone de demixtion étant très élargie dans la partie inférieure du diagramme, la force attractive y est clairement surestimée. Par contre, on obtient deux points critiques, qui s'expliquent par l'exaltation de la force répulsive à courte portée entre 50 et 75% de LC₁₁C₉, lorsque nous extrapolons au-dessous de 10⁶ Pa, les résultats obtenus au-dessus de 10⁶ Pa, comme nous l'avons remarqué au paragraphe IV-C-1.

H-5) les trois forces varient avec $x_{LC_{11}C_9}$. Les forces électrostatique et d'hydratation varient comme pour les diagrammes précédents. Pour estimer la variation de la force attractive dans les bicouches mixtes, nous considérons d'une part la contribution des chaînes hydrocarbonées, indépendante de $x_{LC_{11}C_9}$, qui s'exprime par une force de van der Waals avec l'origine à 24Å et une constante de Hamaker de $6 \times 10^{-21} J$. D'autre part nous exprimons la contribution des têtes polaires par une exponentielle $\Pi_a \exp[-(D-28)/\lambda_a]$. Nous avons choisi $\lambda_a = 3 \text{Å}$ indépendant de $x_{LC_{11}C_9}$ et une variation linéaire de la pression au contact, Π_a , entre les valeurs extrêmes trouvées pour le DDAB pur et le LC₁₁C₉ pur :

$$\Pi_a = (1 - x_{LC_{11}C_9}) * 1.1 \times 10^7 + x_{LC_{11}C_9} * 9 \times 10^7 \quad (\text{IV- 11})$$

Ce dernier diagramme est le plus proche du diagramme expérimental 6). Dans la partie riche en DDAB, il est clair que c'est l'augmentation de la répulsion à courte distance due à la protusion des têtes sucres introduites qui induit le premier point critique. De plus, nous remarquons que les pressions prédites pour les plateaux d'équilibre sont bien du même ordre de grandeur que les valeurs expérimentales. L'apparition de la deuxième zone de demixtion est due à l'adhésion apportée par le glycolipide et la diminution de la répulsion électrostatique. Sur la figure cette zone apparaît réduite par rapport au résultat expérimental : il est possible que nous ayons surestimé la force d'hydratation en extrapolant les mesures de pressions osmotiques. Mais il faut rappeler que nous avons fait d'autres hypothèses implicites : pas d'entropie de mélanges, variation linéaire de la force attractive avec $x_{LC_{11}C_9}$, constante de dissociation du DDAB indépendante de $x_{LC_{11}C_9}$. Par contre la force attractive d'adhésion du glycolipide est au moins égale à la valeur que nous lui avons trouvée, ce qui confirme que les têtes polaires constituées de sucres donnent des énergies d'adhésion plus importantes que les têtes polaires de phospholipides.

Des résultats sur des systèmes mixtes glycolipides/phospholipides existent dans la littérature, essentiellement avec le GM1, qui est chargé. Avec 10 ou 20% de GM1 mélangé à la DOPC ou à la DPPC (deux phospholipides zwitterioniques, donc globalement neutres), Parker n'a mis en évidence par SFA qu'une augmentation de la répulsion à courte distance, liée à l'hydratation et à l'encombrement stérique des têtes polaires volumineuses du GM1 [23]. Il n'a mesuré aucune énergie attractive qui puisse promouvoir l'adhésion des bicouches. De même, par la méthode de stress osmotique, McIntosh et Simon ont trouvé que dans le système GM1/lécithine d'œuf, la force d'interaction est toujours répulsive, même si la constante de Hamaker est augmentée par la présence des oligosaccharides dans les têtes polaires [13]. Seuls Luckham et coll. ont mesuré par SFA des énergies d'adhésion dans les systèmes mixtes GM1/DPPC et GT1/DPPC [24]. Dans le Tableau IV- nous avons regroupé nos résultats d'énergie d'adhésion et ceux trouvés dans la littérature. Il faut noter que les valeurs numériques dépendent de la définition de la distance "au contact" et sont donc à considérer relativement, les unes par rapport aux autres.

	<i>Energie d'adhésion au contact (mN/m)</i>
DDAB	-3.3 (à 28Å) ; -12.6 (à 24Å)
LC ₁₁ C ₉	-27 (à 28Å) ; -5.1 (à 33Å)
DGDG	-1.8 [20]
DPPC	-0.9 [20]
GM1	0 [23] et [24]
GM1/DOPC	0 [23]
GM1/DPPC	-2.5 [24]; 0 [23] et [13]
GT1/DPPC	-3.1 [24]

Tableau IV- 3 : Tableau comparatif des valeurs des énergies d'adhésion mesurées sur différents systèmes de glycolipides.

IV.D. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mesuré expérimentalement les pressions osmotiques des phases lamellaires mixtes DDAB/LC₁₁C₉ et DDAB/LS. A courte distance nous avons mis en évidence une augmentation de la répulsion stérique dans les fortes pressions liée aux têtes polaires volumineuses des glycolipides. Nous avons également observé que la portée de cette répulsion augmente linéairement avec la fraction molaire x_{GL} de glycolipide ajoutée. Cet effet stérique nous a permis d'interpréter la fermeture du trou de miscibilité L_{α} - L_{α}' , avec un point critique, dans la partie riche en DDAB des diagrammes de phases ternaires.

D'autre part dans le cas du LC₁₁C₉, nous avons trouvé, en modélisant théoriquement le diagramme de phases ternaire, qu'il existe une forte force attractive au contact, sans laquelle il n'y aurait pas de deuxième zone double-lamellaire aussi étendue. Au niveau des têtes polaires, nous avons estimé l'énergie d'adhésion à -5.1mN/m. Notre réponse à la question initiale - les glycolipides induisent-ils une force d'adhésion dans les membranes ? - est donc "oui" dans le cas non chargé du LC₁₁C₉.

Enfin à partir du calcul explicite de toutes les interactions en fonction de la composition, nous avons obtenu ce que nous pouvons appeler **l'équation d'état** de notre système mixte dans le cas du LC₁₁C₉ et que nous avons représenté sur la Figure IV- 19 : la variation de la pression Π est donnée en fonction de $\Phi_{DDAB+LC_{11}C_9}$ la fraction volumique de molécules amphiphiles et $x_{LC_{11}C_9}$ la fraction molaire de LC₁₁C₉ par rapport au DDAB.

Cette figure met en évidence le fait que les deux points critiques se placent à des pressions osmotiques du même ordre de grandeur. A posteriori ceci explique l'observation au chapitre III des échantillons blancs monophasiques à température ambiante dans la région intermédiaire : on imagine que le système fluctue facilement entre ces états proches en énergie. Déjà dans le cas de DDAB pur, nous avons remarqué qu'au voisinage de la zone biphasique, côté dilué (L_{α}), les échantillons sont plus fluides qu'ailleurs, probablement parce que les phases lamellaires sont ouvertes et non plus sous forme d'oignons. Comme la région d'échantillons blancs se situe entre deux points critiques, on peut donc imaginer que c'est aussi la proximité de ces régions critiques qui induit une forte densité de défauts dans la phase lamellaire. De plus lorsque la température augmente on sait que les deux points critiques s'éloignent en composition (cf. chapitre III). Donc on prévoit que la différence en énergie entre les deux états

critiques augmente avec la température ce qui doit stabiliser cette région lamellaire monophasique intermédiaire et explique que les échantillons deviennent progressivement transparents en chauffant.

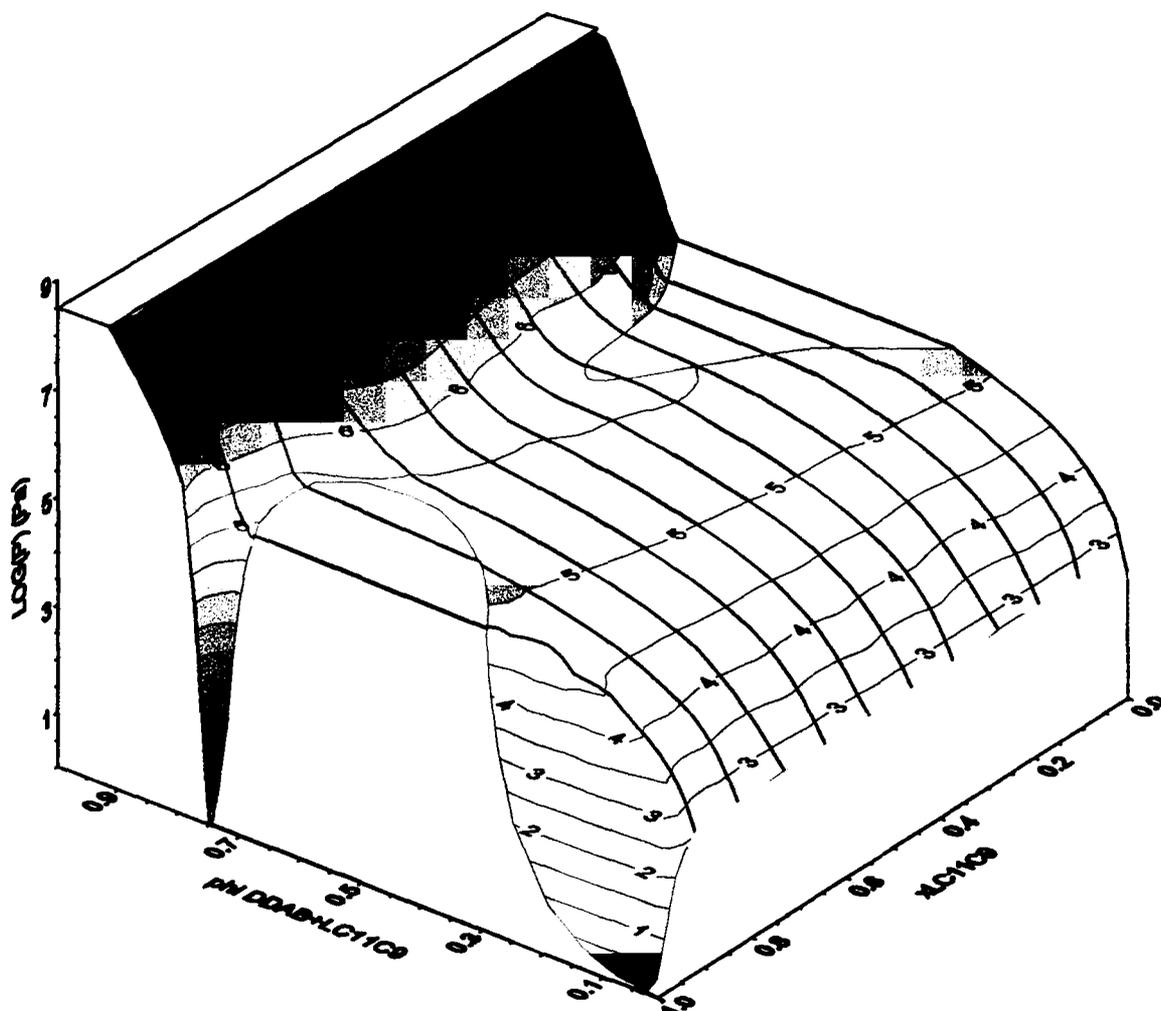


Figure IV- 19 : Représentation de l'équation d'état $\Pi(\Phi_{DDAB+LC11C9}, x_{LC11C9})$ du système eau/DDAB/LC₁₁C₉ avec $\Phi_{DDAB+LC11C9}$ la fraction volumique de molécules amphiphiles et x_{LC11C9} la fraction molaire de LC₁₁C₉ par rapport au DDAB. Les lignes en trait gras correspondent aux courbes pression-distance calculées pour chaque x_{LC11C9} donné avec les hypothèses de calculs H-5 décrites dans ce chapitre. Les deux zones blanches sont les deux régions lamellaires biphasiques prédites.

Références

- [1] Israelachvili J. N. *Intermolecular and surface forces*, 2nd Edition, Academic Press, London, 1991
- [2] Rand R. P. and Parsegian V. A., *Biochim. Biophys. Acta* **988** (1989) 351-376
- [3] Eriksson J. C. and Ljunggren S. *Adv. in Colloid Interface Sci.* **41** (1992) 33-43
- [4] Parsegian V. A. *Langmuir* **9** (1993) 3625-3628; Israelachvili J.N. *Langmuir* **10** (1994) 3369-3370; Parsegian V. A. *Langmuir* **11** (1995) 1047
- [5] Evans E. *Langmuir* **7** (1991) 1900-1908
- [6] Parsegian V. A., Rand R. P. and Rau D. C. *Methods Enzymol.* **127** (1986) 400-416
- [7] Claesson P. M., Ederth T., Bergeron V. and Rutland M. W. *Adv. Colloid Interface Sci.* **68** (1996) 119-183
- [8] Bagger-Jørgensen H. and Olsson U. *Langmuir* **12** (1996) 4057-4059
- [9] Bonnet-Gonnet C. résultats non publiés mais accessibles sur Internet : http://www.mgsl.dcrn.nih.gov/docs/osmdata/Fit_Dex.html
- [10] Gawrisch, K.; Arnold, K.; Dietze, K.; Schulze, U. In *Electromagnetic Fields and Biomembrane*; Markov, M.; Blank, M.; Ed.; New York: Plenum Press, p9-18, 1988
- [11] O'Brien F. E. M. *J. Sci. Instrum.* **21** (1948) 73-76
- [12] Parsegian VA, Fuller N and Rand RP *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (1979) 2750
- [13] McIntosh T. J., Magid A. D. and Simon S. A. *Biochemistry* **26** (1987) 7325
- [14] Derjaguin B. V. and Obuchov *Acta Physic, URSS* **5** (1936) 1
- [15] Scheludko A. and Exerowa D. *Kolloid-Z.* **155** (1957) 39 ; Mysels K. J. *Disc. Faraday Soc.* **42** (1966) 42 ; Bergeron V. and Radke C. J. *Langmuir* **8** (1992) 3020
- [16] Bergeron V. *Langmuir* **12** (1996) 5751-5755
- [17] Gershfeld N. L., Stevens W. B. and Nossal R. J. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81** (1986)
- [18] McIntosh T. J. and Simon S. A. *Biochemistry* **33** (1994) 10477-10486
- [19] LeNeveu D. M., Rand R.P., Parsegian V.A. and Gingell D. *Biophys. J.* **18** (1976) 209-230; Lis L. J., McAlister M., Fuller N, Rand R. P. and Parsegian V. A. *Biophys. J.* **37** (1982) 657-666
- [20] Marra J. J. *Colloid Interface Sci.* **107** (1985) 446-458 et **109** (1986) 11-20
- [21] Evans E. and Needham D. *J. Phys. Chem.* **91** (1987) 4219-4228

[22] Jönsson B. and Persson P. K. T. *J. Colloid Interface Sci.* **115** (1987) 507-512

[23] Parker J. L. *J. Colloid Interface Sci.* **137** (1990) 571-576

[24] Wood J., Luckham P. and Swart R. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*
77 (1993) 179-189

Chapitre V

Effet de l'addition de glycolipides sur le gonflement maximum de la phase lamellaire

Le gonflement maximum d'une phase lamellaire peut être limité par différents mécanismes d'équilibre de forces :

- le cas le plus standard correspond à la situation où la phase lamellaire est en équilibre avec des monomères très dilués, c'est-à-dire qu'au gonflement maximal D_{\max} , la pression totale est quasi nulle ($\sim 100\text{Pa}$ aux termes de tension interfaciale microscopique près). Les bicouches non chargées de DMPC en sont un exemple, et comme nous l'avons vu dans le chapitre II, la force de van der Waals à D_{\max} égale alors la répulsion stérique de courte portée appelée aussi "hydratation".

- un autre cas correspond à la phase lamellaire de $C_{12}E_5$ qui contient jusqu'à 99% d'eau. L'estimation du gonflement maximum permet d'accéder implicitement à la force attractive qui contrebalance la répulsion à longue distance de type Helfrich qui intervient dans ce cas là [1].

- dans le cas des bicouches chargées de DDAB, le gonflement maximal n'apparaît également qu'à des concentrations très faibles ($\sim 3\%$ en poids). Il correspond à l'apparition de la phase $[L_\alpha]$ formée de cristallites de phase lamellaire en coexistence avec des vésicules, sans séparation de phase macroscopique [2]. L'origine de D_{\max} provient alors de l'équilibre thermodynamique entre la phase lamellaire et la phase de vésicules qui se traduit par l'équilibre des pressions osmotiques dans ces deux phases : la répulsion électrostatique entre les bicouches devient égale à la répulsion d'origine entropique dans la phase $^A L_3$ en équilibre [3] :

$$\Pi(D_{\max})_{L_\alpha} = 64kTc_s\gamma^2 \exp(-\kappa'D) = \Pi(\xi)_{L_3} = kT/\xi^3 \quad (\text{V- 1})$$

Sur la Figure V- 1 nous avons détaillé la séquence complète des structures rencontrées au cours de la dilution de la phase lamellaire de DDAB et que nous retrouverons dans ce chapitre :

- la phase lamellaire L_α est transparente, biréfringente statiquement et donne des pics de Bragg fins. La dilution dans cette phase obéit à la loi linéaire $\Phi=t/D$ où Φ est la fraction volumique de tensioactif, t l'épaisseur des bicouches et D la période smectique.

- la phase $[L_\alpha]$ correspond à un gel de cristallites lamellaires (que l'on appelle aussi sphérulites ou oignons) dispersés dans une phase diluée de vésicules. Les échantillons sont assez fluides, transparents et biréfringents statiquement. En diffusion elle se caractérise par l'invariance de la position des pics de Bragg donc de la période lamellaire $D=D_{\max}$ avec Φ . Parfois on observe également un pic moins intense à une deuxième distance caractéristique λ , de l'ordre de 2000-4000Å, qui correspond à la distance centre à centre des sphérulites. De plus on a une remontée aux petits angles démontrant l'hétérogénéité.

- la phase L_3 est métastable et au cours du temps démixe entre la phase $[L_\alpha]$ et la phase vésiculaire plus diluée. Elle est constituée de lamelles aléatoires, et est biréfringente d'écoulement. Elle est caractérisée par une longueur de persistance ξ qui donne une bosse de diffusion diffuse. Il est possible de distinguer le cas symétrique, c'est-à-dire lorsque la fraction volumique de domaines intérieurs, délimités par les bicouches, est égale à la fraction volumique de domaines extérieurs et tel que avec ξ qui doit varier en $1.5*\delta/\Phi$, et le cas asymétrique où la pseudo-phase extérieure est plus grande que la pseudo-phase intérieure et ξ est indépendant de Φ [4, 5]. De telles structures ont été observées en présence d'huile dans des systèmes ternaires [6] et dans des systèmes quaternaires en présence de cotensioactif [7, 8]. En fait les observations en microscopie par cryofracture ont confirmé que cette phase est asymétrique dans le cas du DDAB avec des tailles de vésicules de l'ordre de 300Å [9].

- lorsque l'on dilue l'échantillon, la phase L_3 devient de plus en plus asymétrique. On aboutit alors, sans transition marquée, à une phase de vésicules qui est liquide, isotrope du fait de la trop faible concentration d'objets et thermodynamiquement à l'équilibre.

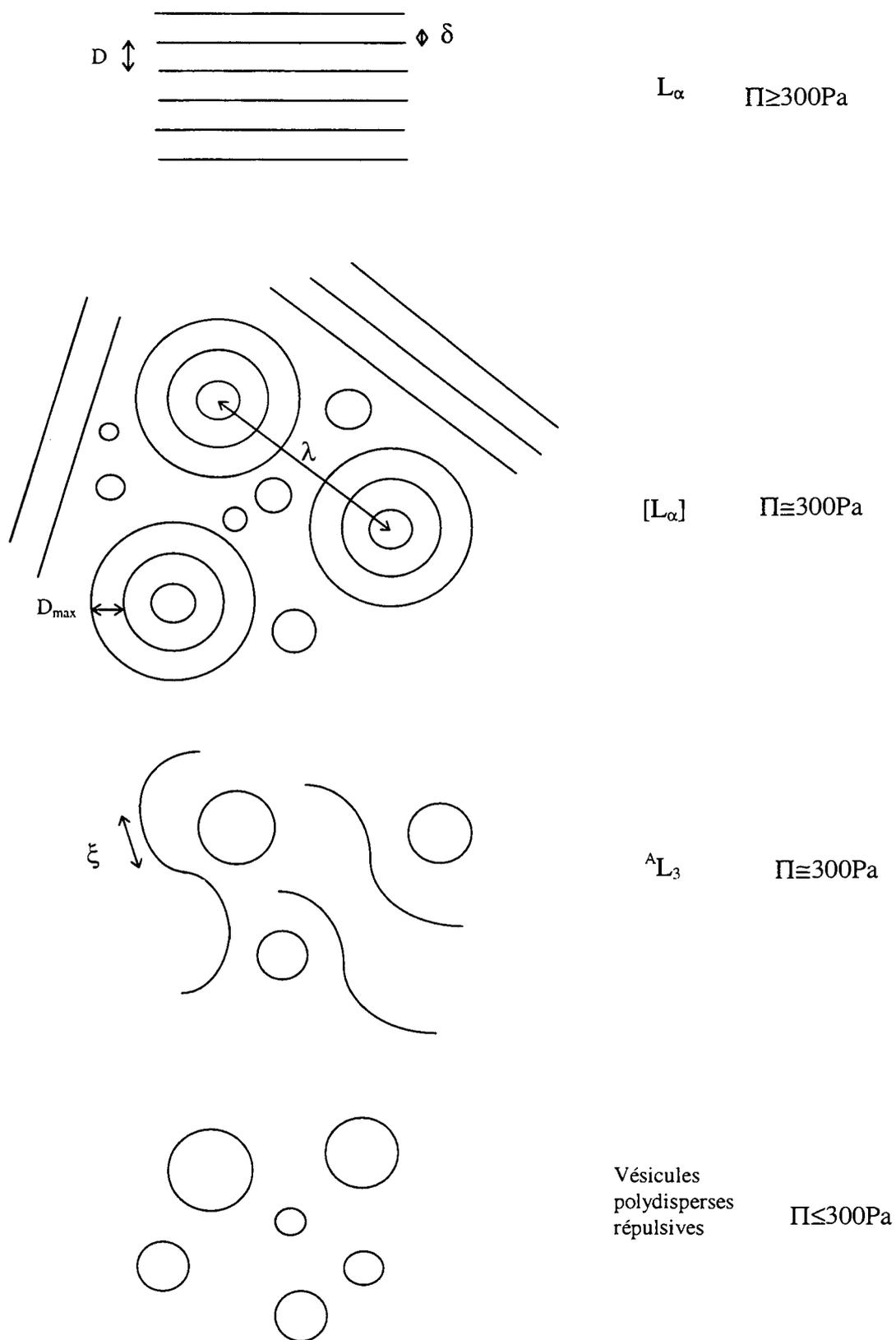


Figure V- 1: Schéma de la séquence de structures que l'on rencontre au cours de la dilution de la phase lamellaire de DDAB.

L'étude de la variation de D_{\max} en fonction du paramètre thermodynamique que représente l'ajout de glycolipide est ainsi intéressante puisqu'elle doit nous permettre de caractériser l'effet des glycolipides sur les interactions mises en jeu dans l'existence de D_{\max} . Deux possibilités sont envisageables, comme nous l'avons représenté sur la Figure V- 2 pour le cas du DDAB : soit le glycolipide induit une diminution de D_{\max} en fonction de x_{GL} , soit une augmentation.

Après une description de la préparation des échantillons et un rappel sur les méthodes de diffusion aux petits angles utilisées pour caractériser les microstructures, nous donnons, dans ce chapitre, les résultats expérimentaux sur le gonflement maximal obtenus sur les systèmes DMPC/LC₁₁C₉, DDAB/LC₁₁C₉ et DDAB/LS.

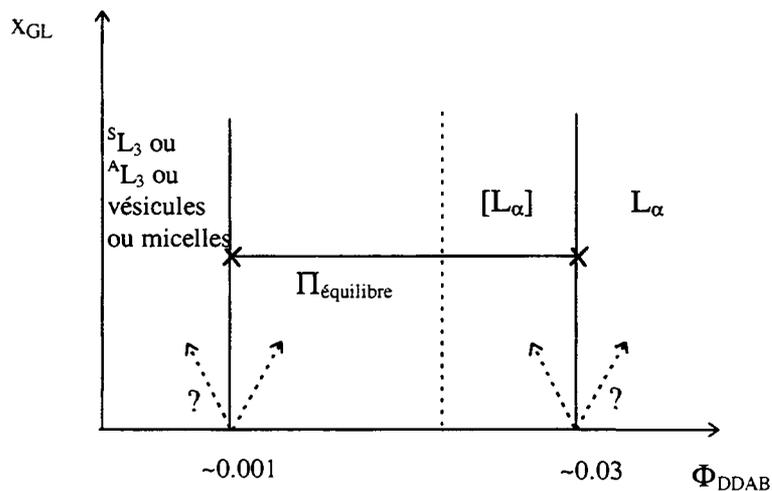


Figure V- 2 : Représentation schématique et prévisionnelle du diagramme de phases du DDAB, dans la partie diluée, en fonction de la fraction de glycolipide ajoutée.

V.A. Méthodes expérimentales

V.A.1. Préparation et analyse en composition des échantillons

Pour le système DDAB/LS les échantillons ont été préparés classiquement dans D₂O par pesée des poudres et du solvant. Pour les mélanges DDAB/LC₁₁C₉ et DMPC/LC₁₁C₉, la molécule de LC₁₁C₉ étant peu soluble, nous avons suivi la méthodologie mise au point par B. Demé [10] et déjà utilisée au chapitre III : c'est-à-dire que nous avons d'abord formé une phase très diluée de vésicules, rendue homogène par sonication. Il s'agit alors d'une dispersion moléculaire. Puis après lyophilisation, nous sommes revenus à la concentration souhaitée en ajoutant la quantité nécessaire de D₂O au mélange des deux poudres.

