



HAL
open science

Films et bulles de protéines solubles : structure, interactions et perméabilité au gaz

Caroline Sultanem

► **To cite this version:**

Caroline Sultanem. Films et bulles de protéines solubles : structure, interactions et perméabilité au gaz. Matière Condensée [cond-mat]. Université Paris Sud - Paris XI, 2004. Français. NNT : . tel-00008960

HAL Id: tel-00008960

<https://theses.hal.science/tel-00008960>

Submitted on 6 Apr 2005

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

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

N° D'ORDRE : 7777

Université Paris XI
UFR scientifique d'Orsay

Thèse

présentée par

Caroline SULTANEM

pour obtenir le grade de

Docteur de l'université Paris XI Orsay

Spécialité : **Matière Condensée**

**FILMS ET BULLES DE PROTÉINES SOLUBLES :
STRUCTURE, INTERACTIONS
ET PERMÉABILITÉ AU GAZ**

Soutenue le 15 Décembre 2004

devant la commission d'examen composée de :

M J.-J. BENATTAR	Directeur de thèse
Mme J. ETRILLARD	Rapporteur
M F. LEAL-CALDERON	Rapporteur
M P. PERRIN	Examineur
M J. PROST	Président
M H. VAN DAMME	Examineur

Thèse préparée au CEA-Saclay
au sein du Service de Physique de l'Etat Condensé

Remerciements

Je remercie Jean-Jacques Benattar d'avoir encadré mes recherches durant ces trois années de thèse. Par son souci de valorisation, il m'a aidé à éclairer mes résultats scientifiques sous un meilleur jour.

Je suis très reconnaissante à Janine Etrillard et Fernando Leal-Calderon d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. J'ai été sensible à la rigueur et à la minutie dont ils ont fait preuve au cours de leur lecture. Jacques Prost m'a fait l'honneur de présider mon jury, tandis que Patrick Perrin et Henri Van Damme ont accepté d'y participer. Je les remercie tous de la pertinence de leurs remarques et de l'intérêt qu'ils ont porté à ma thèse.

Ce travail a été réalisé au Service de Physique de l'Etat Condensé du CEA Saclay. C'est un service très hétéroclite compte tenu de la diversité des thématiques qui y sont abordées. Je suis ravie des contacts que j'ai pu y nouer tout au long de ma thèse. Je remercie en particulier Jacques Hammann et Eric Vincent, son successeur à la direction du SPEC, de m'y avoir accueilli. D'un point de vue universitaire, j'étais rattachée à de l'Ecole Doctorale de Physico-Chimie du Sud de Paris. Je remercie sincèrement son directeur, Jacques Delaire, qui m'a soutenu à différents moments de mon parcours universitaire, et notamment au cours de ma thèse.

Je tiens également à remercier chaleureusement Michael Nedyalkov, chercheur bulgare qui fréquente assidûment le SPEC. Sa gentillesse et son humour bien caractéristique ont largement contribué à rendre mon séjour au CEA agréable. Scientifique méticuleux et expérimentateur bricoleur, il m'a livré une grande partie des secrets de la physico-chimie des films noirs. Il a été un interlocuteur privilégié et un soutien moral irremplaçable. J'ai également une pensée tout particulière pour Svetlana Bratskaya dont le post-doc dans notre groupe a été le début d'une grande amitié. J'exprime à tous les deux ma profonde reconnaissance.

Je n'oublie pas Delphine Bellegarde et Julien Paris, étudiants ingénieurs en alternance, dont la présence a insufflé au laboratoire un peu de fraîcheur et de bonne humeur. Je remercie en particulier Julien pour sa participation à la réalisation des expériences de mousse. Son goût immodéré pour le vélo et la freebox en font un personnage d'autant plus sympathique! Je pense également à Carla Liz, qui a commencé sa thèse en même que moi, et dont la vivacité et l'énergie ne se sont jamais démenties.

La partie de cette thèse consacrée à l'étude de l'activité de surface des cyclodextrines amphiphiles est le fruit d'une collaboration avec Stéphane Moutard, chimiste doctorant au Service de Chimie Moléculaire du CEA Saclay, Bruno Perly de ce même service et Florence Djedaïni-Pilard, directrice du laboratoire des Glucides de l'Université d'Amiens. Je les remercie de leur enthousiasme et de leur disponibilité. Lorsque les films de protéines étaient capricieux, me plonger dans le monde des cyclodextrines fut salvateur! Travailler avec eux fut un réel plaisir.

Par ailleurs, je remercie chaleureusement Michel Juignet, Jean-Claude Tack, Vincent Padilla, Pascal Senat et Philippe Forget pour leur aide spontanée lors de mes passages à l'atelier. Sans eux, ce travail n'aurait pas été possible. Jean-Claude, en particulier, a fait preuve d'une grande patience et d'une conscience professionnelle rare pour usiner les diverses pièces qui manquaient à mes manip. Je lui en suis sincèrement reconnaissante. Je remercie également Pierre Janvier, toujours serviable, lors de mes raids au magasin ! A un autre niveau, le soutien logistique de Sandrine Thunin et Nathalie Royer fut très appréciable pour me démêler des contraintes administratives du CEA.

Enfin, j'adresse ma plus grande sympathie à tous les permanents et étudiants du SPEC avec qui j'ai régulièrement déjeuné. Leur gaieté et leur humour ont égayé mes parfois trop longues journées de manip et de rédaction ! Corinne, Patrick, Caroline, Charly, Carolina, Hughes, Dinah, Nick, Robert, Patrice. . . La liste n'est pas exhaustive ! Je remercie en particulier Jacques Jestin sans qui je n'aurais pas eu l'opportunité d'enseigner à l'IUT de Créteil, ainsi qu'Antonio Checco pour ses conseils en informatique (Image tool) et son agréable compagnie.

Et pour finir, un très grand merci à mes parents qui m'ont apporté un soutien sans faille par leur présence attentive et leur affection. J'envoie mes plus tendres pensées à Stéphane, toujours à mes côtés, qui a partagé au plus près les hauts et les bas de cette période de thèse. Son écoute et son soutien, tant moral que logistique, ont été des plus précieux.

Table des matières

1	Avant-propos	1
2	Les protéines : généralités et activité de surface	3
2.1	Structure générale des protéines	3
2.2	Propriétés interfaciales des couches de protéines adsorbées	6
2.2.1	Cinétique d'adsorption des protéines	6
2.2.2	Equation d'état $\Pi(\Gamma)$ à l'interface air/solution	7
2.2.3	Irréversibilité de l'adsorption des protéines	8
2.2.4	Dénaturation des protéines aux interfaces	9
2.2.5	Propriétés rhéologiques et structure gélifiée	10
2.3	Les protagonistes de cette thèse	11
3	Stabilité et structure d'un film noir de protéines	17
3.1	Les films noirs : un système modèle...	17
3.1.1	Préambule : irisation des films de savon	17
3.1.2	Métastabilité	19
3.1.3	Équilibre thermodynamique d'un film mince	20
3.1.4	Film noir commun et film noir de Newton	21
3.1.5	Spécificité de la structure des films noirs de Newton	23
3.1.6	Interactions et applications	25
3.2	Technique de réflectivité des rayons X	26
3.2.1	Indice de réfraction de la matière pour les rayons X	28
3.2.2	Approximation de Born	29
3.2.3	Formalisme matriciel de l'optique	30
3.2.4	Rugosité interfaciale	33
3.2.5	Dispositif expérimental	35
3.3	Stabilité et structure de films noirs de protéines	38
3.3.1	Influence du pH sur la stabilité des films	38
3.3.2	Influence de la concentration en protéines sur les propriétés des films au pH_i	40
3.3.3	Influence de la concentration en électrolyte sur les propriétés des films au pH_i	42
3.3.4	Drainage d'un film de protéines	43
3.3.5	Structure d'un film de Newton de protéines	44

3.3.6	Conclusion	49
4	Perméabilité à l'air des films minces de protéines	54
4.1	Technique expérimentale de mesure	54
4.1.1	Dispositif expérimental	54
4.1.2	Description théorique: le modèle diffusif	55
4.1.3	Limites de la technique	58
4.2	Perméabilités comparées des films noirs	59
4.2.1	Expression de la perméabilité du film en fonction de celle des monocouches adsorbées	60
4.2.2	Perméabilité des films communs	62
4.2.3	Perméabilité des films de Newton	62
4.3	Perméabilité de la paroi d'une bulle de protéines	66
4.3.1	Méthode expérimentale	67
4.3.2	Description théorique	67
4.3.3	Résultats expérimentaux	68
4.4	Perméabilité des films de protéines	70
4.4.1	Extension du modèle diffusif	70
4.4.2	Description des films microscopiques de protéines	70
4.4.3	Les films de protéines: films communs ou films de Newton?	72
4.4.4	Résultats expérimentaux	72
4.4.5	Influence de la rhéologie des couches de protéines adsorbées sur la vitesse de décroissance des bulles	74
4.4.6	Optimisation du modèle utilisé pour le calcul de la perméabilité	77
4.4.7	Structure d'un film de protéines « collapsé »	77
4.5	Conclusion	78
5	Angle de contact d'un film noir de protéines	83
5.1	L'angle de contact: un révélateur des interactions...	83
5.2	Les principales techniques de mesure	85
5.3	Hysteresis dynamique de l'angle de contact	88
5.3.1	Méthode expérimentale	88
5.3.2	Tension de ligne	89
5.3.3	Application au cas des films de protéines: observation d'un phénomène d'hystérésis	90
5.4	Une nouvelle méthode...	93
5.4.1	Préliminaire	93
5.4.2	Principe	95
5.4.3	Dispositif expérimental	98
5.4.4	Résultats	99
5.4.5	Conclusion	101

6	Vers l'étude des mousses de protéines	105
6.1	Généralités	105
6.1.1	Métastabilité des mousses	105
6.1.2	Phénomènes responsables de la destruction des mousses	106
6.1.3	Cas particulier des mousses de protéines	110
6.2	Dispositif expérimental pour l'étude des mousses	111
6.3	Résultats expérimentaux	114
6.3.1	Protocole expérimental	114
6.3.2	Influence des conditions de formation de la mousse sur sa stabilité	116
6.3.3	Influence de la composition de la solution sur la stabilité des mousses	118
6.3.4	Drainage des mousses de protéines	121
6.3.5	Comparaison de la stabilité des mousses obtenues à partir de différentes protéines	125
6.4	Digression : de l'utilisation du perfluorohexane	128
6.4.1	Protocole et résultats expérimentaux	128
6.4.2	Influence du perfluorohexane gazeux sur la tension de surface d'une solution de protéines	130
6.5	Conclusion	132
7	Films noirs de cyclodextrines amphiphiles	136
7.1	Les cyclodextrines amphiphiles : présentation générale	136
7.1.1	Propriétés structurales des cyclodextrines	136
7.1.2	Fonctionnalisation des cyclodextrines	137
7.1.3	Les phospholipidyl-cyclodextrines	138
7.2	Etude des films noirs de phospholipidyl-cyclodextrines	140
7.2.1	Préambule	140
7.2.2	Comment favoriser la formation d'un film noir de Newton?	141
7.2.3	Description de la structure moléculaire des films	143
7.2.4	Influence du degré de méthylation des cyclodextrines sur l'hydratation des films	146
7.2.5	Films noirs communs ou films noirs de Newton?	147
7.2.6	Déshydratation des films par irradiation I.R.	148
7.2.7	Changement d'hydratation des films en présence de complexes d'inclusion	150
7.2.8	Perméabilité à l'air des films noirs de phospholipidyl-cyclodextrines	153
7.2.9	Conclusion	154
8	Conclusion	158
A	Aire d'une calotte sphérique	160
B	Description thermodynamique d'un film mince	162
C	Angle de contact d'une bulle légèrement déformée par la gravité	166

Chapitre 1

Avant-propos

La plupart des études concernant les films liquides se sont développées parallèlement aux théories sur la stabilité des dispersions colloïdales. De fait, les interactions qui gouvernent la structure de ces films minces sont analogues à celles mises en jeu dans les systèmes colloïdaux, où le rôle des interfaces est primordial. Sous leur forme la plus simple, les films liquides correspondent à des bicouches de tensioactifs dont on peut ajuster l'épaisseur en modulant les répulsions électrostatiques entre les parois. Toutefois, les films peuvent revêtir des formes plus complexes, associées à la nature chimique des tensioactifs impliqués dans leur structure et aux interactions tensioactif-tensioactif qui s'y développe. Le terme « tensioactif » lui-même s'applique à une panoplie de molécules extrêmement diversifiée, capables d'abaisser la tension superficielle. Il s'agit dans le cas le plus basique de petites molécules constituées d'une tête polaire et d'une chaîne aliphatique, et dans le cas le plus complexe, de macromolécules synthétiques ou biologiques comme les protéines.

D'un point de vue pratique, les molécules tensioactives intéressent des secteurs de l'industrie très variés comme l'extraction du pétrole, les détergents, l'agroalimentaire (mousses et émulsions), la cosmétique et la pharmacologie (encapsulation de principes actifs). Par ailleurs, dans le domaine du vivant, la matrice des membranes cellulaires est composée d'un type de tensioactifs particuliers appelés phospholipides. Dans ce contexte, les films minces apparaissent comme des systèmes modèles pertinents pour caractériser l'activité de surface de nombreux tensioactifs et répondre à des problèmes interfaciaux très divers. Les récents travaux réalisés dans notre laboratoire illustrent tout à fait ce point. Ils concernent l'étude de films de polyélectrolytes couplée à celle des émulsions correspondantes, mais aussi l'hydratation des films de phospholipides ou l'étude des interactions protéines/tensioactifs par le biais de films mixtes.

Dans le cadre de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés à une nouvelle architecture moléculaire, celle des films stabilisés par des protéines solubles. Il est vrai que les propriétés interfaciales des protéines sont déjà abondamment étudiées du fait de l'omniprésence des protéines dans l'industrie agroalimentaire. Ces travaux, parfois empiriques, concernent majoritairement la structure et la rhéologie des couches adsorbées à diverses interfaces, ou la stabilité globale des mousses et des émulsions. Cependant, les études concernant les films de protéines à proprement parlés sont rares. Ils permettent pourtant de modéliser les interactions qui existent entre particules dispersées (les bulles dans le cas d'une mousse) et finalement d'interpréter la stabilité des

dispersions. Ici, nous avons adopté une approche basée sur plusieurs techniques afin de déterminer la structure moléculaire des films de protéines, quantifier les interactions qui y prennent part et discuter de leur perméabilité au gaz. Dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à d'autres films complexes, constitués uniquement de cyclodextrines amphiphiles. Au cours de cette étude, nous avons mis l'accent sur le rôle-clef de l'hydratation des cyclodextrines dans la structure de ces films.

Le plan de ce manuscrit se divise en six grandes parties :

- tout d'abord, nous présentons brièvement les caractéristiques des couches de protéines adsorbées à l'interface air/solution, ainsi que les modèles théoriques utilisés dans la littérature pour décrire cette adsorption (chapitre 2);
- puis, nous faisons le point sur l'état actuel des connaissances relatives aux films noirs et sur les motifs de leur étude. La suite de cette partie est consacrée à la présentation de la réflectivité des rayons X, technique très performante pour déterminer la structure fine des films noirs. Nous l'utiliserons ensuite pour étudier l'organisation moléculaire des films noirs de protéines. Ainsi, nous mettrons en évidence comment les propriétés des couches de protéines adsorbées à l'interface air/solution conditionnent la stabilité et la structure des films résultants (chapitre 3);
- dans la partie suivante, nous nous intéressons au « mûrissement d'Ostwald »,¹ l'un des phénomènes responsables de la déstabilisation des mousses. Ce phénomène est le résultat de la diffusion de l'air des petites bulles vers les plus grosses à travers le film qui les sépare. Nous le caractériserons à l'échelle d'une bulle individuelle en étudiant comment les couches de protéines adsorbées s'opposent au transfert de l'air de l'intérieur de la bulle vers l'extérieur. Nous en déduirons le coefficient de perméabilité à l'air des couches d'adsorption. Nous insisterons particulièrement sur l'influence de la rhéologie des surfaces lors de la diminution de taille de la bulle (chapitre 4);
- ensuite, nous proposons une nouvelle technique pour mesurer l'énergie d'interaction entre les couches de protéines adsorbées dans les films noirs. A la lumière de ces résultats, nous verrons si l'énergie d'interaction des films est un paramètre pertinent pour expliciter leur perméabilité à l'air (chapitre 5);
- enfin, nous étudions la stabilité globale de mousses de protéines. Nous tenterons d'interpréter ces résultats au regard des propriétés des films et des bulles individuelles présentées tout au long des chapitres précédents (chapitre 6);
- dans un autre registre, nous exploitons la géométrie confinée des films noirs pour étudier l'hydratation des cyclodextrines (chapitre 7).

1. En toute rigueur, le terme de « mûrissement d'Ostwald » s'applique aux émulsions pour décrire la disparition des petites gouttes au profit des grosses. Un phénomène analogue se produit au niveau des bulles dans les mousses. Il est désigné en anglais sous le terme de « coarsening ». Malheureusement, il n'existe pas de traduction en français. A défaut, nous parlerons aussi de « mûrissement d'Ostwald » dans le cas des mousses.

Chapitre 2

Les protéines : présentation générale et activité de surface

2.1 Structure générale des protéines

Les protéines sont des polymères biologiques construits à partir de 20 acides aminés différents. Les acides aminés se divisent en trois familles : polaires non chargés, chargés et hydrophobes [Bra91]. Ils peuvent s'associer en un grand nombre de séquences différentes via des liaisons peptidiques (Figure 2.1) et former des domaines spécifiques, dont la structure tridimensionnelle détermine la fonction biologique de la protéine.

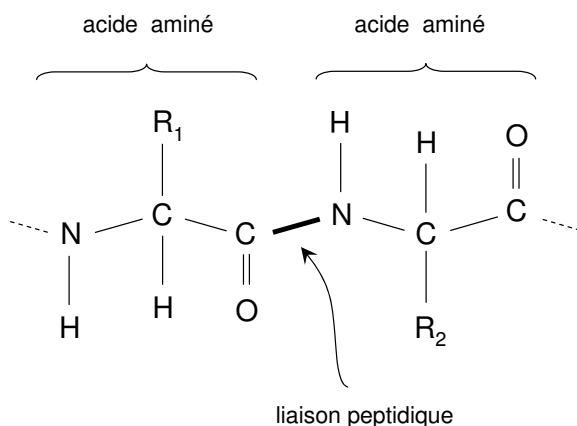


FIG. 2.1 – Les protéines sont constituées d'une succession d'acides aminés soudés les uns aux autres par des liaisons peptidiques. Les acides aminés (20 au total) diffèrent par la nature chimique du résidu, noté R sur le dessin.

On distingue traditionnellement quatre niveaux d'organisation dans les protéines :

- la structure primaire désigne la séquence des acides aminés le long de la chaîne principale,
- certaines régions de la séquence s'organisent localement en hélices α , en feuillets β ou en coudes β (Figure 2.2). Ce sont les motifs élémentaires qui caractérisent la structure secondaire de la protéine,
- la structure tertiaire décrit le repliement spatial de ces motifs, qui conduit généralement à

la formation de globules compacts en solution,

- quant à la structure quaternaire, elle indique si la protéine finale est composée de l'association (non covalente) de plusieurs chaînes peptidiques.

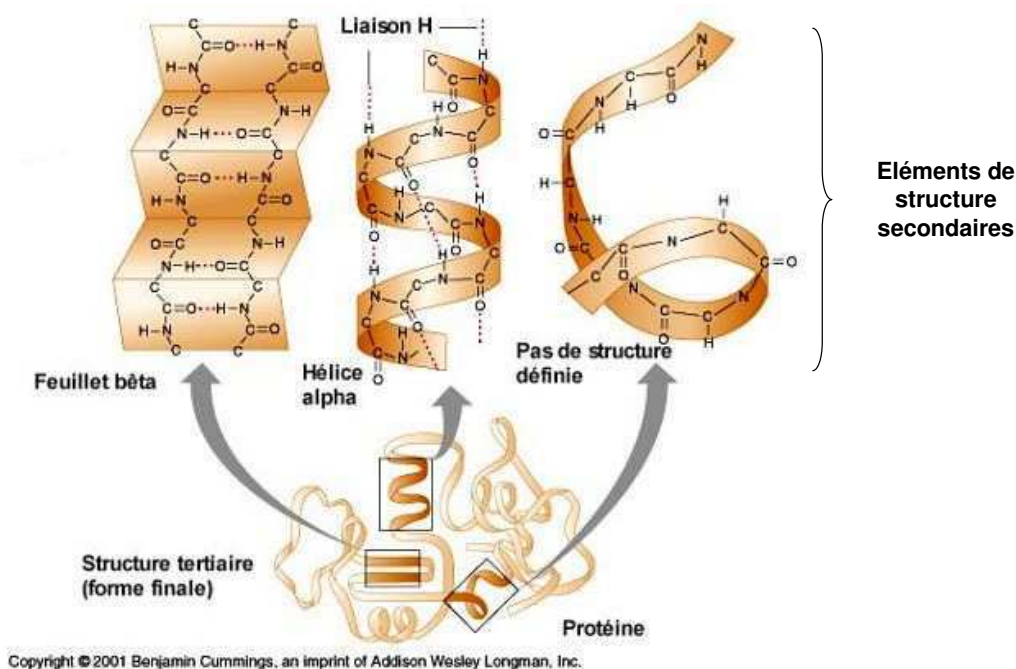


FIG. 2.2 – Représentation schématisée des différents motifs élémentaires qui forment la structure secondaire des protéines.

Ces éléments de structure sont stabilisés par des interactions de type électrostatique, Van der Waals, hydrophobe, par liaison hydrogène et parfois même par liaison covalente. Les interactions entre la protéine et son environnement jouent également un rôle prépondérant. Ces interactions sont brièvement présentées ci-dessous, à l'exception des deux premières (électrostatique et Van der Waals), qui n'ont rien de spécifique aux protéines.

Interaction hydrophobe L'intérieur des protéines solubles est plutôt hydrophobe tandis que leur surface est hydrophile. Il est couramment admis que les effets hydrophobes sont le principal moteur qui gouverne l'effondrement de la chaîne peptidique sur elle-même [Bra91]. Le repliement des protéines solubles dans l'eau permet donc de soustraire les acides aminés hydrophobes à tout contact avec le solvant. Cependant, seules les chaînes latérales de ces acides aminés sont effectivement hydrophobes. La chaîne principale, constituée uniquement de groupes N-H et C=O, est très polaire. Afin de minimiser le coût énergétique de son insertion dans un environnement hydrophobe, elle s'arrange en hélice α ou en feuillet β , structures dans lesquelles les groupes N-H et C=O se lient par liaisons hydrogène. C'est également la raison pour laquelle les segments des protéines transmembranaires insérés dans les bicouches lipidiques adoptent des conformations en hélice α ou en feuillet β (Figure 2.3).

Liaison hydrogène La structure en hélice α est maintenue par un ensemble régulier de

Interaction avec l'environnement L'hydratation des protéines solubles, tout comme l'interaction protéine transmembranaire/membrane sont des paramètres cruciaux pour comprendre leur structure et donc leur fonction. En effet, les protéines globulaires en solution sont entourées d'une coquille de molécules d'eau fortement liées, dont les propriétés sont très différentes de celles de l'eau liquide [Sve98]. Cette couche d'hydratation représente environ 0.3 g d'eau par gramme de protéine, ce qui correspond en moyenne à 2 molécules d'eau par acide aminé [Cre93]. Les interactions protéine/solvant, dont dépend la solubilité de la protéine, sont essentiellement déterminées par les acides aminés hydrophiles qui tapissent la surface du globule.

La structure tridimensionnelle des protéines résulte donc d'un grand nombre d'interactions simultanées qui se développent entre différentes parties de la molécule et avec son environnement. Aujourd'hui encore, prévoir la conformation native d'une protéine dans un environnement donné à partir de sa séquence d'acides aminés reste un défi majeur en biologie moléculaire. De nombreuses interrogations subsistent quant à la nature des mécanismes qui contrôlent le repliement des protéines. L'hypothèse d'un contrôle purement thermodynamique suppose que l'état natif des protéines correspond à la conformation de plus basse énergie. Cependant, Levinthal a montré qu'il était impossible qu'une chaîne dépliée cherche de manière aléatoire la conformation la plus favorable énergétiquement à travers l'espace de toutes les conformations possibles [Lev68]. Cela nécessiterait en effet un temps gigantesque non compatible avec les temps de repliement mesurés expérimentalement. Il semble donc que l'hypothèse d'un contrôle mixte, thermodynamique et cinétique, soit plus conforme à la réalité [Cam93].

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes exclusivement intéressés à la structure et aux propriétés de films minces stabilisés par des protéines solubles. En effet, les protéines présentent un caractère amphiphile marqué qui les rend très actives aux interfaces. Connaître la structure de ces couches adsorbées est fondamental pour mieux contrôler la formation et la stabilité des mousses et des émulsions dans lesquelles les protéines sont impliquées.

2.2 Propriétés interfaciales des couches de protéines adsorbées

2.2.1 Cinétique d'adsorption des protéines

Du fait de leur amphiphilie, les protéines s'adsorbent spontanément aux interfaces. Pour des temps très courts (quelques dizaines de secondes), le processus d'adsorption est purement diffusif. La concentration surfacique de protéines (Γ) obéit à la loi suivante, proposée par Langmuir [Mac63a] [Ybe98a]:

$$\Gamma(t) = 2c_0 \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad (2.1)$$

où c_0 est la concentration de protéines en solution et D leur coefficient de diffusion.

Pour des temps plus longs, les protéines doivent franchir une barrière d'énergie avant de pouvoir s'ancrer sur la surface [Mac63b]. Cette barrière est induite par la présence des molécules déjà adsorbées dans la couche. Ainsi, le taux d'adsorption des protéines $\frac{d\Gamma}{dt}$ diminue lorsque la pression de surface augmente. En négligeant le phénomène de désorption, on peut exprimer $\frac{d\Gamma}{dt}$ à partir

de l'équation de Boltzmann suivante¹ :

$$\frac{d\Gamma}{dt} = Z \exp\left(-\frac{\Pi\Delta A}{kT}\right) \quad \text{avec} \quad Z = k_1 c_0 \quad (2.2)$$

où Z représente le nombre de protéines qui entre en collision avec la surface par unité de temps et k_1 une constante cinétique du premier ordre. $\Pi\Delta A$ correspond au travail que doit fournir une protéine pour s'adsorber sur une surface de pression Π . En effet, elle doit compresser les molécules déjà présentes afin de dégager la surface minimum ΔA dont elle a besoin pour s'adsorber. Dans le cas de polyélectrolytes comme les protéines, l'adsorption est également limitée par la présence d'une barrière électrostatique à la surface [Mac63c]. Cette contribution électrique conduit à une diminution de la concentration effective en protéines aux abords de la surface et donc à une diminution du nombre de collisions (Z). On peut en tenir compte dans l'équation (2.2) en modifiant l'expression de Z :

$$Z = k_1 c_0 \exp\left(-\frac{Q\xi}{kT}\right) \quad (2.3)$$

où ξ est le potentiel zêta de la surface et Q la charge des protéines en solution.

Narsimhan *et al* ont ainsi modélisé l'adsorption des protéines comme un processus de diffusion dans un champ de potentiels [Nar92]. Leur modèle, assez élaboré, intègre les barrières liées à la pression de surface et à la charge électrique évoquées ci-dessus. Il prend également en compte la taille et la forme des protéines, ainsi que l'hydrophobicité de leur surface. De cette manière, leurs prédictions sont en accord avec les courbes expérimentales $\Gamma(t)$ obtenues pour diverses protéines à l'interface air/solution.

2.2.2 Equation d'état $\Pi(\Gamma)$ à l'interface air/solution

La plupart des travaux concernant la cinétique d'adsorption des protéines proposent une mesure simultanée de la concentration de surface $\Gamma(t)$ et de la pression de surface $\Pi(t)$ correspondante [Gra79a] [Cor99] [Gur03]. La concentration de surface est déterminée par ellipsométrie ou par des méthodes de traçage radioactif, tandis que la pression de surface est directement mesurée par la méthode de Wilhelmy. L'équation d'état $\Pi(\Gamma)$ est ensuite déduite de ces expériences. De manière générale, Π et Γ augmentent très rapidement au début de l'adsorption. Cette augmentation est d'autant plus forte que la concentration de protéines en solution est importante.² Plusieurs modèles ont été proposés pour rendre compte de l'état des couches de protéines adsorbées à l'interface air/solution :

- le modèle le plus simple assimile les couches d'adsorption à un gaz idéal à deux dimensions.

1. Cette équation a été initialement proposée par Ward et Tordai (1952) pour décrire l'adsorption d'acides gras à l'interface hexane/eau. Elle a ensuite été appliquée à de nombreux systèmes, comme les polyélectrolytes.

2. On observe parfois une phase d'induction durant laquelle la pression de surface est nulle alors que la concentration de surface atteint des valeurs assez élevées ($\sim 1 \text{ mg/m}^2$). Ce phénomène a été observé pour la BSA [Ybe98a] et la β -lactoglobuline [Cor99] [Gur03] lorsque la concentration de protéines en solution était faible (10^{-3} mg/mL). Dans ces conditions, la couche de protéines adsorbées, très diluée pendant la phase d'induction, se comporte comme un gaz idéal à deux dimensions. C'est l'absence d'interactions entre les protéines qui expliquerait que la pression de surface reste quasi-nulle au début de l'adsorption.

Les protéines adsorbées obéissent alors à l'équation d'état suivante :

$$\Pi = k_B T \Gamma \quad (2.4)$$

Cette équation est très restrictive puisqu'elle suppose que les protéines adsorbées n'interagissent pas entre-elles. Elle ne s'applique donc que dans des régimes dilués,

- pour des concentrations de surface plus hautes, l'équation de Volmer semble décrire convenablement l'état des monocouches de protéines globulaires [Dou99] [Gur03] :

$$\Pi = \frac{k_B T \Gamma}{(1 - w\Gamma)} \quad (2.5)$$

où w représente l'aire moyenne occupée par une protéine adsorbée. Cette équation décrit les couches d'adsorption comme une solution 2D. Dans ce modèle, les protéines sont assimilées à des disques durs qui interagissent entre eux uniquement via des forces à courte portée. On peut remarquer que pour $w\Gamma \ll 1$, on retrouve l'équation du gaz idéal,

- il existe un autre modèle, basé sur l'idée que les protéines adsorbées se comportent comme des polymères multiblocs en régime semi-dilué [Dou99]. L'équation d'état correspondante est alors déduite d'une approche de type loi d'échelle :

$$\Pi \sim k_B T \Gamma^y \quad (2.6)$$

Ce modèle est particulièrement pertinent pour décrire les couches adsorbées de β -caséine [Agu99]. En effet, cette protéine possède une structure désordonnée, très distincte des structures compactes des protéines globulaires. En première approximation, la β -caséine est souvent assimilée à un polyélectrolyte linéaire et flexible [Lee96],

- enfin, Fainerman *et al* ont proposé un autre modèle, valable dans des régimes très concentrés, qui prend en compte le phénomène d'agrégation des protéines en surface [Fai99].

2.2.3 Irréversibilité de l'adsorption des protéines

Une des caractéristiques du comportement interfacial des protéines réside dans l'irréversibilité de leur adsorption [Mac98]. Malgré leur grande solubilité dans l'eau, les protéines sont très difficiles à désorber de l'interface air/solution [Gra79b]. On se propose d'illustrer ce point à travers deux exemples de la littérature :

- Graham *et al* ont déterminé les paramètres à l'équilibre (Γ_{eq} et Π_{eq}) de diverses couches de protéines à l'interface air/solution. Ils ont ensuite cherché à déplacer cet équilibre en remplaçant progressivement la solution de protéines par de l'eau. Ils ont observé que la pression de surface ne variait pas malgré la déplétion. Les protéines responsables de l'activité de surface de la solution sont donc irréversiblement adsorbées.³

3. Toutefois, ces expériences montrent que la concentration de surface diminue sous l'effet de la déplétion. Cette diminution correspond à la désorption des protéines situées dans les sous-couches de l'interface (sous la couche primaire directement adsorbée au contact de l'air). La présence de ces protéines a peu d'incidence sur la tension de surface de la solution.

– Ybert *et al* ont étudié la vitesse d’ascension d’une bulle d’air ($R \sim 400\mu\text{m}$) dans une solution de protéines [Ybe98b]. Leurs résultats montrent que la vitesse de la bulle diminue au fur et à mesure que les protéines s’adsorbent à sa surface. En effet, la bulle s’enveloppe d’un manteau de protéines qui lui confère des propriétés hydrodynamiques proches de celle d’une sphère rigide. Ils ont ensuite considéré la vitesse d’ascension d’une bulle, déjà recouverte de protéines, dans une colonne d’eau pure [Ybe00]. D’après leurs mesures, la vitesse reste constante. Ce résultat indique que la structure de la paroi de la bulle ne varie pas. Les protéines sont donc adsorbées de manière irréversible.

A l’inverse, la vitesse d’une bulle recouverte de dodécyl sulfate de sodium (SDS) augmente au cours de sa montée le long d’une colonne d’eau pure. Cette accélération traduit la désorption des molécules de SDS et donc une modification des propriétés hydrodynamiques de la bulle.

On peut donc conclure que les protéines sont des tensioactifs singuliers. Contrairement aux tensioactifs classiques, constitués d’une tête polaire et d’une queue hydrophobe (SDS), les protéines s’adsorbent de manière irréversible. Ceci est probablement lié au fait qu’elles sont attachées à la surface en plusieurs points. De plus, les protéines adsorbées interagissent fortement avec leurs voisines ; elles tendent à former un réseau dont il est difficile de les extraire.

2.2.4 Dénaturation des protéines aux interfaces

Que devient la structure des protéines une fois adsorbées ? Cette question est aujourd’hui encore sujet à débat. S’il est communément admis que les protéines subissent des réarrangements moléculaires aux interfaces [Gra79a], l’amplitude de ces réarrangements n’est pas encore bien connue. Elle dépend d’une part de l’interface considérée (eau/air, eau/huile, eau/surface solide, etc.), mais également de la nature des protéines en question. A l’interface air/solution, les protéines adsorbées cherchent à exhiber à l’air leurs groupements hydrophobes. Néanmoins, elles sont limitées dans leur capacité de réorganisation par la flexibilité de leur structure (le nombre de ponts disulfides que possède la protéine peut être un élément pertinent pour discuter de ce point.).

De manière générale, on peut retenir les deux points suivants :

- l’amplitude des réarrangement structurels subis par les protéines dépend de la concentration en molécules à l’interface [Gra79c] [Nor92]. Ainsi, les protéines se déplient davantage lorsque la concentration surfacique est faible. En revanche, les protéines impliquées dans des couches d’adsorption denses adoptent une structure compacte, proche de leur structure native en solution,
- les protéines globulaires ne se dénaturent que partiellement aux interfaces. Des expériences de spectroscopies I.R. ont montré qu’elles conservaient de nombreux éléments de leur structure en solution une fois adsorbées [Fan97] [Pos03]. Postel *et al* ont vérifié ceci à travers l’étude de couches de lysozyme adsorbées à l’interface air/solution. En présence d’un agent dénaturant en solution, ils ont observé que le profil de densité des couches d’adsorption obéissait à la loi d’échelle théorique prévue pour les polymères ($\sim z^{-\frac{4}{3}}$). Néanmoins, les profils d’adsorption associés à des solutions natives de lysozyme ne vérifient plus cette loi,

et leur structure ne correspond pas pour autant à celle d'une monocouche de protéines natives. Il semble donc que les protéines adsorbées subissent des réarrangements moléculaires au contact de l'air (hydrophobe); toutefois, l'amplitude de ces réarrangements est limitée par des interactions intramoléculaires suffisamment fortes qui empêchent la dénaturation complète des protéines.

2.2.5 Propriétés rhéologiques et structure gélifiée

Les protéines ont la particularité de former des couches viscoélastiques aux interfaces. Dans la littérature, on parle souvent de réseau interfacial, ou même d'une « peau » qui tapisse l'interface considérée [Pri98].

La spécificité des couches de protéines adsorbées a été mise en évidence à travers l'étude de leurs propriétés rhéologiques. Typiquement, on applique une déformation à l'interface étudiée et on observe ensuite les répercussions sur la tension de surface (σ) en fonction du temps. On distingue traditionnellement deux types de déformations [Bos01]: la dilatation et le cisaillement (Figure 2.5).

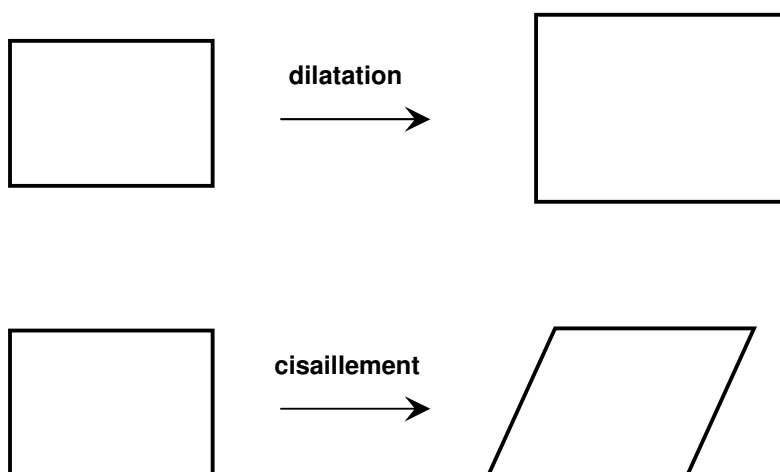


FIG. 2.5 – Exemples de déformations 2D qu'on applique aux interfaces pour caractériser les propriétés rhéologiques de leurs couches d'adsorption.

La réponse de l'interface dans chacune de ces situations est caractérisée par les paramètres suivants :

- le module élastique de dilatation ε défini par l'expression :

$$\varepsilon = \frac{d\sigma}{d \ln A} \quad (2.7)$$

où A correspond à l'aire de la surface considérée,

- le module élastique de cisaillement μ .

A chacun de ces modules, on associe un paramètre de viscosité (η) qui traduit le déphasage entre le moment où la déformation est appliquée et le moment où la structure de la surface change.

Les techniques utilisées pour déterminer ces paramètres sont multiples. En outre, la dynamique à laquelle les déformations sont appliquées ainsi que leur amplitude sont très variables d'une expérience à une autre [Bos01]. De manière générale, l'étude des propriétés rhéologiques des couches d'adsorption sert de base pour sonder indirectement la structure du réseau interfacial et les interactions entre les protéines. Les auteurs en tirent des informations pour discuter de la « rigidité » des couches d'adsorption, et éventuellement de la conformation des protéines adsorbées (*cf.* [Gra80a] [Gra80b] [Mel98] par exemple). A terme, le but est de parvenir à interpréter la stabilité globale des mousses de protéines en fonction de la nature du réseau présent à l'interface air/solution [Mar02]. En particulier, les expériences de rhéologie peuvent servir à optimiser les conditions de formation des mousses (vitesse de création de l'interface) [Mur02a] [Mur02b].

Du fait de la complexité de leur structure chimique, les protéines interagissent fortement les unes avec les autres via des liaisons très variées (liaisons hydrogène, électrostatiques, hydrophobes, etc.). Ainsi, les paramètres viscoélastiques de cisaillement et la viscosité dilatationnelle des couches de protéines sont très supérieures à ceux des couches de tensioactifs de petite taille (petites molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire et d'une chaîne hydrophobe) [Pri98] [Bos01]. C'est pourquoi, les couches de protéines adsorbées sont souvent assimilées à des gels physiques à deux dimensions [Pet00] [Ban03].

2.3 Les protagonistes de cette thèse

Dans ce paragraphe, nous présentons les principales caractéristiques des protéines que nous allons étudier tout au long de cette thèse (*cf.* tableau). Les échantillons d' α -lactalbumine et de β -lactoglobuline proviennent de la compagnie Davisco Foods International, et ceux de β -caséine de Nutriceps. Quant aux échantillons de BSA et de lysozyme, nous les avons acheté auprès de Sigma-Aldrich. Dans tous les cas, le degré de pureté en protéines est supérieur à 95 % (sur une base sèche). Le pourcentage restant correspond essentiellement à du matériel inorganique et occasionnellement à des impuretés grasses (1,8 % dans le cas de l' α -lactalbumine).

Protéines	α -la	β -lg	β -ca	BSA	lysozyme
Nb d'acides aminés	123	162	209	581	129
Poids moléculaire	14200	18300	24000	67000	14500
Structure tertiaire	globule	globule	pelote stat.	globule	globule
dimensions (nm)	3,7×3,2×2,5	3,58×3,58×3,58	-	4,16×4,16×14,09	3×3×4,5
Nb de ponts disulfides	4	2	0	17	4
pH _i	4,6	5,2	5	4,8	11,8

L' α -lactalbumine, la β -lactoglobuline et la β -caséine sont des protéines du lait. Les deux premières sont globulaires alors que la β -caséine possède une structure tridimensionnelle aléatoire. En effet, elle ne comporte pas de pont disulfide intramoléculaire. La flexibilité de sa conformation lui confère une grande activité de surface, puisqu'elle peut rapidement exhiber ses parties hydrophobes à l'air [Gra79b]. Sa chaîne est constituée d'une alternance de séquences hydrophiles

et hydrophobes. De ce fait, elle est souvent modélisée comme un copolymère multiblocs et la structure de ses couches d'adsorption peut être décrite à l'aide de la théorie classique des polymères [Agu99] [Har98]. Dans le lait, elle est impliquée dans la formation de gros agrégats mixtes qui permettent de piéger du matériel organique.

Nous avons également travaillé avec deux autres protéines globulaires, la BSA (Bovine Serum Albumin) et la lysozyme. La première se distingue par ses dimensions : sa chaîne peptidique est environ quatre fois plus longue que celles des autres protéines globulaires étudiées ici. Quant à la lysozyme, elle, est connue pour la stabilité de sa structure tridimensionnelle en solution [Nor92] ; elle se dénature à plus haute température que les autres protéines globulaires [Gra79a]. On peut s'en rendre compte sur la figure 2.6 qui compare la tension de surface des différentes solutions de protéines préparées au point isoélectrique.⁴ Au bout de 1/2 h, les tensions de surface ont toutes atteintes leur valeur à l'équilibre à l'exception de celle associée à la lysozyme. Très rigide, cette protéine réarrange lentement sa structure moléculaire à l'interface air/solution. En outre, sa tension de surface est la plus haute de toutes. Par conséquent, la lysozyme est la protéine qui possède l'activité de surface la plus pauvre pour des raisons intrinsèques à sa structure native.