Dans le cas des échantillons biphasiques avec le DDAB, nous avons essayé de travailler avec des volumes aussi grands que possible (~4ml) pour améliorer la séparation des phases en coexistence. Nous avons parfois forcé la séparation par centrifugation modérée, à 4500 tr/min pendant 12 heures, soit environ 5×g à R=10cm.

Des dosages de la composition des phases ont été réalisés d'une part par la pesée des poudres sèches après lyophilisation pour déduire la teneur en eau et d'autre part par chromatographie Iatroscan, en suivant le mode opératoire donné dans l'Annexe 3, pour déterminer la fraction molaire de glycolipide.

V.A.2. Diffusion de neutrons et de rayons X aux petits angles (DNPA et DXPA)

La diffusion de rayonnement aux petits angles permet dans de nombreux cas de caractériser la structure des agrégats moléculaires en solution aqueuse. En effet l'intensité diffusée par un ensemble de N particules dans un volume V est donnée en fonction du vecteur d'onde q par :

$$I(q) = \frac{N}{V} P(q) S(q) \quad (\text{V- 2})$$

où P(q) est le facteur de forme de la particule diffusante, qui dépend de sa géométrie et S(q) le facteur de structure qui rend compte des interactions entre les particules.

V.A.2.a. Cas des micelles globulaires

Pour des particules sphériques homogènes, sans interaction ($S(q)=1$), $P(q)$ est donné par :

$$I(q) = \Phi V(R)(\Delta\rho)^2 (f(q,R))^2 \quad (\text{V- 3})$$

avec Φ la fraction volumique occupée par les particules, $\Delta\rho$ la différence de densité de longueur de diffusion, $V(R)$ le volume d'une sphère de rayon R , $V(R) = 4\pi R^3 / 3$ et $f(q,R) = \frac{3[\sin(qR) - qR \cos(qR)]}{(qR)^3}$.

Aux très petits angles, $q \ll R^{-1}$, on devrait observer la loi limite de Guinier, jamais observable en pratique pour des micelles ioniques en raison des interactions électrostatiques fortes :

$$I(q) \sim \Phi(\Delta\rho)^2 V(R) \exp\left(-\frac{R_G^2 q^2}{3}\right) \quad (\text{V- 4})$$

avec R_G le rayon de gyration des particules ($R_G^2 = 3R^2/5$).

Dans le cas de deux coquilles ellipsoïdales concentriques de rayons intérieur R_i et extérieur R_e , d'ellipticité ε , la formule (V- 3) se complique et devient [11]:

$$I(q, R_i, R_e, \varepsilon) = \Phi \int_0^{\pi/2} F^2[q, r(R, \varepsilon, \alpha)] \sin \alpha \, d\alpha \quad (\text{V- 5})$$

où $r(R, \varepsilon, \alpha) = R(\sin^2 \alpha + \varepsilon^2 \cos^2 \alpha)^{1/2}$ et

$F(q, r) = \frac{1}{V} [\rho_i V(R_i) f(q, r_i) + (\rho_e - \rho_i) V(R_e) f(q, r_e)]$ et $V = \rho_i V(R_i) + (\rho_e - \rho_i) V(R_e)$ avec $V(R)$ et $f(q, R)$ définis plus haut.

Lorsque la concentration en tensioactif augmente, la micelle peut être le siège d'une transition vers des cylindres rigides ou flexibles [12, 13]. L'expression exacte du facteur de forme fait alors intervenir la fonction de Bessel d'ordre un [11]. Aux petits angles et si on néglige les interactions, on peut écrire :

$$I(q) \sim \pi \Phi V_L \frac{(\Delta\rho)^2}{q} \exp\left(-\frac{R_c^2 q^2}{4}\right) \quad (\text{V- 6})$$

avec V_L le volume par unité de longueur du cylindre de rayon R_c , c'est à dire πR_c^2 . Le tracé classique $\log(Iq) = f(q)$ donne alors une droite car la diffusion aux petits angles tend vers une loi de puissance en -1 .

V.A.2.b. Cas des vésicules

Pour des bicouches libres, d'épaisseur δ , $I(q)$ est donné par :

$$I(q) = 2\pi\Phi t \cdot \frac{(\Delta\rho)^2}{q^2} \cdot \left(\frac{\sin q\delta/2}{q\delta/2} \right)^2 \quad (\text{V- 7})$$

et aux petits angles l'approximation est :

$$I(q) \sim 2\pi\Phi t \cdot \frac{(\Delta\rho)^2}{q^2} \cdot \exp\left[-\frac{(q\delta)^2}{12}\right] \quad (\text{V- 8})$$

V.A.2.c. Analyse des micelles

Pour analyser les spectres de phases micellaires nous avons utilisé un programme développé par J. S. Pedersen qui permet le paramétrage simultané des données de rayons X et de neutrons, par la méthode des moindres carrés, pour des particules sphériques ou cylindriques, neutres ou chargées [11].

Le facteur de structure est calculé analytiquement pour des particules sphériques en résolvant l'équation intégrale d'Ornstein-Zernike avec une relation de fermeture approchée. Pour le potentiel de sphères dures, on utilise l'approximation de Percus-Yevick. Dans le cas de micelles chargées, le programme reprend les calculs de Hayter et Penfold obtenus avec un potentiel d'interaction électrostatique écranté de type Yukawa et avec l'hypothèse de "Mean Spherical Approximation", MSA [14]. Pour obtenir de meilleurs résultats aux faibles concentrations, la renormalisation du rayon de sphère dure est faite comme décrite par Hansen et Hayter [15].

A l'usage, et comme nous le verrons dans la partie expérimentale, nous avons éliminé l'hypothèse des cylindres qui ne donnait pas de résultats satisfaisants pour nos échantillons. Cinq paramètres sont donc restés effectivement libres :

- le nombre d'aggrégation N des micelles
- le nombre d'hydratation h (c'est-à-dire le nombre de molécules d'eau par tensioactif incluses dans le volume exclu)
- l'ellipticité ε

pour le facteur de forme, et

- la fraction volumique sphères dures v_{HS}
- la charge effective par tensioactif Z_{eff}

pour le facteur de structure.

Les valeurs numériques connues et utilisées des densités de longueur de diffusion en neutrons et en X, sont données dans le Tableau V- 1, pour les trois molécules de DDAB, LS et LC₁₁C₉.

	DDAB		LS		LC ₁₁ C ₉		D ₂ O
	<i>polaire</i>	<i>apolaire</i>	<i>polaire</i>	<i>apolaire</i>	<i>polaire</i>	<i>apolaire</i>	
Volume partiel (Å ³ /molécule)	84	700	372	323	415	563	30
ρ _X (×10 ¹⁰ cm ⁻²)	20.2	7.8	14.8	7.8	13.3	8.1	9.4
ρ _{neutron} (×10 ¹⁰ cm ⁻²)	8.3	-0.39	4.7	-0.32	1.7	-0.43	6.4

Tableau V- 1 : Densités de longueur de diffusion en rayons X et en neutrons.

V.A.2.d. Conditions expérimentales

Les expériences de DXPA ont été réalisées au laboratoire sur le montage Huxley-Holmes à collimation ponctuelle [16]. Les échantillons ont été préparés dans des cellules plates avec des parois en Kapton collées. Les spectres ont été enregistrés sur un détecteur à gaz bidimensionnel. La gamme de vecteur d'onde utile est $0.02 < q < 0.35 \text{Å}^{-1}$. Un exemple de spectre brut en deux dimensions est donné sur la Figure V- 3 tandis que nous avons tracé sur la Figure V- 4 le spectre regroupé radialement ainsi que celui de la cuve vide à deux parois de Kapton et l'eau avec la cuve.

La normalisation en échelle absolue (cm⁻¹) est faite à partir de l'eau. En effet la valeur de l'intensité diffusée par l'eau se calcule théoriquement à partir de la compressibilité χ_T . A $q=0$ on a :

$$S(0) = \frac{\chi_T}{\chi_T^0} = \frac{\chi_T}{(\rho kT)^{-1}} \quad (\text{V- 9})$$

et

$$I(0) = \rho \cdot f_e^2 \cdot n_e^2 \cdot S(0) \quad (\text{V- 10})$$

avec $\chi_T = 45 \times 10^{-11} \text{Pa}$ [17], $\rho = 55 \text{ moles/l}$, $f_e = 0.282 \times 10^{-12} \text{cm}$ le facteur de Thomson et $n_e = 10$. Finalement on trouve $I(\text{eau}) = 1.613 \times 10^{-2} \text{cm}^{-1}$.

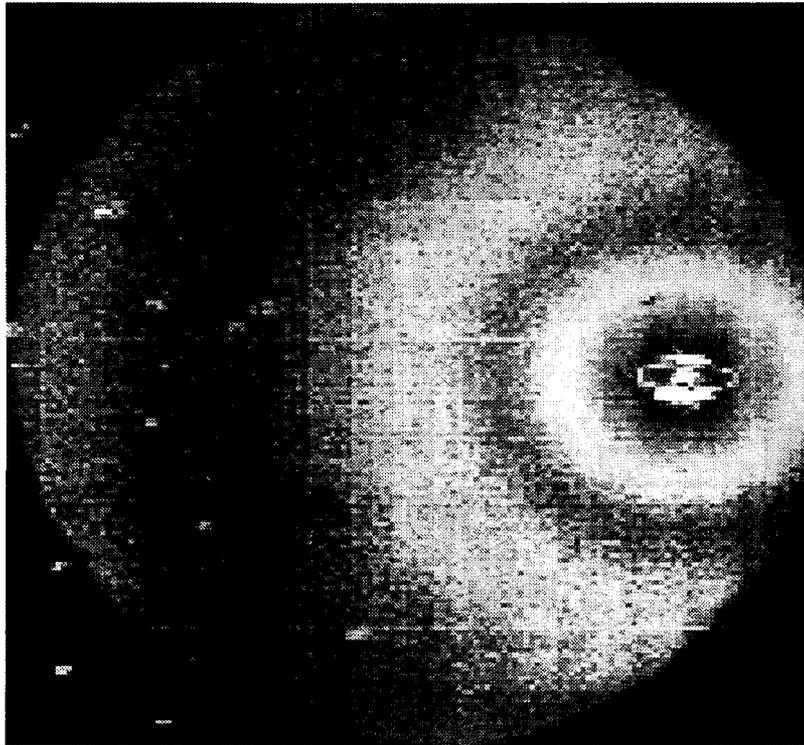


Figure V- 3 : Spectre brut de DXPA en deux dimensions d'un échantillon de LS, 4% en poids dans D_2O , obtenu sur un détecteur à fils.

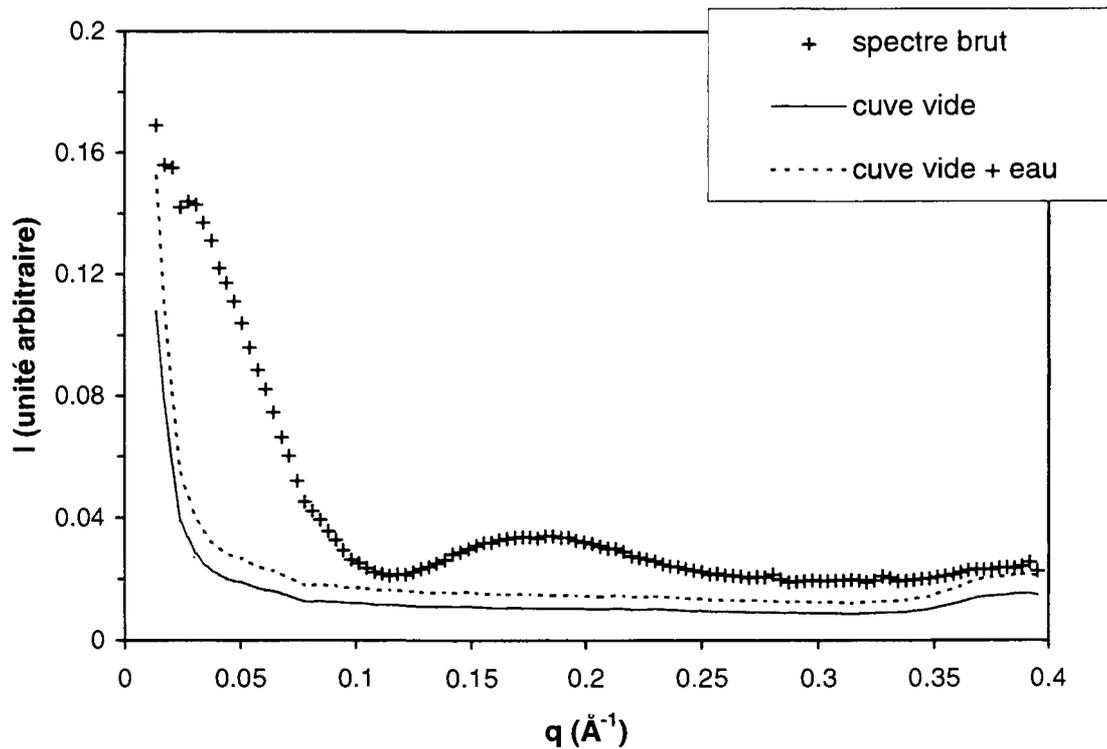


Figure V- 4 : Spectre de DXPA de la figure précédente regroupé radialement, ainsi que les spectres de la cuve vide en Kapton et de l'eau.

Les expériences en DNPA ont été réalisées en plusieurs séries, sur plusieurs spectromètres. Pour le système DDAB/LS nous avons travaillé sur PAXE au LLB avec trois configurations ($\lambda=5.5\text{\AA}$ et détecteur, décentré, à 1.5m ou 5m ; $\lambda=14\text{\AA}$ et détecteur à 5m), d'où la gamme totale $0.0044 < q < 0.4\text{\AA}^{-1}$. Pour le système DDAB/LC₁₁C₉ nous avons réalisé une série de mesure sur D11 à l'ILL ($\lambda=6\text{\AA}$ et détecteur à 35, 10, 2.5 et 1.1m) avec $0.0017 < q < 0.3\text{\AA}^{-1}$. La deuxième série a été effectuée sur D22 à l'ILL ($\lambda=8\text{\AA}$ et détecteur à 1.7 et 12m et $\lambda=12\text{\AA}$ et détecteur à 18m) avec $0.003 < q < 0.4\text{\AA}^{-1}$.

Les intensités sont données en unité absolue (cm^{-1}) après une calibration par l'eau (H_2O) sur chaque configuration selon la procédure décrite par Jacrot [18] (cf. aussi [19]). Sur la Figure V- 5 nous avons tracé deux spectres du même échantillon obtenus sur deux spectromètres différents. Nous notons que les intensités se raccordent bien.

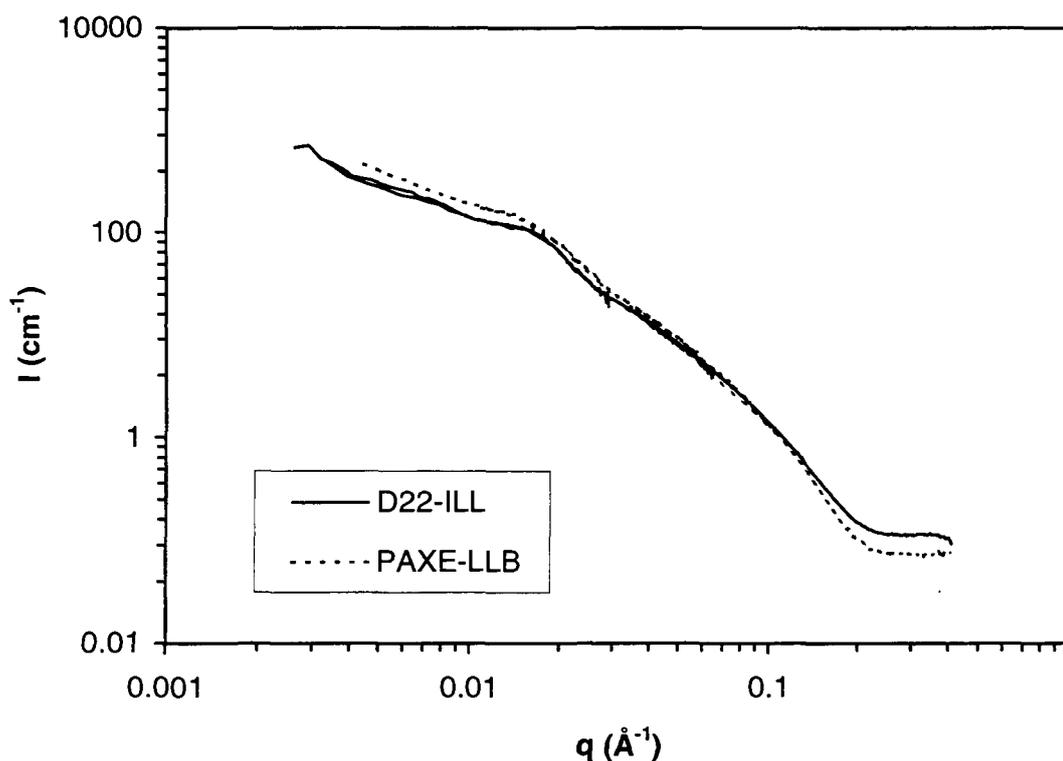


Figure V- 5 : Spectres de DNPA d'un même échantillon (phase concentrée du mélange initial DDAB 1.65%+LC₁₁C₉ 2.3% dans D₂O) obtenus sur deux spectromètres différents et calibrés par rapport à H₂O.

V.B. Résultats

V.B.1. Système non chargé DMPC/LC₁₁C₉

Cinq échantillons ont été préparés au gonflement maximum, c'est-à-dire avec de l'eau en excès de la phase lamellaire donc avec au plus 50% en poids de lipides au total. Les échantillons ont été analysés par DXPA, à température ambiante. Les valeurs de D_{\max} obtenues sont données sur la Figure V- 6 en fonction de la fraction molaire de $x_{LC_{11}C_9}$ dans les bicouches.

Nous remarquons que D_{\max} varie linéairement avec $x_{LC_{11}C_9}$, entre 62Å pour la DMPC pure et 42Å pour le LC₁₁C₉. Tout se passe comme si nous avons un mélange idéal des deux molécules. Les deux lipides formant des bicouches d'épaisseurs très proches (~33Å pour le LC₁₁C₉ et ~35Å pour la DMPC), la variation d'épaisseur de la bicouche mixte doit être négligeable, même si les fractions de parties polaire et apolaire sont différentes pour les deux molécules.

Si on reprend le bilan des forces de l'équation (II-10), en supposant l'additivité des pressions, on peut écrire :

$$\begin{aligned} \Pi_{hyd}^{mél}(D_{\max}) + \Pi_{vdw}^{mél}(D_{\max}) &= 0 \\ &= x_{LC_{11}C_9}[\Pi_{hyd}(D_{\max}, \lambda, \Pi_0) + \Pi_{vdw}(D_{\max}, A, d)] \\ &\quad + (1 - x_{LC_{11}C_9})[\Pi_{hyd}(D_{\max}, \lambda', \Pi_0') + \Pi_{vdw}(D_{\max}, A', d')] \end{aligned} \quad (V- 11)$$

avec λ, Π_0 les paramètres de la répulsion stérique pour le LC₁₁C₉ seul, A, d la constante de Hamaker et l'origine associées à la force de van der Waals. λ', Π_0' et A', d' sont les paramètres pour la DMPC. Les valeurs numériques sont données dans le Tableau V- 2 : pour le LC₁₁C₉, nous avons repris les résultats du chapitre IV et pour la DMPC ceux de B. Demé [10]. Les quatre forces sont représentées sur la Figure V- 7 . On remarque que la différence entre les deux lipides provient essentiellement de la pente de la force d'hydratation (mais il faut noter que si on choisit l'origine de la force de van der Waals pour le LC₁₁C₉ au niveau des têtes polaire comme pour la DMPC, donc à 33Å, alors il faut prendre une constante de Hamaker de $1.5 \times 10^{-20} J$, c'est-à-dire 3 fois plus grande que celle de la DMPC, pour obtenir le bon gonflement maximal).

En utilisant l'équation précédente (V-11) nous avons donc calculé la valeur attendue a priori pour D_{\max} en fonction de $x_{LC_{11}C_9}$. Les résultats sont représentés par la

courbe en pointillés sur la Figure V- 6 . On observe que l'allure de cette courbe ne correspond pas au résultat expérimental.

Par contre, si maintenant on fait la moyenne directement de λ , de Π_0 et de A ($\lambda^{mél} = x_{LC_{11}C_9}\lambda + (1 - x_{LC_{11}C_9})\lambda'$; $\Pi_0^{mél} = x_{LC_{11}C_9}\Pi_0 + (1 - x_{LC_{11}C_9})\Pi_0'$ etc...) avant d'utiliser les formules de la force d'hydratation et de la force de van der Waals, on obtient la courbe en trait continu. On retrouve alors une variation linéaire de D_{max} avec $x_{LC_{11}C_9}$.

Autrement dit, si les forces d'hydratation sont additionnées proportionnellement à la fraction molaire de glycolipides ajoutée, on ne retrouve pas les résultats expérimentaux : pour retrouver ces résultats expérimentaux il faut supposer que c'est la portée de la force d'hydratation totale qui dépend du paramètre thermodynamique qu'est la fraction molaire. Ceci est en accord avec les résultats expérimentaux de pressions osmotiques du chapitre IV, avec le système chargé DDAB/LC₁₁C₉ pour lequel nous avons trouvé que pour $x_{LC_{11}C_9} < 0.75$, λ , la portée de la force d'hydratation totale, varie linéairement avec la fraction molaire.

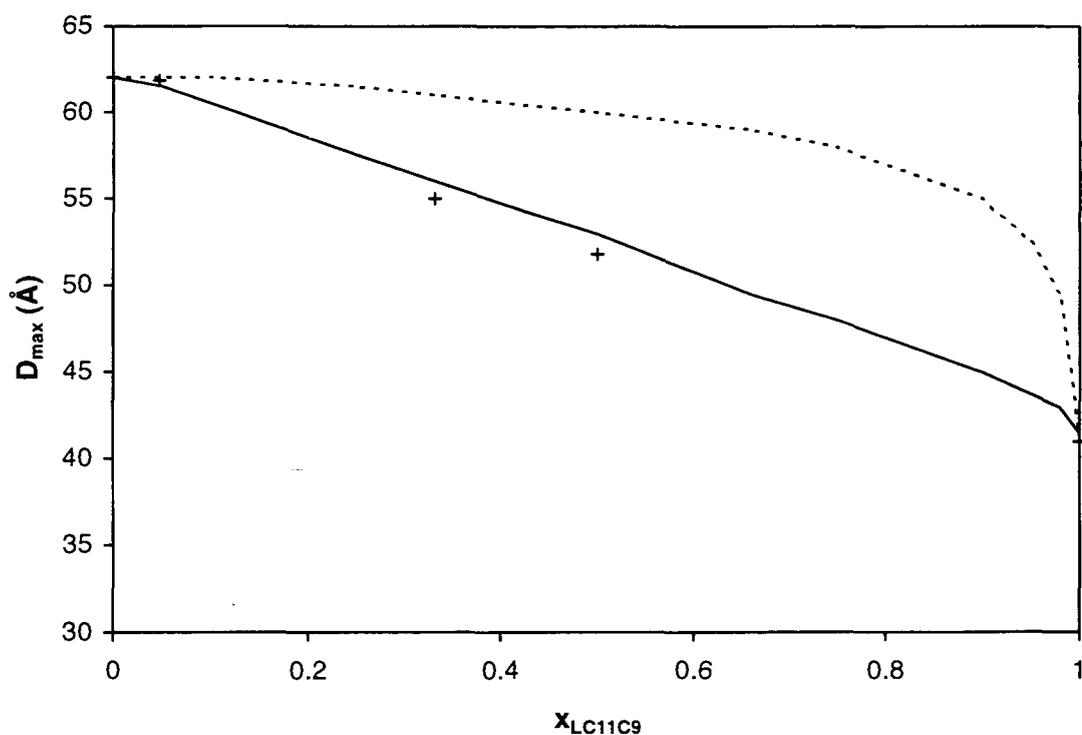


Figure V- 6 : Variation du gonflement maximal des bicouches mixtes DMPC/LC₁₁C₉ en fonction de la fraction molaire de LC₁₁C₉. Les points expérimentaux sont représentés par des croix. La ligne continue a été calculée en faisant la moyenne pondérée des paramètres des forces tandis que la courbe en pointillés correspond à la formule (V-8).

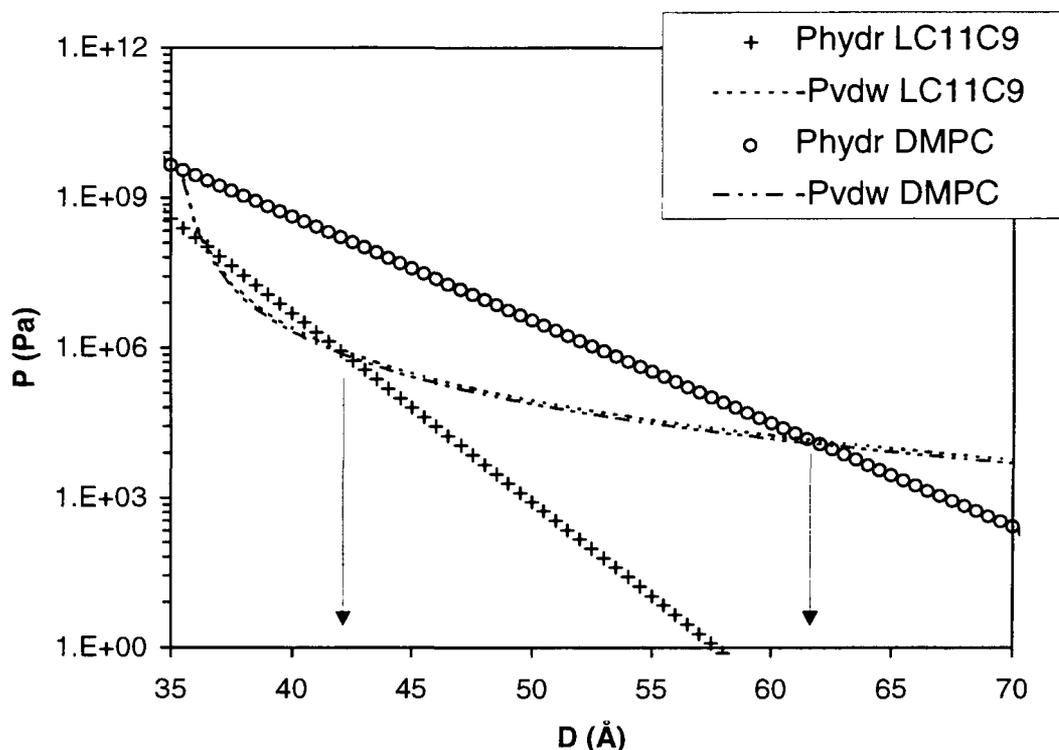


Figure V- 7 : Bilan des forces pour les deux systèmes DMPC et LC₁₁C₉, en échelle semi-logarithmique. Les valeurs numériques des paramètres sont données dans le Tableau V-2. Les flèches indiquent les gonflements maximaux.