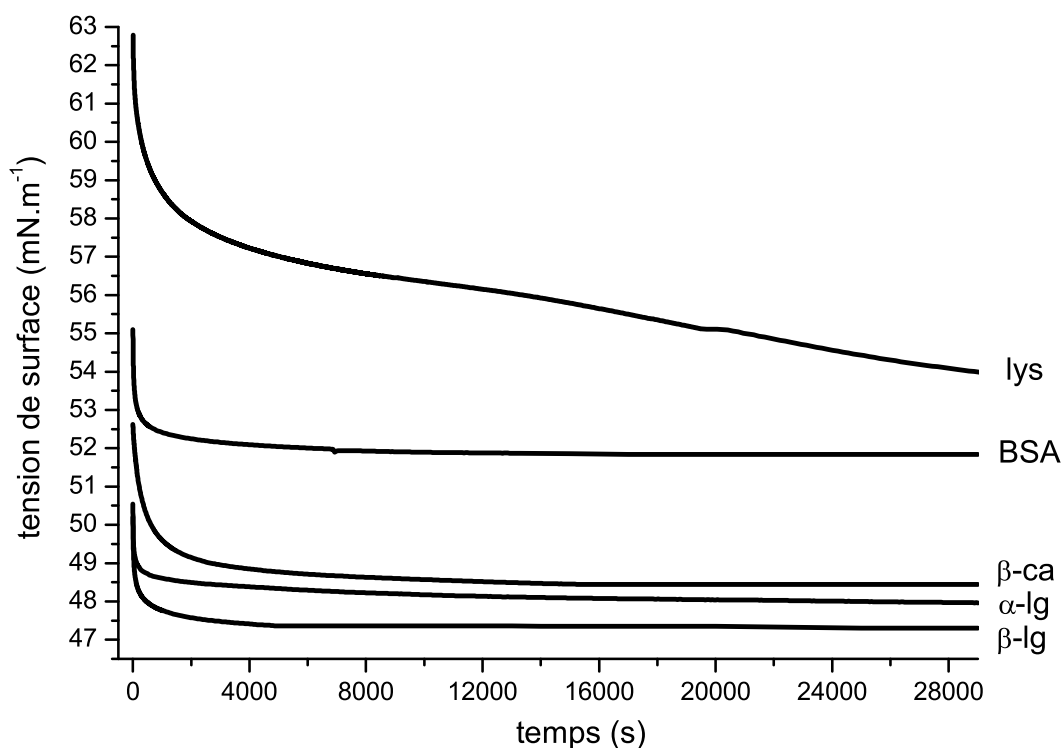


FIG. 2.6 – Isothermes de tension de surface (σ) des différentes protéines étudiées tout au long de ce travail. Les solutions ont été préparées au point isoélectrique en présence de 0,5 mg/mL de protéines. Les expériences ont été réalisées par la méthode de Wilhelmy à $T=24\pm 1^\circ\text{C}$. La précision des mesures est de l'ordre de $\pm 1\text{ mN/m}$.

4. Le principe de cette méthode consiste à mesurer la force F exercée par la surface de la solution sur une fine plaque de platine (dimension : l) via le ménisque qui les met en contact. L'angle de contact entre la solution et le platine étant proche de zéro, on a : $\sigma = \frac{F}{2l}$.

D'un point de vue rhéologique, les couches de β -caséine sont souvent qualifiées de flexibles, tandis que celles des protéines globulaires sont dites rigides [Gra80a] [Gra80b] [Bos01]. En d'autres termes, les couches de protéines globulaires possèdent une structure interne plus cohésive, ce qui se traduit par des coefficients viscoélastiques plus élevés. Parmi elles, les couches de lysozyme semblent être plus rigides que celles de BSA.

On dispose ainsi d'une série de protéines dont les caractéristiques en solution et aux interfaces sont assez diversifiées. Nous allons voir tout au long de ce travail comment ces différences se manifestent à travers l'étude des films minces stabilisés par chacune de ces protéines. A un autre niveau, nous comparerons régulièrement les propriétés des films de protéines à celles des films de SDS (sodium dodécyl sulphate). Ainsi, nous opposerons souvent le comportement interfacial des protéines à celui des tensioactifs dits de petite taille, dont le SDS sera le représentant (Figure 2.7).

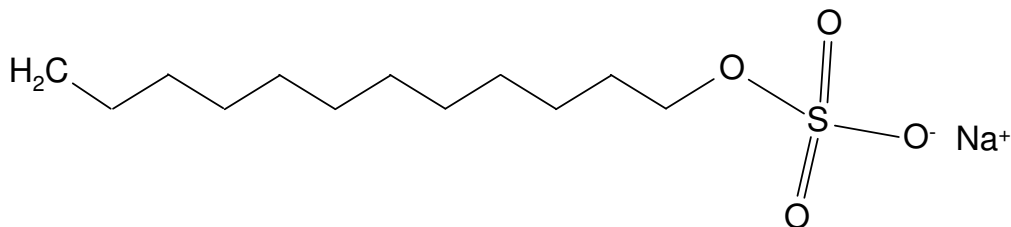


FIG. 2.7 – Formule chimique du sodium dodécyl sulphate (SDS). Ce composé est constitué d'une tête polaire chargée et d'une chaîne carbonée hydrophobe. Il possède une cinétique d'adsorption très rapide qu'on ne peut pas observer par la méthode de Wilhelmy. Expérimentalement, la tension de surface des solutions ($c_{SDS}=0,5$ mg/mL, $c_{NaCl}=0,32$ M) chute instantanément à $31,5$ mN/m à $T=24\pm 1^\circ$ C. Elle est donc beaucoup plus basse que celle des protéines, typiquement comprise entre 45 et 55 mN/m.

Bibliographie

- [Agu99] V. AGUIÉ-BÉGHIN, E. LECLERC, M. DAOUD, *Asymmetric Multiblock Copolymers at the Gas-Liquid Interface: Phase Diagram and Surface Pressure*, Journal of Colloid and Interface Science **214**, 143-155 (1999).
- [Ban03] G.B. BANTCHEV, D.K. SCHWARTZ, *Surface Shear Rheology of β -Casein Layers at the Air/Solution Interface: Formation of a Two-Dimensional Physical Gel*, Langmuir **19**, 2673-2682 (2003).
- [Bos01] M.A. BOS, T. VAN VLIET, *Interfacial Rheological Properties of Adsorbed Protein Layers and Surfactants: a Review*, Advances in Colloid and Interface Science **91**, 437-471 (2001).
- [Bra91] C. BRANDEN, J. TOOZE, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc.: New York (1991).
- [Cam93] C.J. CAMACHO, D. THIRUMALAI, *Kinetics and Thermodynamics of Folding in Model Proteins*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **90**, 6369-6372 (1993).
- [Cor99] M. CORNEC, D. CHO, G. NARSIMHAN, *Adsorption Dynamics of α -lactalbumin and β -lactoglobulin at Air/Water Interfaces*, Journal of Colloid and Interface Science **214**, 129-142 (1999).
- [Cre93] T.E. CREIGHTON, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, 2nd edition, W.H. Freeman and Company: New York (1993) p262.
- [Dou99] R. DOUILLARD, V. AGUIÉ-BÉGHIN, *Surface Pressure of Protein Adsorption Layers: Application to Molecular Mass and Molecular Area Measurements*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **149**, 285-290 (1999).
- [Fai99] V.B. FAINERMAN, R. MILLER, *Equation of State for Concentrated Protein Surface Layers at the Water/Air Interface*, Langmuir **15**, 1812-1816 (1999).
- [Fan97] Y. FANG, D.G. DALGLEISH, *Conformation of β -Lactoglobulin Studied by FTIR: Effect of pH, Temperature, and Adsorption to the Oil-Water Interface*, Journal of Colloid and Interface Science **196**, 292-298 (1997).
- [Gra79a] D.E. GRAHAM, M.C. PHILLIPS, *Proteins at Liquid Interfaces. I. Kinetics of Adsorption and Surface Denaturation*, Journal of Colloid and Interface Science **70**(3), 403-414 (1979).
- [Gra79b] D.E. GRAHAM, M.C. PHILLIPS, *Proteins at Liquid Interfaces. II. Adsorption Isotherms*, Journal of Colloid and Interface Science **70**(3), 415-426 (1979).
- [Gra79c] D.E. GRAHAM, M.C. PHILLIPS, *Proteins at Liquid Interfaces. III. Molecular Structures of Adsorbed Films*, Journal of Colloid and Interface Science **70**(3), 427-439 (1979).

- [Gra80a] D.E. GRAHAM, M.C. PHILLIPS, *Proteins at Liquid Interfaces. IV. Dilatational Properties*, Journal of Colloid and Interface Science **76**(1), 227-239 (1980).
- [Gra80b] D.E. GRAHAM, M.C. PHILLIPS, *Proteins at Liquid Interfaces. V. Shear Properties*, Journal of Colloid and Interface Science **76**(1), 240-250 (1980).
- [Gur03] T.D. GURKOV, S.C. RUSSEV, K.D. DANOV, I.B. IVANOV, B. CAMPBELL, *Monolayers of Globular Proteins on the Air/Water Interface: Applicability of the Volmer Equation of State*, Langmuir **19**, 7362-7369 (2003).
- [Har98] B. HARZALAH, V. AGUIÉ-BÉGHIN, R. DOUILLARD, L. BOSIO, *A Structural Study of β -Casein Adsorbed Layers at the Air/Water Interface Using X-Ray and Neutron Reflectivity*, International Journal of Biological Macromolecules **23**, 73-84 (1998).
- [Lee96] F.A.M. LEERSMAKERS, P.J. ATKINSON, E. DICKINSON, D.S. HORNE, *Self-Consistent-Field Modeling of Adsorbed β -Casein: Effects of pH and Ionic Strength on Surface Coverage and Density Profile*, Journal of Colloid and Interface Science **178**, 681-693 (1996).
- [Lev68] C. LEVINTHAL, *Are there Pathways for Protein Folding?*, Journal of Chemical Physics **65**, 44-45 (1968).
- [Mac63a] F. MACRITCHIE, A.E. ALEXANDER, *Kinetics of Adsorption of Proteins at Interfaces. Part I. The Role of Bulk Diffusion in Adsorption*, Journal of Colloid Science **18**, 453-457 (1963).
- [Mac63b] F. MACRITCHIE, A.E. ALEXANDER, *Kinetics of Adsorption of Proteins at Interfaces. Part II. The Role of Pressure Barriers in Adsorption*, Journal of Colloid Science **18**, 458-463 (1963).
- [Mac63c] F. MACRITCHIE, A.E. ALEXANDER, *Kinetics of Adsorption of Proteins at Interfaces. Part III. The Role of Electrical Barriers in Adsorption*, Journal of Colloid Science **18**, 464-469 (1963).
- [Mac98] F. MACRITCHIE, *Reversibility of Protein Adsorption*, in *Proteins at liquid Interfaces*, D. Möbius and R. Miller (eds), Elsevier:Amsterdam (1998) p149.
- [Mar02] A.H. MARTIN, K. GROLLE, M.A. BOS, M.A. COHEN STUART, T. VAN VLIET, *Network Forming Properties of Various Proteins Adsorbed at the Air/Water Interface in Relation to Foam Stability*, Journal of Colloid and Interface Science **254**, 175-183 (2002).
- [Mel98] M. MELLEMA, D.C. CLARK, F.A. HUSBAND, A.R. MACKIE, *Properties of β -Casein at the Air/Water Interface as Supported by Surface Rheological Measurements*, Langmuir **14**, 1753-1758 (1998).
- [Mur02a] B.S. MURRAY, I. CAMPBELL, E. DICKINSON, K. MAISONNEUVE, P.V. NELSON, I. SÖDERBERG, *Technique for Studying the Effects of Rapid Surface Expansion on Bubble Stability*, Langmuir **18**, 5007-5014 (2002).
- [Mur02b] B.S. MURRAY, B. CATTIN, E. SCHÜLER, Z.O. SONMEZ, *Response of Adsorbed Protein Films to Rapid Expansion*, Langmuir **18**, 9476-9484 (2002).
- [Nar92] G. NARSIMHAN, F. URAIZEE, *Kinetics of Adsorption of Globular Proteins at an Air-Water Interface*, Biotechnology Progress **8**, 187-196 (1992).
- [Nor92] W. NORDE, J.P. FAVIER, *Structure of Adsorbed and desorbed Proteins*, Colloids and Surfaces **64**, 87-93 (1992).

- [Pet00] J.T. PETKOV, T.D. GURKOV, B.E. CAMPBELL, R.P. BORWANKAR, *Dilatational and Shear Elasticity of Gel-like Protein Layers at the Air/Solution Interface*, Langmuir **16**, 3703-3711 (2000).
- [Pos03] C. POSTEL, O. ABILLON, B. DESBAT, *Structure and Denaturation of Adsorbed Lysozyme at the Air/Water Interface*, Journal of Colloid Science **266**, 74-81 (2003).
- [Pri98] A. PRINS, M.A. BOS, F.J.G. BOERBOOM, H.K.A.I. VAN KALSBECK, *Relation between Surface Rheology and Foaming Behaviour of Aqueous Protein Solutions*, D. Möbius and R. Miller (eds), Elsevier:Amsterdam (1998) p221.
- [Sve98] D.I. SVERGUN, S. RICHARD, M.H.J. KOCH, Z. SAYERS, S. KUPRIN, G. ZACCAI *Protein Hydration in Solution: Experimental Observation by X-Ray and Neutron Scattering*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **95**, 2267-2272 (1998).
- [Ybe98a] C. YBERT, J.M. DI MEGLIO, *Study of Protein Adsorption by Dynamic Surface Tension Measurements: Diffusive Regime*, Langmuir **14**, 471-475 (1998).
- [Ybe98b] C. YBERT, J.M. DI MEGLIO, *Ascending Air Bubble in Protein Solutions*, The European Physical Journal B **4**, 313-319 (1998).
- [Ybe00] C. YBERT, J.M. DI MEGLIO, *Ascending Air Bubble in Solutions of Surface-Active Molecules: Influence of Desorption Kinetics*, The European Physical Journal E **3**, 143-148 (2000).

Chapitre 3

Stabilité et structure d'un film noir de protéines

Dans ce chapitre, nous commencerons par présenter l'état actuel des connaissances concernant les films noirs. Nous mettrons particulièrement l'accent sur leurs propriétés de stabilité et de structure, puis nous montrerons en quoi ils constituent des systèmes pertinents pour modéliser les interactions dans les systèmes colloïdaux. Dans une deuxième partie, nous présenterons la technique de réflectivité de rayons X qui est notre outil pour déterminer la structure moléculaire de ces films. Nous verrons comment les données expérimentales sont traitées à l'aide d'un formalisme matriciel d'optique, et nous détaillerons les informations auxquelles on a finalement accès. Pour finir, nous mettrons à profit ces connaissances et cette technique expérimentale pour étudier un nouveau type de film noir, constitué uniquement de protéines solubles.

3.1 Les films noirs : un système modèle pour étudier les interactions entre objets colloïdaux

3.1.1 Préambule : irisation des films de savon

Newton est l'un des premiers à s'être intéressé aux films de savon, et plus particulièrement aux irisations qu'ils présentent à leur surface. Par analogie avec les interférences colorées, observées à l'aide d'un coin d'air entre deux plaques en verre, il mit en relation la couleur des films en fonction de leur épaisseur. L'ensemble de ses travaux ont permis d'établir l'échelle des teintes dite de Newton (Figure 3.1) [New04].

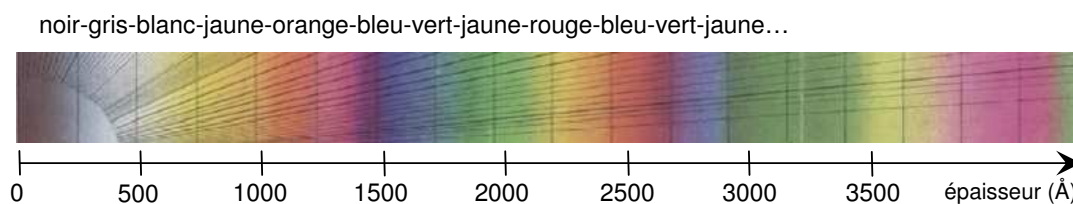


FIG. 3.1 – *Echelle des teintes de Newton: elle fait correspondre l'épaisseur des films à leur irisation.*

Lorsqu'un faisceau de lumière incident atteint la surface d'un film, une partie du faisceau est réfléchi tandis que l'autre est transmise (Figure 3.2). Le faisceau transmis va lui-même se scinder de manière analogue à sa rencontre avec l'autre surface du film, etc... Le film est donc le siège de réflexions multiples.

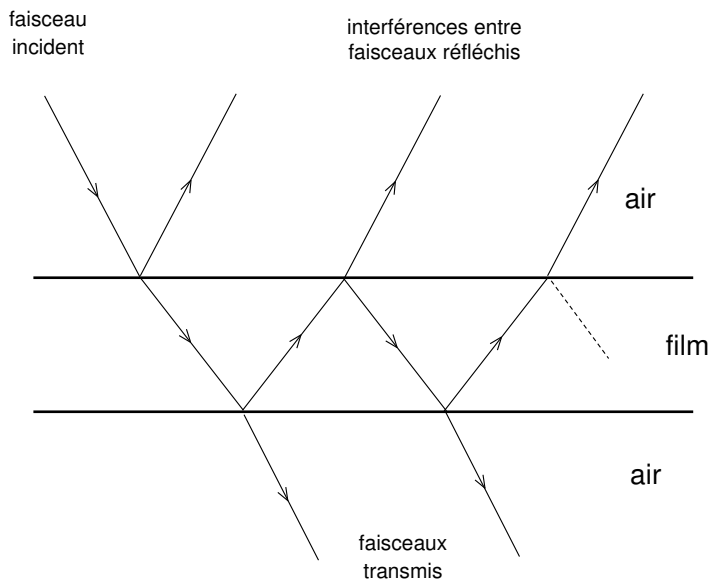


FIG. 3.2 – Réflexion de la lumière par un film mince: les irisations sont le résultat d'interférences constructives entre les faisceaux réfléchis sur chacune des faces du film.

Les irisations sont le résultat des interférences constructives qui se produisent entre les faisceaux réfléchis sur chacune des faces du film. Considérons le cas simple où l'on éclaire un film d'épaisseur e et d'indice de réfraction n par un faisceau de lumière blanche sous incidence normale. L'intensité réfléchi pour une longueur d'onde λ s'exprime de la manière suivante [Bor80]:

$$I = I_0 \frac{4r^2 \sin^2\left(\frac{2\pi ne}{\lambda}\right)}{(1 - r^2)^2 + 4r^2 \sin^2\left(\frac{2\pi ne}{\lambda}\right)} \quad (3.1)$$

où I_0 est l'intensité incidente et r le coefficient de Fresnel: $r = \frac{1-n}{1+n}$.

La couleur du film sera celle dont la longueur d'onde est la plus intensément réfléchi compte tenu de l'épaisseur du film. Plus schématiquement, ce sera la couleur pour laquelle les différents faisceaux réfléchis sont en phase. Pour illustrer ceci, voici la description de trois exemples caractéristiques:

- un film très épais, typiquement de $10\,000 \text{ \AA}$, apparaît blanc. En effet, plusieurs longueurs d'onde du spectre visible¹ présentent des pics de réflexion pour cette épaisseur et se mélangent optiquement,
- un film d'épaisseur 3000 \AA présente une irisation verte ($\lambda = 5500 \text{ \AA}$),
- enfin, un film mince ($\sim 700 \text{ \AA}$) est plutôt blanc brillant (« argenté » d'après [Mys59]); pour cette épaisseur, l'intensité réfléchi par le film dépend peu des longueurs d'onde du spectre visible.

1. $4000 \text{ \AA} < \lambda < 8000 \text{ \AA}$

En-dessous de 200 \AA , aucune radiation visible n'est réfléchi de manière conséquente par le film. En effet, son épaisseur est négligeable devant les longueurs d'onde considérées ; ainsi les faisceaux réfléchis sur chacune des ses faces interfèrent systématiquement de manière destructive.² Le film est alors invisible pour l'oeil humain et ne peut être détecté que par la présence de ses ménisques. Il est dit noir car il ne réfléchit pas la lumière visible.

Cependant, il est possible de restaurer un jeu d'interférences constructives en irradiant les films noirs par un faisceau de longueur d'onde plus petite comme celle des rayons X. Nous verrons en effet au paragraphe 3.2 que la réflectivité de rayons X est une technique particulièrement pertinente pour déterminer la structure moléculaire des films noirs [Bel91a].

3.1.2 Métastabilité

Les films noirs communs se composent de deux couches de molécules amphiphiles séparées par une fine couche d'eau (n'excédant pas une centaine d'angströms). Ces systèmes sont donc caractérisés par une grande surface spécifique, c'est-à-dire par un grand rapport surface sur volume. L'énergie interfaciale d'un film de surface S , formé à partir d'une solution de tension de surface σ , est de l'ordre de $2\sigma S$. Prenons le cas d'un film noir rectangulaire $0.3 \times 3.5 \text{ cm}$, épais de 100 \AA . Ces dimensions sont comparables à celles des films que nous étudierons par réflectivité de rayons X (*cf.* § 3.2). La surface spécifique de ce film vaut :

$$\frac{2S}{V} = \frac{2.1}{1,05 \cdot 10^{-6}} = 2 \cdot 10^6 \text{ cm}^{-1} \quad (3.2)$$

En comparaison, la surface spécifique d'une goutte sphérique de volume équivalent est de seulement $4,8 \cdot 10^2 \text{ cm}^{-1}$. D'un point de vue énergétique, la formation d'un film noir est donc clairement défavorable. Lorsqu'il casse, il libère une énergie de surface de l'ordre de 10^2 erg (pour $\sigma \sim 50 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$)³. Les films noirs sont des états métastables de la matière. Il est possible de les observer sur des durées allant de quelques minutes à plusieurs heures selon la nature du tensioactif utilisé et les conditions de préparation de la solution (pH, force ionique, concentration en tensioactifs).

Les forces interfaciales jouent un rôle prépondérant au moment de la formation des films noirs, du fait de leur grande surface spécifique. Nous verrons par la suite qu'ils ne peuvent être obtenus qu'à partir de solutions dont la tension de surface est suffisamment basse (*cf.* § 3.3). D'autre part, leur extrême finesse les rend fragiles ; les mécanismes responsables de leur déstabilisation sont liés à la propagation d'ondes capillaires à leur surface. Ce point sera précisé au paragraphe 3.3.1.

2. En effet, les deux interfaces qui marquent la frontière entre le film et l'air ne sont pas équivalentes en terme de réflexion pour un faisceau incident. A la première interface air \rightarrow film, l'indice de réfraction diminue, tandis qu'à la seconde interface film \rightarrow air, l'indice de réfraction augmente. Cette alternance d'indice est à l'origine d'un déphasage supplémentaire de π entre les faisceaux réfléchis sur chacune des faces du film [Mys59]. Dans le cas d'un film noir, la différence de chemin optique entre des faisceaux de lumière visible est tellement faible qu'ils restent en opposition de phase. Ils interfèrent donc systématiquement de manière destructive.

3. L'erg est l'unité d'énergie de base du système d'unités cgs (centimètre-gramme-seconde), $1 \text{ erg} = 1 \cdot 10^{-7} \text{ J}$.