	λ (Å)	Π_0 à 35Å (Pa)	A (J)	d_{vdw} (Å)
LC ₁₁ C ₉	1.15	3.8E8	6E-21	35
DMPC	2.1	4.5E9	5.1E-21	35

Tableau V- 2 : Valeurs numériques utilisées pour le calcul de la force d'hydratation et de la force de van der Waals.

V.B.2. Système chargé DDAB/LC₁₁C₉

De manière à obtenir directement le gonflement maximum de la phase lamellaire L _{α} sans avoir à réaliser le diagramme de phase par dilutions successives des échantillons jusqu'à observer une démixtion, nous avons imaginé travailler comme en stress osmotique (cf. chapitre précédent), mais à pression nulle c'est-à-dire en mettant les échantillons à équilibrer avec de l'eau pure, sans polymère. Nous avons donc préparé une première série de huit échantillons avec des fractions molaires de LC₁₁C₉ allant de 0 à 0.5 et à des fractions volumiques allant de 5 à 20% de manière à se placer dans la phase lamellaire L _{α} monophasique. Ces solutions ont été placées ensuite dans des sacs à

dialyse et mis en équilibre avec de l'eau (lourde). Après deux semaines d'équilibration, l'observation du gonflement des sacs et le renouvellement du réservoir d'eau une fois, nous avons prélevé les échantillons. Une fraction a été analysée en DNPA telle quelle, tandis que nous avons dilué environ par 5 l'autre fraction. Nous avons alors obtenu une séparation en deux phases de volumes à peu près égaux : une phase supérieure blanchâtre, biréfringente d'écoulement, correspondant à la phase $[L_{\alpha}]$, et une phase inférieure plutôt transparente et bleutée. Nous avons centrifugé les échantillons pour essayer d'améliorer la séparation avant d'observer les phases par DNPA et d'effectuer un dosage par Iatroscan.

Une deuxième série d'échantillons a été obtenue plus classiquement en se plaçant dans la zone biphasique et en prélevant les solutions dans les phases supérieures ou inférieures.

V.B.2.a. Echantillons préparés dans les sacs de dialyse

Sur la Figure V- 8 nous avons tracé les spectres de DNPA des échantillons prélevés dans les sacs de dialyse. Pour déterminer plus précisément la période lamellaire nous avons tracé ces spectres en représentation I^*q^2 en fonction de q pour nous affranchir du facteur de forme en q^{-2} des bicouches (cf. équation (V-7)). Pour les premières valeurs de $x_{LC_{11}C_9}$ la variation de la position du pic de Bragg n'est pas nette, on observe d'abord une diminution puis une augmentation puis une diminution : en fait les positions correspondent à des distances de l'ordre de 1000\AA donc à des pressions osmotiques très faibles. On imagine que la moindre impureté peut perturber le système et déplacer facilement l'équilibre. De même pour l'échantillon à $x_{LC_{11}C_9}=0.09$ nous avons observé une démixtion $[L_{\alpha}]$ /phase isotrope dans le sac qui expliquerait un gonflement relativement grand.

Cependant qualitativement nous pouvons dire qu'il y a un déplacement du pic de Bragg vers les plus grands q lorsque $x_{LC_{11}C_9}$ augmente. C'est-à-dire que le gonflement maximal des bicouches diminue lorsque $x_{LC_{11}C_9}$ augmente.

A partir des spectres en Iq^2 il est possible d'obtenir le facteur de structure $S(q)$ des bicouches en normalisant à la valeur 1 la limite à grand q des oscillations des spectres : si on trace alors la valeur de $S(q)$ extrapolée à l'origine, comme sur la Figure V- 9, on note que $S(0)$ augmente avec $x_{LC_{11}C_9}$. Donc il y a une augmentation de la compressibilité des bicouches lorsque l'on ajoute du $LC_{11}C_9$, c'est-à-dire une diminution de la répulsion.

De plus, si nous traçons les spectres en coordonnées réduites, comme sur la Figure V- 10, nous remarquons que les pics s'élargissent lorsque l'on ajoute le glycolipide, surtout à partir de $x_{LC11C9}=0.33$. Contrairement au cas des phases concentrées étudiées au chapitre III, cela indique que, en régime dilué, il y a une augmentation des fluctuations thermiques des bicouches lorsque la fraction de glycolipide augmente. Ceci peut s'expliquer soit parce que le taux de charge des membranes diminue et donc la répulsion entre les bicouches diminue, soit parce que les ondulations des bicouches deviennent importantes, comme nous l'avons vu en diffusion de neutrons sur les échantillons orientés (chapitre III) et en TFB (chapitre IV).

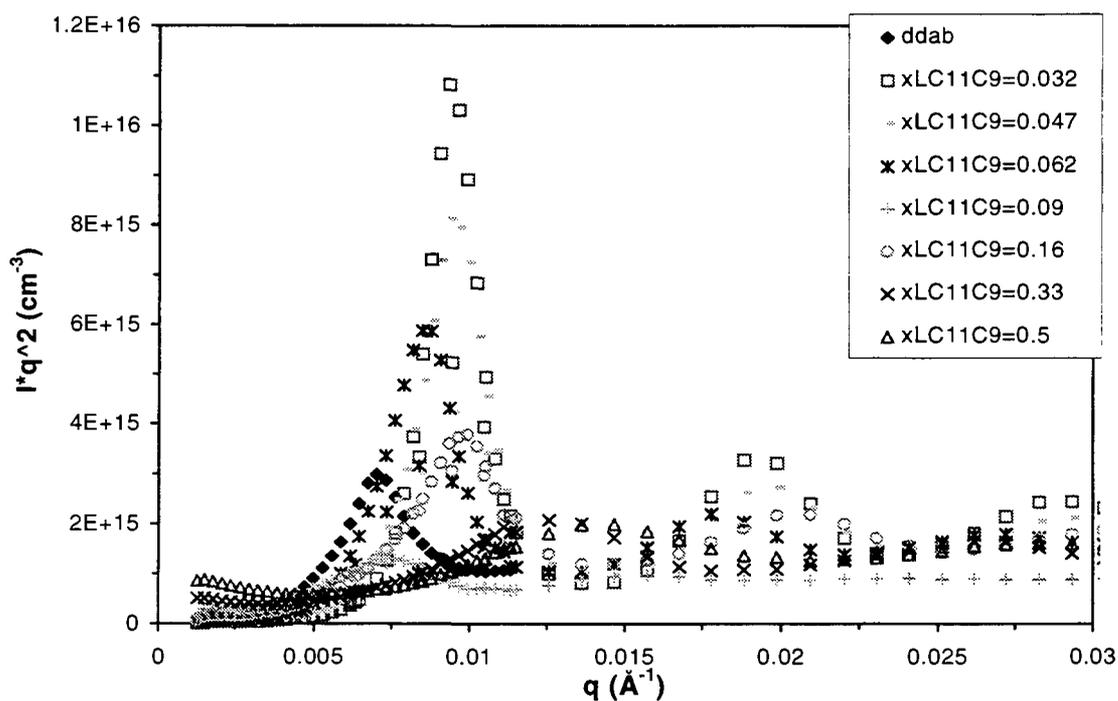


Figure V- 8 : Spectres de DNPA en représentation Iq^2 en fonction de q pour les échantillons préparés dans les sacs de dialyse avec différentes fractions molaires x_{LC11C9} dans le mélange DDAB:LC₁₁C₉.

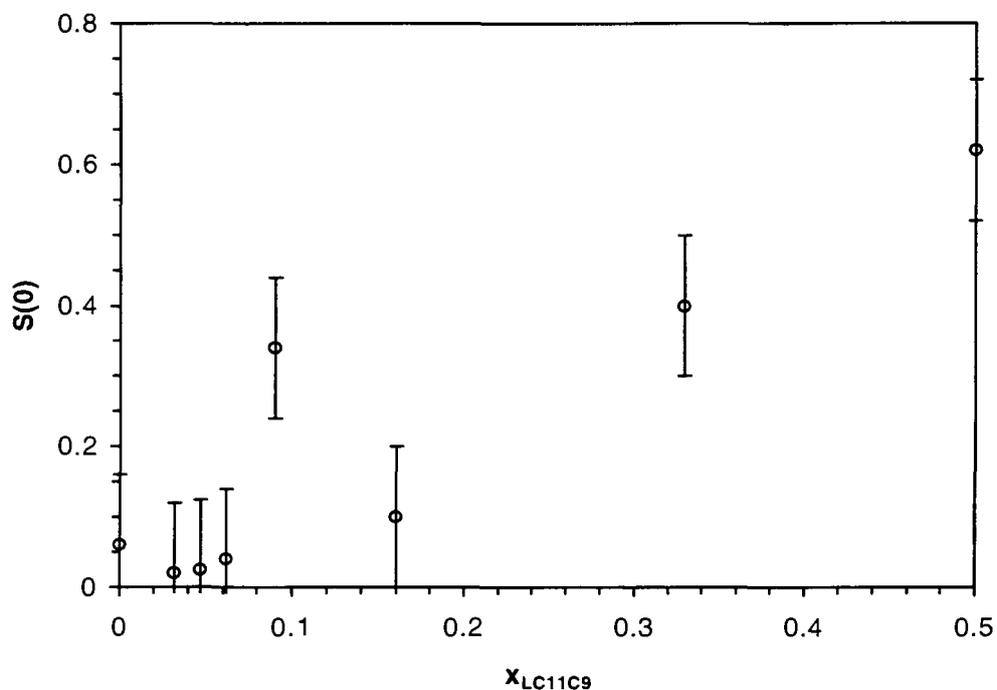


Figure V- 9 : Valeurs de $S(0)$ extrapolées à partir des spectres de la Figure V- 8.

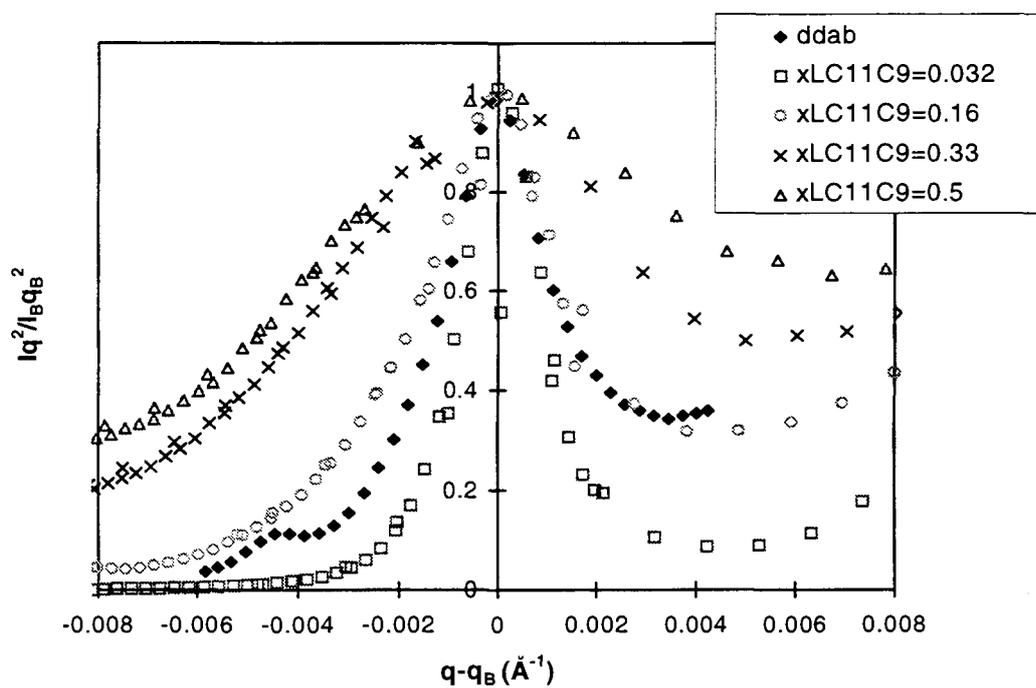


Figure V- 10 : Allure des pics de Bragg des spectres de la Figure V- 8, en coordonnées réduites, $Iq^2/I_{Bragg}q_{Bragg}^2$ en fonction de $q - q_{Bragg}$ pour plusieurs fractions molaires de $LC_{11}C_9$.

D'autre part, à partir de la valeur de D_{max} , la position du pic de Bragg à ce gonflement maximum, il est possible de retrouver la composition de la phase lamellaire : en effet si on suppose que la fraction molaire de $LC_{11}C_9$ reste égale, dans les deux phases en équilibre, à la fraction molaire initiale (ce qui a été vérifié à 10% près par les dosages au Iatroscan) alors la fraction de tensioactifs se déduit de la formule

$$\phi_{TA} = \phi_{LC_{11}C_9} + \phi_{DAB} = \phi_{LC_{11}C_9} \left[1 + \frac{462}{651} * 1.1 * \frac{1 - x_{LC_{11}C_9}}{x_{LC_{11}C_9}} \right] = \frac{\langle \delta \rangle}{D_{max}} \quad (V-12)$$

avec $\langle \delta \rangle$ l'épaisseur moyenne des bicouches, qui est la moyenne pondérée des bicouches de DDAB pur (24Å) et de $LC_{11}C_9$ pur (33Å). Les résultats de D_{max} et des compositions sont regroupés dans le Tableau V-1. Nous avons placé ces points sur le diagramme de phases ternaire eau/DDAB/ $LC_{11}C_9$, comme représenté sur la Figure V- 11 .

x_{lc11c9}	D_{max} (Å)	$\langle \delta \rangle$ (Å)	%vol ta	%vol eau	%lc11c9	%ddab
0.000	885	25.00	2.82	97.18	0.00	2.82
0.032	654.5	25.26	3.86	96.14	0.16	3.70
0.048	628	25.38	4.04	95.96	0.24	3.80
0.063	737	25.50	3.46	96.54	0.27	3.19
0.091	828	25.73	3.11	96.89	0.35	2.75
0.167	642	26.33	4.10	95.90	0.84	3.27
0.333	733	27.67	3.77	96.23	1.47	2.30
0.500	493	29.00	5.88	94.12	3.30	2.58

Tableau V- 3 : Résultats de la mesure de D_{max} par DNPA pour les échantillons préparés dans les sacs de dialyse et déduction de la composition par la formule (V-1).

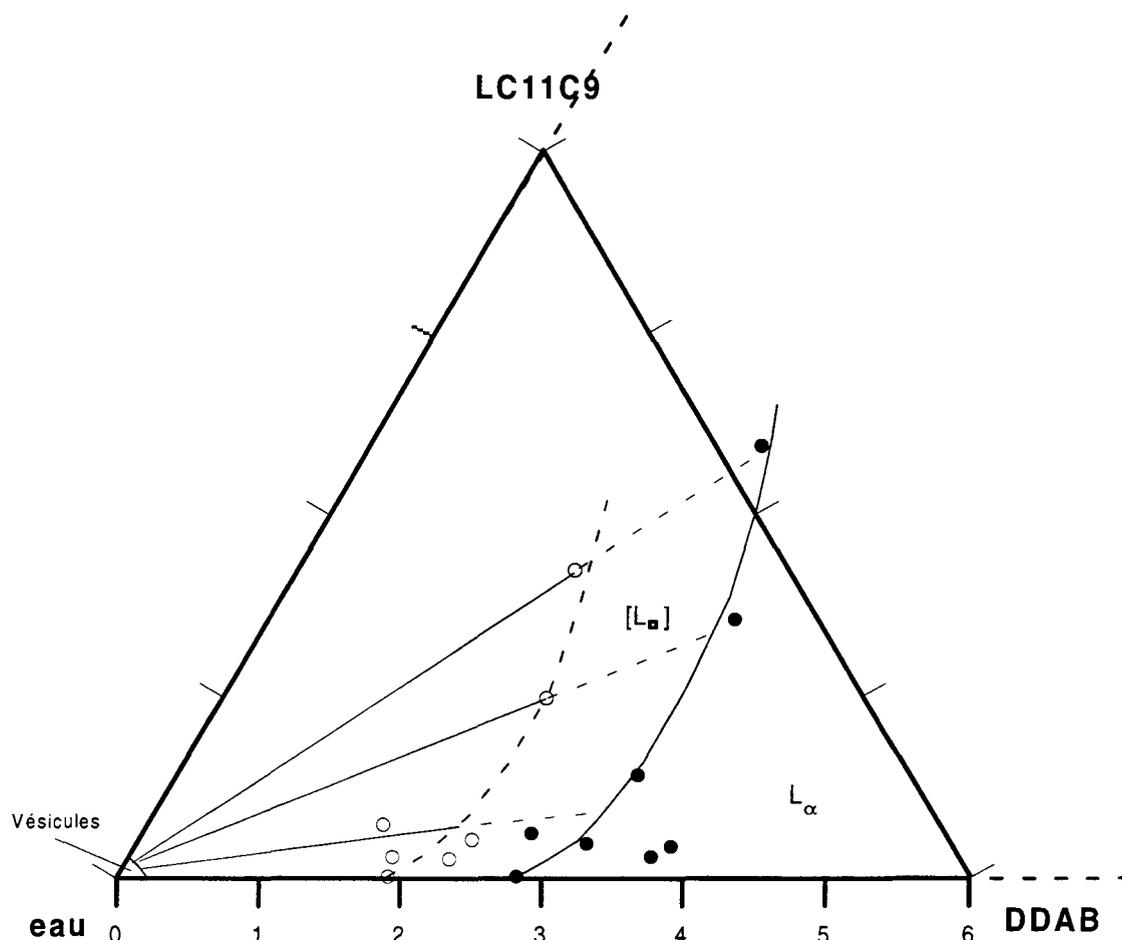


Figure V- 11 : Partie diluée du diagramme ternaire eau/DDAB/LC₁₁C₉. Les ronds en noir correspondent aux résultats de DNPA pour les expériences dans les sacs de dialyse, en blanc pour les échantillons dilués.

V.B.2.b. Echantillons dilués

Sur ce diagramme Figure V- 11 nous avons également placé les résultats obtenus avec les échantillons qui, contrairement aux échantillons précédents, ont été dilués après gonflement dans les sacs, puis séparés. Les phases supérieures, concentrées, ont des spectres analogues aux précédents, c'est-à-dire caractéristiques de phases lamellaires. Là aussi nous observons que la période diminue avec l'ajout du glycolipide. Cependant les périodes mesurées sont toutes inférieures aux valeurs trouvées précédemment donc la limite de phases qui se déduit par la formule (V-12) est décalée vers le coin riche en eau du diagramme ternaire de la Figure V- 11 . Nous comprenons que le gonflement maximum ait continué à augmenter avec la dilution s'il y a une variation, même faible, de la composition de la bicouche, dans le sens d'une diminution

de $x_{LC_{11}C_9}$. Si nous reprenons les observations faites sur le DDAB pur, cette nouvelle limite déterminée avec des échantillons réellement démixés macroscopiquement, doit correspondre à la limite d'existence de la zone monophasique $[L_\alpha]$. Sur la Figure V- 11 nous avons donc placé cette phase entre les deux lignes de gonflement maximum et tracé en pointillé les binodales entre cette phase $[L_\alpha]$ et une phase de vésicules correspondant aux phases inférieures.

En effet pour les phases inférieures nous avons obtenu les spectres donnés sur la Figure V- 12. Nous remarquons qu'ils présentent tous une décroissance en q^{-2} sur plusieurs ordres de grandeurs. Sur la Figure V- 13, nous avons tracé le spectre expérimental pour la fraction molaire $x_{LC_{11}C_9}=0.33$ ainsi que les courbes théoriques obtenues avec quatre modèles différents : le premier correspond au facteur de forme de bicouches donné par la formule (V-6), avec $\delta=16\text{\AA}$ et $\Phi=0.0075$. Les deux modèles suivants correspondent à des micelles sphériques en interaction avec un potentiel de sphères dures et à des micelles sphériques chargées en interaction avec un potentiel de type Yukawa (cf. paragraphe V-A-2) : nous avons choisi un nombre d'agrégation de 70, un nombre d'hydratation de 20, une ellipticité de 4 et la même fraction volumique 0.0075. Le dernier modèle est celui de cylindres rigides : avec la même fraction volumique nous avons pris $N=150$ et une longueur $L=800\text{\AA}$. On note bien, surtout aux petits angles, que seule l'hypothèse de bicouches est satisfaisante. Comme à l'œil ces phases diluées sont bleutées on peut supposer qu'il s'agit de vésicules. Par contre nous n'observons aucun pic de corrélation ce qui indique que les vésicules doivent être très diluées.

Certains des spectres de la Figure V- 12, les moins riches en $LC_{11}C_9$, présentent cependant des oscillations entre $1050-1250\text{\AA}$, c'est-à-dire correspondant aux positions de la phase lamellaire en équilibre dans la phase concentrée. Il s'agit donc probablement soit de fractions mal séparées de la phase supérieure, soit de cristallites lamellaires réellement en équilibre thermique avec la phase diluée. Comme pour les deux dernières fractions molaires de $LC_{11}C_9$ (0.33 et 0.5) on n'observe aucune oscillation sur les spectres, cette séparation entre la phase $[L_\alpha]$ et la phase de vésicules a été mieux réussie ou bien elle existe réellement.

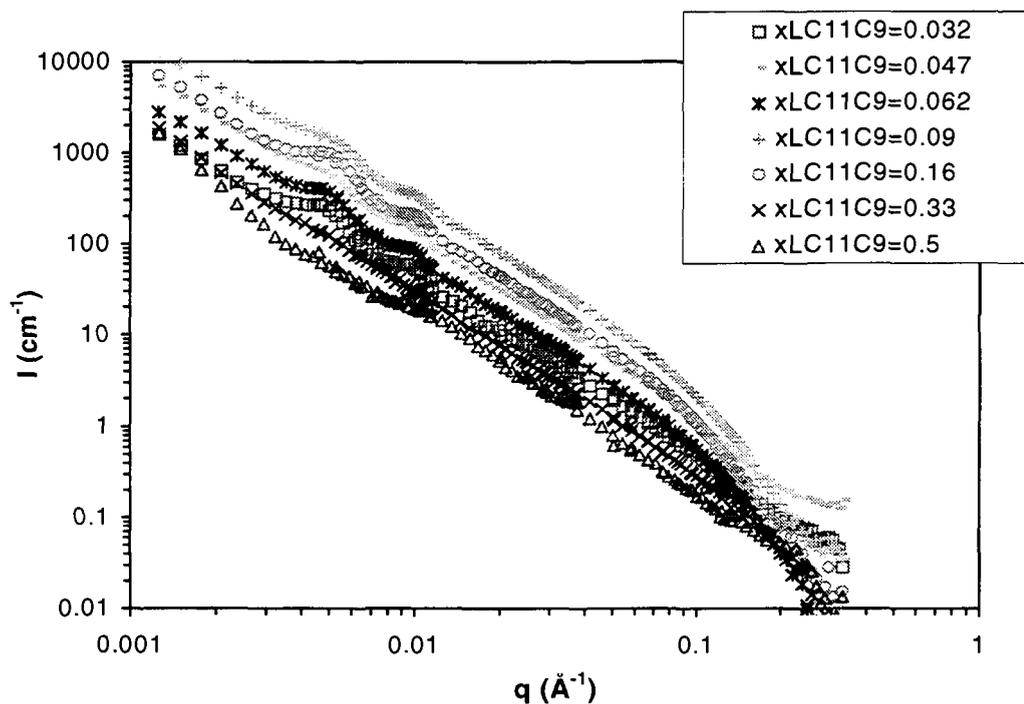


Figure V- 12 : Spectres de DNPA en échelle logarithmique des phases diluées des échantillons séparés.