3.1.3 Équilibre thermodynamique d'un film mince

Un paramètre fondamental: la pression de disjonction

Derjaguin a été le premier à formuler le concept de pression de disjonction (notée Π) pour caractériser les films minces [Der76] [Der78]. Cette grandeur thermodynamique permet de quantifier les interactions qui se développent entre les parois d'un film d'épaisseur connue. Elle traduit également le fait que les propriétés de la couche de solution emprisonnée dans le film dépendent de l'intensité de ces interactions. Dans le cas d'un film épais, la pression de la couche d'eau centrale est égale à celle du réservoir de solution auquel il est connecté. En revanche, lorsque les films sont très minces, les champs de force associés à chacune des parois de tensioactifs commencent à se recouvrir et donnent naissance à une pression supplémentaire (Figure 3.3). C'est à cette surpression (positive ou négative) que correspond la pression de disjonction. Pour un film plan, elle s'exprime de la manière suivante :

$$\Pi = p_N - p_B = p_{atm} - p_B \quad (3.3)$$

où p_N est la pression normale qui s'applique sur la surface du film et p_B la pression dans le réservoir de solution au contact du film.

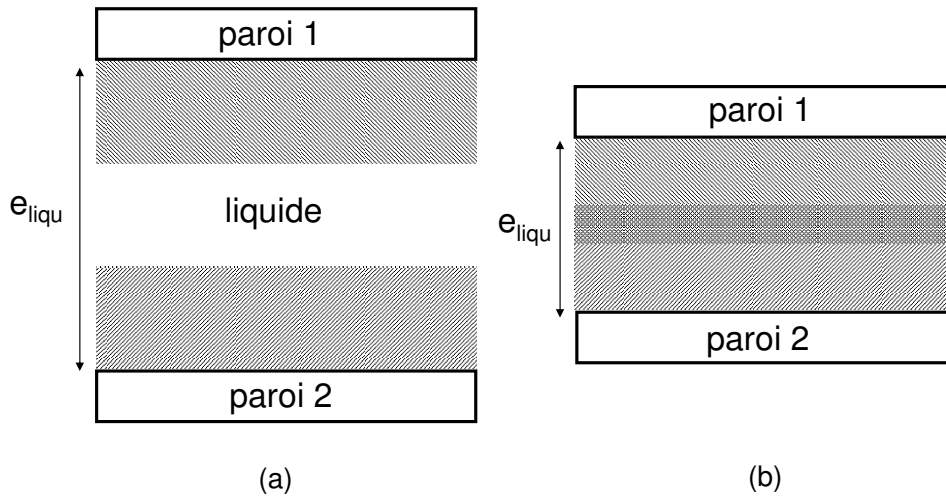


FIG. 3.3 – Représentation schématique de deux parois (1 et 2) séparées par une couche de liquide. La zone hachurée, associée à chaque paroi, indique la portion de l'espace dans laquelle son champ de force s'applique. Dans le cas (a), les champs de force des deux parois ne se recouvrent pas ; la pression du film liquide est donc celle du réservoir communiquant. Dans le cas (b), il y a recouvrement des zones interfaciales, il apparaît alors une surpression liée aux forces de surface qu'on appelle pression de disjonction.

On décompose traditionnellement la pression de disjonction en plusieurs termes relatifs aux différentes forces qui s'exercent entre les surfaces [Ber99] :

$$\Pi = \Pi_{VdW} + \Pi_{elec} + \Pi_{steric} + \dots \quad (3.4)$$

Les indices VdW, elec et steric se rapportent respectivement aux forces de Van der Waals, élec-

trostatiques et stériques. Les expressions détaillées des termes de l'équation 3.4 sont disponibles dans la référence [Isr91]. Nous verrons qu'il existe deux types de films noirs pour lesquels les contributions de chacune de ces forces sont très différentes.

Condition d'équilibre

Considérons le cas général d'un film vertical plan étiré sur un cadre métallique. Après avoir trempé le cadre dans une solution de tensioactifs, le film initialement formé est épais ($\Pi = 0$). Une partie de son contenu en eau s'écoule ensuite sous l'action conjuguée de la gravité et des forces capillaires. En effet, le film est raccordé au cadre par l'intermédiaire d'un ménisque, dont la courbure indique que la pression du liquide à l'intérieur est inférieure à la pression atmosphérique (Figure 3.4). Le liquide contenu dans la partie plane du film (à la pression atmosphérique) est donc entraîné vers le ménisque par aspiration capillaire [Mys59]. D'un point de vue thermodynamique, l'équilibre d'un film plan est réalisé lorsque sa pression de disjonction est égale à la pression capillaire dans le ménisque (p_σ) [Tos75]:

$$\Pi = p_\sigma \quad (3.5)$$

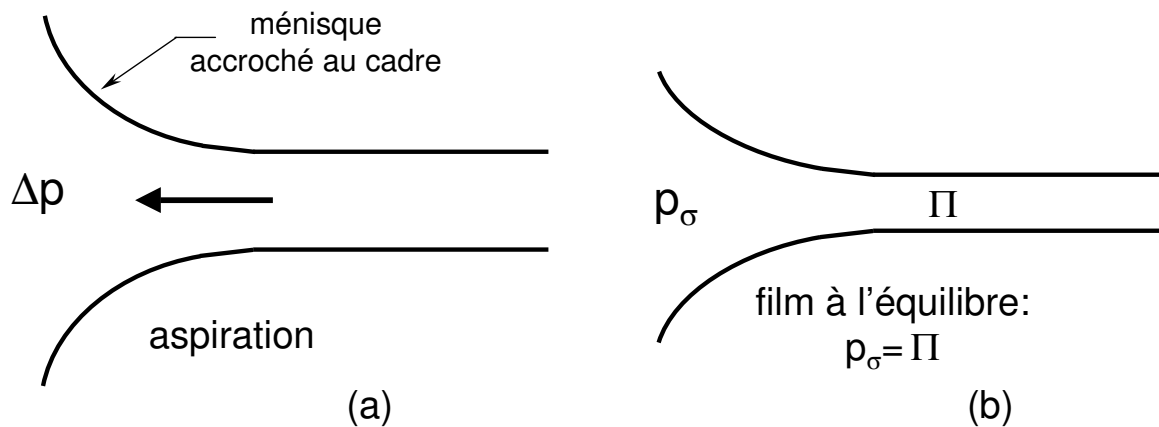


FIG. 3.4 – Représentation d'un film en train de drainer: (a) le liquide contenu dans le ménisque est en dépression par rapport à celui contenu dans le film ; (b) le film est à l'équilibre lorsque la pression capillaire est égale à la pression de disjonction.

3.1.4 Film noir commun et film noir de Newton

Il existe deux états d'équilibre pour les films noirs, qu'on désigne sous les noms de films communs (CBF) et films de Newton (NBF). Dans les deux cas, les films sont constitués de deux parois de tensioactifs qui enserrant un coeur central aqueux. Cette structure « sandwich » des films noirs a été mise en évidence dans les années soixante par des mesures de radioactivité [Cor61]. La taille du coeur aqueux est déterminée par l'équilibre des forces qui agissent entre les parois amphiphiles et gouvernent la structure du film. Les films communs sont convenablement décrits par le modèle DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) [Mys66][Isr91]; leur

épaisseur résulte de l'équilibre des pressions de Van der Waals et électrostatique (Figure 3.5). Ils possèdent une couche centrale d'eau de plusieurs dizaines d'angströms, dont la structure est supposée proche de celle de la solution. Dans le cas des films de Newton, cette couche se réduit à quelques molécules d'eau directement impliquées dans l'hydratation des têtes polaires et des contre-ions éventuellement présents : on parle alors d'eau liée. La description de ces films, caractérisés par leur extrême finesse, fait intervenir des forces répulsives à très courte portée, liées à l'hydratation et au confinement entropique des molécules qui participent au film (Figure 3.5) [Ber99].

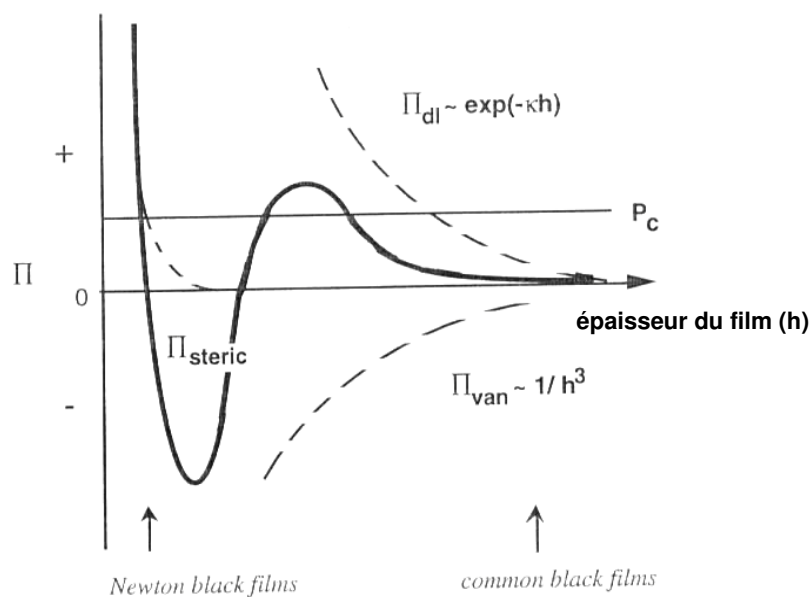


FIG. 3.5 – Représentation schématique d'une isotherme de pression de disjonction qui prend en compte les contributions électrostatique (Π_{dl}), de Van der Waals (Π_{van}) et stérique (Π_{steric}) [Ber99].

La transition du film commun au film de Newton a été abondamment étudiée. Le changement de structure des films a pu être observé expérimentalement soit par des techniques interférométriques [Jon66] [Ibb69] [Exe87], soit par réflectivité de rayons X [Bel91a] [Ben92]. Le type de films obtenus dépend étroitement des paramètres suivants : la concentration en électrolyte, la température, et la concentration surfacique de tensioactifs adsorbés aux parois du film. La variation de l'un d'entre-eux influence les valeurs de la pression de disjonction du film et de la pression capillaire, modifiant ainsi les conditions de l'équilibre thermodynamique présenté à l'équation (3.5). Chacun de ces paramètres constitue donc un levier permettant de passer de l'état de film commun à celui de film de Newton. Dans le cas d'un film formé à partir de tensioactifs ioniques, la transition CBF \rightarrow NBF s'opère en augmentant progressivement la concentration en électrolyte de la solution (voir par exemple [Jon66]). On écrante ainsi les répulsions électrostatiques qui s'exercent entre les parois du film [Isr91]. Au-delà d'une certaine concentration en électrolyte, l'épaisseur du film ne dépend plus de la force ionique de la solution [Bel91a]. Cela indique que le terme électrostatique (Π_{elec}) de la pression de disjonction du film est finalement supplanté par

le terme stérique (Π_{steric}), déterminant pour décrire la structure des films de Newton. Pour une concentration donnée en électrolyte, Jones *et al* ont également montré que l'état d'équilibre du film (CBF ou NBF) dépendait de la température [Jon66]. Enfin, la formation d'un film de Newton nécessite que les tensioactifs adsorbés à l'interface air/solution soient empilés de la manière la plus compacte possible. En revanche, les films communs sont obtenus pour des concentrations surfaciques moindres [Exe81].

Malgré tous ces travaux, des interrogations subsistent quant à la nature de la transition CBF \rightarrow NBF : pour certains tensioactifs, les courbes expérimentales de pressions de disjonction en fonction de l'épaisseur du film $\Pi(h)$ montrent que la transition se produit continûment sur une certaine gamme de pressions, et non pas de manière abrupte pour une valeur de la pression bien définie. Suite à ces observations, Stubenrauch *et al* ont proposé d'interpréter ces courbes en terme de diagramme de phase (Figure 3.6), par analogie avec les diagrammes p-V classiques qui caractérisent la transition liquide-vapeur [Stu04].

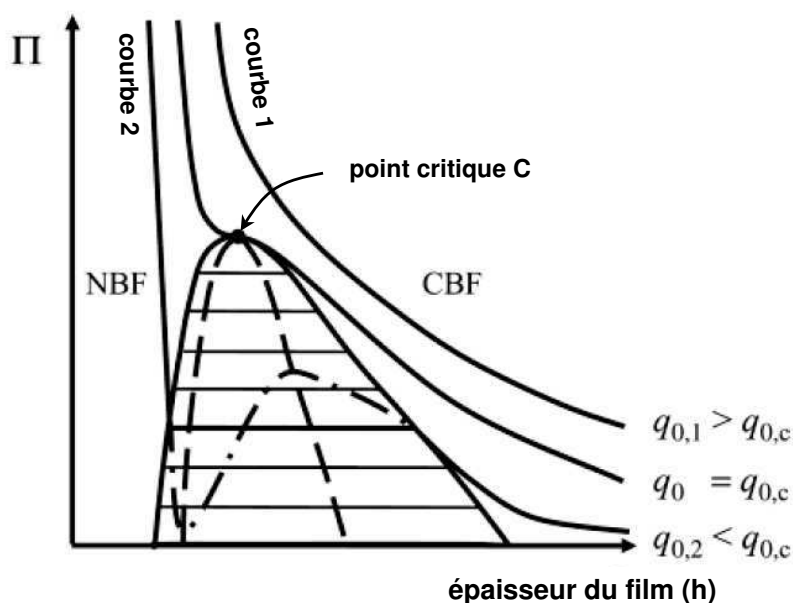


FIG. 3.6 – Représentation schématique du diagramme de phase Π - h d'un film de surfactants non-ioniques. q_0 correspond à la densité de charge surfacique des parois du film. Pour de grandes épaisseurs et de faibles pressions de disjonction, on assiste à la formation de CBF. A l'opposé, les NBF se forment dans une gamme d'épaisseurs plus faibles et pour des pressions de disjonction d'autant plus grandes que q_0 est élevée. A l'intérieur de la courbe en cloche, CBF et NBF coexistent.

3.1.5 Spécificité de la structure des films noirs de Newton

Les films de Newton sont constitués de deux parois de tensioactifs, au contact l'une de l'autre. Leur structure moléculaire a été mise en évidence au début des années 90 par réflectivité de rayons X sur des films de SDS (dodécyl sulfate de sodium) [Bel91a]. Ces expériences ont permis de dégager un certain nombre de caractéristiques structurales qui ont été observées par

la suite pour de nombreux films de tensioactifs tels que les polyéthylène glycol alkyl éther [Sch94]. Les résultats expérimentaux ont également été confirmés par diverses simulations moléculaires [Gam92] [Bre04]. Les films de Newton s'illustrent par les différents points suivants :

- leur extrême finesse (33 Å pour les films de SDS),
- leur très grande compacité liée à la forte inclinaison des chaînes aliphatiques ($\sim 45^\circ$),
- des rugosités interfaciales extrêmement faibles (~ 3 Å) indiquant que les tensioactifs forment des couches adsorbées très ordonnées.

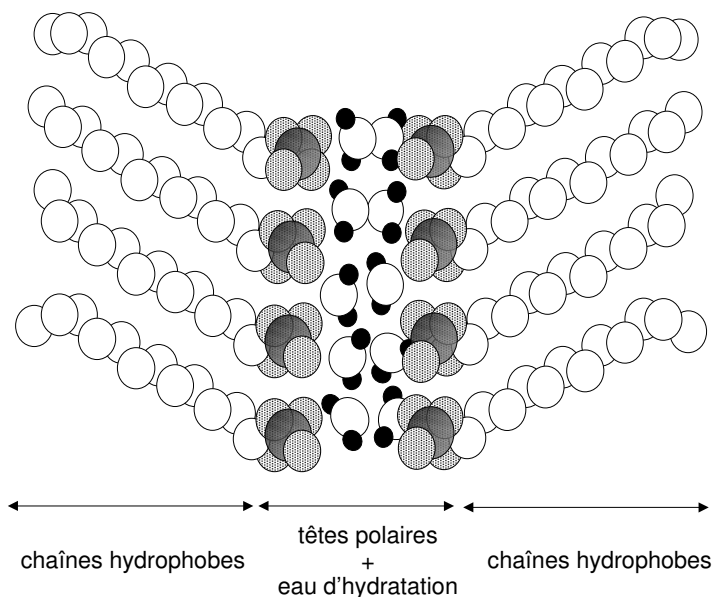


FIG. 3.7 – Représentation d'un film de Newton de SDS d'après les paramètres structuraux déterminés par réflectivité de RX [Bel91a].

A titre d'exemple, la figure 3.7 propose une représentation schématique d'un film de Newton de SDS : les chaînes aliphatiques des tensioactifs forment deux couches hydrophobes à chacune des interfaces film/air tandis que la partie centrale du film, hydrophile, est constituée des têtes polaires et de molécules d'eau d'hydratation. Dans le cas de tensioactifs ioniques comme le SDS, le coeur des films de Newton possèdent également des contre-ions condensés électrostatiquement sur les parois du film (condensation de Manning). La nature du contre-ion utilisé peut ainsi influencer l'épaisseur finale des films obtenus (CBF ou NBF) : à concentration équivalente, l'utilisation de LiCl à la place de NaCl conduit à la formation de films plus épais [Jon66] [Ben92] [Kru97]. Ces résultats sont attribués aux différences d'hydratation caractérisant les ions : les ions Li^+ sont entourés d'une coquille d'hydratation plus épaisse que celles des ions Na^+ , ce qui les rend stériquement plus encombrants et écrante localement leur charge [Sen98].

En conclusion, on peut retenir que les films de Newton correspondent au cas limite pour lequel les deux parois de tensioactifs sont accolées l'une à l'autre. Leur structure, très dense, est défavorable d'un point de vue entropique [DeF78]. Elle est régie par un ensemble de forces à courte portée, telles que les forces de protusion ou d'ondulation, que nous ne décrirons pas ici (voir [Isr91] pour plus de détails). L'hydratation des parties polaires des tensioactifs est également un

paramètre-clef de leur structure : une illustration de ce point sera proposée au chapitre 7 à travers l'étude de films noirs de cyclodextrines amphiphiles, dont on fait varier le degré de methylation de la couronne.

3.1.6 Interactions et applications

De nombreux travaux sur les films noirs concernent l'étude des interactions qui s'exercent entre les parois amphiphiles [Stu03]. La technique la plus couramment utilisée est celle dite TFPB (Thin Film Pressure Balance). Elle se base sur l'étude d'un film formé au centre d'un poreux (percé d'un trou) qui constitue le réservoir de solution. L'ensemble est placé dans une cellule hermétique dans laquelle on peut modifier la pression par l'intermédiaire d'une seringue. Par ailleurs, le poreux est raccordé à un capillaire au contact de l'atmosphère extérieure à la cellule (Figure 3.8). Ce montage permet de contrôler la pression de disjonction des films tandis que leur épaisseur (h) est mesurée simultanément par micro-interférométrie⁴.

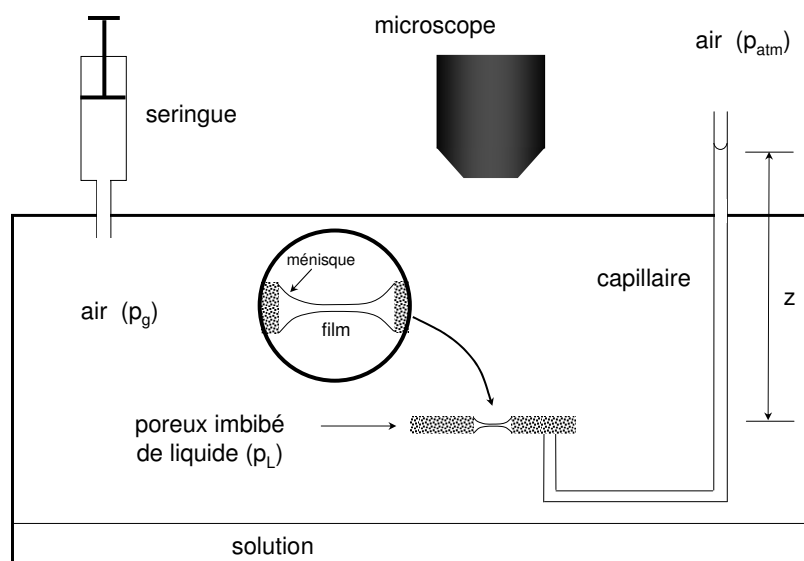


FIG. 3.8 – Montage de la technique du plateau poreux, souvent appelée technique TFPB (Thin Film Pressure Balance). Elle permet de mesurer les isothermes de pression de disjonction des films minces. L'épaisseur des films est mesurée par interférométrie, tandis que la pression de disjonction est déterminée par l'expression suivante : $\Pi = p_g - p_{atm} + \frac{2\sigma}{r} - \Delta\rho g z$, σ et r étant respectivement la tension de surface de la solution et le rayon du capillaire.

Initialement mise au point par Mysels et Jones [Mys66], cette technique a permis d'observer la transition CBF→NBF d'une grande variété de films [Exe87] [Ber96a]. D'autre part, elle s'est montrée très pertinente pour étudier l'organisation supramoléculaire de particules colloïdales confinées dans des films minces d'épaisseur variable. Ce type d'architecture est obtenue pour des films de tensioactifs classiques, formés à partir de solutions au-dessus de la concentration

4. Cette technique consiste à éclairer le film par un faisceau monochromatique en incidence normale, puis à récolter l'intensité réfléchi. L'épaisseur du film est déduite de l'équation (3.1). Pour plus de détails, voir [Sch67].

micellaire critique (cmc) [Ber92], ainsi que pour des films renfermant des chaînes de polyélectrolytes [Ber96b] [Asn97] [Kli01]. Les films résultants présentent une structure stratifiée, mise en évidence par les oscillations de la pression de disjonction en fonction de l'épaisseur. Il s'avère que la période des oscillations est liée à une grandeur caractéristique des particules confinées, *i.e.* la taille des micelles ou la longueur de corrélation des chaînes de polyélectrolytes. Les travaux concernant la stratification des films sont très nombreux et la liste de références proposées ci-dessus ne prétend pas être exhaustive. On se rend compte à travers toutes ces études que les films minces (et noirs en particulier) constituent des systèmes de choix pour modéliser les interactions entre objets colloïdaux. Ainsi, la théorie de Pincus, décrivant les interactions entre deux brosses de polymères chargés, a été vérifiée en mesurant l'épaisseur à l'équilibre d'une série de films noirs de copolymères dibloc obtenus pour différentes concentrations en électrolyte [Gue95].