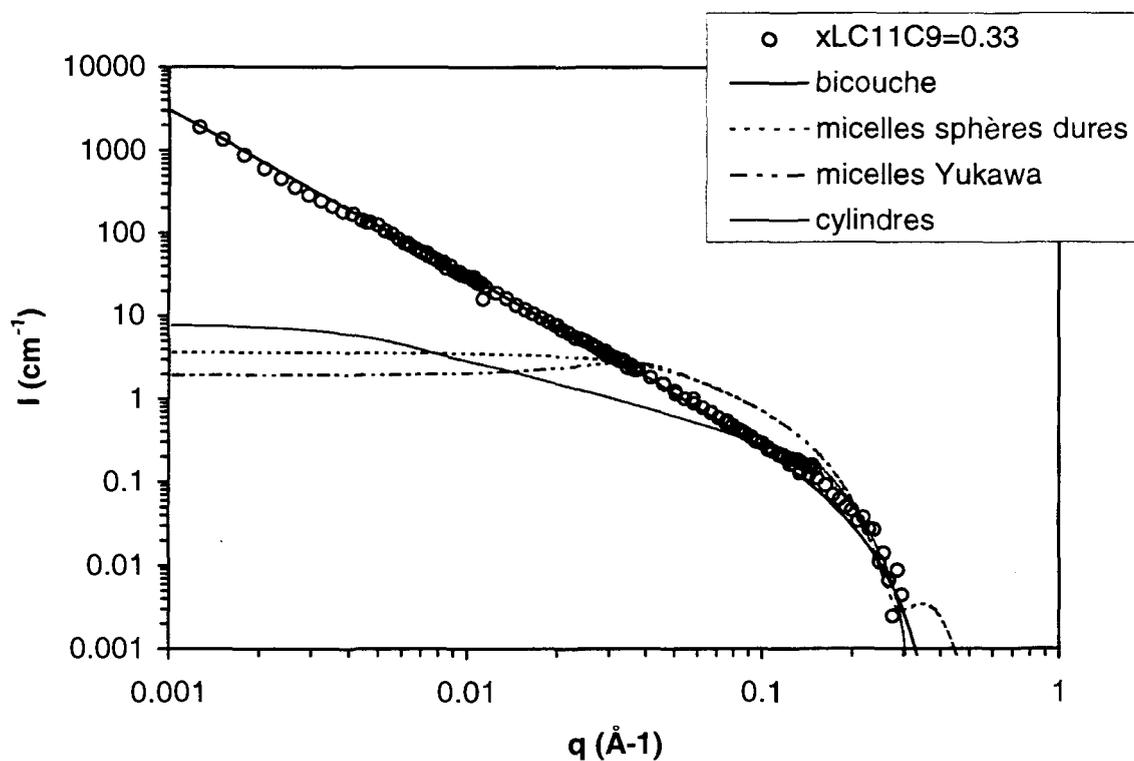


Figure V- 13 : Spectre expérimental de DNPA en échelle logarithmique de la phase diluée de l'échantillon à $x_{LC11C9}=0.33$ avec trois courbes théoriques de diffusion de bicouches, de micelles neutres et de micelles chargées.

Nous avons essayé de doser la composition chimique dans chacune des phases démixées, par chromatographie Iatroscan (cf. Annexe 3). Malheureusement, en pratique, une séparation parfaite entre ces deux phases très liquides et de densités voisines, sur des volumes limités, est difficile. Nous avons trouvé par dosage que, dans chacune des phases, la fraction molaire de glycolipide ne varie pas à 10% près de sa valeur initiale, mais les phases lamellaires supérieures sont beaucoup plus diluées que ne l'indique la mesure des périodes en DNPA. En fait si cette phase est bien ce que l'on a appelé la phase $[L_c]$ pour le DDAB pur, il y a en fait coexistence entre des cristallites de phase lamellaires et des poches de vésicules, et il est normal de trouver de l'eau en excès par rapport à une phase lamellaire pure. Cependant il se peut aussi que pendant les prélèvements, les deux phases se séparent mal et expliquent un si grand décalage entre les deux résultats.

V.B.2.c. Echantillons préparés classiquement

La deuxième série d'échantillons a été préparée à 1% et 4% en volume de tensioactifs dans D_2O et à $x_{LC11C9}=0, 0.16, 0.33$ et 0.5 . Les échantillons sont biphasiques, avec une phase supérieure, concentrée, blanchâtre et une phase inférieure diluée et bleutée. Mais comme aux paragraphes précédents, nous avons retrouvé qu'il n'y a pas de séparation parfaite entre cette phase supérieure lamellaire et la phase diluée : sur la Figure V- 14 nous avons tracé les spectres des phases concentrées et diluées de l'échantillon à 4% et $x_{LC11C9}=0.5$; nous avons également tracé les spectres obtenus un mois et demi plus tard sur le même échantillon. Alors qu'initialement les spectres sont bien distincts entre la phase concentrée et diluée, un mois et demi plus tard on note qu'il a une combinaison des deux spectres : donc a priori les phases ont redémixé, ce qui signifie que la séparation est métastable.

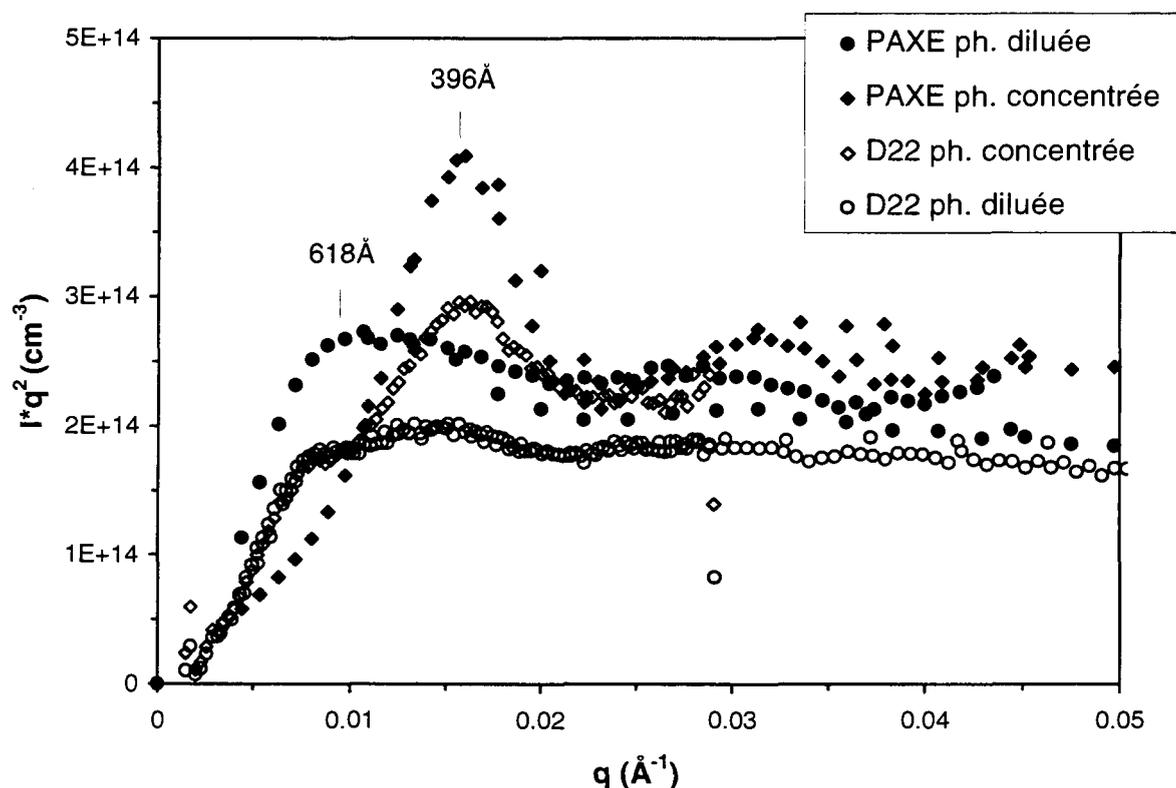


Figure V- 14 : Représentation en Iq^2 fonction de q des spectres obtenus pour les phases de l'échantillon préparé initialement à 4% en volume et à $x_{LC_{11}C_9}=0.5$: en symboles pleins sur PAXE au LLB, en symboles ouverts sur D22 à l'ILL, un mois et demi plus tard.

Sur la Figure V- 15 nous avons tracé en représentation Iq^2 en fonction de q les spectres des phases concentrées des échantillons préparés à 1% en volume. On remarque le déplacement vers les plus grands q et l'élargissement du pic de Bragg : comme pour la première série d'échantillons, il y a une diminution du gonflement maximum lorsque $x_{LC_{11}C_9}$ augmente. Par rapport aux échantillons à 4% en volume les gonflements sont plus grands pour des fractions molaires $x_{LC_{11}C_9}$ initiales identiques (491Å au lieu de 396Å pour $x_{LC_{11}C_9}=0.5$) : ainsi même si les dosages chimiques nous ont indiqué à 10% près que $x_{LC_{11}C_9}$ ne varie pas dans les phases démixées, nous retrouvons comme au paragraphe V-B-2-b qu'il doit quand même y avoir un léger enrichissement en DDAB de la phase concentrée et inversement un enrichissement en $LC_{11}C_9$ de la phase diluée pour pouvoir expliquer ce décalage de D_{max} . Donc en pratique sur la Figure V- 11 les binodales entre la phase $[L_c]$ et la phase diluée doivent être légèrement inclinées vers le bas par rapport aux lignes de dilution simple.

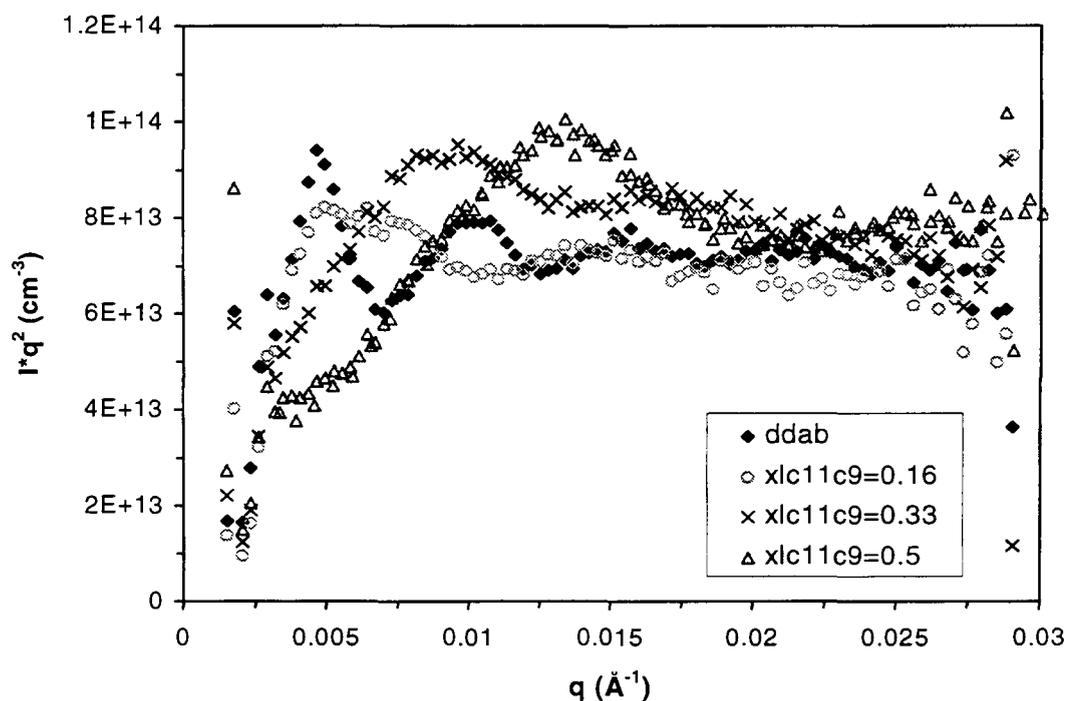


Figure V- 15 : Représentation en Iq^2 fonction de q des spectres de DNPA obtenus sur les phases concentrées des échantillons préparés initialement à 1% en volume.

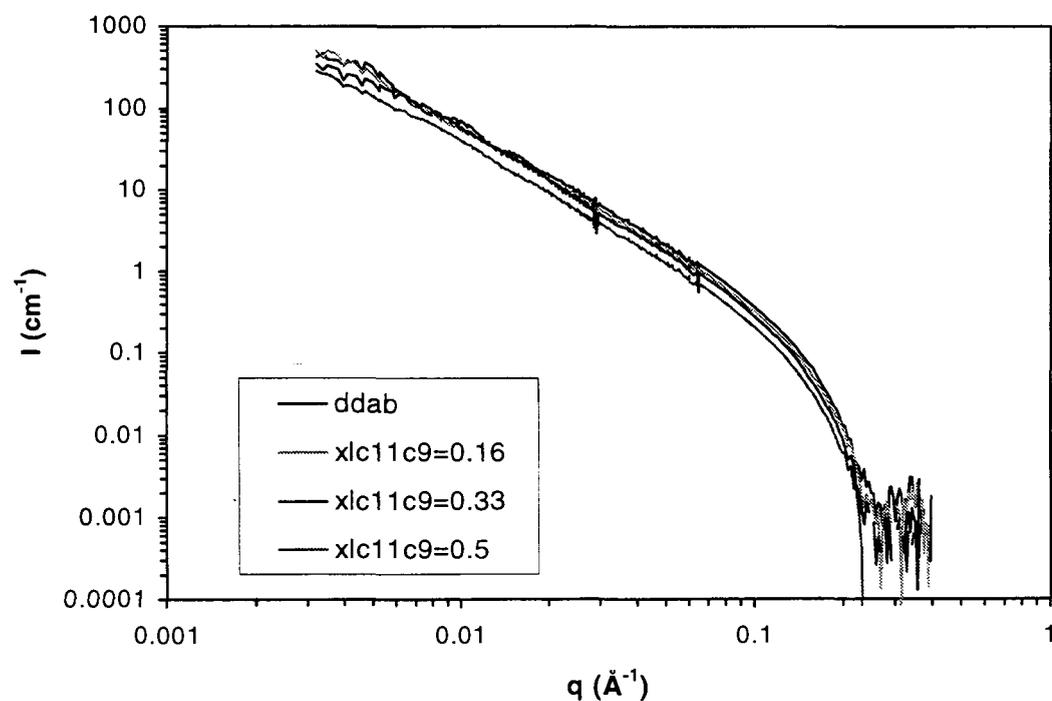


Figure V- 16 : Spectres de DNPA en échelle logarithmique des phases diluées des échantillons préparés initialement à 1% en volume, recueillies en bas. Il s'agit de bicouches isolées de longueur de persistance dépassant 1000\AA .

Par contre pour les phases diluées les spectres ne présentent pas autant de différence (cf. Figure V- 16) et correspondent tous à des bicouches isolées, dont la longueur de persistance dépasse 1000\AA puisque l'on n'observe aucune oscillation sur toute la gamme de vecteur d'onde étudiée.

On trouve que si on divise par la fraction de volume initiale les spectres des échantillons à 4%, les spectres de phases diluées se superposent avec ceux à 1%, sauf aux petits angles, où pour l'échantillon le plus concentré il y a une diminution du signal donc une augmentation de la compressibilité de la phase (cf. Figure V- 17). On comprend donc qu'à 4% le gonflement maximal dans la phase lamellaire soit moins grand puisque la pression osmotique dans la phase diluée en équilibre doit être plus grande.

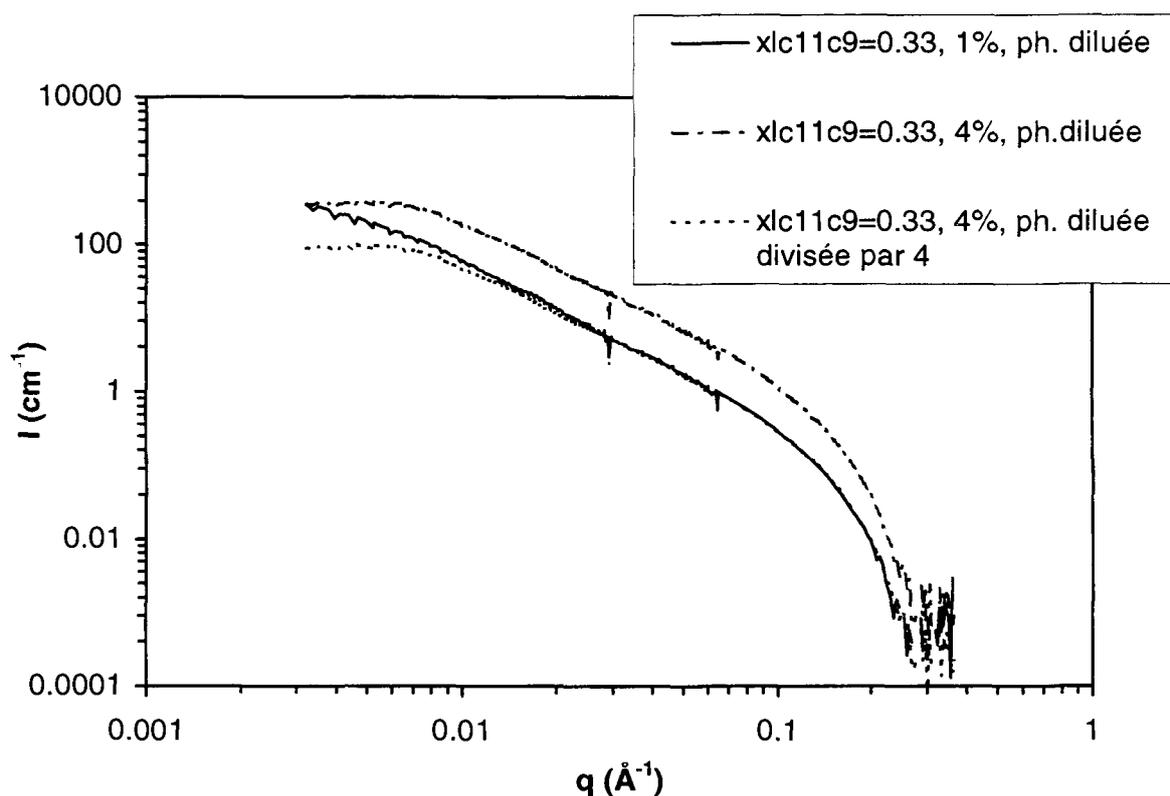


Figure V- 17 : Spectres de DNPA en échelle logarithmique des phases diluées des échantillons préparés initialement à 1% et 4% en volume pour $x_{LC11C9}=0.33$.

Connaissant maintenant la variation du gonflement maximal en fonction de la composition en glycolipide, nous allons pouvoir interpréter, après avoir aussi analysé le comportement avec le glycolipide monochaine, les mécanismes qui limitent D_{max} et nous intéresser aux équilibres de pressions osmotiques.

V.B.3. Système chargé DDAB/LS

L'observation visuelle et la caractérisation par DNPA d'échantillons préparés à différentes compositions en LS, en dessous de 8% en volume de poudre, nous a permis de déterminer l'allure du diagramme ternaire eau/DDAB/LS dans la partie riche en eau, comme représentée sur la Figure V- 18. Nous observons l'équilibre de la phase lamellaire au gonflement maximal avec soit une phase L_3 , bleutée et biréfringente d'écoulement qui est probablement composée de vésicules, soit une phase de micelles mixtes L_1 , transparente, isotrope. La phase supérieure lamellaire est probablement une phase $[L_\alpha]$ et est parfois blanchâtre, la séparation entre les phases ne présentant pas toujours un ménisque net. La limite entre les deux formes de démixtion L_3 - L_1 est indiquée par une ligne pointillée sur le diagramme et correspond à une fraction molaire de LS de 0.5.

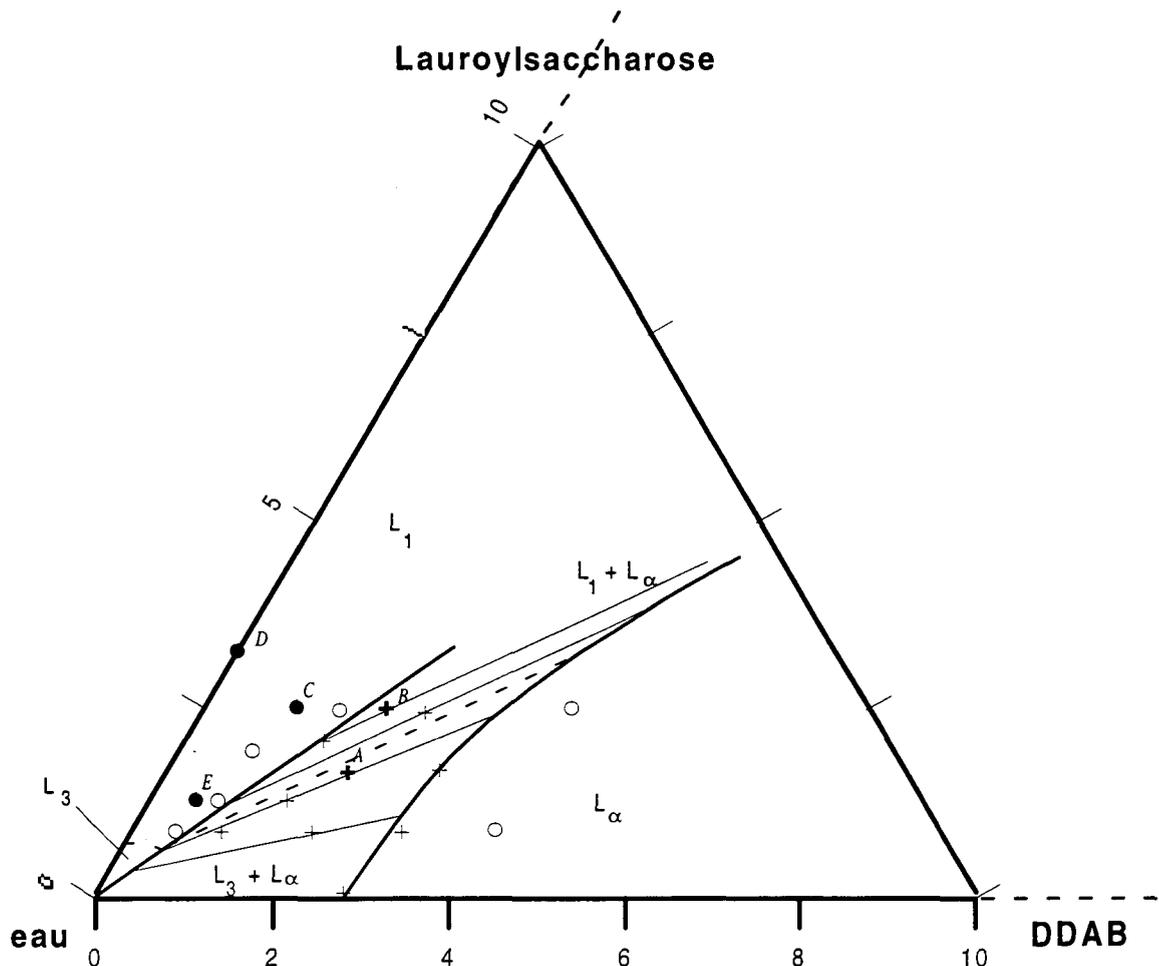


Figure V- 18 : Partie diluée du diagramme de phases ternaire eau / DDAB / LS. Les ronds correspondent à des échantillons monophasiques, tandis que les croix correspondent à des échantillons biphasiques.

Sur les Figures V-19 et V-20, nous avons tracé en échelle logarithmique les spectres de DNPA des phases démixées concentrées et diluées des échantillons notés A et B sur le diagramme de phases : l'échantillon A ($x_{LS}=0.47$, $LS=2\%$ + $DDAB=2\%$ en poids) a démixé en une phase inférieure bleutée à l'œil et une phase supérieure biréfringente. Sur Figure V- 19, on note trois ordres de pics de Bragg d'une phase lamellaire tandis que le spectre de la phase inférieure présente un large domaine en q^{-2} caractéristique d'une phase L_3 , symétrique ou asymétrique (vésicules). Pour l'échantillon B ($x_{LS}=0.57$, $LS=3\%$ + $DDAB=2\%$ en poids), la phase supérieure est visqueuse, biréfringente tandis que la phase inférieure est complètement transparente, sans biréfringence. Sur la Figure V- 20 , nous retrouvons pour la phase supérieure trois ordres lamellaires et pour la phase inférieure nous obtenons un signal que nous interprétons comme le spectre d'une solution de micelles mixtes chargées, comme nous allons le justifier maintenant.

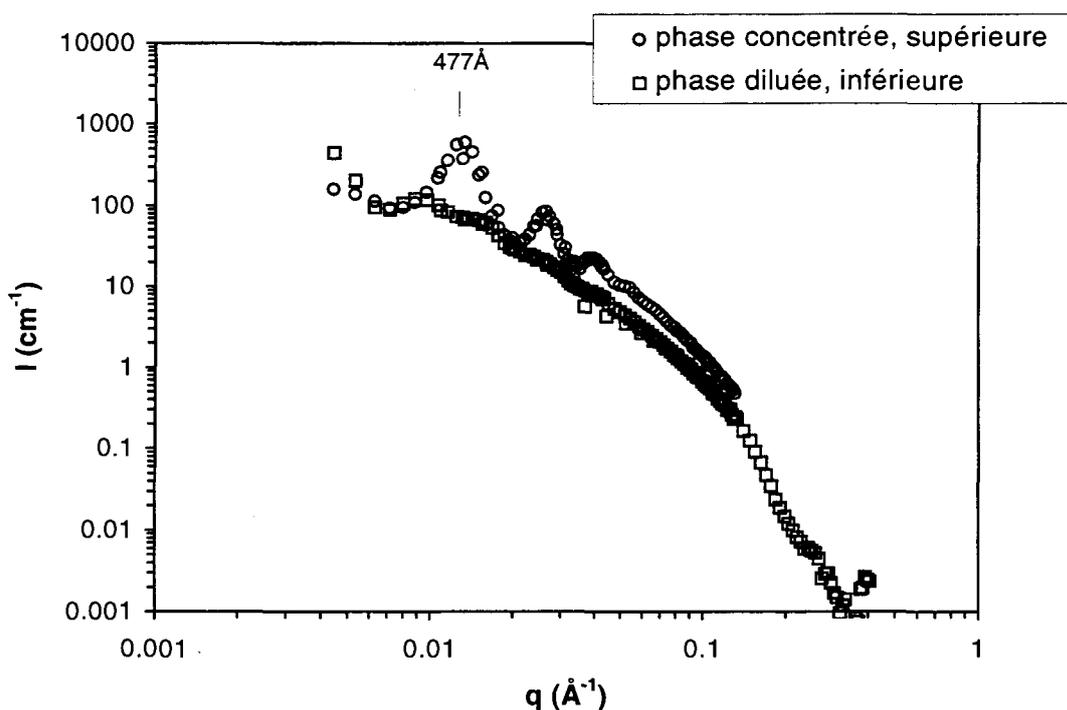


Figure V- 19 : Spectre de DNPA en échelle logarithmique des phases supérieure et inférieure de l'échantillon noté A sur la Figure V- 18, c'est-à-dire préparé à $x_{LS}=0.47$ ($LS=2\%$ + $DDAB=2\%$ en poids).