Une autre approche, motivant l'étude des films noirs, cherche à corréler leurs structure et propriétés diverses (rhéologie, perméabilité, etc) à la stabilité des systèmes dispersés. En effet, les films minces sont susceptibles de modéliser l'espace interstitiel qui sépare deux bulles dans une mousse ou deux gouttelettes d'huile dans une émulsion [Mil99] [Lan00]; l'état noir des films correspond à la situation extrême où les particules colloïdales flocculent.

Enfin, l'étude des films noirs permet également d'aborder des problèmes physico-chimiques d'intérêt biologique. En effet, la structure des films de Newton de phospholipides n'est pas sans rappeler celle d'une membrane biologique inverse: les têtes polaires occupent le centre des films tandis qu'elles pointent vers l'extérieur dans les membranes (Figure 3.9 (a)). Etant donnée l'extrême complexité des membranes réelles, l'analogie film de phospholipides/membrane est à manier avec précaution (Figure 3.9 (b)). Néanmoins, ces deux structures mettent en jeu les mêmes interactions élémentaires, et de nombreux travaux soulignent que les films constituent un système pertinent pour modéliser les membranes [Exe92]. Ainsi, la structure moléculaire (épaisseur, hydratation, etc) de films stabilisés par divers phospholipides a été établie par réflectivité de rayons X [Cuv00] [Tra02]. D'autres études proposent de mesurer directement les isothermes de pression de disjonction de ces films ([Coh91] par exemple).

On peut se rendre à compte à travers cette revue de l'intérêt multiple porté à l'étude des films noirs, et plus particulièrement aux interactions qui régissent leur structure. Dans la suite de ce travail, nous allons nous intéresser à un nouveau type de films, constitués uniquement de protéines solubles.

3.2 Technique de réflectivité des rayons X

Dans ce paragraphe, nous allons présenter la technique de réflectivité des rayons X. De manière générale, une expérience de réflectivité consiste à illuminer la surface étudiée par un faisceau X à différentes incidences, puis à récolter les signaux réfléchis correspondants (Figure 3.10).

On appelle coefficient de réflectivité $R(\theta)$, le rapport de l'intensité réfléchie à l'angle θ sur l'intensité incidente :

$$R(\theta) = \frac{I(\theta)}{I_0} \quad (3.6)$$

Le coefficient de réflectivité permet de remonter à l'indice de réfraction du milieu étudié, lui-

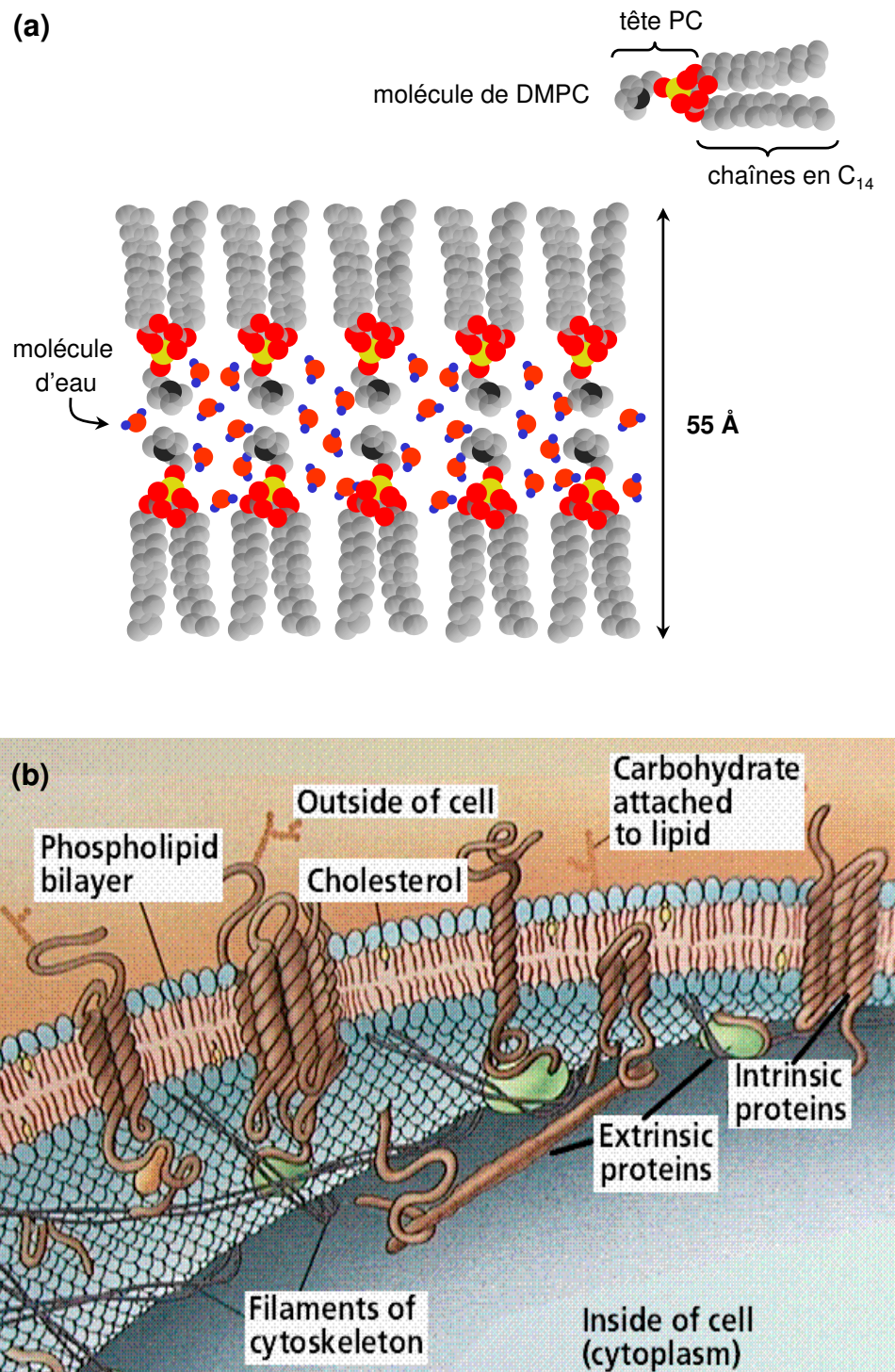


FIG. 3.9 – Représentations schématiques : (a) d'un film de Newton de phospholipides, en l'occurrence de dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) [Cuw00]; (b) d'une membrane réelle. La géométrie de ces deux systèmes est inversée; néanmoins, ils mettent en jeu des interactions élémentaires similaires. La complexité des membranes réelles provient de la grande variété des composants qu'elles impliquent. Elles sont formées d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont ancrées diverses protéines transmembranaires, des molécules de cholestérol, etc.

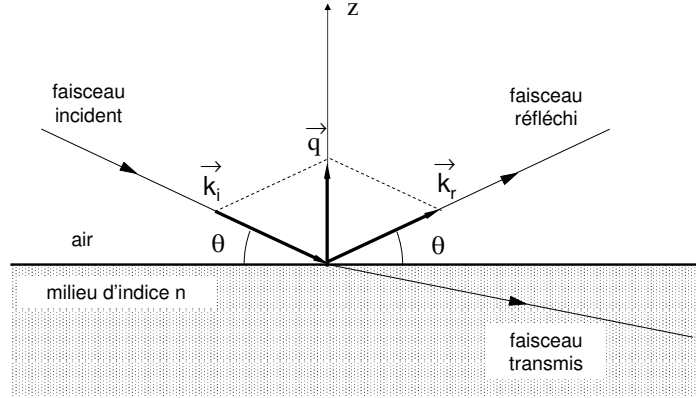


FIG. 3.10 – Faisceau de rayons X éclairant une surface plane sous l'incidence θ . k_i et k_r sont respectivement les vecteurs d'onde incident et réfléchi. Le vecteur de diffusion q est défini par l'expression suivante : $q = k_r - k_i$. Dans le cas d'une expérience de réflectivité, q est perpendiculaire à la surface du film et son module vaut $q_z = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$.

même relié à ses propriétés physiques. A travers les brefs rappels théoriques proposés ci-après, nous expliquerons pourquoi la réflectivité est particulièrement adaptée à l'étude des films libres.⁵

3.2.1 Indice de réfraction de la matière pour les rayons X

La propagation des rayons X à travers un milieu donné peut être décrite en introduisant l'indice de réfraction n , caractérisé par l'expression suivante [Jam82] :

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad (3.7)$$

avec :

$$\delta = \frac{\lambda^2 r_e}{2\pi} \rho \quad \text{et} \quad \beta = \frac{\mu \lambda}{4\pi} \quad (3.8)$$

où λ est la longueur d'onde du rayonnement considérée et $r_e = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2}$ désigne le rayon classique de l'électron.

δ est une grandeur sans dimension habituellement appelée densité électronique réduite. Ce terme est proportionnel à la densité électronique ρ du milieu traversé et sa valeur pour les films qu'on étudie est de l'ordre de 10^{-6} . A titre de référence, on peut retenir que la densité réduite de l'eau liquide vaut $3,56 \times 10^{-6}$ pour la raie $K\alpha_1$ du cuivre ($\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$). Quant au terme β , il est proportionnel au coefficient d'absorption linéaire du milieu (noté μ). Les films amphiphiles sont très peu absorbants et se caractérisent par des valeurs de β autour de $\sim 10^{-8}$. On négligera donc ce terme dans la suite de ce travail.

L'expression (3.7) montre que l'indice de réfraction des films étudiés est légèrement inférieur à 1. La loi de Snell-Descartes prévoit alors l'existence d'un angle critique, au-dessous duquel la réflexion est totale au cours d'une expérience de réflectivité à l'interface air/film. Néanmoins, sous

⁵. On parle d'un film libre par opposition à un film déposé au contact d'un substrat. Les films libres qu'on étudie sont suspendus à un cadre : leurs deux faces sont au contact de l'air.

cette valeur critique, une onde évanescente se propage le long de l'interface (*cf.* [Bor80] p47). Son amplitude décroît exponentiellement en fonction de la distance z avec la frontière air/film ; sa profondeur de pénétration dans l'eau ou dans un milieu organique est de l'ordre de 100 Å [Sen97]. Par conséquent, lors de l'étude d'un film noir de Newton (épaisseur de quelques dizaines d'ångströms), l'onde évanescente traverse le film. Il n'existe donc pas réellement de domaine angulaire de réflexion totale.

On peut remarquer qu'au cours d'une expérience de réflectivité des rayons X, la plupart de l'intensité du faisceau qui atteint le film est transmise. L'intensité réfléchie, porteuse d'information sur la structure interne du film, est extrêmement faible. En effet, le coefficient de réflectivité, qui compare l'intensité réfléchie à l'intensité incidente, est typiquement compris entre 10^{-3} et 10^{-6} dans nos expériences. Les expériences de réflectivité X sur des films noirs nécessitent donc un détecteur de haute sensibilité.

3.2.2 Approximation de Born

Dans ce paragraphe, nous allons proposer une expression analytique simplifiée du coefficient de réflectivité $R(\theta)$. Ce calcul, basé sur l'approximation de Born, permet de mettre en évidence la loi de dépendance de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence et de la densité électronique du milieu étudié. Cette approximation suppose que l'onde électromagnétique diffusée en un point par le système considéré n'est le résultat que d'une seule interaction avec celui-ci [Coh77]. Dans le cas d'une expérience de réflectivité sur un milieu stratifié, cela revient à négliger les réflexions multiples au sein du système. Pour les films de savon, cette approximation est valable dès que $\theta \geq 3$ mrad [Bel91b].

La section efficace différentielle de diffusion correspond au carré du module de l'amplitude de diffusion. Cohen-Tannoudji *et al* en propose une expression générale dans le cadre de l'approximation de Born [Coh77]. Appliquée au cas de la diffusion de rayons X, il vient :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_e^2 \left| \int \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} d\vec{r} \right|^2 = \left| \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2} \int \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \quad (3.9)$$

où $\rho(\vec{r})$ est la densité électronique du milieu diffuseur et \vec{q} le vecteur de diffusion. Le terme $(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 mc^2})^2$ est parfois appelé facteur de Thomson ; il décrit l'oscillation d'un électron soumis à une onde électromagnétique.

Au cours d'une expérience de réflectivité, le vecteur de diffusion \vec{q} est orthogonal à la surface du milieu diffuseur (Figure 3.10) et il faut intégrer (3.9) sur la section droite du faisceau pour obtenir la section efficace de diffusion. La réflectivité correspond à la section efficace rapportée au flux du faisceau :

$$R(\theta) = \left(\frac{e^2}{2\epsilon_0 mc^2} \right)^2 \left(\frac{\lambda}{2\pi} \right)^2 \left(\frac{1}{\sin^2 \theta} \right) \left| \int \rho(z) e^{-iq_z z} dz \right|^2 \quad (3.10)$$

Cette expression peut être simplifiée en introduisant la variable δ (*cf.* equation (3.8)) et en intégrant par parties l'intégrale qu'elle contient. En négligeant le terme tout intégré, on obtient

finalemt dans l'approximation des petits angles ($\sin \theta \sim \theta$) :

$$R(\theta) = \frac{1}{4\theta^4} \left| \int \frac{\partial \delta(z)}{\partial z} e^{-iq_z z} dz \right|^2 \quad (3.11)$$

L'équation (3.11) appelle quelques commentaires :

- d'un point de vue expérimental, la rapide décroissance du signal réfléchi en $\frac{1}{\theta^4}$ impose de travailler en incidence rasante (typiquement entre 5 et 80 mrad),
- les effets de polarisation sont négligeables aux incidences rasantes. Par conséquent, l'expression (3.11) est valable en polarisation s ou p [Sch94],
- le vecteur de diffusion étant orthogonal à la surface de l'échantillon, la réflectivité n'est sensible qu'à la projection de la densité électronique le long de la normale (0z) du milieu étudié. On ne récolte aucune information directe sur sa distribution électronique dans le plan (x,y),
- la réflectivité est liée au profil de densité électronique par une transformée de Fourier. Elle est donc sensible aux gradients de densité électronique créés par les différentes strates homogènes qui constituent le milieu étudié. Le signal réfléchi résulte d'interférences entre les faisceaux réfléchis sur chacune des interfaces qui partitionnent l'échantillon. Ces interférences, aussi appelées franges de Kiessig, ont pour effet de moduler la décroissance en $\frac{1}{\theta^4}$ de la réflectivité d'un dioptre parfait. Dans le cas des films libres de tensioactifs, les interfaces air/film/air offrent chacune un important gradient de densité, à l'origine de modulations très marquées sur les courbes expérimentales (Figure 3.11 (a)). De plus, si le film possède une structure interne très organisée, le spectre de réflectivité présentera un diagramme d'interférences plus complexe. A titre d'exemple, la figure 3.11 (b) présente le spectre de réflectivité d'un film de Newton de DMPC. Dans ces films, les différentes parties chimiques de la molécule donnent lieu à des empilements moléculaires de densités électroniques très différentes qu'on peut visualiser par réflectivité X. Cette technique est donc très pertinente pour analyser la structure des films libres à une échelle moléculaire.

Ainsi, l'approximation de Born permet d'établir une expression simple du coefficient de réflectivité qui met en évidence l'origine physique des motifs présentés sur les spectres de réflectivité des films. Néanmoins, l'interprétation de nos courbes expérimentales sera basée sur un autre formalisme, plus complet (valable à tous les angles), que nous allons présenter ci-après.

3.2.3 Formalisme matriciel de l'optique

Une description très détaillée du formalisme matriciel de l'optique est disponible dans le livre de Born et Wolf [Bor80]. Ce formalisme rend compte de la propagation d'une onde électromagnétique dans un milieu stratifié. Il permet d'établir une expression exacte de la réflectivité valable quelque soit l'angle d'incidence θ , *i.e.* il prend en compte le phénomène de réflexions multiples. Il est particulièrement adapté à l'étude des films de Newton, qui présentent une structure moléculaire organisée par strates de densité homogène.

Lorsqu'une onde incidente traverse le milieu étudié, elle rencontre successivement chacune des interfaces qui séparent les différentes strates (Figure 3.12). Chacune de ces strates est modélisée

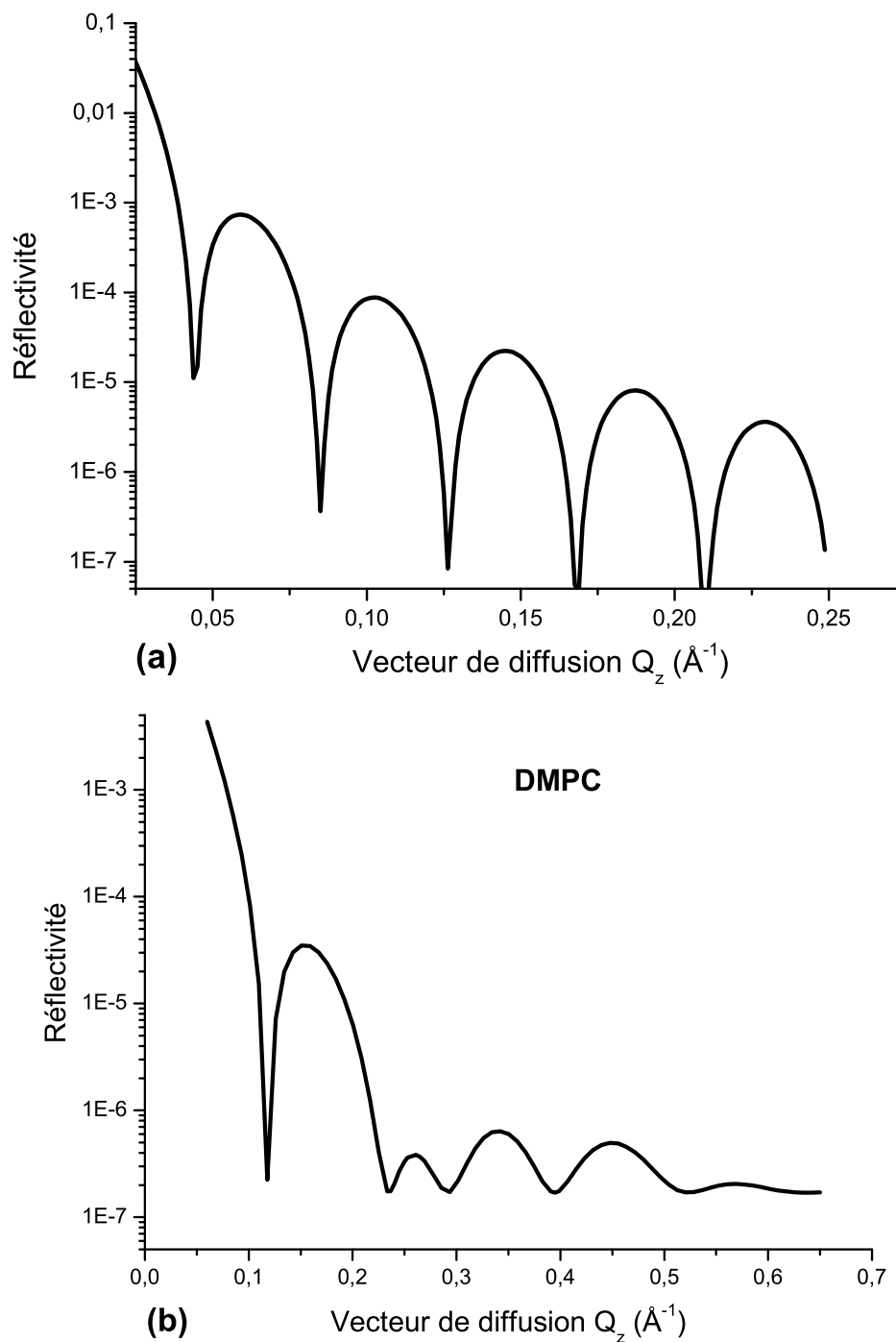


FIG. 3.11 – Profils de réflectivité : (a) d'un film de 150 \AA de densité électronique uniforme ; (b) d'un film de Newton de DMPC dont la structure interne se caractérise par des gradients de densité électronique très marqués. Dans le premier cas, le coefficient de réflectivité est tel que : $R(\theta) \propto \sin^2\left(\frac{2\pi\theta e}{\lambda}\right)$, e étant l'épaisseur du film. C'est pourquoi on observe un signal de réflectivité périodique. Dans le second cas, la complexité du diagramme d'interférences révèle une organisation du film en différentes strates de densité électronique homogène. Ces strates correspondent aux différentes parties chimiques des molécules de DMPC (partie polaire, chaîne hydrophobe) (voir aussi la figure 3.14).