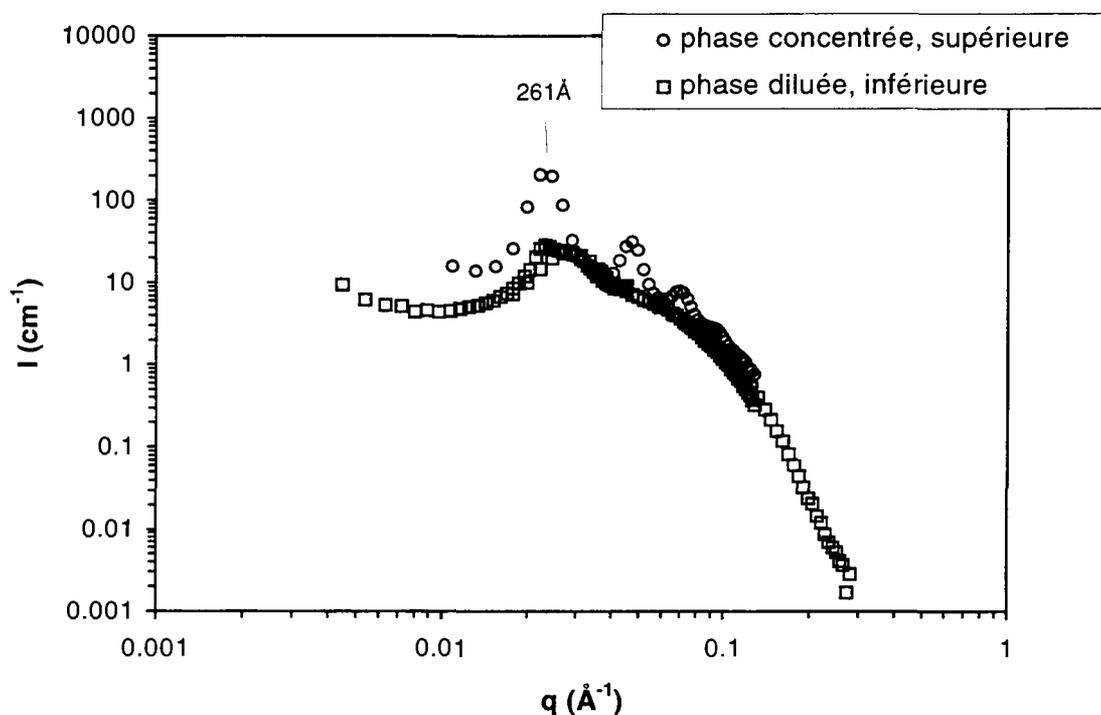


Figure V- 20 : Spectre de DNPA en échelle logarithmique des phases supérieure et inférieure de l'échantillon noté B sur la Figure V- 18, c'est-à-dire préparé à $x_{LS}=0.57$ (LS=3% + DDAB=2% en poids).

Nous avons par ailleurs caractérisé la phase micellaire mixte L_1 sur deux échantillons notés C et D sur la Figure V- 18, c'est-à-dire préparés respectivement à LS=3% + DDAB=1% en poids ($x_{LS}=0.75$) et LS=4% en poids ($x_{LS}=1$). Les spectres expérimentaux de DNPA et de DXPA sont donnés sur la Figure V- 21 ainsi que les résultats du paramétrage simultané des deux spectres en utilisant la programme développé par J. S. Pedersen, détaillé au début de ce chapitre. Nous avons utilisé un modèle de coquilles ellipsoïdales concentriques pour le facteur de forme et un facteur de structure de Hayter et Penfold. Nous avons utilisé les densités de diffusion pour les rayons X et pour les neutrons du Tableau V-1. Pour l'échantillon C nous avons fait l'hypothèse d'une moyenne pondérée par x_{LS} des volumes polaire et apolaire, des densités de longueur de diffusion et de la charge. Les résultats des paramètres obtenus sont donnés dans le Tableau V- 4.

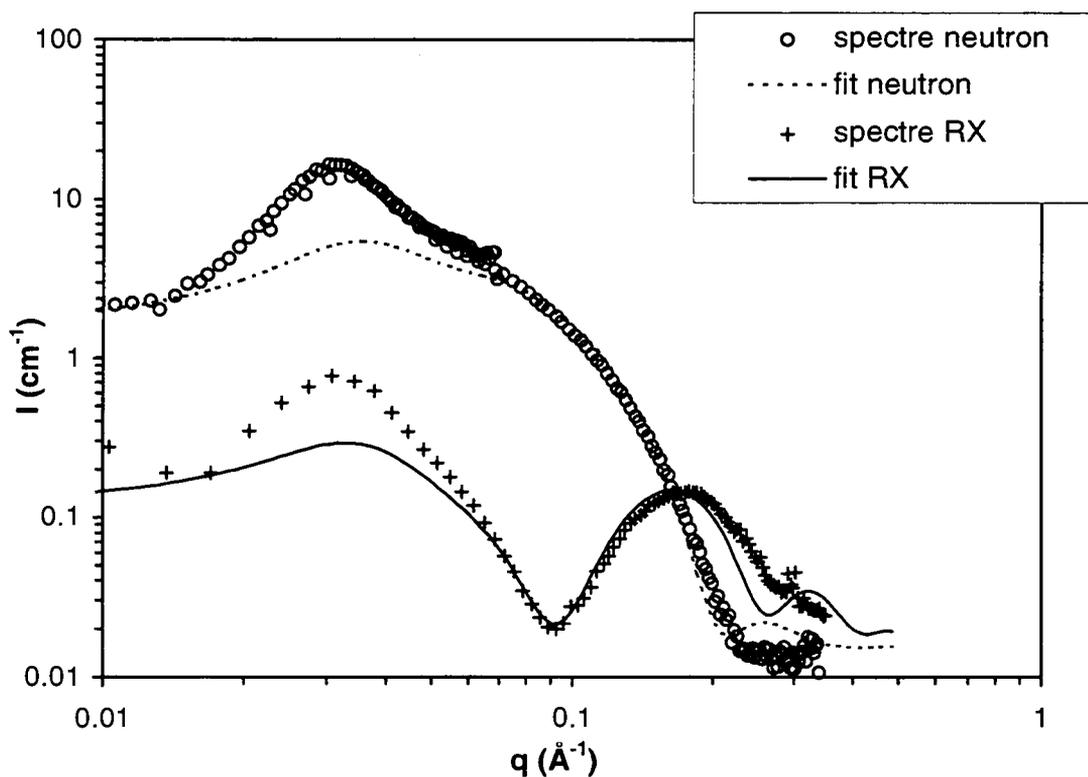
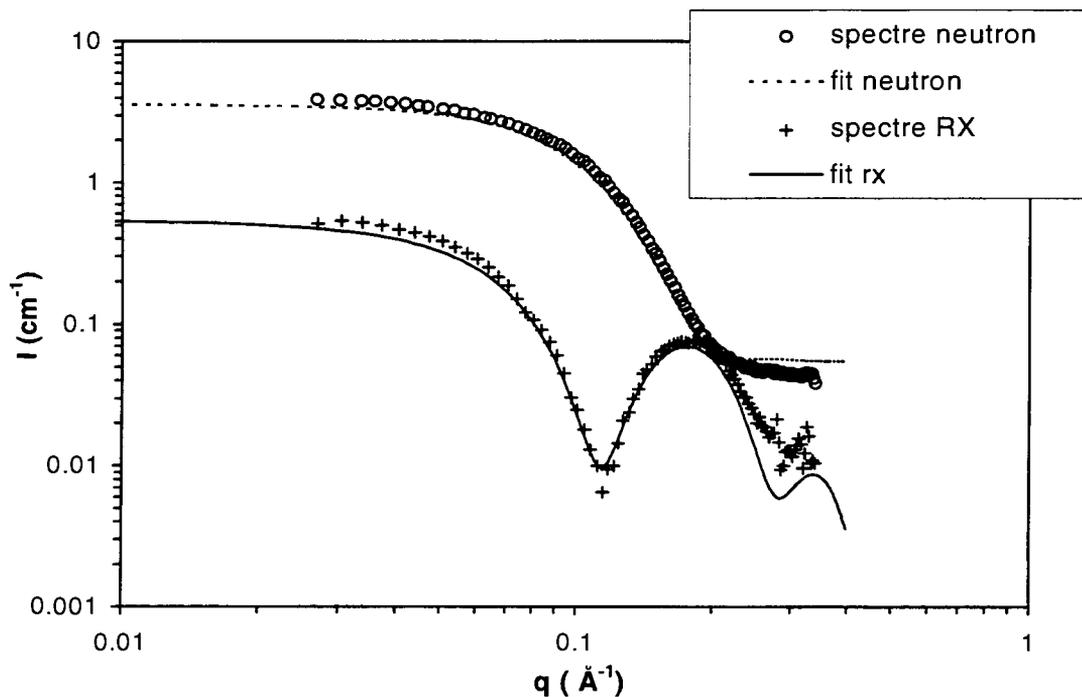


Figure V- 21 : Spectres expérimentaux de DXPA (croix) et de DNPA (ronds) des échantillons notés dans le texte D (en haut) et C (en bas). Les courbes correspondent au paramétrage simultané expliqué dans le texte.

<i>Echantillon</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
DDAB (% poids)	1	0
LS (% poids)	3	4
x _{LS}	0.72	1
Nombre d'agrégation N _{DDAB+LS}	77	76
Nombre d'hydratation h	15	15
Ellipticité ε	1.3	1.4
Fraction volumique sphère-dure v _{HS}	0.1	0.032
Charge effective par tensioactif Z _{eff}	0.25	10 ⁻⁵

Tableau V- 4 : Résultats des paramètres des modèles de micelles mixtes

Nous notons qu'il n'y a pratiquement pas de variation de la géométrie des micelles entre le LS pur et les micelles mixtes DDAB/LS, malgré l'introduction pour un quart de la molécule bicaténaire, chargée et de volume polaire réduite. A partir du nombre d'agrégation, il est possible d'en déduire les rayons intérieur et extérieur, respectivement 18 et 23.5Å. Nous remarquons également que le modèle Hayter-Penfold renormalisé ne rend pas bien compte du pic d'interaction important observé aux petits angles sur l'échantillon C, même en jouant sur la fraction sphère-dure. Le calcul est fait pour des particules sphériques et sous-estime peut être l'interaction électrostatique entre ces objets allongés, mais à notre connaissance, aucune formule analytique simple n'existe pour le S(q) de micelles ellipsoïdales chargées.

D'autre part sur la Figure V- 22 nous avons tracé en échelle logarithmique et divisé par la fraction volumique de tensioactifs les intensités diffusées par les échantillons D et E. Ces deux échantillons ont été préparés à la même fraction molaire x_{LS}=0.72, E étant deux fois plus dilué que D. Nous remarquons qu'à grands q les spectres se superposent parfaitement, indiquant que le facteur de forme des objets diffusants n'a pas changé, donc la géométrie des micelles n'a pas varié. Par contre le pic d'interaction s'est décalé, de d=203 à 273Å. En fait ce décalage est légèrement plus grand que si l'on applique la loi de dilution

$$\Phi \propto \frac{1}{d^3} \quad (\text{V- 10})$$

Ceci peut s'expliquer par l'influence du facteur de forme P(q) sur l'intensité diffusée qui déplace la position du pic du S(q) diminué par la dilution.

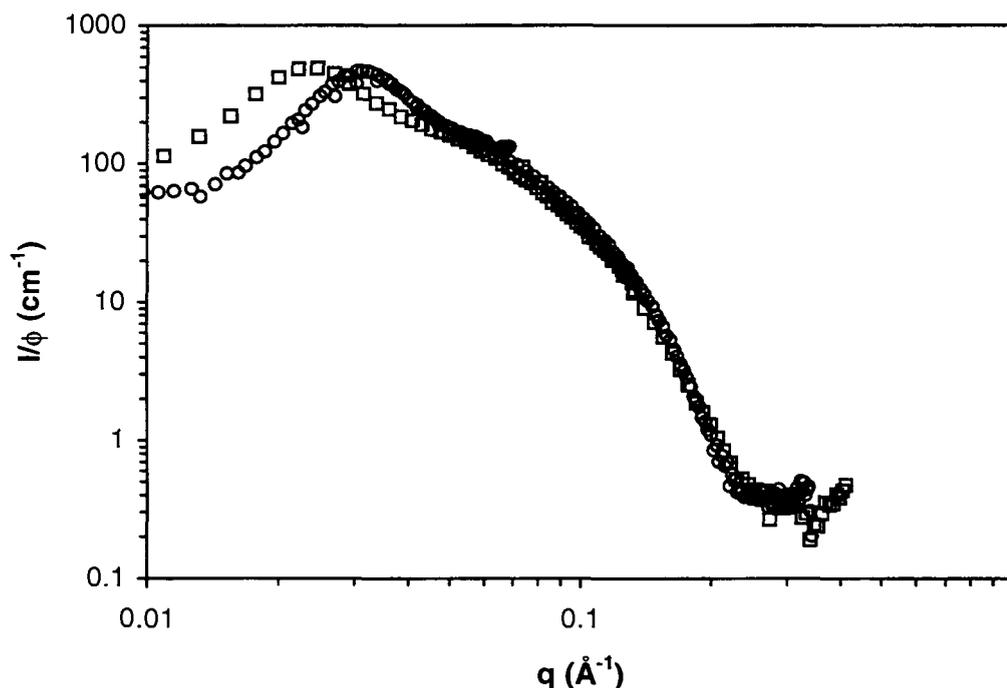


Figure V- 22 : Spectres de DNPA en échelle logarithmique normalisés par la fraction volumique de tensioactifs des échantillons micellaires C (ronds) et E (carrés), qui correspondent à la même fraction molaire $x_{LS}=0.72$ et respectivement à $\phi=0.035$ et 0.0175 .

V.C. Discussion

Nous venons de déterminer le gonflement maximum D_{\max} et les structures en équilibre avec la phase lamellaire L_{α} de DDAB à son gonflement maximum en fonction de l'ajout de $LC_{11}C_9$ et de LS. Il est donc maintenant possible de comparer et d'essayer de comprendre les mécanismes physiques qui agissent sur le gonflement maximum avec l'addition de glycolipides.

Sur la Figure V- 23 nous avons tracé la variation de D_{\max} en fonction de la fraction molaire x_{GL} . Pour les deux systèmes, DDAB/ $LC_{11}C_9$ et DDAB/LS, on note la diminution quasi linéaire jusqu'à $x_{GL}=0.5$. Les premiers points dans le cas DDAB/ $LC_{11}C_9$ sont assez dispersés, probablement, comme nous l'avons déjà dit, à cause des très faibles pressions mises en jeu, qui rendent le système sensible aux perturbations de structure de la phase diluée, aux impuretés... Dans le cas DDAB/LS, au-delà de $x_{LS}=0.5$, il a apparition des micelles au lieu de la phase L_3 .

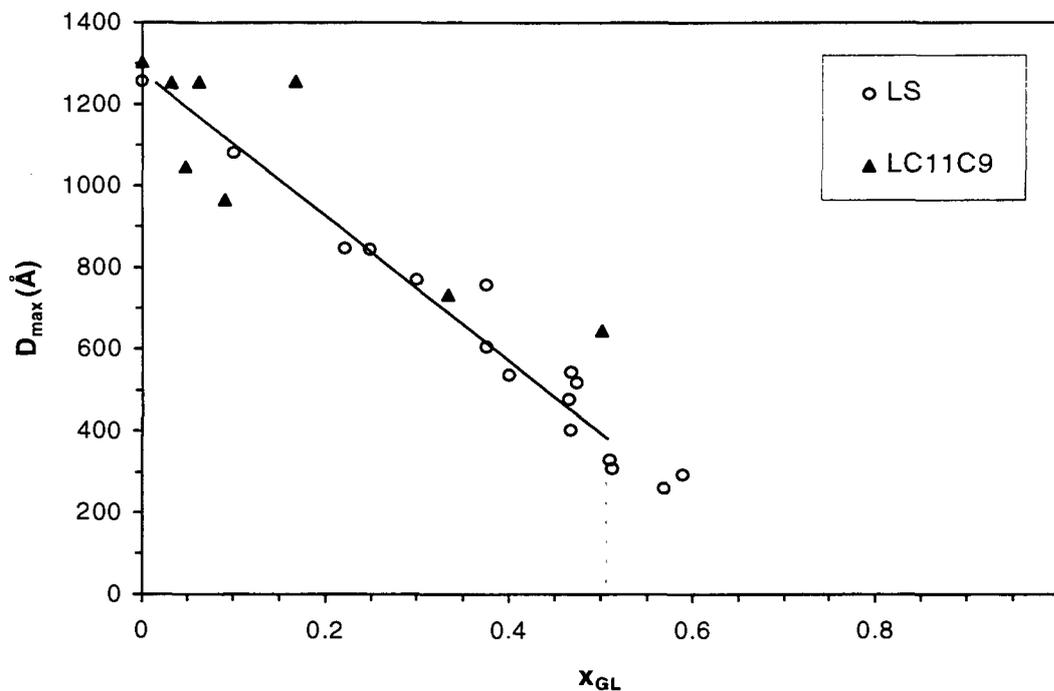


Figure V- 23 : Variation du gonflement maximal D_{max} en fonction de la fraction molaire de glycolipide ajoutée au DDAB.

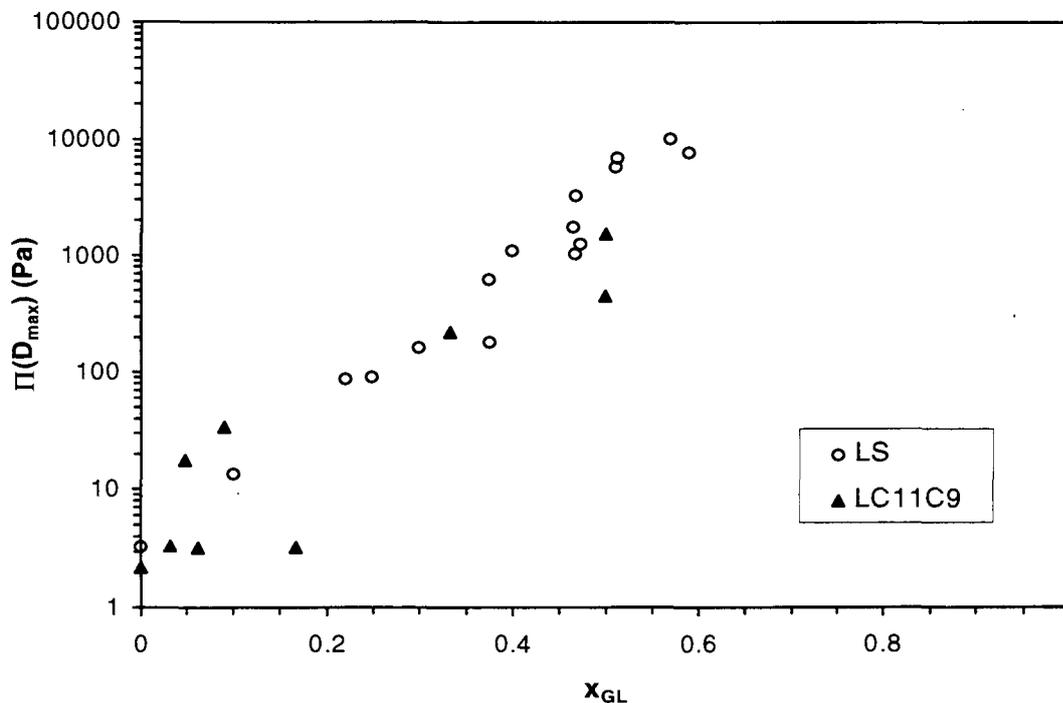


Figure V- 24 : Variation de la pression osmotique dans la phase lamellaire au gonflement maximal en fonction de la fraction molaire de glycolipide ajoutée au DDAB. La pression a été calculée pour les valeurs de D_{max} tracées sur la figure précédente et en utilisant la loi électrostatique asymptotique (V-1).

En supposant que l'interaction électrostatique reste la répulsion dominante dans la phase lamellaire gonflée, nous pouvons aussi estimer la variation de la pression osmotique d'équilibre en fonction de x_{GL} , en utilisant l'équation (V-1) pour la loi électrostatique. Sur la Figure V- 24 nous avons donc tracé $\Pi(D_{max})_{L\alpha}$ en fonction de x_{GL} , en prenant $c's=6\times 10^{-4}M$ et les valeurs expérimentales de D_{max} de la Figure V- 23. Nous notons que la pression osmotique d'équilibre au gonflement maximum augmente lorsque l'on ajoute le glycolipide.

Puisqu'il y a un équilibre thermodynamique entre la phase lamellaire et la phase diluée, nous pouvons dire que la pression osmotique de la phase diluée doit aussi augmenter avec x_{GL} . Il serait intéressant de retrouver par le calcul cette variation de pression de la phase diluée. Dans la partie précédente nous avons caractérisé cette phase diluée comme une phase L_3 fortement asymétrique (vésiculaire), pour le système $LC_{11}C_9/DDAB$ et le système $LS/DDAB$ quand $x_{LS}<0.5$. Malheureusement nous n'avons pas pu mesurer de distance caractéristique de cette phase, comme la longueur de persistance ou la distance vésicule-vésicule, qui puisse nous permettre de retrouver, par le calcul, l'ordre de grandeur de ces pressions d'équilibre. La seule explication qualitative que nous puissions donner à l'augmentation de pression quand x_{GL} augmente, est que soit la taille des objets diminue avec x_{GL} à concentration égale, soit la concentration de la phase diluée augmente avec x_{GL} , de telle sorte que, dans les deux cas, le nombre d'objets augmente ($\Pi \sim \rho kT$ en première approximation).

Par contre dans le cas du LS avec $x_{LS}>0.5$, comme nous avons pu caractériser la phase micellaire en équilibre avec la phase lamellaire, il est possible de calculer théoriquement la pression osmotique d'équilibre. En effet dès que l'on connaît la taille, la fraction volumique et la charge des micelles on peut effectuer un calcul de type Poisson-Boltzmann Réseau pour obtenir la pression osmotique de la solutions de micelles [20].

Ce modèle calcule les profils ioniques $c_+(r)$ et $c_-(r)$ autour des particules colloïdales en découpant la solution en cellules sphériques centrées sur les particules et en utilisant la charge structurale des particules. L'équation de Poisson-Boltzmann non linéarisée est intégrée numériquement et de manière itérative sur toute la cellule et la pression osmotique se déduit selon :

$$\Pi = kT(c_+(R) + c_-(R) - 2c_s') = 4kTc_s' sh^2(\varphi(R)/2) \quad (V-11)$$

Le rayon de la cellule, R , est donné par la concentration en colloïdes : $\rho \times 4/3\pi R^3 = 1$; c_s' est la salinité du réservoir et φ est le potentiel électrostatique normalisé.

Généralement, sans sel ajouté, la contribution des contre-ions est prépondérante. Par contre ce modèle ne donne aucun renseignement sur l'intensité diffusée car les corrélations entre particules ne sont pas considérées.

Nous pouvons donc appliquer ce modèle à notre phase de micelles mixtes en équilibre avec la phase lamellaire. Nous avons vu sur la Figure V- 22 que nous pouvons supposer que la structure des micelles ne varie pas avec la dilution. Nous faisons donc le calcul en prenant les paramètres des échantillons C et E : rayon=23.5Å, charge maximale = $(1-x_{LS}) \cdot N_{agg} = 21$. De plus nous travaillons à équilibre constant, en prenant un pK de dissociation du Brome de 0.95, comme dans le chapitre I et le chapitre IV.

Sur la Figure V- 25 nous avons tracé la pression calculée en fonction de la fraction volumique de micelles. En particulier nous trouvons une pression de 26560Pa pour C et 12400Pa pour E. Sur la même figure nous avons aussi tracé pour comparaison la variation de la pression dans la phase lamellaire en utilisant la loi électrostatique (V-1) et $\Phi = 24/D$. Nous retrouvons la propriété que la pression augmente plus avec la fraction volumique dans le cas des micelles que dans le cas de la phase lamellaire. Ainsi les pressions calculées pour une fraction volumique de micelles de l'ordre de 1% sont de l'ordre de grandeur de la pression calculée dans la phase lamellaire pour $x_{LS} > 0.5$ et $D_{max} \sim 300\text{Å}$. Donc ceci est tout à fait en accord avec l'orientation des binodales portées sur le diagramme de la Figure V- 18 et que nous avons retracé sur la Figure V- 26.