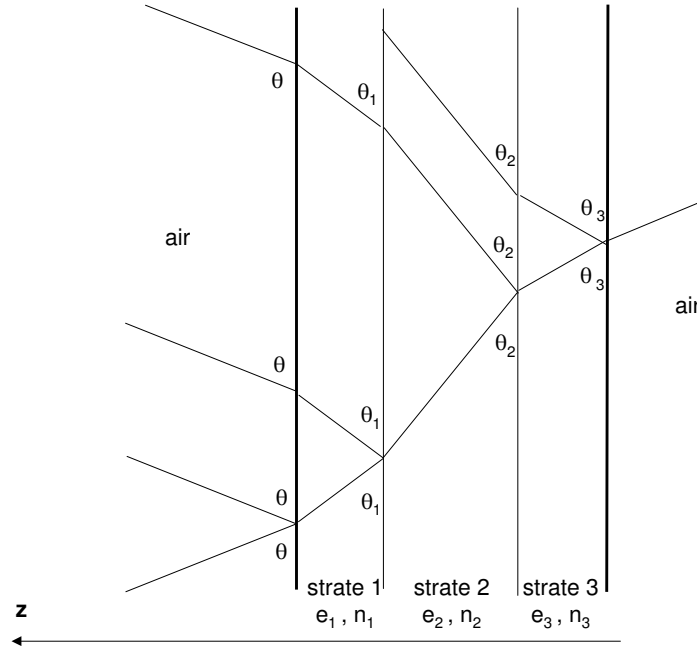


FIG. 3.12 – Propagation d'une onde électromagnétique dans un milieu stratifié: cas d'un film noir présentant trois couches de densité électronique différente. La structure de ces films est symétrique par rapport au plan médian du système (films libres), soit : $n_1 = n_3$ et $e_1 = e_3$.

par une matrice dont les éléments dépendent de ses propriétés physiques. Ainsi, une strate i est décrite par la matrice carrée suivante [Bor80] :

$$M_i = \begin{pmatrix} \cos \psi_i & \frac{-i}{p_i} \sin \psi_i \\ -ip_i \sin \psi_i & \cos \psi_i \end{pmatrix}$$

avec :

$$\psi_i = \frac{2\pi}{\lambda} n_i \sin \theta_i e_i \quad (3.12)$$

et :

$$p_i = n_i \sin \theta_i \quad \text{en polarisation } s \quad (3.13)$$

$$p_i = \frac{\sin \theta_i}{n_i} \quad \text{en polarisation } p \quad (3.14)$$

n_i et e_i sont respectivement l'indice de réfraction et l'épaisseur de la strate considérée. Quant à l'angle θ_i , il se déduit de celui de la strate précédente θ_{i-1} par la loi de Descartes :

$$n_{i-1} \cos \theta_{i-1} = n_i \cos \theta_i \quad (3.15)$$

Ces matrices correspondent en quelque sorte à des matrices de passage dont l'effet est d'assurer la continuité des composantes de l'onde lorsqu'elle pénètre dans une nouvelle strate. Elles vérifient également la loi de conservation de l'énergie au moment de la scission de l'onde incidente en une onde transmise et une onde réfléchie. Finalement, le milieu entier est caractérisé par la

matrice produit $[M]$ suivante :

$$[M] = \prod_i [M_i] \quad (3.16)$$

dont les coefficients donnent accès assez simplement au coefficient de réflectivité du milieu étudié [Bor80].

Toutes nos courbes expérimentales de réflectivité sont interprétées à l'aide d'une procédure d'ajustement basée sur ce formalisme. On remonte ainsi à la densité et à l'épaisseur des sous-couches qui forment le film en identifiant les courbes expérimentales à des simulations théoriques par la méthode des moindres carrés.

3.2.4 Rugosité interfaciale

Jusqu'à présent, la réflectivité des films a été calculée dans l'approximation où les interfaces, délimitant deux zones de densité électronique différente, étaient parfaitement lisses. Cependant, toutes les surfaces réelles présentent des aspérités à l'échelle de la longueur d'onde des rayons X (Figure 3.13). C'est pourquoi, dans un modèle plus réaliste, il est nécessaire de considérer la rugosité des interfaces des systèmes qu'on étudie.

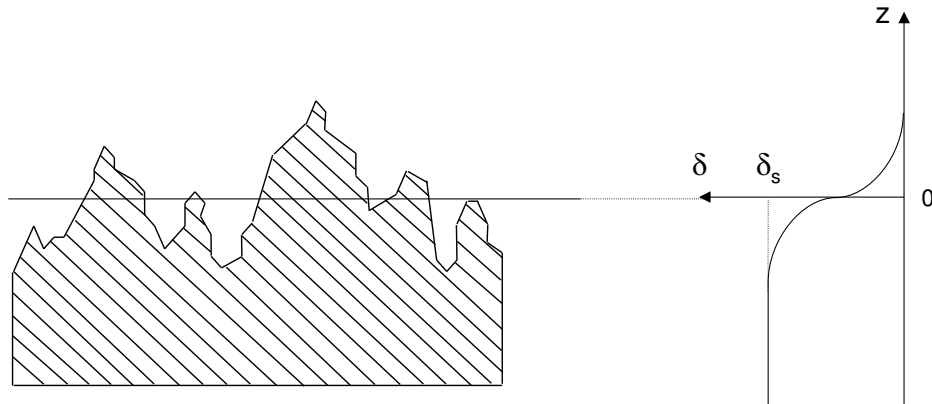


FIG. 3.13 – Aspect d'une interface rugueuse dont les aspérités obéissent à une distribution aléatoire de hauteur. Le plan $z=0$ est le plan moyen des aspérités. δ_s est la densité électronique réduite du substrat.

Supposons que les aspérités aux interfaces obéissent à une distribution aléatoire de hauteur (z). On définit la hauteur des aspérités par rapport à un plan moyen tel que la valeur moyenne de $z(x,y)$ soit nulle. Alors, la probabilité pour qu'une aspérité ait une hauteur z donnée est :

$$P(z) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(\frac{-z^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3.17)$$

Dans ce modèle statistique gaussien, la rugosité est définie par $\sigma = \sqrt{\langle z^2 \rangle}$.

Le principal effet de la rugosité interfaciale est d'arrondir les profils de densité électronique (Figure 3.14) : la transition d'un milieu 1 à un milieu 2 ne se fait plus de manière discontinue. Autrement dit, cela se traduit par une modulation de l'indice de réfraction au niveau de

l'interface :

$$\langle n(z) \rangle = n_1 P^<(z) + n_2 P^>(z) \quad (3.18)$$

avec :

$$P^<(z) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^z \exp\left(\frac{-u^2}{2\sigma^2}\right) du \quad \text{et} \quad P^>(z) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_z^{+\infty} \exp\left(\frac{-u^2}{2\sigma^2}\right) du \quad (3.19)$$

En traduisant cette modulation de l'indice en terme de densité électronique et en l'injectant dans l'expression (3.11) de la réflectivité, il vient [Sen98] :

$$R(\theta) = R_F(\theta) \exp(-q^2 \sigma^2) \quad (3.20)$$

où $R_F = \frac{\theta - (\theta^2 - \theta_c^2)^{\frac{1}{2}}}{\theta + (\theta^2 - \theta_c^2)^{\frac{1}{2}}}$ correspond à la réflectivité d'un dioptre parfait d'indice $n = 1 - \delta$, aussi appelée réflectivité de Fresnel. Dans cette expression, $\theta_c = \sqrt{2\delta}$ correspond à l'angle critique au-dessous duquel on a réflexion totale.

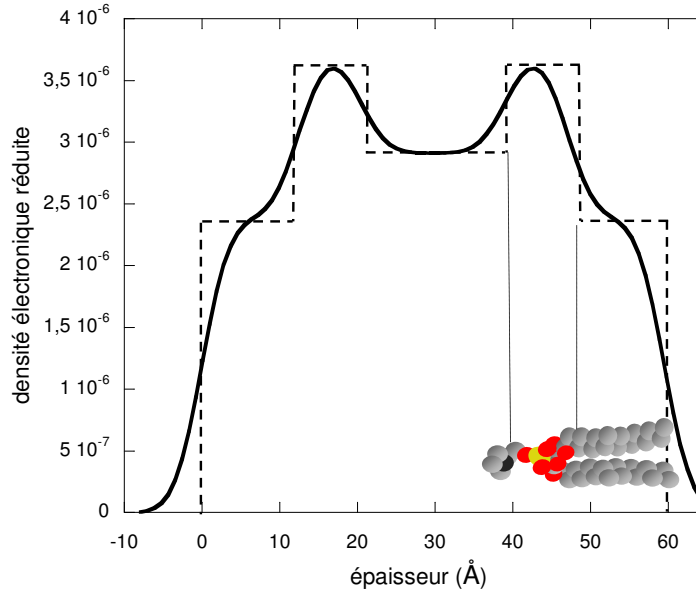


FIG. 3.14 – Profil de densité électronique réduite d'un film de Newton de DMPC. A l'inverse de la courbe en pointillés, la courbe en trait plein prend en compte l'effet de la rugosité ($\sim 3 \text{ \AA}$). On peut noter que les différentes strates de ce film correspondent aux différentes parties chimiques des molécules de DMPC (cf. dessin au bas du graphique).

On peut donc conclure que l'effet de la rugosité est d'atténuer le signal réfléchi aux grands angles⁶ (Figure 3.15). Cet effet peut être intégré dans le formalisme d'optique matriciel décrit au paragraphe précédent. Par conséquent, on peut également déduire la rugosité des films noirs à partir de leurs courbes de réflectivité expérimentales. Cette rugosité est essentiellement liée à la propagation d'ondes capillaires à la surface du film.

6. En effet, une partie du signal incident est diffusé en position hors-spéculaire. Cette diffusion est une source potentielle d'information sur la structure du plan de l'interface. Cependant, son intensité est tellement faible que son étude ne peut être réalisée qu'en utilisant un rayonnement synchrotron, c'est-à-dire très brillant.

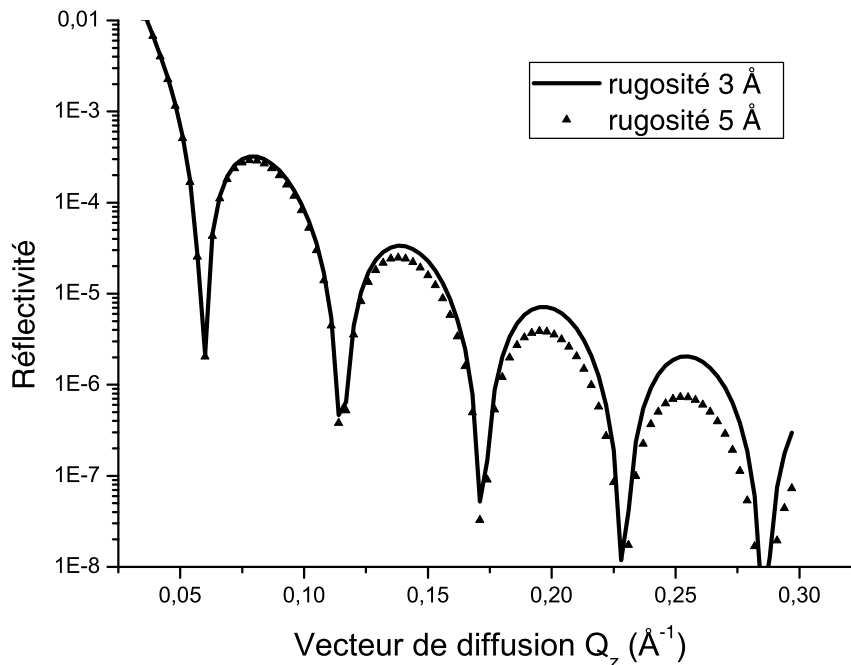


FIG. 3.15 – Profils de réflectivité de deux films d'épaisseur et de densité électronique identiques, mais de rugosité différente. L'effet de la rugosité est d'atténuer le signal réfléchi aux grands vecteurs de diffusion.

3.2.5 Dispositif expérimental

Description

Un schéma du dispositif expérimental est proposé à la figure 3.16. Le faisceau de rayons X est délivré par une anti-cathode de cuivre fonctionnant à l'aide d'un générateur Enraf-Nonius (30 mA et 40kV). Un monochromateur taillé dans la face $\langle 111 \rangle$ du silicium permet de sélectionner la raie $K\alpha_1$ ($\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$), tandis qu'une fente F_d ($100 \mu\text{m}$), située à environ 30 cm de la source, limite la divergence du faisceau ($\sim 0.1 \text{ mrad}$). Juste derrière F_d , une autre fente F_h ($1,25 \text{ mm}$) est utilisée pour limiter la hauteur de film illuminée.

Les films qu'on étudie sont formés sur un cadre vertical en inox. Ce dernier est nettoyé régulièrement dans des solutions très corrosives (mélange à 6 % en HCL et 10 % en HNO_3) afin d'éliminer les impuretés adsorbées qui rendent sa surface hydrophobe. Le cadre est par ailleurs biseauté et suffisamment large (4 cm) pour que la totalité du faisceau atteigne le film lorsqu'on s'approche des incidences rasantes. La cuve contenant la solution de tensioactifs est en téflon. Elle est nettoyée dans un mélange 3:1 d'acide sulfurique et d'eau oxygénée (pirahna) afin de ne pas introduire d'impuretés dans le système. Enfin, l'ensemble cuve + cadre est placé dans une cellule confinée pour éviter l'évaporation de l'eau contenue dans le film. Deux fenêtres en kapton (matériau peu absorbant pour les rayons X) permettent le passage des faisceaux incident et réfléchi tout en garantissant l'étanchéité de la cellule.

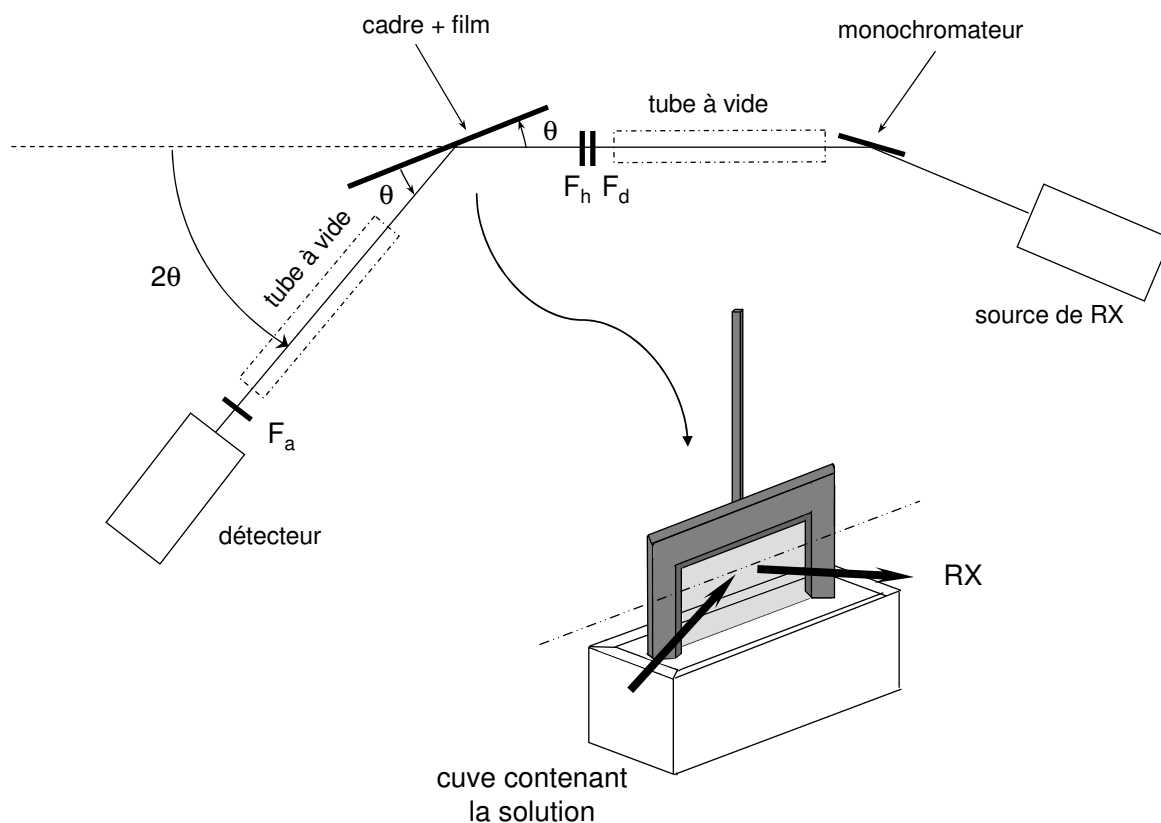


FIG. 3.16 – Présentation de la géométrie ($\theta : 2\theta$) d'une expérience de réflectivité X et des différents éléments optiques qui constituent le dispositif (voir texte).

Les expériences de réflectivité sont réalisées à l'aide d'un diffractomètre 4-cercles de haute résolution, conçu en collaboration avec la société Micro-Contrôle. La précision des déplacements des moteurs est de 10^{-3} degré. La source de rayons X est fixe tandis que deux cercles assurent la rotation du cadre et du détecteur. Nous avons exclusivement utilisé le diffractomètre dans le mode de fonctionnement ($\theta : 2\theta$) : le cadre tourne d'un angle θ pendant que le détecteur tourne d'un angle 2θ pour se placer en position spéculaire. Un troisième cercle permet la rotation du cadre dans le plan du film afin de régler le parallélisme entre l'arête supérieure du cadre et la surface de la solution. Enfin, un quatrième cercle permet la rotation du détecteur dans un plan orthogonal au plan d'incidence, offrant ainsi la possibilité de réaliser des mesures hors-spéculaires.

Le faisceau réfléchi est récolté et analysé à l'aide d'un détecteur à scintillation NaI. Une fente d'analyse F_a ($250 \mu\text{m}$) est placée devant le détecteur à environ 30 cm du film. Sa taille est choisie de manière à optimiser le contraste entre les franges d'interférences recueillies sur les spectres expérimentaux.

Pour finir, deux tubes à vide sont placés sur le trajet optique des faisceaux incidents et réfléchis de manière à minimiser leur absorption par l'air.

Alignement de l'échantillon par rapport au faisceau

Nous avons vu que la forte décroissance en $\frac{1}{\theta^4}$ de la réflectivité nécessitait de travailler aux incidences rasantes. Pour ce faire, il faut parvenir à aligner le cadre parallèlement au faisceau incident (Figure 3.17). La qualité des expériences de réflectivité dépend largement de la précision de cet alignement.

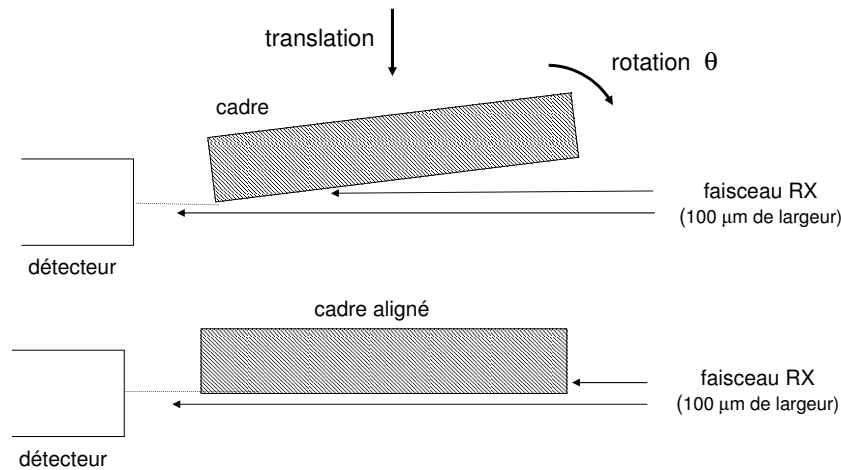


FIG. 3.17 – Schéma illustrant la procédure d'alignement du cadre dans le faisceau de rayons X (vue de dessus).

Dans un premier temps, il faut s'assurer que le détecteur et le faisceau incident sont alignés lorsque θ est nul (on utilise pour cela un filtre en aluminium afin de protéger le détecteur). On monte ensuite le cadre sur son support et on le déplace, à l'aide d'une translation horizontale, jusqu'à ce qu'il coupe partiellement le faisceau. On le fait alors pivoter, grâce à un berceau θ d'une précision de 0,01 deg, de telle sorte que l'intensité du faisceau mesurée augmente : le cadre en s'alignant sort progressivement du faisceau. Lorsqu'il en est complètement sorti, on l'avance à nouveau et on réitère l'opération. Le plan du cadre est parallèle au faisceau lorsque l'intensité diminue quelque soit le sens de rotation du cadre.

L'alignement réalisé, on peut former le film à l'aide d'un moteur de translation vertical qui permet de tremper le cadre dans la solution au-dessous, puis de le remonter. Le film se situe toujours légèrement en retrait de l'extrémité du cadre ; il est donc nécessaire d'ajuster son alignement en position spéculaire (toujours à l'aide du berceau θ et de la translation horizontale du cadre). Une fois tous ces réglages effectués, l'acquisition des courbes de réflectivité peut commencer.

Précision des mesures

Préalablement à chaque expérience, on mesure l'intensité I_0 en plaçant le détecteur en incidence directe avec le faisceau de rayons X (on utilise pour cela un filtre en aluminium parfaitement calibré). Sa valeur se situe typiquement autour de 10^6 coups/s, tandis que le bruit de fond récolté par le détecteur est de l'ordre de 0.1 coup/s. On a donc accès expérimentalement à 7 décades d'intensité. L'erreur statistique sur la détermination de l'intensité du signal réfléchi varie d'une

décade à l'autre :

$$\frac{\Delta N}{N} = \sqrt{\frac{1}{Nt}} \quad (3.21)$$

où N est l'intensité réfléchie (en coups par seconde) et t le temps de comptage à une position spéculaire donnée.

Dans notre cas, l'épaisseur des films que nous avons étudiés (protéines ou cyclodextrines amphiphiles) était de l'ordre d'une centaine d'angströms. Ils présentaient entre 4 et 5 franges de Kiessig sur un domaine angulaire compris entre 7 et 50 mrad. Lorsque la stabilité des films le permettait, nous avons enregistré les courbes de réflectivité en deux parties afin d'utiliser des temps de comptage plus longs (~ 100 s) pour résoudre la forme des dernières franges du spectre (30 s suffisent en général pour les premières franges).

En respectant ces précautions expérimentales, on obtient des franges de Kiessig bien définies. On estime alors que la détermination des paramètres du film, à l'aide de notre logiciel de traitement des données, se fait avec une incertitude de :

- ± 1 % pour les épaisseurs,
- ± 5 % pour les densités électroniques,
- ± 5 % pour les rugosités.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons utiliser les performances de cette technique pour caractériser la structure moléculaire de films noirs de protéines.

3.3 Etude de la stabilité et de la structure de films noirs de protéines

Nous allons porter notre attention sur un nouveau type de films, constitués uniquement de protéines solubles. Nous avons travaillé plus particulièrement avec la β -lactoglobuline, une des protéine globulaire du lait. Nous verrons tout d'abord quelles sont les conditions de pH, de concentrations en protéines et en électrolyte qui favorisent la formation de films noirs stables. Nous montrerons, à travers ces résultats, que la structure et la stabilité des films sont conditionnées par les propriétés des couches d'adsorption à l'interface air/solution. Finalement, nous proposerons une description moléculaire de la structure des films noirs ainsi obtenus [Pet03].