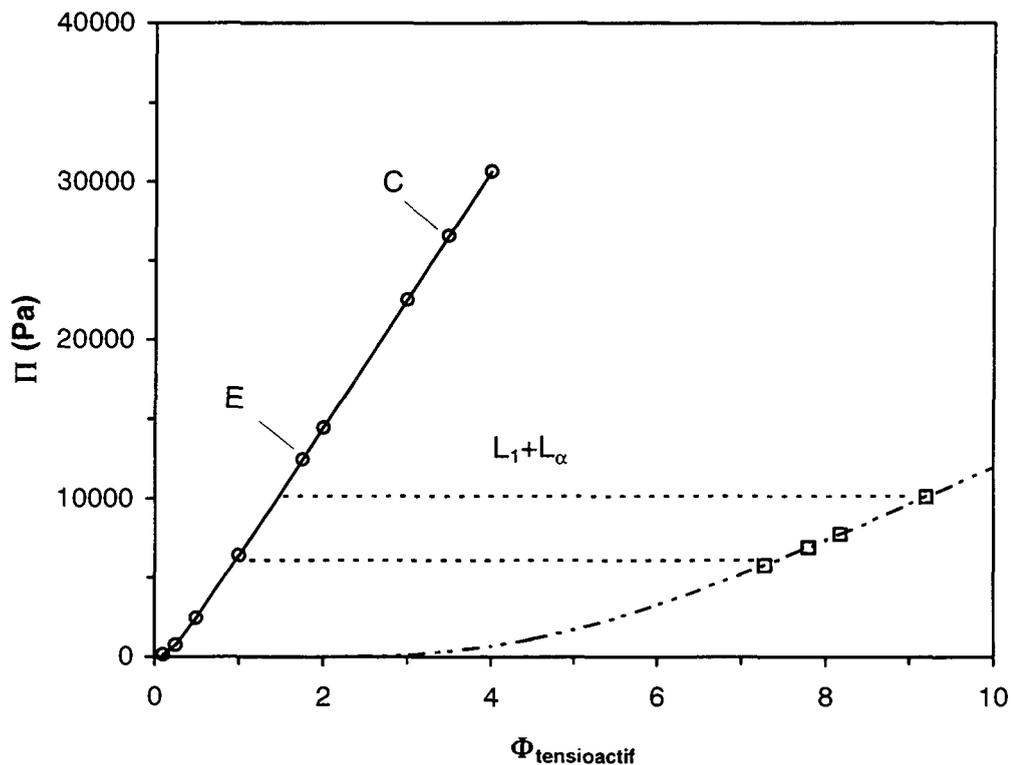


Figure V- 25 : Pression osmotique (en trait plein) de la phase de micelles mixtes en fonction de la fraction volumique de tensioactif, calculée par le modèle Poisson-Boltzmann réseau en faisant l'hypothèse que la géométrie des micelles ne varie pas avec la dilution. En trait gris est tracée la variation de la pression osmotique calculée dans des bicouches qui se repoussent électrostatiquement.

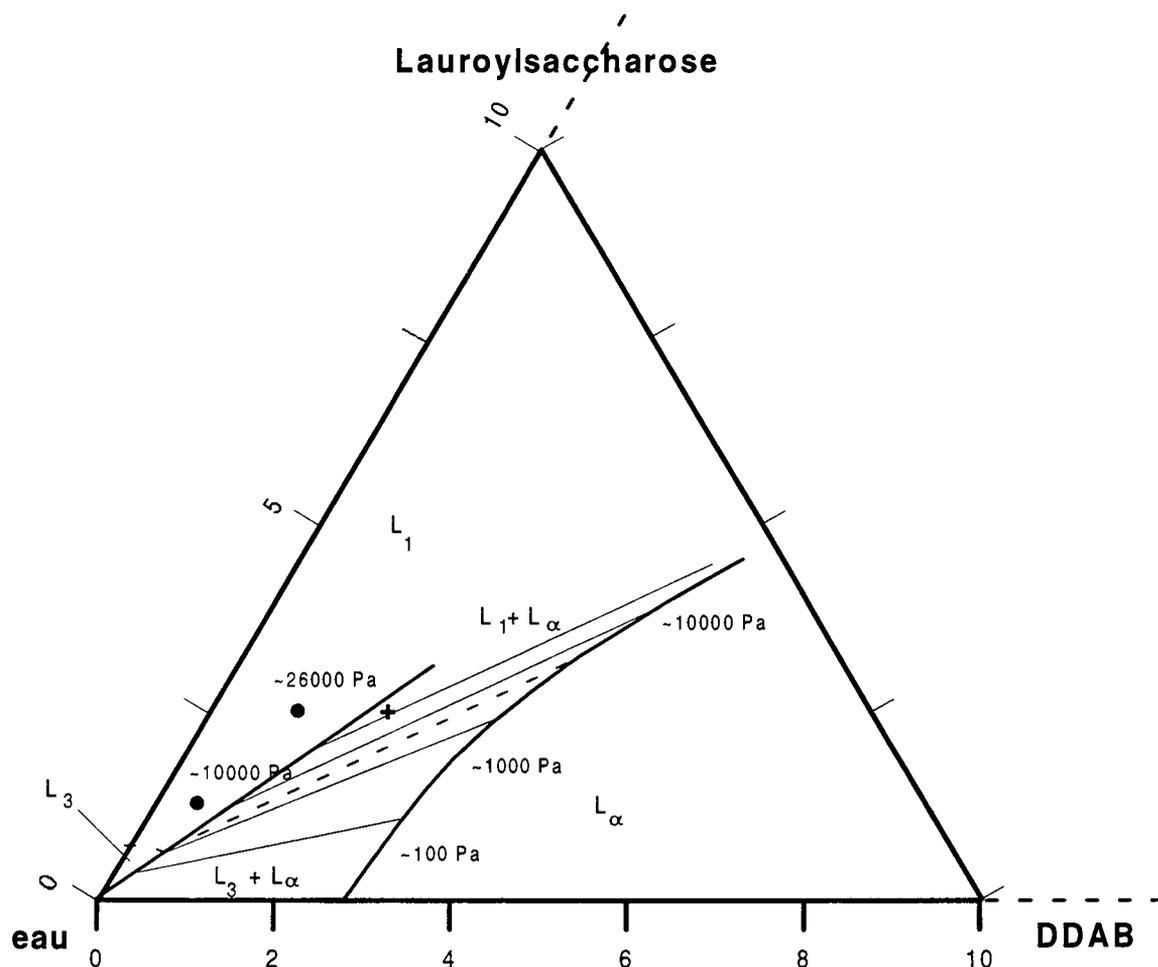


Figure V- 26 : Partie diluée du diagramme de phases du système DDAB/LS. Les pressions indiquées correspondent d'une part au calcul plan-plan de la répulsion électrostatique dans la phase lamellaire au gonflement maximum et d'autre part au calcul avec le modèle Poisson-Boltzmann réseau dans la phase de micelles.

V.D. Conclusion

Dans le cas du système non chargé, DMPC/LC₁₁C₉, nous avons observé une diminution linéaire du gonflement maximum de la phase lamellaire mixte en fonction de la fraction molaire x_{LC₁₁C₉}. Nous avons montré que ce résultat se retrouve théoriquement si le mélange moléculaire est traduit dans le bilan des forces par une moyenne pondérée des paramètres décrivant chacune des forces mises en jeu, hydratation + van der Waals. Ainsi, comme au chapitre IV, la simple addition pondérée de ces forces ne donne pas le résultat expérimental.

Dans les systèmes chargés, avec le DDAB, nous avons trouvé que les glycolipides, LS et LC₁₁C₉, induisent aussi une diminution du gonflement maximum : cette diminution est quasi proportionnelle à la fraction molaire x_{GL} , du moins jusqu'à $x_{GL}=0.5$. Nous n'avons pas travaillé au delà avec le LC₁₁C₉ ; avec le LS, nous avons observé pour les valeurs supérieures de x_{GL} un changement de structure, de vésicules à micelles, de la phase diluée en équilibre.

Nous avons démontré que l'origine physique du comportement du gonflement maximal de la phase lamellaire est liée à l'équilibre osmotique entre les deux phases, lamellaire et diluée. Ainsi les vésicules étant de gros objets, donc moins nombreux que des micelles, à fractions volumiques de tensioactif égales, elles imposent une pression osmotique plus faible, ce qui explique l'équilibre avec des phases lamellaires très gonflées. N'ayant pu caractériser précisément la structure de ces vésicules, nous n'avons cependant pas pu établir de modèle théorique pour expliquer la variation de D_{max} avec x_{GL} . Par contre, dans le système DDAB/LS, lorsque nous avons une phase de micelles en coexistence, nous avons mis en évidence l'équilibre osmotique entre la phase lamellaire et la phase micellaire par le calcul explicite des pressions dans les deux phases. Nous avons ainsi retrouvé l'orientation des lignes de démixtion du diagramme de phases expérimental.

Conclusion générale

Notre objectif initial, dans ce travail, était d'isoler et de quantifier les interactions spécifiques des oligosaccharides et des glycolipides dans les phases lamellaires chargées, du seul système lamellaire binaire connu dominé par l'interaction électrostatique sur plusieurs décades de pression, le DDAB (bromure de didodécyltriméthyl ammonium).

Dans ce but, nous avons utilisé les techniques de diffusion de rayonnement aux petits angles (DNPA : diffusion de neutrons aux petits angles et DXPA : diffusion de rayons X aux petits angles) qui sont a priori bien adaptées pour l'étude structurale de tels systèmes. En particulier nous avons mis au point deux méthodes expérimentales originales pour caractériser les systèmes ternaires :

- d'une part, une méthode par variation de contraste en DNPA qui permet d'étudier de façon générale l'adsorption de solutés sur des bicouches organisées en phase lamellaire. Nous avons montré que l'enthalpie libre d'absorption du soluté peut se déduire de la mesure de la composition isotopique du solvant qui annule le contraste. Nous avons ainsi obtenu la preuve que les oligosaccharoses restent libres dans l'espace interlamellaire.

- d'autre part, une méthode en gradient de concentration en capillaire pour établir quantitativement les diagrammes de phases des systèmes lyotropes ternaires. Par rapport aux autres méthodes en gradient, cette nouvelle technique de DXPA permet de connaître la composition en chaque point du gradient, grâce à un marquage au carbone 14 et à la mesure simultanée de la transmission du faisceau de rayons X. Ainsi, avec une quantité de molécules hôtes de l'ordre de 100mg, cette méthode permet d'obtenir rapidement la nature et la composition des phases présentes en fonction de la température sur tout le triangle de composition.

Pour les deux glycolipides étudiés, 2-O lauroylsaccharose (LS) et N-lauroyl, N-nonyl lactitol (LC₁₁C₉), nous avons établi les diagrammes de phases ternaires eau/DDAB/glycolipide en fonction de la température.

Sur le système eau/DDAB/LC₁₁C₉ nous retenons la présence de deux points critiques lamellaire-lamellaire à température ambiante. Dans le système eau/DDAB/LS nous ne retrouvons que le point critique dans la zone riche en DDAB. L'excès de ce glycolipide monochaine entraîne l'apparition d'une phase cubique. Nous avons également isolé, avec le LC₁₁C₉, des échantillons lamellaires monophasiques caractérisés par DXPA, qui sont très opaques au point d'apparaître blancs lorsqu'on les observe à l'œil, à température ambiante, mais qui deviennent progressivement, de manière réversible, transparents en chauffant. Nous avons attribué ce phénomène très inhabituel à des variations de concentration créées par les glycolipides, liées à la proximité de deux points critiques et aux fluctuations du système entre ces deux points très proches en énergie.

Les diagrammes de phases une fois établis, nous sommes passés à leur interprétation thermodynamique, ce qui nous a amené à étudier quantitativement les pressions osmotiques dans les phases lamellaires concentrées. Pour les deux glycolipides étudiés nous avons mesuré une augmentation de la répulsion stérique exponentielle à courte distance. Nous avons observé que le mélange moléculaire se traduit par la variation linéaire de la portée de cette répulsion exponentielle avec la quantité de glycolipide ajoutée et non celle de la valeur à l'origine. Nous avons retrouvé ce comportement avec le mélange DMPC (un phospholipide zwitterionique) + LC₁₁C₉.

Avec le LC₁₁C₉ nous avons également mis en évidence une énergie attractive d'adhésion supérieure aux valeurs des énergies de van der Waals habituelles. Cette énergie, liée à la présence des têtes polaires constituées de sucres, est donc caractéristique des glycolipides.

Le calcul théorique des interactions moléculaires à partir des données expérimentales partielles de pressions nous a permis d'obtenir **l'équation d'état** de notre système mixte, donnant la variation de la pression en fonction de la composition. Nous avons alors retrouvé l'allure des diagrammes de phases ternaires expérimentaux.

En régime dilué, nous avons observé l'équilibre entre la phase lamellaire gonflée au maximum et une phase diluée formée de vésicules ou de micelles mixtes. Dans le cas des micelles, nous avons démontré, par le calcul explicite des pressions dans les deux phases en présence, l'équilibre osmotique entre la phase lamellaire au gonflement maximum et la phase diluée. Nous avons également observé que ce gonflement maximum diminue avec l'ajout du glycolipide.

Des problèmes soulevés pendant cette étude restent encore à éclaircir :

- pourquoi par le calcul de l'interaction électrostatique l'ion brome apparaît fortement adsorbé, alors que, dans le calcul de Gibbs, il faut le considérer comme complètement dissocié pour obtenir la bonne surface par tête polaire?
- ne faudrait-il pas tenir compte, dans le bilan des forces des bicouches mixtes, des fluctuations de concentrations dans le plan des bicouches et des ondulations possibles?

Notre étude n'a considéré que des surfaces identiques en regard, avec les mêmes motifs sucres présents en protusion; il serait intéressant d'obtenir les mêmes informations sur les interactions avec des têtes sucres différentes de part et d'autre. Par exemple on peut imaginer ajouter des oligosaccharides d'un certain type dans un équilibre lamellaire-lamellaire de bicouches décorées en surface avec les têtes polaires d'un glycolipide d'une autre famille.

De même la méthode de gradient de concentration en capillaire ouvre la perspective de travailler avec des glycolipides naturels encore plus rares (GM1, GM3...) ou des glycoprotéines membranaires, pour lesquelles les quantités manipulées sont de l'ordre du milligramme. Avec la mesure des pressions osmotiques, cela permettrait d'obtenir l'équation d'état de tels systèmes biologiques et d'avancer dans la compréhension des mécanismes d'interactions cellulaires.

Annexes

Annexe 1 : Etude d'adsorption sur des bicouches de DDAB par variation de contraste en DNPA

Adsorption Study on DDAB Bilayers Using Contrast Variation with SANS

Florence Ricoul (*), Monique Dubois and Thomas Zemb

Service de Chimie Moléculaire, Centre d'Études de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

(Received 29 February 1996, revised 9 July 1996, accepted 7 October 1996)

PACS.61.12.Ex – Neutron scattering techniques (including small-angle scattering)

PACS.82.60.Hc – Chemical equilibria and equilibrium constants

PACS.61.30.Eb – Experimental determinations of smectic, nematic, cholesteric, and other structures

Abstract. — Partition coefficients of solutes between bilayers and water are determined with a new method, using contrast variation with SANS. The isotopic composition of the solvent that annuls the contrast is shown to depend on thermodynamical quantities related to the adsorption. Experimental results are given for two organic solute molecules (lactitol and aniline) in the favorable case of the swollen lamellar phase obtained with DDAB double chain surfactant.

One of the basic aspects in the study of biological membranes is to understand what happens at the water-bilayer interface or what interactions are dominant during molecular recognition involved in immunologic processes. It is therefore important to determine directly partition coefficients of solutes between the bulk and the surface of surfactant bilayers.

Consider any guest molecule in a complex fluid. This molecule can exist either as molecularly dissolved in the solvent or associated to the surfactant. The molar fraction ratio of these two situations is the partition coefficient. In the latter situation, the guest molecule can be adsorbed at the interface or embedded in the aggregate. The simplest complex fluid is the spherical micelle. In this case an extended review of the methods used to determine partition coefficients exists for instance in [1]. A number of analytical techniques have been developed: fluorescence probing, NMR self diffusion experiments, differential spectrophotometry, liquid chromatography, conductance, vapor pressure techniques, *etc.* In the case of reverse micelles, a detailed study has been made by Hatton and co-workers [2].

Our aim is to determine the partition coefficient when the complex fluid under study is a swollen lamellar phase at thermodynamical equilibrium.

In this case the host molecule can be dissolved in the interbilayer solvent considered as bulk or attached to the bilayer.

In this paper, we describe a method based on solvent contrast variation with SANS allowing measurement of partition coefficients. The contrast variation technique has been routinely used to determine the internal structure of micelles or of biological objects [3,4]. It relies on the contrast dependence of the intensity scattered by the sample extrapolated to zero angle:

$$I(q \rightarrow 0) = \Phi V(\rho_1 - \rho_2)^2 \quad (1)$$

(*) Author for correspondence (e-mail: ricoul@nanga.saclay.cea.fr)

where Φ is the volume fraction of the scatterer, V is the molecular volume of the scatterer and ρ_1 and ρ_2 are the scattering densities of the scatterer and the solvent respectively. These densities are given by the following formula:

$$\rho = \frac{b}{V} = \frac{\sum x_i b_i}{\sum x_i v_i} \quad (2)$$

where b_i is the scattering length of the element i and \bar{v}_i is the specific volume of the element i .

By varying the isotopic constitution of the solvent, for example by adding heavy water to light water, it is possible to annul the contrast and determine the exact scattering length density ρ_1 of the scatterer. The standard procedure to determine ρ_1 is to plot the square root of $I(q \rightarrow 0)$ versus the molar ratio D_2O/H_2O [4].

Since we work with a swollen lamellar phase it is better, to increase the signal/noise ratio, to use the square root of the intensity of the integrated first order Bragg peak. This is possible only if the shape of the form factor $P(q)$ is independent of the contrast. At low angle, if q_0 is the peak position and t the bilayer thickness, then $t \ll \frac{2\pi}{q_0}$ and we can consider in a good approximation that the bilayer is homogeneous and that the form factor has the following expression [5]:

$$P(q) = \Phi \frac{2\pi}{q^2} t (\rho_1 - \rho_2)^2 \left(\frac{\sin(qt/2)}{qt/2} \right)^2 \quad (3)$$

Thus $P(q)$ is linear with the square of $(\rho_1 - \rho_2)$. Since the intensity of the sample is the form factor modulated by a numerical structure factor which is independent from the contrast, we assume the linearity in intensity as for $P(q)$. Typical result obtained with a pure bilayer [6] is shown in Figure 1.

In the following, we show on a complete example how it is possible to extend this contrast variation method to determine the partition coefficient of a solute between the bulk and the interface of a bilayer. The model system chosen is a dilute lamellar phase of DDAB, (dido-decyltrimethylammonium bromide), with two different solutes, aniline and lactitol, which is a lactose derivative. The DDAB presents a large domain of stable swollen lamellar phase, so that the bulk water thickness is much larger than the bilayer thickness [6]. Moreover the DDAB lamellar phase is a rigid phase with no fluctuation so that no strong central diffusion can perturb the observation of the Bragg peak. The two solutes chosen are expected to have different behaviors: the lactitol molecule being more hydrophilic with its hydroxy groups than the aniline molecule that contains an aromatic ring.

1. Experimental

We use DDAB from Kodak recrystallized 3 times in ethyl acetate. Lactitol monohydrate ($C_{12}H_{24}O_{11}, H_2O$) is used as received from Aldrich. To increase the contrast between DDAB and aniline molecules and thus to get a better precision on K , the equilibrium constant, we use deuterated aniline ($C_6D_5NH_2$) from Eurisotop.

Numerical constants used for the scattering length and the molecular volumes are given in Table I. The molecular volumes of DDAB and lactitol have been measured using a Density Measurement Apparatus DMA 60 from A. Paar (Graz, Austria). The volume of the bromide is taken from crystallographic data [7]. The volume for aniline and water are calculated from the densities values given in [8]. We assume that these molecular volumes in liquids are independent of the structure and we also neglect the effects of strong interactions that may exist with association [9].

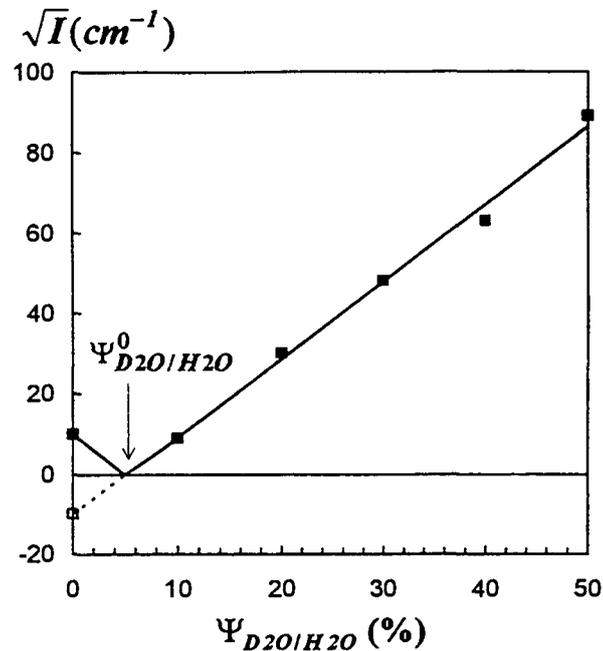


Fig. 1. — Typical contrast variation experiment with DDAB 10 wt% in water (from [6]). Ψ_{D_2O/H_2O} is the volume fraction of heavy water over light water and I is the scattering intensity. The squares are the experimental values and the line gives the best linear fit. Ψ_{D_2O/H_2O}^0 is found equal to 4.3% which is in good agreement with the value of 4.14% calculated according to the model described in the text.

Table I. — Numerical constants used for the calculation of the contrast (details for the molecular volumes determination are given in the experimental part).

	b ($\times 10^{-12}$ cm)	\bar{v} ($\times 10^{-24}$ cm ³)
DDA ⁺	-2.723	751
Br ⁻	0.679	39
H ₂ O	-0.168	30
D ₂ O	1.9152	30
Lactitol (C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁)	$-8.7526 + 9 \times [\Psi_{D_2O/H_2O} \times b_D + (1 - \Psi_{D_2O/H_2O}) \times b_H]$	350
Aniline (C ₆ D ₅ NH ₂)	$8.2576 + 2 \times [\Psi_{D_2O/H_2O} \times b_D + (1 - \Psi_{D_2O/H_2O}) \times b_H]$	151

The composition of the samples is defined by the values of the volume fractions of DDAB, Φ_{ddab} , of solute, Φ_s , and of water $\Phi_w = \Phi_{D_2O} + \Phi_{H_2O} = 1 - \Phi_{ddab} - \Phi_s$ as well as the volume ratio of heavy water over light water $\Psi_{D_2O/H_2O} = \Phi_{D_2O} / (\Phi_{D_2O} + \Phi_{H_2O})$.

Φ_{ddab} was fixed to 5% so that the periodicity of the lamellar liquid crystal is 480 Å. At room temperature, the chains are in the liquid state (L_α). 10 samples with different ratios Ψ_{D_2O/H_2O} from pure H₂O to pure D₂O were prepared for each of the 3 experiments we made: $\Phi_{lactitol} = 0.1$, $\Phi_{aniline} = 0.005$ and $\Phi_{aniline} = 0.01$. The scattering experiments have been performed on PAXE spectrometer at the LLB laboratory at Saclay with a wavelength of 7 Å and the detector at 5 m. The samples were placed in 1 mm quartz cells from Thuet-Bichelin (B.P. 7-Blodelsheim-France).

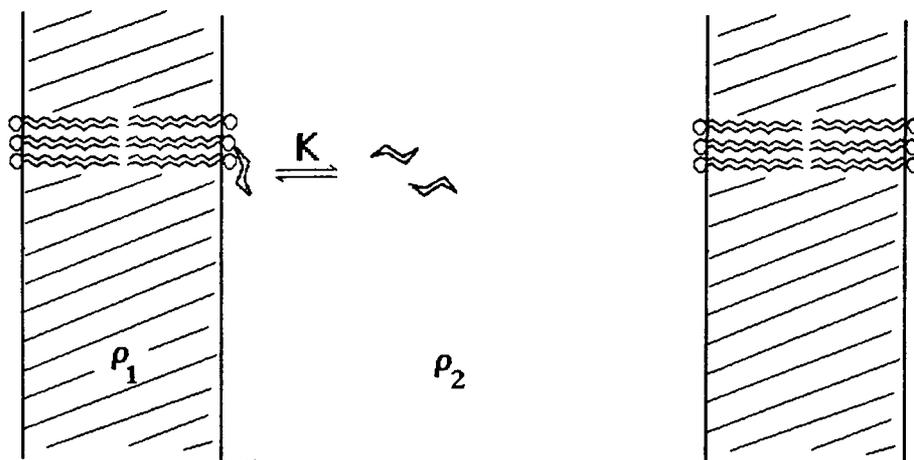


Fig. 2. — Schematic structure of the lamellar phase in presence of the solute: K is the equilibrium constant of the solute between the bulk and the interface, ρ_1 and ρ_2 are the average scattering densities respectively for the bilayer and for the bulk (quantities are defined in the text).

2. Theory

From the measurement of Ψ_{D_2O/H_2O}^0 , the volume ratio of heavy water over light water that annuls the contrast between the bulk and the lamella one can deduce the amount of solute that adsorbs at the surface. Indeed, we show now that the binding constant of the solute depends on Ψ_{D_2O/H_2O}^0 .

Let us consider our system as schematized in Figure 2. In order to calculate the contrast between the lamella and the bulk, we introduce:

$$\rho_1 - \rho_2 = \frac{b_1}{V_1} - \frac{b_2}{V_2} \quad (4)$$

where b_1 and b_2 are the scattering lengths for respectively the lamella and the bulk; V_1 and V_2 are the volumes of respectively the lamella and the bulk. In the following these quantities are evaluated per DDAB molecule.

We introduce the parameter λ , the interfacial composition, as defined by Leodidis and Hatton [2]: $\lambda = n_s^{ads}/n_{ddab}^0$ (where n_s^{ads} is the number of solute molecule adsorbed on the bilayer and n_{ddab}^0 is the number of DDAB molecule in the sample). Thus for the bilayer, per DDAB molecule, we have:

$$v_1 = b_{dda+} + \beta b_{Br-} + \lambda b_s \quad (5)$$

β is the ratio of bound bromide counterion per DDAB molecule. We assume $\beta \approx 0.9$ as it was found in DLVO fit of forces measurement in [10]. However we have verified that a variation in the value of β less than 10% is in the range of the experimental error on the determination of Ψ_{D_2O/H_2O}^0 . The scattering density of the solute, b_s , depends on Ψ_{D_2O/H_2O} as the solute can exchange labile protons with the solvent (*cf.* Tab. I).