3.3.1 Influence du pH sur la stabilité des films

La question de la stabilité des films est critique pour les expériences de réflectivité de rayons X. En effet, elles nécessitent des films de grande taille (typiquement $3,5 \times 0,3 \simeq 1$ cm²), plus délicats à obtenir que les films microscopiques. Le pH des solutions de protéines est un des paramètres-clé de la stabilité des films. Nous avons effectué des expériences préliminaires qui visent à déterminer la zone de pH pour laquelle les films sont les plus stables. La figure 3.18 présente les résultats obtenus pour une série de films, formés à partir d'une solution contenant 1 mg/mL de β -lactoglobuline et 0,01 M de NaCl. On observe que la stabilité des films augmente de manière significative autour du point isoélectrique de la protéine ($\text{pH}_i=5,2$). Seuls les films obtenus à $\text{pH} \sim 5,2$ finissent par devenir noirs, tandis qu'ils éclatent immédiatement après leur

formation ou bien au cours du processus de drainage dans tous les autres cas considérés. Même épais, les films sont donc instables.

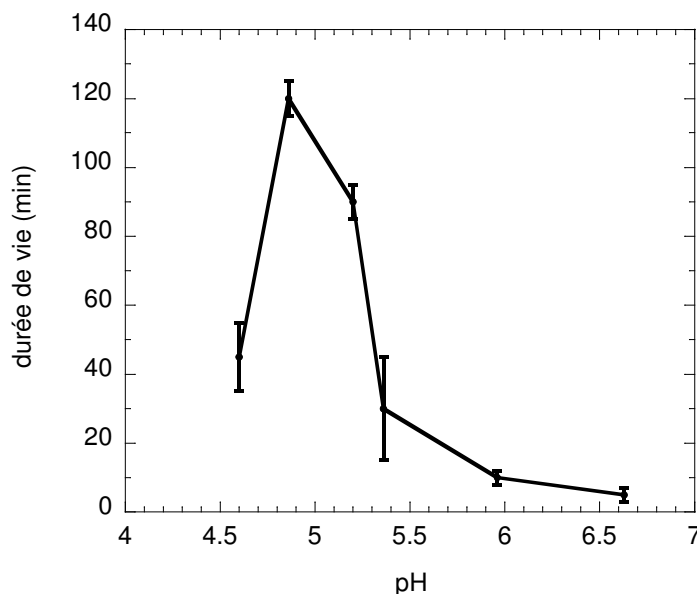


FIG. 3.18 – Effet du pH sur la stabilité de films minces de β -lactoglobuline formés à partir d'une solution contenant à 1 mg/mL de protéine et 0.01 M NaCl. Les expériences ont été réalisées à $T=25^\circ\text{C}$. Le point isoélectrique de la protéine est situé à $\text{pH}=5,2$.

Stabilité d'un film juste formé

Les films sont formés en plongeant le cadre dans la solution de protéines étudiée, puis en le relevant au moyen d'une translation motorisée (typiquement $V=2$ cm/min). Les films juste formés sont blancs, donc très épais. Leur épaisseur initiale dépend de la vitesse à laquelle le cadre est levé : plus le film est étiré rapidement, plus il entraîne avec lui une grande quantité de solution du fait des frottements visqueux entre les couches de liquide. L'équilibre mécanique d'un film vertical, fraîchement formé, est tel que le poids du film est supporté par les forces de surface [DeG01]. Pour une tranche élémentaire de film située à la hauteur z , on peut donc écrire :

$$\rho ghLdz = 2L (\sigma(z + dz) - \sigma(z)) = 2L \frac{\partial \sigma}{\partial z} dz \quad (3.22)$$

où h et L sont respectivement l'épaisseur et la largeur du film, et ρ sa masse volumique.

Finalement :

$$\rho gh = 2 \frac{\partial \sigma}{\partial z} \quad (3.23)$$

Cette expression indique que le poids du film est équilibré par un gradient de tension de surface au niveau des parois. Pour avoir un film stable, il est donc nécessaire d'avoir une couverture dense de molécules à la surface de la solution. Expérimentalement, on laisse la surface de la solution s'enrichir en molécules pendant quelques heures avant de tirer les films.⁷ Malgré toutes

7. On se base pour cela sur les isothermes de tension de surface $\sigma(t)$ mesurées indépendamment par la méthode de Wilhelmy.

ces précautions, les films de β -lactoglobuline obtenus près du $\text{pH}=7$ cassent presque instantanément après leur formation. C'est probablement lié au fait que la tension de surface n'est pas suffisamment basse pour assurer la formation de films épais.

Stabilité d'un film en cours de drainage

Lorsqu'on s'approche davantage du point isoélectrique, la durée de vie des films s'améliore. Ainsi, les films formés aux $\text{pH}=4,6$ et $5,4$ restent stables quelques dizaines de minutes. Ils cassent ensuite au cours du drainage. Plusieurs modèles ont été proposés pour rendre compte du phénomène de rupture des films minces. Ils considèrent pour cela les fluctuations thermiques d'épaisseur [Vri66] [Rad83] ou de concentration en tensioactifs adsorbés [Exe92], susceptibles de déstabiliser la structure des films. Lorsque l'amplitude des fluctuations est trop importante, le film casse. Cependant, on peut noter que ces fluctuations sont amoindries lorsque les parois du film présentent des coefficients viscoélastiques élevés [Vri66] [Lan00]. Les films ainsi obtenus sont donc plus stables, autrement dit ils cassent plus tardivement pendant le drainage (à des épaisseurs plus petites). Dans le cas de solutions de protéines, plus on s'approche du point isoélectrique et plus les couches adsorbées possèdent des propriétés rhéologiques importantes [Nin99]. Cela pourrait expliquer pourquoi les films de β -lactoglobuline atteignent un stade de drainage plus avancé lorsque le pH tend vers $5,2$.

Condition nécessaire à la formation d'un film noir

C'est près du point isoélectrique de la protéine qu'on a observé les meilleures conditions de stabilité et la formation de films noirs. Ce résultat, assez intuitif, a déjà été mis en évidence pour d'autres films de protéines [Ang80]. On l'interprète de la manière suivante : à l'approche du point isoélectrique, la charge nette portée par les protéines en solution diminue. Cela se traduit par des couches d'adsorption plus denses à l'interface air/solution comme le montrent les expériences de réflectivité de neutrons d'Atkinson *et al* [Atk95]. En effet, les répulsions électrostatiques entre protéines adsorbées sont moins importantes autour du point isoélectrique, permettant ainsi la formation d'arrangements moléculaires plus compacts. Il s'ensuit que la tension de surface des solutions de protéines diminue lorsqu'on s'approche du pH_i [Pau92]. Finalement, les couches de protéines adsorbées à l'interface air/solution au pH_i présentent un potentiel électrostatique φ_0 faible et des taux d'adsorption importants. Ces deux propriétés sont primordiales pour la formation de films noirs, caractérisés par leur extrême finesse et leur grande compacité.

En bref, on peut retenir que la structure des couches de protéines adsorbées à l'interface air/solution conditionne la stabilité des films résultants. L'obtention de films noirs est favorisée près du point isoélectrique de la β -lactoglobuline. C'est pourquoi toutes les expériences présentées dans la suite de ce chapitre ont été réalisées au $\text{pH}=5,2 \pm 0,1$.

3.3.2 Influence de la concentration en protéines sur les propriétés des films au pH_i

Nous avons étudié l'effet de la concentration de β -lactoglobuline en solution ($\text{pH}=5,2$) sur la structure et la stabilité des films noirs associés. Les résultats sont regroupés dans le tableau

ci-dessous. A l'exception des films obtenus à partir de solutions à 1 mg/mL, tous les films cassent en fin de drainage, c'est-à-dire avant que leur structure ne se soit bien stabilisée. Les courbes de réflectivité X correspondantes ont donc été enregistrées sur des temps relativement courts (~ 10 min). Dans ces conditions, elles ne nous serviront qu'à estimer l'épaisseur globale des films avant qu'ils ne cassent, mais aucune information sur leur structure fine ne pourra être déduite.

$c_{\beta-lg}$ (mg/mL)	< 0,25	0,25	0,5	1
durée de vie	qqs min	40 min	60 min	qqs heures
épaisseur (Å)	-	110	130	210

On peut dégager de nos résultats les tendances suivantes :

- il existe une concentration seuil, identifiée autour de 0,25 mg/mL de β -lactoglobuline, au-dessous de laquelle on ne peut pas obtenir de films noirs stables de taille macroscopique (~ 1 cm²). Comme évoqué au paragraphe précédent, c'est sans doute lié au fait que l'interface air/solution ne possède pas une couverture moléculaire assez compacte pour que les films deviennent noirs. Une alternative à cette explication serait que le réservoir de protéines en solution n'est pas suffisant pour que l'interface air/solution se régénère rapidement un fois le film étiré,
- au-delà de cette concentration-seuil ($c_{\beta-lg} \geq 0,25$ mg/mL), la durée de vie moyenne des films augmente en fonction de la concentration en protéines. Cependant, leur vitesse de drainage diminue : les films obtenus pour 0,25 mg/mL de protéines atteignent en 40 minutes une épaisseur de 110 Å, tandis qu'ils se figent à 210 Å au bout d'1h30 pour une concentration de 1 mg/mL. Ces derniers présentent des spectres de réflectivité peu structurés qui semblent indiquer une structure inhomogène et gélifiée. Il est intéressant de souligner que même sur une gamme de concentrations relativement restreinte ($0,25$ mg/mL $\leq c_{\beta-lg} \leq 1$ mg/mL), les répercussions sur le drainage et la structure des films noirs sont très sensibles. A priori, on ne s'attend pas à ce que la viscosité des solutions varie de manière significative sur cet intervalle de concentrations. Le taux de drainage doit donc dépendre essentiellement de la structure interfaciale des parois du film. Pour des concentrations élevées en protéines, les phénomènes d'agrégation de surface peuvent ralentir la dernière phase du drainage lorsque les deux parois du film sont proches, et limiter l'amincissement des films.

C'est donc la structure des couches de protéines adsorbées qui contrôle les propriétés de drainage et de structure des films résultants. Au point isoélectrique, augmenter la concentration de protéines en solution améliore la densité de molécules adsorbées et favorise la formation d'agrégats de surface.

On a remarqué que l'effet du vieillissement sur la structure de l'interface air/solution équivaut à celui d'une augmentation de la concentration de protéines en solution. Expérimentalement, si on laisse l'interface air/solution au repos une dizaine d'heures, on obtient des films extrêmement stables mais qui n'atteignent jamais le stade noir. Ces films, inhomogènes et très épais, présentent une structure de type gel qui leur confère une très grande résistance mécanique. Ce même type d'observations a déjà été rapporté à propos de films de BSA et de β -caséine. En effet, Pereira

et al ont montré que le drainage et l'épaisseur finale des films dépendaient de l'âge des couches d'adsorption impliquées dans leur formation [Per03]. Avec le temps, les protéines adsorbées se dénaturent et forment un réseau interfacial dont les propriétés viscoélastiques augmentent [Mar02]. De plus, on assiste à la formation de multicouches et d'agrégats de surface [Gra79] [Per03], qui sont à l'origine des inhomogénéités et de l'épaisseur finale des films.

3.3.3 Influence de la concentration en électrolyte sur les propriétés des films au pH_i

Nous avons déterminé l'effet de la concentration en électrolyte sur la stabilité et la structure de films obtenus au point isoélectrique de la protéine. Nous avons travaillé pour cela à une concentration en β -lactoglobuline de 0,25 mg/mL, qui favorise la formation de films noirs fins et homogènes.

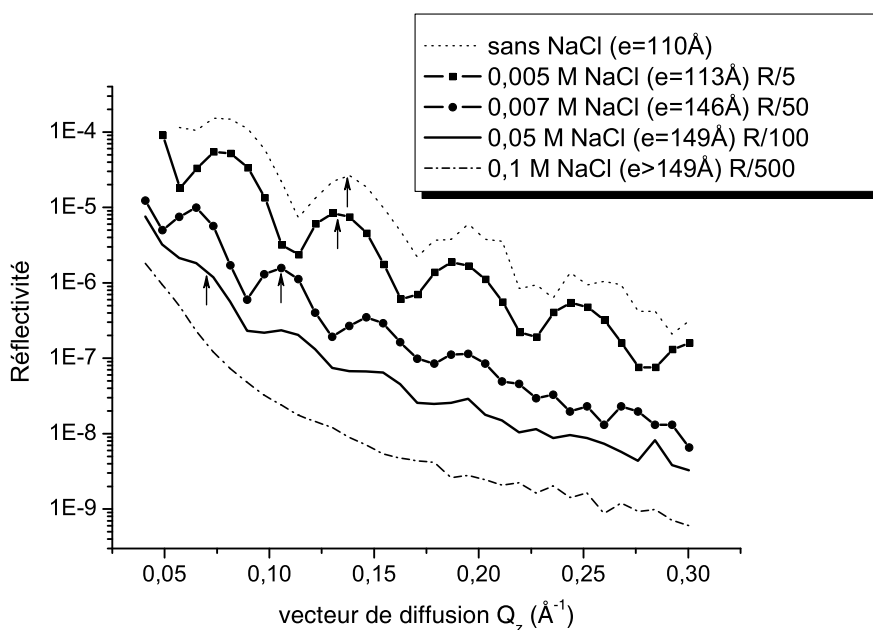


FIG. 3.19 – Courbes expérimentales de réflectivité de rayons X caractérisant des films noirs de β -lactoglobuline (solution: 0,25 mg/mL de protéine à $pH=5,3$) obtenus pour différentes concentrations en électrolyte. Pour une meilleure lisibilité de la figure, les courbes ont été décalées verticalement en divisant le coefficient de réflectivité par un facteur indiqué dans la légende. On observe un déplacement des franges d'interférences vers les petits vecteurs de diffusion lorsque la concentration en sel augmente. L'addition de sel est donc à l'origine d'un épaissement des films.

L'ajout de seulement 5×10^{-3} mol/L de NaCl améliore considérablement la stabilité des films : leur durée de vie passe de 40 minutes en l'absence de sel à plusieurs heures. Ce changement est peut-être lié à l'écrantage de charges résiduelles dans le film, qui permet aux protéines d'optimiser leur arrangement aux interfaces. De plus, l'addition de NaCl permet d'augmenter de manière conséquente la solubilité de la protéine près de son point isoélectrique (on parle de

« salting-in effect » en anglais)[Wit96]. En présence de sel, il y a donc a priori davantage de protéines disponibles en solution pour couvrir les interfaces. Cela pourrait expliquer la stabilité accrue des films observée expérimentalement.

Lorsqu'on continue d'augmenter la concentration de NaCl en solution, on assiste à la formation de films (stables) de plus en plus épais (Figure 3.19). Ce comportement, surprenant au regard de la théorie DLVO, a déjà été observé pour des films microscopiques de protéines [Pla81]. Toutefois, il ne semble pas être spécifique aux interactions entre couches de protéines adsorbées. Des singularités de ce type ont déjà été observées pour des particules colloïdales de silice, qui ne coagulent pas, même en présence de fortes concentrations en électrolyte (c'est-à-dire lorsque les forces répulsives de double-couches électriques sont minimisées) [Man01a]. Ces observations suggèrent qu'il est nécessaire de prendre en compte d'autres forces, telles que les forces d'hydratation pour décrire convenablement ces systèmes. Manciu *et al* ont proposé un modèle théorique basé sur l'idée suivante : lorsque la concentration en électrolyte augmente, il y a des phénomènes d'association d'ions en surface qui diminuent la charge effective du système, mais génèrent de nouvelles paires d'ions. Le moment dipolaire de ces paires polarise les molécules d'eau environnantes et serait à l'origine d'une force d'hydratation répulsive qui pourrait expliquer l'absence de coagulation observée dans certains systèmes [Man01a]. Bien que l'origine microscopique des forces d'hydratation soit toujours discutée aujourd'hui (une revue est disponible dans la référence [Man01b]), leur importance ne fait pas de doute pour décrire fidèlement les interactions au sein des systèmes colloïdaux.

3.3.4 Drainage d'un film de protéines

Le drainage des films de protéines diffère nettement de celui observé pour des tensioactifs de petite taille. Dans ce dernier cas, on observe des franges horizontales de différentes couleurs qui défilent verticalement à la surface du film. Des mouvements rapides et turbulents sont visibles le long des ménisques verticaux et les premières zones noires apparaissent au bout de quelques minutes sur la partie haute du film. Ce type de films, dits « mobiles », drainent selon le processus de « régénération marginale » décrit initialement par Mysels [Mys59]. Dans ce processus, des portions de film sont absorbées au niveau des bords et sont remplacées par des zones plus fines, lesquelles s'accumulent ensuite par convection sur la partie supérieure du film. L'origine de ce phénomène, assez complexe, est aujourd'hui encore matière à débat [Nie98][Ara01].

Les films de protéines appartiennent à une autre catégorie de films, dits « rigides ». Leurs parois sont caractérisées par des coefficients viscoélastiques supérieurs à ceux des films « mobiles ». Au cours du drainage, ils ne présentent pas de franges colorées horizontales. Par contre, leur surface est parsemée de petites taches multicolores qui indiquent que l'épaisseur du film est très hétérogène. Ces films s'affinent selon un processus non uniforme qui implique des distorsions importantes au niveau de leurs parois. Des zones noires nucléent à différents endroits du film et finissent par envahir intégralement sa surface (Figure 3.20). Mysels *et al* ont montré que l'amincissement d'un film rigide est dû à un écoulement visqueux du cœur aqueux entre ses parois [Mys59].

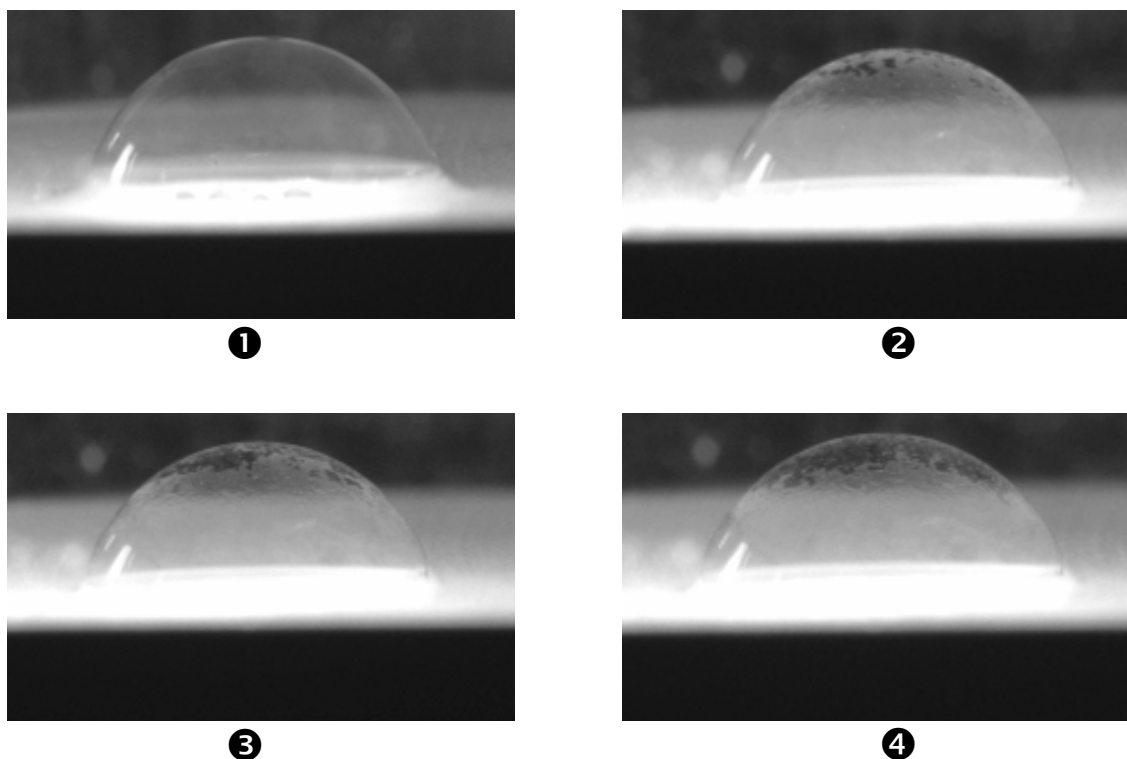


FIG. 3.20 – Photographies d'un film sphérique de β -lactoglobuline soufflé à la surface d'un poreux imbibé de solution ($\text{pH}=5,2$, sans sel). Le film est observé à différents moments du drainage. Sur la première image, le film est blanc brillant donc relativement épais ($\sim 700 \text{ \AA}$). Dans les minutes qui suivent, de petites taches noires apparaissent localement à la surface du film. Elles finissent ensuite par se rejoindre et à envahir intégralement la surface du film. A la différence des films de tensioactifs de petite taille, on n'observe pas de front noir horizontal qui se propage de haut en bas du film.

3.3.5 Structure d'un film de Newton de protéines

Nous allons discuter dans ce paragraphe de l'organisation moléculaire des films noirs de β -lactoglobuline obtenus dans les conditions optimales de stabilité déterminées précédemment ($\text{pH}\sim 5,3$, $c_{\beta\text{-lg}}=0,25 \text{ mg/mL}$ et $c_{\text{NaCl}}=5\times 10^{-3} \text{ mol/L}$). Les films sont formés après avoir laissé l'interface air/solution deux heures au repos, temps au bout duquel la tension de surface atteint sa valeur minimale. Quarante minutes après sa formation, le film a atteint son épaisseur d'équilibre.

Description générale

Le spectre de réflectivité X obtenu dans ces conditions présente quatre franges d'interférences bien distinctes (Figure 3.21). Il n'est pas possible de rendre compte de la forme de la courbe expérimentale en considérant le film comme une strate homogène. Seul un modèle à trois couches permet de décrire convenablement sa structure. Il existe donc un gradient de densité électronique significatif au sein du film.