In equation (4), V_1 is derived from:

$$V_1 = \bar{v}_{dda+} + \beta \bar{v}_{Br-} + \lambda \bar{v}_s \quad (6)$$

Since we have $\bar{v}_w n_w^0 = \Phi_w V$ and $\bar{v}_{ddab} n_{ddab}^0 = \Phi_{ddab} V$ with \bar{v}_w and \bar{v}_{ddab} the molecular volumes of the water and DDAB respectively and V the total volume of the sample, we can write $n_w^0/n_{ddab}^0 = \bar{v}_{ddab}/\bar{v}_w \Phi_w/\Phi_{ddab}$.

The average scattering length of the bulk solvent b_2 is also depending on λ , because the adsorbed host molecule should not contribute in the bulk scattering:

$$b_2 = (1 - \beta)b_{\text{Br}^-} + \left(\frac{\Phi_s}{\Phi_{\text{ddab}}} \frac{\bar{v}_{\text{ddab}}}{\bar{v}_s} - \lambda \right) b_s + \left(\frac{\Phi_w}{\Phi_{\text{ddab}}} \frac{\bar{v}_{\text{ddab}}}{\bar{v}_w} \right) b_w \quad (7)$$

with $b_w = \Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}} b_{\text{D}_2\text{O}} + (1 - \Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}) b_{\text{H}_2\text{O}}$. The volume of the bulk is given by:

$$V_2 = (1 - \beta)\bar{v}_{\text{Br}^-} + \left(\frac{\Phi_s}{\Phi_{\text{ddab}}} \frac{\bar{v}_{\text{ddab}}}{\bar{v}_s} - \lambda \right) \bar{v}_s + \frac{\Phi_w}{\Phi_{\text{ddab}}} \bar{v}_{\text{ddab}} \quad (8)$$

So finally we obtain an expression for the contrast depending on four physical quantities:

$$\rho_1 - \rho_2 = \frac{b_1}{V_1} - \frac{b_2}{V_2} = f_1(\lambda, \Phi_{\text{ddab}}, \Phi_s, \Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}) \quad (9)$$

This equation gives a linear relation between $\rho_1 - \rho_2$ and $\Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}$ so according to (1) it implies also a linear relation between $\pm\sqrt{I}$ and $\Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}$.

For given Φ_{ddab} and Φ_s it is possible to solve numerically the equation $\rho_1 - \rho_2 = 0$ and get the variation of λ as a function of the value of $\Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}$ that annuls the contrast: $\lambda = f_2(\Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}^2)$.

Besides from the value of λ , one can calculate $x_s^{\text{ads}} = \lambda/(1 + \lambda)$, the mole fraction of solute at the interface, and $c_s^{\text{free}} = ((n_s^0 - n_s^{\text{ads}})/n_{\text{ddab}}^0)/V_2 = (\Phi_s/\Phi_{\text{ddab}} \bar{v}_{\text{ddab}}/\bar{v}_s - \lambda)/V_2$, the concentration of solute that stays in the bulk. Then we can deduce the equilibrium constant K , as defined in [1]:

$$K = \frac{x_s^{\text{ads}}}{c_s^{\text{free}}} = f_3(\Phi_{\text{ddab}}, \Phi_s, \Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}^0) \quad (10)$$

or a dimensionless partition coefficient K' , as defined in [2]:

$$K' = \frac{x_s^{\text{ads}}}{x_s^{\text{free}}} \quad (11)$$

In sufficiently dilute solutions one has $x_s^{\text{free}} \cong c_s^{\text{free}}/55.5$ (so that $K' \cong K \times 55.5$). These two quantities, K and K' , make no hypothesis on the bilayer being a continuum since x_s^{ads} represents a mole fraction. Moreover if the solute in the aqueous solution has an ideal behavior in the sense of Henry's law, then K or K' can be converted into thermodynamical quantities. For example, for given Φ_{ddab} and Φ_s , it is possible to plot $-\log(K)$, which is proportional to the free enthalpy of adsorption of the solute on the surface, *versus* $\Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}^0$, the ratio that annuls the contrast. This is illustrated in Figure 3 with computed values of $\Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}^0$ *versus* $\log(K')$.

Finally, from the experimental measurement of $\Phi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}^0$ it is possible to deduce the thermodynamical quantities about the adsorption of the solute.

3. Results and Discussion

For the different experiments, the maximum intensity of the first Bragg peak has been determined graphically on each scattering spectrum. The square-root of this intensity is plotted in Figure 4 *versus* $\Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}$: for clarity, only the points with $\Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}$ below 30% are shown and the points below the match point (open symbols in the figure) have been plotted with an opposite sign so that they can align with the others. The lines in the figure are the best linear

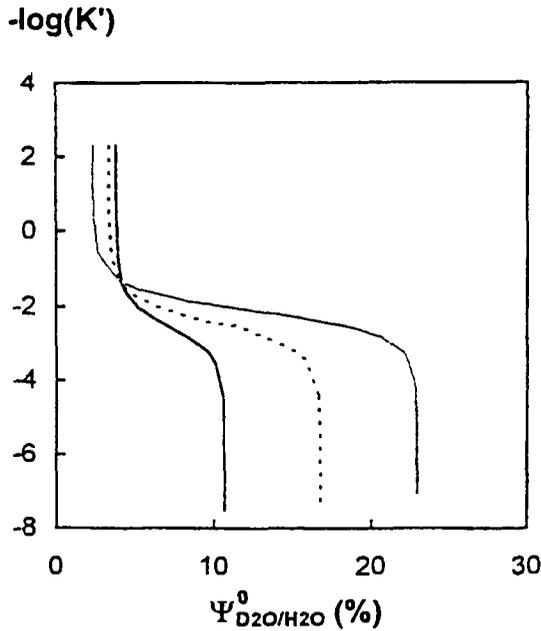


Fig. 3

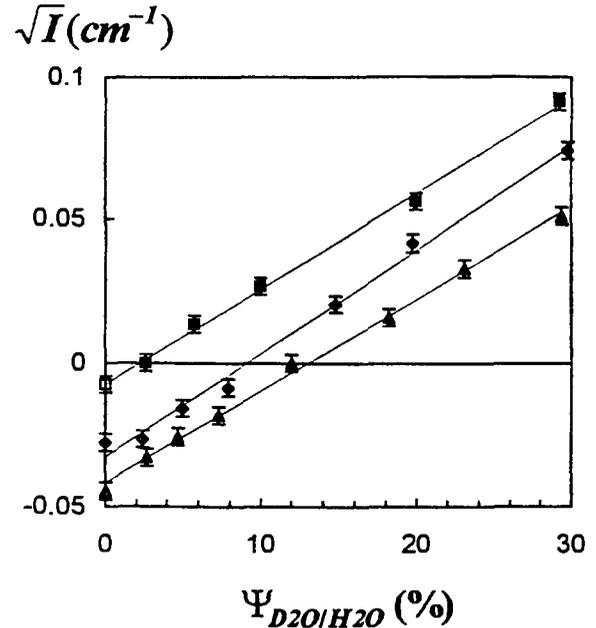


Fig. 4

Fig. 3. — Simulations of the logarithm of K' , the molar fraction based partition coefficient as defined in the text and in [2], as a function of Ψ_{D_2O/H_2O}^0 , the volume ratio of heavy water that annuls the contrast: (—) $\Phi_{aniline} = 0.005$, (- - -) $\Phi_{aniline} = 0.01$ and ($\cdots\cdots$) $\Phi_{lactitol} = 0.1$ ($\Phi_{ddab} = 0.05$ for the three curves).

Fig. 4. — Square root of the scattering intensity *versus* volume fraction of heavy water in the solvent for 3 experiments: squares $\Phi_{lactitol} = 0.1$, losanges $\Phi_{aniline} = 0.005$ and triangles $\Phi_{aniline} = 0.01$. The open symbols represent the values for which the sign has been changed so that the full lines could give the best linear fits for all the points.

fits which have regression coefficients higher than 0.99 in the three cases. The error on the graphical measurement of the intensity has been reported by the error bars.

In the experiments with aniline, we observe that the points do not align as well. We explain this phenomenon by the fact that the bilayers may not be strictly homogeneous especially if there is some adsorption. Equation (3) for $P(q)$ is modified for heterogeneous bilayers and since we work at finite angle instead of zero angle, $P(q)$ is slightly different when the contrast between the lamellae and the bulk is high compared to the case when the contrast is small. The scattered intensity should be modified by a small factor. However we find that, either using the linear fit of all the points or only several points around the match point, the uncertainty in the determination of Ψ_{D_2O/H_2O}^0 is less than 0.2 units.

From equations (1) and (9) described above, which give a linear relation between $(\rho_1 - \rho_2)$ (or $\pm\sqrt{I}$) and Ψ_{D_2O/H_2O} , it is possible to deduce the value of λ that gives the best fit of the experimental points. The value of the fit is arbitrarily set equal to the intensity of the experimental points at $\Psi_{D_2O/H_2O} = 100\%$ for which the intensity of the Bragg peak is the highest and the error is the smallest. The fit corresponds also to a best linear fit so it should cross the abscissa axis at the same value of Ψ_{D_2O/H_2O}^0 as the experimental points. Thus we deduce the upper and lower possible values for λ by the fits that reproduce the upper and lower experimentally determined limits for Ψ_{D_2O/H_2O}^0 . The results are summarized in Table II. Figures 5a, b and c show the comparison for $\sqrt{I} = f_4(\Psi_{D_2O/H_2O})$ between computed lines with

Table II. — *Results of the contrast variation experiments for lactitol and aniline.*

	$\Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}}^0$	λ	% of solute adsorbed
Lactitol 10%	0.023 ± 0.002	$< 10^{-2}$	$< 1\%$
Aniline 0.5%	0.09 ± 0.002	0.354 ± 0.108	$75\% \pm 2.2$
Aniline 1%	0.13 ± 0.002	0.674 ± 0.101	$71\% \pm 2$

Table III. — *Values of the different partition constants for the adsorption of aniline.*

	K (mol/l)	K'	ΔG (kcal/mol)
Aniline 0.5%	19.5 ± 9.9	1085 ± 553	-4.06 ± 0.24
Aniline 1%	13.0 ± 3.5	725 ± 196	-3.82 ± 0.14

different values of λ and experimental curves. For clarity around the match point, only the points below $\Psi_{\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}} = 50\%$ are shown.

In the case of the lactitol molecule solubilized in an L_α phase, it is clear that we do not have an adsorption of the sugar at the interface (Fig. 5a). This observation agrees with the observation reported by Katz and Diamond on sucrose and multilayered DMPC liposomes [11]. However in this latter case, the adsorption equilibria were evaluated on liposomes with excess water.

On the contrary, in the case of aniline, we see a strong adsorption, greater than 70% in our experimental conditions (Figs. 5b and 5c). In Table III, we show the values for K and K' calculated using equations (10) and (11). We have also calculated the free enthalpy of transfer of aniline from water to DDAB bilayer using K' . The value we found (~ -4 kcal/mol) is of the order of the value found for the most hydrophobic amino acids in the scale of the transfer from water to AOT interface described by Leonidis and Hatton [2]. This is consistent with the fact that aniline has an aromatic ring and no carboxylic group in comparison with amino acids. It is also possible to correlate these values of the free enthalpies of transfer with the octanol/water scale for partition coefficients, first studied by Collander, [12], who observed that there tend to be systematic relationships among nonelectrolyte partition coefficients measured between water and nonpolar solvents for a family of solutes. Later Hansch and Leo [13], found that biological activity of simple organic compounds correlate with their octanol/water partition coefficients. In [2], Leonidis and Hatton have found that it costs more energy to transfer amino acids from water to the AOT interface than to octanol whereas Katz and Diamond have found that the free energies of transfer for nonelectrolytes are lowered in the case of the DMPC bilayers. In our case, with DDAB bilayers, we have only data for aniline. The octanol/water partition coefficient for aniline is given in [14]: the value 8 is defined as the unitless ratio of the concentrations in the organic phase and in the aqueous phase. Using the same definition we can calculate the partition coefficient DDAB-membrane/water for aniline and we find a ratio of 50, indicating that aniline has more affinity for the bilayers than for octanol.

It is also interesting to define l , a characteristic thickness for the adsorption layer, by $(n_s^{\text{ads}} \times \bar{v}_s) / (n_{\text{ddab}}^0 \times \sigma_{\text{ddab}})$ where σ_{ddab} is the polar headgroup area of DDAB and equals 68 \AA^2 . The calculations with aniline give 0.78 \AA for $c_s^{\text{free}} = 0.013 \text{ mol/l}$ and 1.49 \AA for $c_s^{\text{free}} = 0.031 \text{ mol/l}$. First we observe that l is in the range of 1 \AA , which is less than the aniline molecule size: this means that the surface is not totally covered. Then we observe that l is proportional to c_s^{free} ,

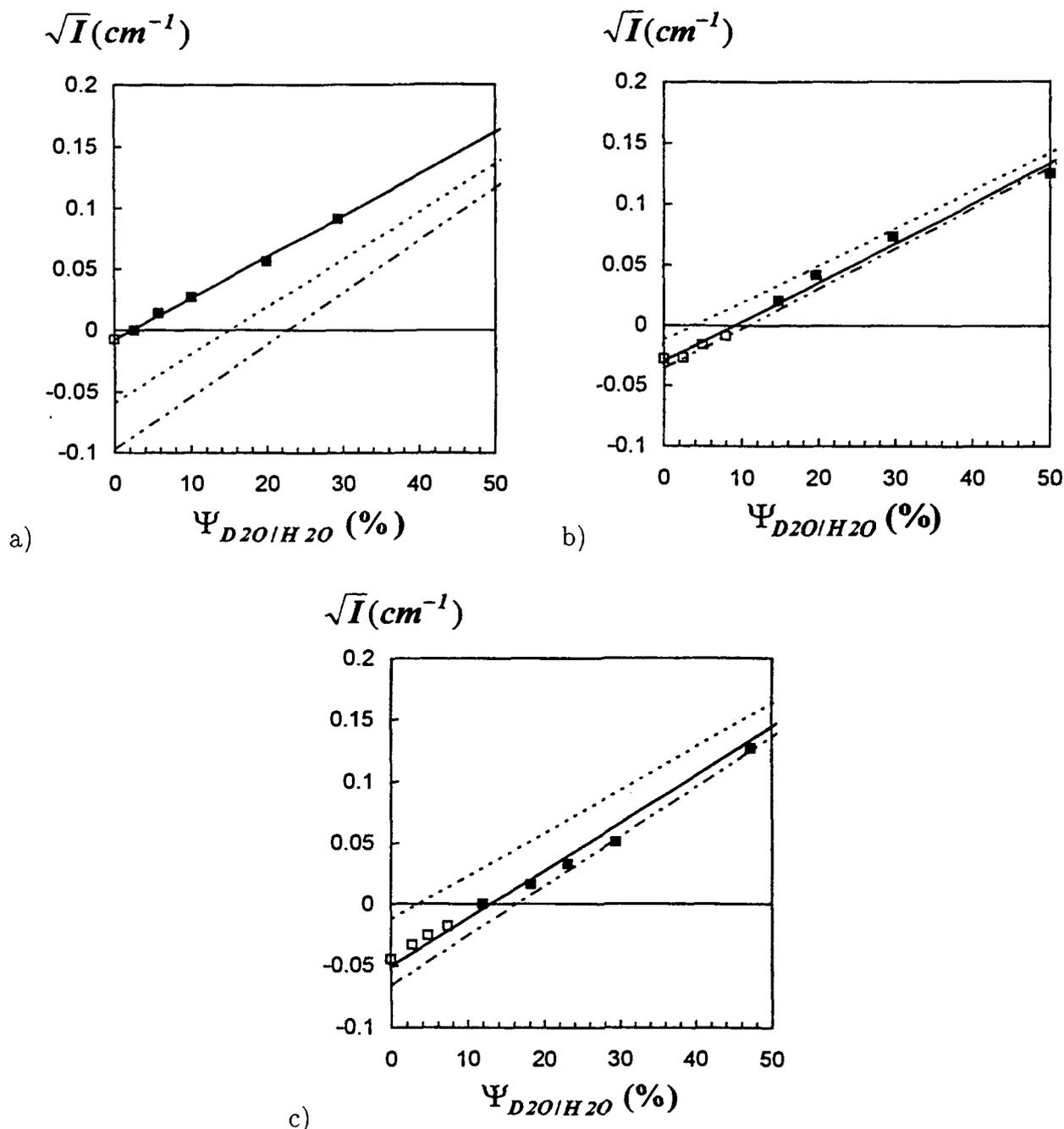


Fig. 5. — Square root of the scattering intensity *versus* volume fraction of heavy water in the solvent. The squares are the experimental results (open squares represent the points that have been plotted negatively) and the lines are predictions calculated with the implicit relation (2) for different adsorption ratios: a) $\Phi_{\text{lactitol}} = 0.1$ and (—) $n_s^{\text{ads}}/n_s^0 = 0\%$; (- - -) 50%; (- · - · - ·) 100%; b) $\Phi_{\text{aniline}} = 0.005$ and (- - -) 0%; (—) 75%; (- · - · - ·) 100%; c) $\Phi_{\text{aniline}} = 0.01$ and (- - -) 0%; (—) 71%; (- · - · - ·) 100%.

so no saturation seems to happen. If saturation occurs, an extension of this method to higher solute/surface ratio would allow the determination of a full Langmuir isotherm in a lamellar system.

A large number of such a membrane/water partition coefficient study already exist in the literature: a good review of them can be found in [15]. But as the authors explain it, most of the studies are based on the separation of vesicle and aqueous phases like in [11]: this procedure can however lead to errors since the centrifugation may modify the system and the

solute partitioning. Fluorescence spectroscopy or EPR do not require phase separation: for example, in [16], partition coefficients of local anesthetics have been determined in spin labeled membranes. However these methods are indirect measurements of the partition coefficient since they are sensitive to the spectral effects caused by the addition of the solutes to the bilayers; in addition they need probes either on the solute or on the lipids which may give artifacts. Compared to these methods, the SANS technique allows direct determination of partition coefficients in a single phase lamellar liquid crystal. The example given in this paper with DDAB, lactitol and aniline is a first illustration of this method which could also be applied to more classical lipid membranes and other biological solutes. The interbilayer space dimension must allow the penetration of the solute and the presence of solute should also not induce a phase transition which is true at dilute concentration. The main limitation is that the shift of the contrast match point with a possible adsorption of the solute has to be measurable, *i.e.* larger than typical error bars, commonly 1 to 2% on the match point isotopic content. This shift depends on each system but can be calculated as shown in this paper once the molecular volumes are known.

Acknowledgments

The authors wish to thank José Teixeira for help in the neutron scattering measurements as well as two referees for helpful comments and precise details.

References

- [1] S.D. Christian and J.F. Scamehorn, Eds., Solubilization in surfactant aggregates, chap 1, (Dekker, NY, 1995).
- [2] Leodidis E.B. and Hatton T.A., *J. Phys. Chem.* **94** (1990) 6400, 6411.
- [3] Williams C.E., in Neutron, X-Ray and Light scattering, Introduction to an investigative tool for colloidal and polymeric systems, Lindner and Zemb, Eds. (North-Holland, 1991) pp. 101-117.
- [4] Stuhmann H.B. and Miller A., *J. Appl. Cryst.* **11** (1978) 325.
- [5] Porod G., in Small angle X-ray scattering, Glatter and Kratky, Eds., (Academic Press, London, 1982) pp. 17-51.
- [6] Dubois M., Gulik-Krzywicki T. and Cabane B., *Langmuir* **9** (1993) 673.
- [7] Immirzi A. and Perini B., *Acta Cryst. A* **33** (1977) 216.
- [8] Handbook of Chemistry and Physics, 72nd Edition (CRC Press).
- [9] Chevalier Y. and Zemb T., *Rep. Prog. Phys.* **53** (1990) 279.
- [10] Pashley R.M., McGuiggan P.M., Ninham B.W., Brady J. and Evans D.F., *J. Phys. Chem.* **90** (1986) 1637.
- [11] Katz Y. and Diamond J.M., *J. Membr. Biol.* **17** (1974) 69, 87, 101, 123.
- [12] Collander R., *Acta Chem. Scand.* **3** (1949) 717.
- [13] Hansch C. and Leo A., Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology (Wiley, New York, 1979).
- [14] Sangster J., *J. Phys. Chem. Ref. Data* **18** (1989) 1111.
- [15] Lissi E., Bianconi M.L., Amaral A.T., de Paula E., Blanch L.E.B. and Schreier S., *Biochim. Biophys. Acta* **1021** (1990) 46.
- [16] de Paula E. and Schreier S., *Biochim. Biophys. Acta* **1240** (1995) 25.

Annexe 2 : Temps de vol en diffusion de neutron

Le principe de la mesure du signal de diffusion en temps de vol consiste à utiliser un faisceau blanc de neutrons (i.e. avec toutes les longueurs d'onde) au lieu d'utiliser un faisceau monochromaté (à 10% près) au moyen d'un sélecteur de vitesse. On utilise alors un "chopper" pour envoyer à un temps t donné des paquets de neutrons sur l'échantillon sur une durée Δt . La détection se fait alors à partir d'un temps t_1 , sur une durée T qui soit suffisante pour tenir compte de la durée mise par les neutrons les plus lents pour parcourir la distance D chopper-détecteur. La vitesse ω de rotation du chopper doit être telle que la fréquence d'émission des paquets d'onde est inférieure ou égale à T pour éviter un recouvrement sur le détecteur des neutrons lents d'un premier paquet et des neutrons rapides du paquet suivant. Dans la configuration actuelle des programmes d'acquisition au LLB, la période T peut être au maximum découpée en 250 canaux temporels de largeur l_c tandis qu'on peut définir sur le détecteur bidimensionnel au maximum 15 zones spatiales sur lesquelles le signal est moyenné.

En résumé il y a quatre paramètres libres à définir par l'utilisateur pour effectuer la mesure en temps de vol : T , D , l_c et les 15 zones de regroupement.

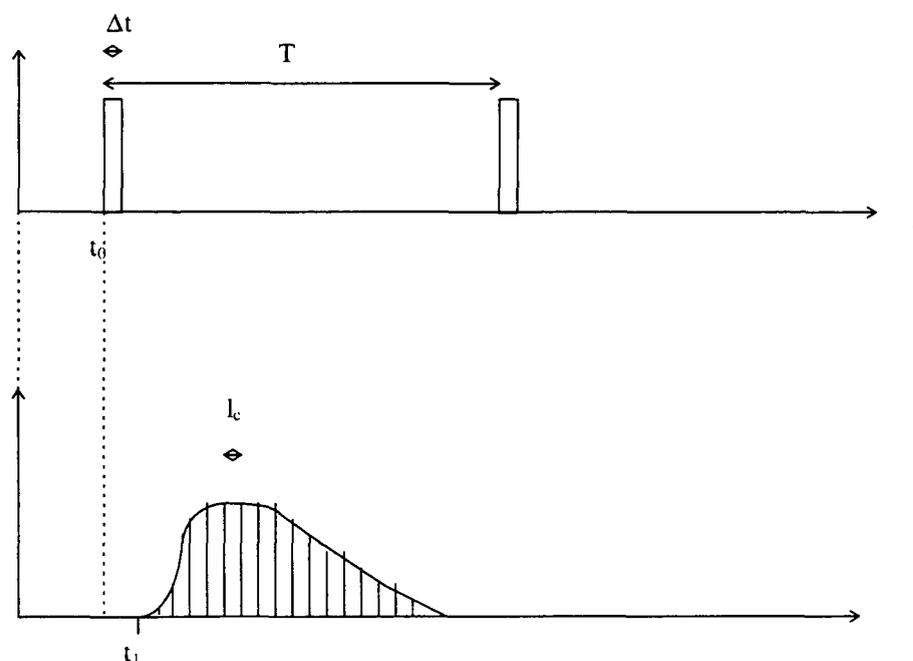


Figure 1 : Schéma de principe de l'analyse en temps de vol.

L'acquisition permet d'obtenir sur chaque zone l'intensité I en fonction du numéro de canal temporel. Le passage en vecteur d'onde q se fait par les calculs suivants :

Sachant que la vitesse d'un neutron de longueur d'onde λ , de masse $m=1.66 \times 10^{-27}$ kg vaut $v=h/(m \lambda)=1/(253 * \lambda)$ Å/ μ s, on a la relation suivante :

$$253 \times \lambda = \frac{T}{D} = \frac{(n - 0.5) \times l_c + R}{D} \quad (i)$$

avec n le numéro du canal (de 1 à 250), l_c la largeur de chaque canal. $R=t_1-t_0$ est le retard à la détection qui n'est pas connu a priori.

Nous avons choisi de travailler à $D=2.70$ m pour obtenir en XY et à 4.5Å le pic de Bragg de nos phases lamellaires entre le piège et le bord du détecteur. Comme les neutrons les plus lents, à 20Å , mettent 13.6 ms pour parcourir D , nous avons choisi une largeur de canal $l_c=50\mu$ s, pour avoir une détection sur 12.5 ms à partir de t_1 . Nous avons également choisi $\omega=4200$ tr/min pour que soit vérifiée la relation suivante :

$$\omega \leq \frac{60 \times 10^6}{250 \times l_c + R} \quad (ii)$$

c'est à dire on a bien $4200/(60 \times 10^6) < 1/(250 \times 50)$ (R étant de l'ordre d'une ms).

En fait dans le programme d'acquisition on introduit un retard arbitraire R_{fiche} (par exemple pour nous 2200μ s) et le retard vrai à entrer finalement dans les équations précédentes est déterminé grâce à une calibration avec un échantillon dont on connaît une longueur d'onde d'absorption. Par exemple nous avons utilisé du béryllium qui a une coupure à 3.95Å . Le spectre brut est donné sur la Figure 2. On note la coupure sur la canal 84. Donc on a, d'après (i) :

$$R = \lambda_{Be} \times 253 \times D - (n_{Be} - 0.5) \times l_c = -1478\mu\text{s} \quad (iii)$$

Si on change R_{fiche} ultérieurement il faut utiliser dans les calculs $R= R_{\text{fiche}}-(2200-(1478))= R_{\text{fiche}}-3678$.

Connaissant λ par l'équation (i), q est défini par :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \left[\arctan \left(\frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{2D_{ech}} \right) \right] \quad (iv)$$

avec x et y les positions de la zone par rapport au faisceau direct et D_{ech} la distance échantillon-détecteur.

La transmission de l'échantillon qui dépend de λ , a été déterminée pour toutes les longueurs d'onde en utilisant le même principe du temps de vol mais en enlevant le beam-stop et en utilisant un atténuateur (3mm de plexiglass) pour mesurer l'intensité sur la zone centrale sous le beam-stop avec l'échantillon et sans échantillon. La transmission est donnée par le rapport des deux intensités. Le résultat pour l'échantillon de DDAB à 50% dans D₂O avec un comptage d'une demi-heure est donné sur la Figure 3. On remarque que pour les grandes longueurs d'onde ($>11\text{\AA}$) la statistique est mauvaise tandis que pour les neutrons rapides ($<2\text{\AA}$) la valeur de T dépasse la limite physique $T=1$.

Sur la Figure 4, nous avons tracé $I(q)$ pour un échantillon de DDAB à 50% . L'intensité a été divisée par la transmission et normalisée par l'intensité maximale du pic de Bragg, qui correspond à la phase L_α . Nous avons également tracé le triangle de résolution de l'expérience dont la largeur à mi-hauteur est estimée à 4% . En effet d'après l'équation (iv) on peut écrire :

$$\frac{\Delta q}{q} \approx \frac{\Delta \lambda}{\lambda} + \frac{\Delta x}{x} \quad (\text{v})$$

$\frac{\Delta x}{x}$ est lié à la taille des cellules du détecteur et est estimé à $1\text{cm}/32\text{cm} \sim 3\%$. Pour $\frac{\Delta \lambda}{\lambda}$ nous estimons l'erreur égale à une largeur de canal, $50\mu\text{s}$, c'est à dire $\sim 1\%$.

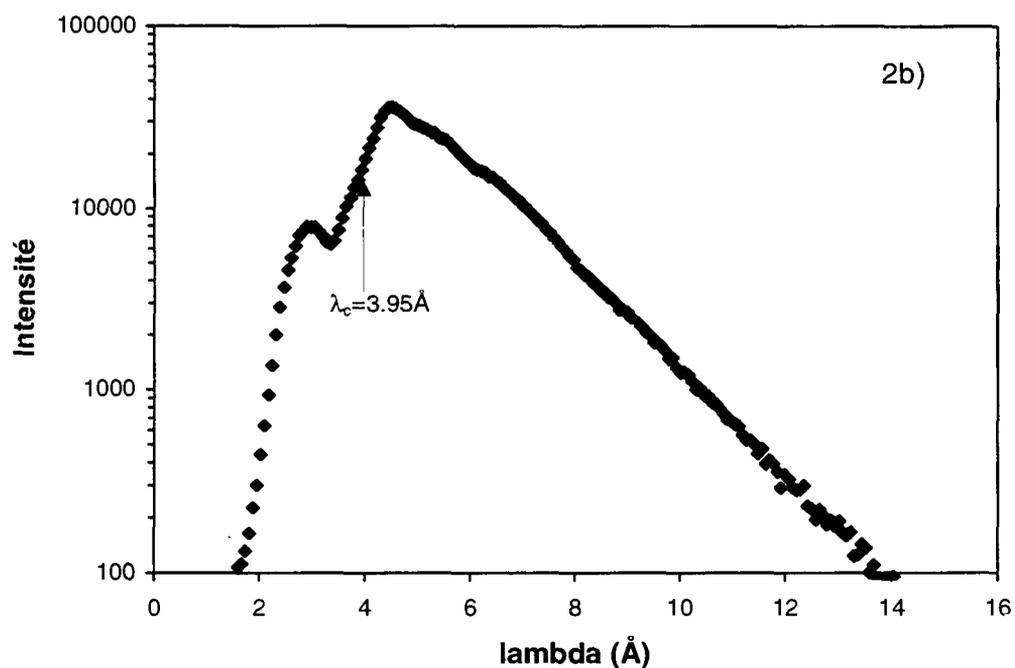
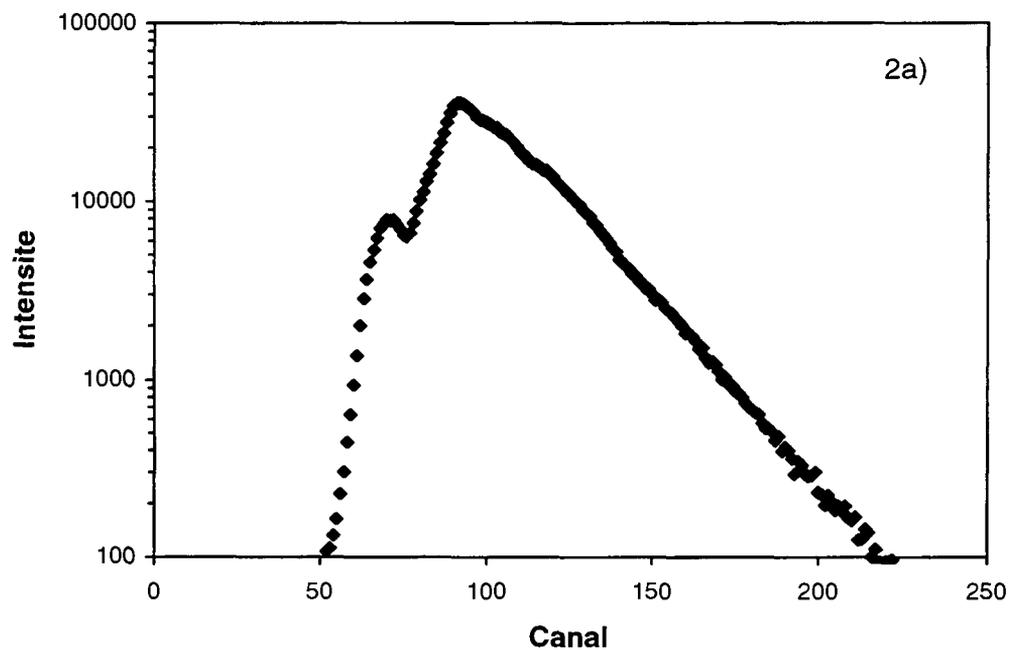


Figure 2 : Spectre en temps de vol du béryllium. 2a) L'intensité est donnée en fonction du canal temporel. On note la coupure pour le canal 84. 2b) L'intensité est donnée en fonction de la longueur d'onde après la calibration avec $\lambda_c = 3.95 \text{ \AA}$.

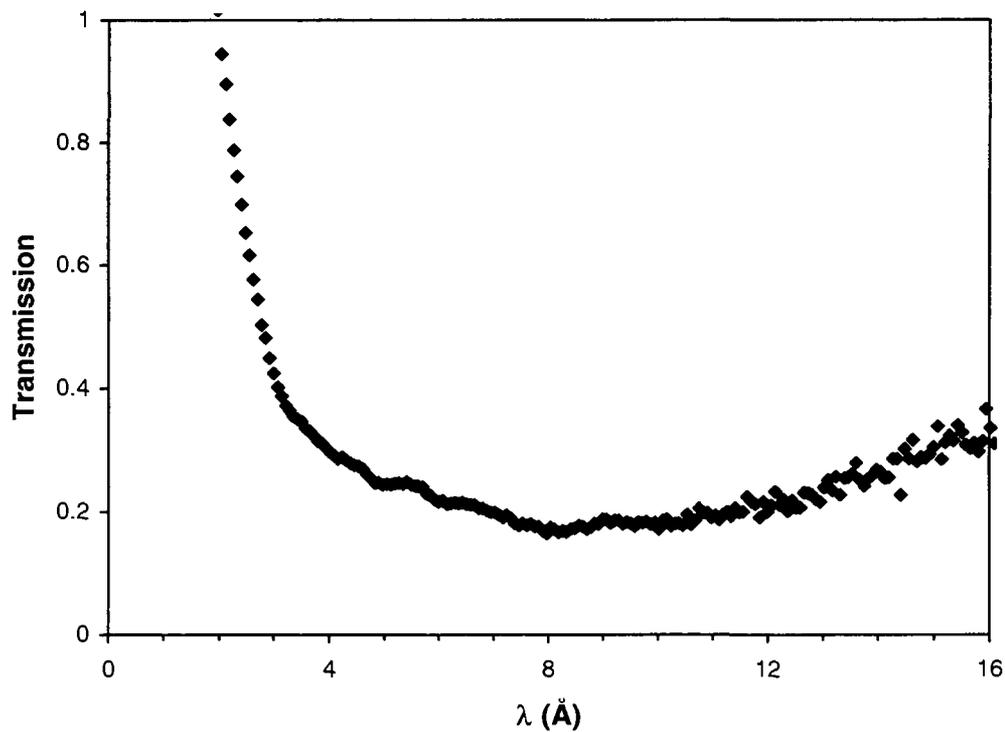


Figure 3 : Mesure de la transmission en temps de vol de l'échantillon de DDAB 50% dans D_2O en fonction de la longueur d'onde.

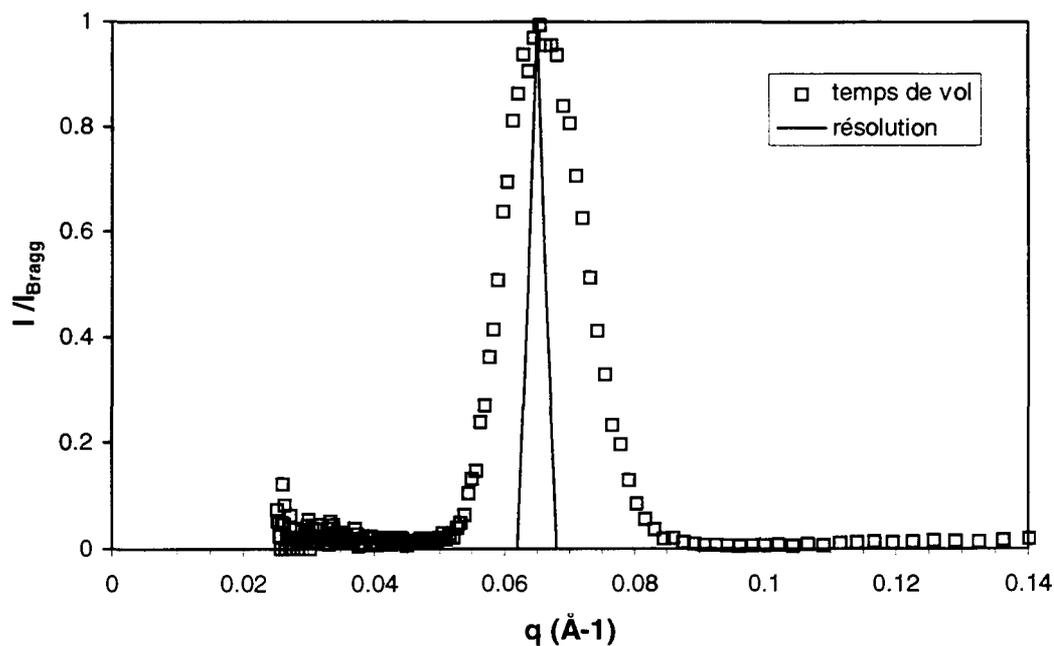


Figure 4 : Spectre $I(q)$ normalisé à 1 sur le pic de Bragg, obtenu avec échantillon de DDAB à 50% en volume dans D_2O . La résolution du montage est estimée à 4% sur la largeur à mi-hauteur.

Annexe 3 : Dosage des échantillons - Chromatographie Iatroscan

Pour déterminer la composition de nos échantillons de mélanges ternaires eau/DDAB/glycolipide nous avons toujours procédé de la même manière :

La quantité d'eau est d'abord déterminée par la méthode des restes, c'est-à-dire par la pesée des poudres sèches après lyophilisation des échantillons. La précision est donc donnée par la précision de la balance, $\pm 0.0001\text{g}$. Pour éviter de perdre de la poudre lyophilisée très volatile nous plaçons, pendant la lyophilisation, en haut des épendorfs, un film de paraffine percé de petits trous.

A partir des poudres sèches il est alors possible d'utiliser la méthode de chromatographie Iatroscan (Iatron, Japon) pour déterminer les concentrations en DDAB et en glycolipide. En effet il est préférable de ne plus avoir d'eau dans les échantillons à analyser car cela peut générer sur les chromatogrammes un élargissement des pics et des bosses parasites.

Principe de la chromatographie Iatroscan

Le principe de base de cette méthode de chromatographie est le même que celui de la chromatographie sur plaque de silice (Chromatographie sur Couche Mince), avec en plus le couplage à une détection par flamme qui donne des informations quantitatives.

La séparation des solutés se fait par élution avec un solvant bien choisi et les plaques de silice sont remplacées par des barreaux de verre de un millimètre de diamètre, recouverts de silice. Le dépôt de la solution se fait à l'aide d'une microsiringue motorisée pour obtenir des volumes reproductibles. Une fois que la migration des différents composés a eu lieu dans une cuve à élution, la détection se fait avec l'appareil Iatroscan proprement dit. Il s'agit d'une détection par flamme : un petit brûleur avec une flamme composée d'un mélange hydrogène + air se déplace le long du barreau de silice et brûle tous les composés qui y sont adsorbés. Ces composés s'ionisent, les cations migrent vers une cathode collectrice placée juste au-dessus tandis que les anions sont attirés par le brûleur qui joue aussi le rôle d'anode. Le courant ainsi généré entre ces deux électrodes est amplifié et donne un signal en fonction de la distance par rapport au

dépôt. Si les différents composés de la solution à analyser ont bien des distances de migration différentes, et si une calibration des composés purs a été faite, on peut alors obtenir la nature et la quantité des composés présents dans la solution à partir des positions et des surfaces des pics. Evidemment il est nécessaire de connaître quelles molécules peuvent se trouver a priori dans l'échantillon. Il est possible d'effectuer 10 analyses en même temps puisque le Iatroscan travaille sur des barrettes comprenant 10 barreaux de silice.

Cette technique est utilisée en milieu industriel dans des domaines variés comme les analyses de lipides en agroalimentaire, de polymères, d'huiles en pétrochimie...

Conditions expérimentales

- l'échantillon sec à analyser est dissout à une concentration de 1% en poids dans un mélange équimoléculaire : méthanol + chloroforme (ce mélange a été choisi de manière à dissoudre complètement le DDAB et le LS plutôt solubles dans l'alcool et le LC₁₁C₉ plutôt soluble dans le chloroforme)

- nous avons déposé des volumes de 1µl, et laissé migrer 40 minutes. Nous utilisons pour l'élution un mélange MeOH:HCCl₃:H₂O:NH₄⁺aq. 30:60:2.5:2 .

- après l'élution les barreaux sont séchés pendant 5 minutes dans une étuve à 80°C avant la mesure sur le Iatroscan. La flamme est réglée avec un mélange air/hydrogène, de débits 180 et 200 ml/min respectivement, et la vitesse de déplacement du brûleur est telle que l'analyse d'un barreau dure 30 secondes.

Sur la Figure 1 nous avons tracé les courbes de calibration obtenues avec les produits purs DDAB, LS et LC₁₁C₉. Sur les Figures 2 et 3 nous donnons deux exemples de chromatogrammes obtenus avec des mélanges DDAB/LS et DDAB/LC₁₁C₉.

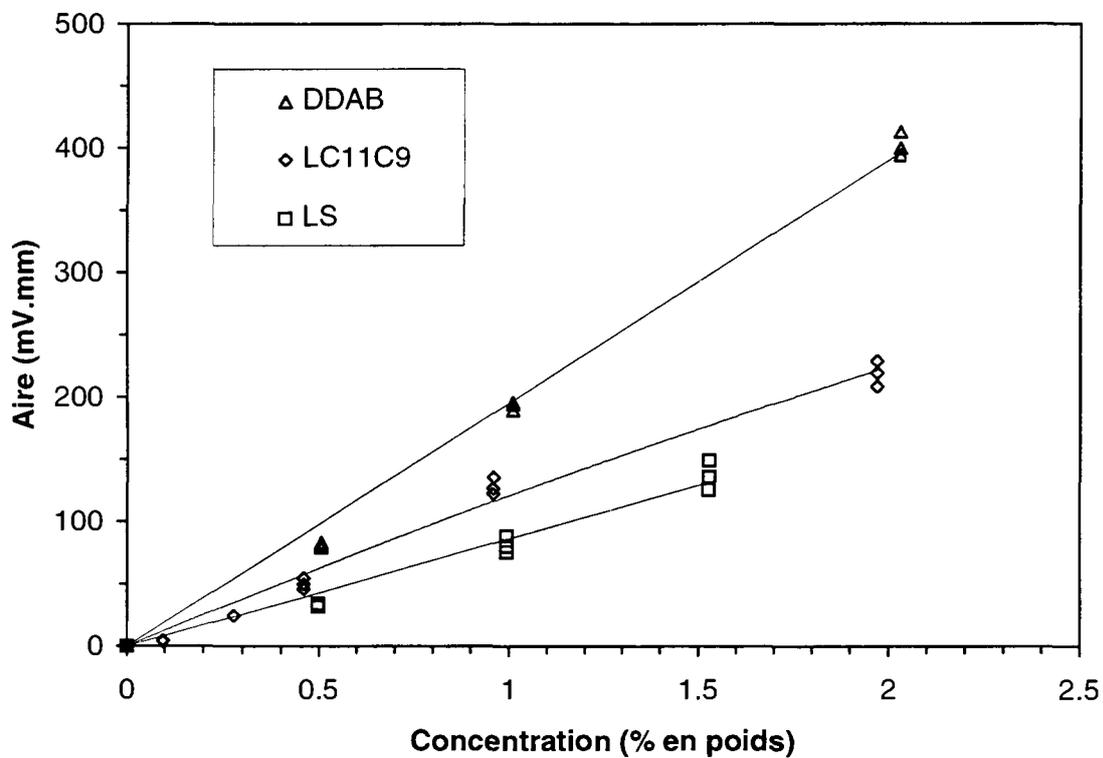


Figure 1 : Courbes de calibration sur le Iatroscan pour les trois molécules DDAB, LC₁₁C₉ et LS. Les poudres sont dissoutes dans un mélange équimoléculaire MeOH:CHCl₃ et l'éluant est un mélange 30:60:2.5:2 de MeOH:CHCl₃:H₂O:NH₄⁺aq.

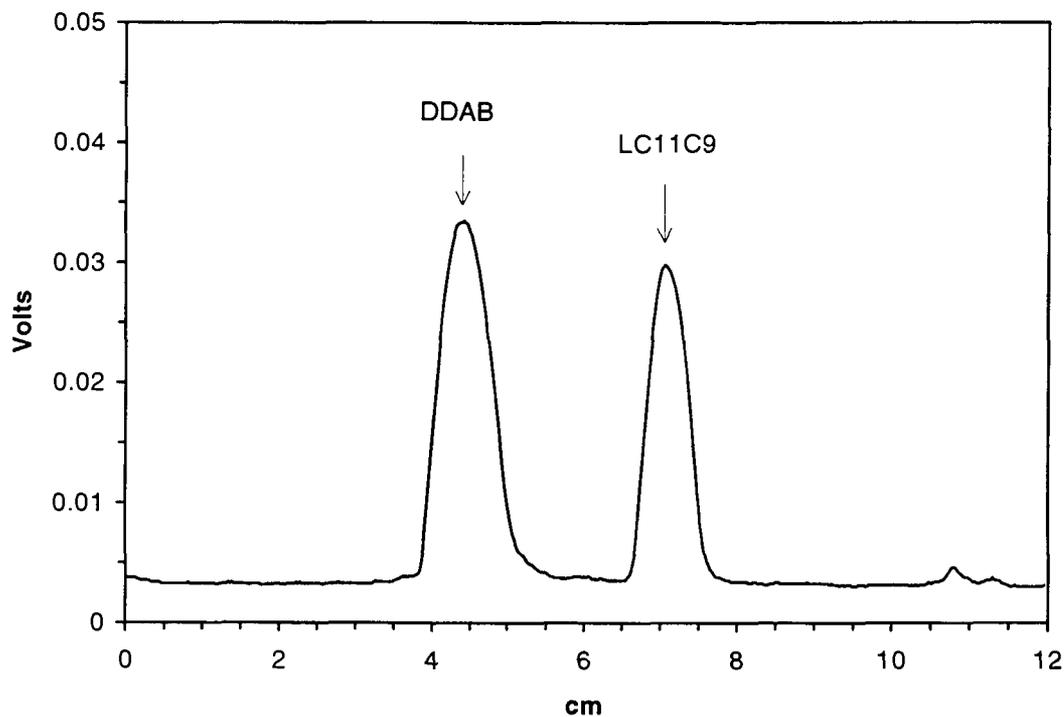


Figure 2 : Chromatogramme d'un échantillon de DDAB+LC₁₁C₉ préparé initialement à $x_{LC_{11}C_9}=0.33$.

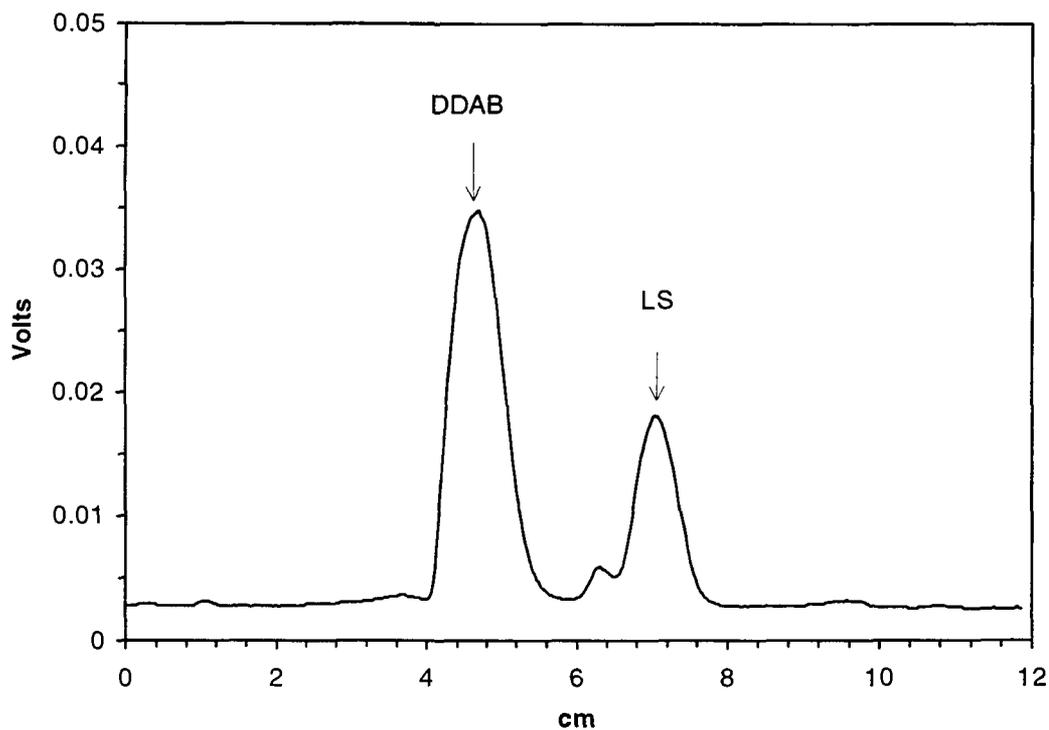


Figure 3 : Chromatogramme d'un échantillon de DDAB+LS (DDAB 2% + LS 2%, phase supérieure). Le petit pré-pic correspond certainement au 6-O Lauroylsaccharose qui se forme au bout d'un certain temps à partir du 2-O Lauroylsaccharose, surtout dans le méthanol.

Résumé :

Le problème général traité dans ce travail est la caractérisation de l'effet spécifique de têtes polaires sucres dépassant à la surface d'une bicouche. Nous avons ainsi étudié l'ajout d'oligosaccharides et de glycolipides dans les phases lamellaires du tensioactif cationique DDAB (bromure de didodécyl diméthyl ammonium). Deux étapes ont été suivies : la détermination des prismes de phases et l'interprétation thermodynamique en termes d'interactions moléculaires.

Pour caractériser ces systèmes nous avons mis au point deux méthodes expérimentales originales de diffusion de rayonnements aux petits angles :

- une méthode par variation de contraste en diffusion de neutrons, qui permet d'étudier l'adsorption de solutés dans des bicouches.

- une méthode en gradient de concentration en capillaire pour établir directement et quantitativement les diagrammes de phases de systèmes ternaires par diffusion de rayons X.

Nous avons observé que les oligosaccharides, c'est-à-dire les têtes polaires sucres libres en solution, induisent sur l'équilibre lamellaire-lamellaire du DDAB une force attractive de déplétion lorsqu'ils sont exclus de la phase la plus concentrée.

Pour les deux glycolipides étudiés, 2-O lauroylsaccharose et N-lauroyl N-nonyl lactitol, nous avons établi les diagrammes de phases ternaires eau/DDAB/glycolipide en fonction de la température. Nous avons mis en évidence des points critiques à température ambiante.

Nous avons mesuré la pression osmotique dans les phases lamellaires concentrées. Nous avons observé que les glycolipides augmentent la répulsion d'hydratation à courte distance, et que la répulsion électrostatique est dominante et inchangée à grande distance tant qu'il reste au moins 1% en moles de tensioactif ionique. Enfin, nous avons calculé une énergie d'adhésion liée aux têtes polaires carbohydratées près de 8 fois plus grande que celle du DDAB, à distance égale des parties apolaires.

En régime dilué, nous avons observé que les glycolipides diminuent le gonflement maximum des phases lamellaires, avec une compétition pour l'eau entre la phase lamellaire et la phase diluée de vésicules ou de micelles suivant le cas.

Mots-clés : glycolipides, phases lamellaires, démixtion lamellaire-lamellaire, pression osmotique, interactions moléculaires, adhésion, diffusion de rayons X aux petits angles, diffusion de neutrons aux petits angles