Les paramètres structuraux, déduits de l'ajustement théorique du spectre de réflectivité, sont regroupés dans le tableau suivant. Au cours du traitement des données, la rugosité a été

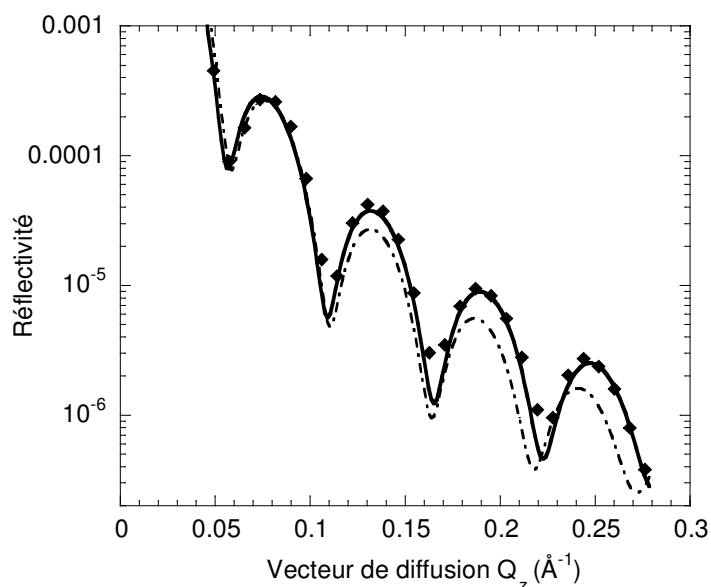


FIG. 3.21 – Courbe de réflectivité de rayons X d'un film noir de β -lactoglobuline (solution: $c_{\beta-lg}=0,25$ mg/mL, $c_{NaCl}=5\times 10^{-3}$, pH=5,3). Les points correspondent à la courbe expérimentale. La courbe en pointillés est le résultat d'une simulation numérique à l'aide d'un modèle à une couche. De toute évidence, elle ne permet pas de reproduire fidèlement l'intégralité du diagramme d'interférences obtenus expérimentalement. Il faut pour cela utiliser un modèle à trois couches (courbe en trait plein) qui indique qu'il existe un gradient de densité électronique le long de la normale du film.

considérée comme un paramètre ajustable, qu'on a supposé identique pour chacune des interfaces du film.

	épaisseur (Å)	$\delta\times 10^6$	rugosité (Å)
couches externes (1 et 3)	12,7	1,8	3,7
couche centrale (2)	87,5	1,4	3,7

D'après les valeurs de densité électronique qui caractérisent le film, il apparaît clairement que celui-ci ne possède pas de couche centrale d'eau liquide (*cf.* $\delta_{eau} = 3,56 \times 10^{-6}$). Le film en question est donc un film de Newton, compte-tenu du fait que les seules molécules d'eau qu'il contient doivent participer à l'hydratation des protéines. Ces molécules interagissent fortement avec les acides aminés de la chaîne peptidique et font partie intégrante de la structure de la protéine par le biais de liaisons hydrogène et d'interactions ioniques [Pes85].

L'épaisseur totale du film est de 113 Å, ce qui correspond environ à trois fois la taille caractéristique de la protéine dans son état natif (35,8 Å). On peut considérer plusieurs hypothèses quant à la structure moléculaire du film :

- soit le film est constitué de trois couches de protéines,
- soit il n'est composé que de deux couches de protéines très dénaturées (chaînes peptidiques dépliées).

Nous allons tester ces deux hypothèses en calculant l'aire moyenne occupée par une protéine

dans le film dans chacune de ces situations. Pour cela, on a utilisé la formule suivante :

$$n_{e^- \text{ total}} = A (2e_{ext}\rho_{ext} + e_{cen}\rho_{cen}) \quad (3.24)$$

où : $n_{e^- \text{ total}}$ correspond au nombre total d'électrons contenus le long d'une section du film d'aire A ; ρ_{ext} et e_{ext} sont respectivement la densité électronique et l'épaisseur des couches externes du film (*cf.* tableau). De manière analogue, les paramètres ρ_{cen} et e_{cen} se rapportent à la couche centrale du film.

En remplaçant ρ par son expression en fonction de la densité électronique réduite δ , il vient :

$$A = \frac{\lambda^2 r_e}{2\pi} \frac{n_{e^- \text{ total}}}{2 e_{ext}\delta_{ext} + e_{cen}\delta_{cen}} \quad (3.25)$$

Hypothèse d'un modèle à trois couches de protéines Le nombre d'électrons contenus dans une molécule de β -lactoglobuline hydratée⁸ est d'environ 13 000. En supposant que le film comporte trois couches de protéines, on a $n_{e^- \text{ total}}=39\ 000$. On trouve alors que A vaut $\sim 2400 \text{ \AA}^2$. Cette valeur semble raisonnable compte-tenu du fait que l'aire occupée par une protéine, au moment de l'effondrement (« collapse ») d'une couche de β -lactoglobuline à l'interface air/solution, se situe autour de 2000 \AA^2 [Bos96].

Hypothèse d'un modèle à deux couches de protéines En considérant cette fois-ci que le film est constitué de deux couches de protéines, on a $n_{e^- \text{ total}}=26\ 000$. L'équation 3.25 donne alors $A \sim 1600 \text{ \AA}^2$. Cette valeur est donc inférieure à l'aire occupée par une protéine au moment du « collapse » [Bos96]. Il faut noter que le « collapse » est induit par la compression de la couche d'adsorption considérée à l'aide d'une barrière de Langmuir. Or, les films que nous étudions ici ne sont pas sous contrainte mécanique. Par conséquent, il ne semble pas réaliste que l'aire moyenne par protéine soit aussi restreinte dans les parois du film.

En conclusion, l'hypothèse d'un modèle à trois couches de protéines semble être la plus probable. Elle semble d'autant plus raisonnable que la β -lactoglobuline possède une structure tridimensionnelle plutôt rigide, liée à la présence de liaisons disulfide intramoléculaires. A la différence des protéines flexibles comme la β -caséine, les protéines globulaires conservent de nombreux éléments de leur structure en solution lorsqu'elles sont impliquées dans des couches d'adsorption denses [Fan97] [Pos03]. Elles se dénaturent partiellement aux interfaces, mais on ne s'attend pas à ce que leurs dimensions changent de manière dramatique une fois adsorbées. Un modèle à deux couches aurait signifié que les molécules de β -lactoglobuline adoptaient une conformation très dépliée dans les films (*cf.* $e_{film}=113 \text{ \AA}$).

Protéines adsorbées au niveau des couches externes du film

Le profil de densité électronique du film (Figure 3.22) se caractérise par la présence de deux pics à chacune des interfaces air/film.

8. En solution, le taux d'hydratation moyen d'une protéine est d'environ 2 molécules d'eau par acide aminé (chargé, polaire, ou hydrophobe) [Cre93]. Ici, pour une protéine adsorbée, on a fait le calcul en supposant deux molécules d'eau en moyenne par acide aminé chargé ou polaire.

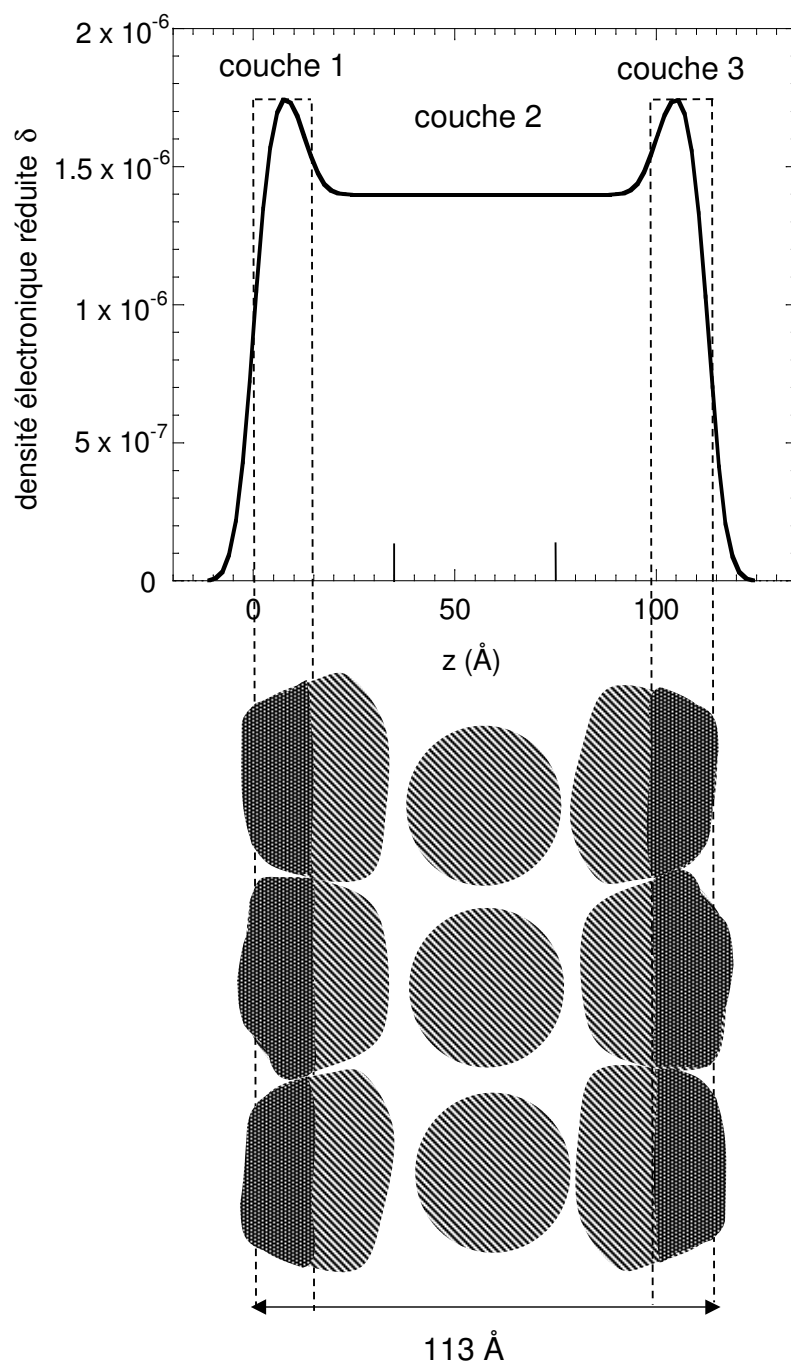


FIG. 3.22 - Profil de densité électronique d'un film noir de β -lactoglobuline (solution: $c_{\beta\text{-lg}}=0,25$ mg/mL, $c_{\text{NaCl}}=5 \times 10^{-3}$, pH=5,3). Ce profil est construit à partir des données structurales présentées au paragraphe précédent (cf. tableau) dans le cadre d'un modèle à trois couches. L'interprétation des informations qu'il regroupe nous a conduit à considérer un film constitué de trois couches de protéines (cf. dessin). Les strates externes du film, caractérisées par des pics de densité électronique, indiquent une dénaturation partielle des protéines au contact de l'air.

La différence de densité électronique entre la couche centrale et les couches externes du film suggère que les protéines contenues dans ces différentes parties ne possèdent pas la même conformation. En effet, on s'attend à ce que la structure et l'hydratation des protéines se modifient partiellement au contact de l'interface. Fang *et al* ont montré par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier que la structure en tonneau β , qui caractérise la cavité hydrophobe de la protéine, était perturbée à l'interface huile/eau [Fan97]. Des études de réflectivité de neutrons à l'interface air/solution ont aussi abouti à la conclusion que la β -lactoglobuline se dénaturait partiellement une fois adsorbée, et ce particulièrement à l'approche du point isoélectrique [Atk95]. Le phénomène de dénaturation, favorable d'un point de vue énergétique, permet à des groupements hydrophobes, enfermés dans le coeur de la structure native de la protéine, de s'exposer à l'air. Il pourrait donc expliquer l'excès de densité électronique observé au contact de l'air dans les films noirs de β -lactoglobuline. On peut noter que ce même type de profil a déjà été observé pour des films de polyélectrolyte tels que les HMPAANa.⁹ Ces derniers sont constitués d'une chaîne principale chargée sur laquelle ont été greffée des groupements alkyles hydrophobes. Ils forment des films stables dont les couches externes au contact de l'air sont plus riches en monomère que la couche centrale. Les polymères adsorbés peuvent ainsi exposer à l'air un maximum de groupement alkyl [Mil99].

En conclusion, l'excès de densité électronique observé dans les films de polyélectrolyte est le résultat d'une optimisation de leur conformation aux interfaces, sous l'effet d'interaction hydrophobe.

Protéines contenues dans le coeur du film

La couche centrale du film (87,5 Å) contient une partie des acides aminés des protéines adsorbées au contact de l'air, ainsi qu'une couche complète de protéines (Figure 3.21). Le coeur du film étant hydrophile, les protéines qu'il renferme gardent probablement une conformation proche de leur état natif. Cependant, comment expliquer la formation de cette troisième couche? Les films que nous étudions ont été obtenus au point isoélectrique de la protéine. A ce pH, les solutions de β -lactoglobuline sont un mélange de dimères et d'octamères. L'équilibre entre ces deux formes est en faveur du dimère à température ambiante [Pau92]. Il existe peu d'information concernant la compétition entre dimères et octamères aux interfaces. Cependant, l'adsorption des dimères est a priori privilégiée d'un point de vue cinétique. De plus, il semble que les octamères soient instables aux interfaces et se dissocient rapidement en monomères et dimères [Elo97]. Par conséquent, les films de β -lactoglobuline doivent être un assemblage de ces deux dernières formes. La formation d'une troisième couche de protéines au coeur du film peut être attribuée à la présence de dimères adsorbés perpendiculairement à l'interface (Figure 3.23). Par ailleurs, d'autres protéines, initialement présentes dans la phase aqueuse du film juste formé, ont pu être emprisonnées au cours du drainage.

9. HMPAANa est le sigle de polyacrylates de sodium hydrophobiquement modifiés.

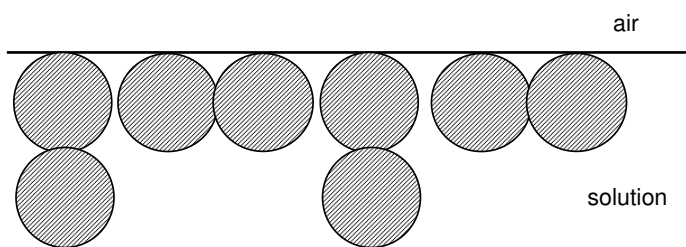


FIG. 3.23 – Dimères de β -lactoglobuline ($3,58 \times 6,93$ nm) adsorbés à l'interface air/solution : les dimères peuvent soit s'allonger à l'interface, soit s'ancrer perpendiculairement à elle.

3.3.6 Conclusion

Nous sommes donc parvenus à contrôler la formation de films noirs de β -lactoglobuline de taille macroscopique et à déterminer leur structure moléculaire. Pour cela, nous avons optimisé les paramètres de la solution (pH, concentration en protéines et en électrolyte) afin de permettre la formation de couches d'adsorption suffisamment denses pour que les films soient stables, mais pas trop chargées en molécules pour que les films puissent drainer jusqu'au stade noir. Ce compromis subtil entre films instables et films inhomogènes de type gel n'est pas évident à trouver pour des films de si grande taille (~ 2 cm²). Les diverses tentatives entreprises avec d'autres protéines comme la β -caséine ou l' α -lactalbumine n'ont pas abouti. Autrement dit, nous n'avons pas trouvé pour ces protéines la fenêtre expérimentale qui conduit à la formation de films noirs stables. Pour pouvoir étudier une gamme de films noirs plus large, il faut avoir recours à des techniques ne nécessitant que des films de taille microscopique.

Dans la suite de ce travail, nous allons déterminer la perméabilité à l'air et l'angle de contact de différents films noirs de protéines. Ces deux paramètres reflètent de manière indirecte l'organisation moléculaire des films considérés.

Bibliographie

- [Ang80] Z.K. ANGARSKA, G.P. YAMPOL'SKAYA, L.E. BOBROVA, V.N. IZMAILOVA, *Formation and Stability of Black Foam Films of Globular Protein*, Colloid Journal of the USSR **42**(3), 352-356 (1980).
- [Ara01] A. ARADIAN, E. RAPHAËL, P.G. DE GENNES, *"Marginal Pinching" in Soap Films*, Europhysics Letters **55**(6), 834-840 (2001).
- [Asn97] A. ASNACIOS, A. ESPERT, A. COLIN, D. LANGEVIN, *Structural Forces in Thin Films Made From Polyelectrolyte Solutions*, Physical Review Letters **78**(26), 4974-4977 (1997).
- [Atk95] P.J. ATKINSON, E. DICKINSON, D.S. HORNE, R.M. RICHARDSON, *Neutron Reflectivity of Adsorbed β -Casein and β -Lactoglobulin at the Air/Water Interface*, Journal of the Chemical Society, Faraday Transaction **91**(17), 2847-2854 (1995).
- [Bel91a] O. BÉLORGEY, J.J. BENATTAR, *Structural Properties of Soap Black Films Investigated by X-Ray Reflectivity*, Physical Review Letters **66**(3), 313-316 (1991).
- [Bel91b] O. BÉLORGEY, *Réflexion des Rayons X sur les Films Noirs de Savon*, Thèse de l'Université de Paris XI (1991).
- [Ben92] J.J. BENATTAR, A. SCHALCHLI, O. BÉLORGEY, *X-Ray Reflectivity Investigation of Newton and Common Black Films*, Journal de Physique, I. **2**, 955-968 (1992).
- [Ber92] V. BERGERON, C.J. RADKE, *Equilibrium Measurements of Oscillatory Disjoining Pressures in Aqueous Foam Films*, Langmuir **8**, 3020-3026 (1992).
- [Ber96a] V. BERGERON, A. WALTERMO, P.M. CLAESON, *Disjoining Pressure Measurements for Foam Films Stabilized by a Nonionic Sugar-Based Surfactant*, Langmuir **12**, 1336-1342 (1996).
- [Ber96b] V. BERGERON, D. LANGEVIN, A. ASNACIOS, *Thin-Films Forces in Foam Films Containing Anionic Polyelectrolyte and Charged Surfactants*, Langmuir **12**, 1550-1556 (1996).
- [Ber99] V. BERGERON, *An Introduction to Forces and Structure in Individual Foam and Emulsion Films in Foams and Emulsions*, J.F. Sadoc and N. Rivier (eds), the Netherlands: Kluwer Academic Publishers (1999) p45.
- [Bor80] M. BORN, E. WOLF, *Principle of Optics*, Pergamon : London, 1980.
- [Bos96] M.A BOS, T. NYLANDER, *Interaction between β -Lactoglobulin and Phospholipids at the Air/Water Interface*, Langmuir **12**, 2791-2797 (1996).
- [Bre04] F. BRESME, J. FARAUDO, *Computer Simulation Studies of Newton Black Films*, Langmuir **20**(12), 5127-5137 (2004).

- [Coh77] C. COHEN-TANNOUJJI, B. DIU, F. LALOË, *Mécanique Quantique, Tome II*, Hermann : Paris, 1977, Chapitre VIII.
- [Coh91] R. COHEN, R. KOYNOVA, B. TENCHOV, D. EXEROWA, *Direct Measurement of Interaction Forces in Free Thin Liquid Films Stabilized with Phosphatidylcholine*, European Biophysics Journal **20**, 203-208 (1991).
- [Cor61] J.M. CORKILL, J.F. GOODMAN, D.R. HAISMAN, S.P. HARROLD, *The Thickness and Composition of Thin Detergent Films*, Transactions of the Faraday Society **57**, 821-828 (1961).
- [Cre93] T.E. CREIGHTON, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, 2nd edition, W.H. Freeman and Company: New York (1993) p262.
- [Cuv00] N. CUVILLIER, F. MILLET, V. PETKOVA, M. NEDYALKOV, J.J. BENATTAR, *Structure of Freestanding Phospholipidic Bilayer Films*, Langmuir **16**, 5029-5035 (2000).
- [DeF78] J. A. DE FEIJTER, J. B. RIJNBOUT, A. VRIJ, *Contact Angles in Thin Liquid Films, II. Contact Angles Measurements in Newton Black Soap Films*, Journal of Colloid and Interface Science **64**(2), 269-277 (1978).
- [DeG01] P.G. DE GENNES, *"Young" Soap Films*, Langmuir **17**, 2416-2419 (2001).
- [Der76] B.V. DERJAGUIN, N.V. CHURAEV, *The Definition of Disjoining Pressure and its Importance in the Equilibrium and Flow of Thin Films*, Colloid Journal of the USSR **38**(3), 402-410 (1976).
- [Der78] B.V. DERJAGUIN, N.V. CHURAEV, *On the Question of Determining the Concept of Disjoining Pressure and its Role in the Equilibrium and Flow of Thin Films*, Journal of Colloid and Interface Science **66**(3), 389-398 (1978).
- [Elo97] U.M. ELOFSSON, M.A. PAULSSON, T. ARNEBRANT, *Adsorption of β -Lactoglobulin A and B in Relation to Self-Association: Effect of Concentration and pH*, Langmuir **13**, 1695-1700 (1997).
- [Exe81] D. EXEROWA, A. NIKOLOV, M. ZACHARIEVA, *Common Black and Newton Film Formation*, Journal of Colloid and Interface Science **81**(2), 419-429 (1981).
- [Exe87] D. EXEROWA, T. KOLAROV, K. KHRISTOV, *Direct Measurement of Disjoining Pressure in Black Foam Films. I. Films from Ionic Surfactant*, Colloids and Surfaces **22**, 171-185 (1987).
- [Exe92] D. EXEROWA, D. KASHCHIEV, D. PLATIKANOV, *Stability and Permeability of Amphiphile Bilayers*, Advances in Colloid and Interface Science **40**, 201-256 (1992).
- [Fan97] Y. FANG, D.G. DALGLEISH, *Conformation of β -Lactoglobulin Studied by FTIR: Effect of pH, Temperature, and Adsorption to the Oil-Water Interface*, Journal of Colloid and Interface Science **196**, 292-298 (1997).
- [Gam92] Z. GAMBA, J. HAUTMAN, J.C. SHELLEY, M.L. KLEIN, *Molecular Dynamics Investigation of a Newton Black Film*, Langmuir **8**, 3155-3160 (1992).
- [Gra79] D.E. GRAHAM, M.C. PHILLIPS, *Proteins at Liquid Interfaces. II. Adsorption Isotherms*, Journal of Colloid and Interface Science **70**(3), 415-426 (1979).
- [Gue95] P. GUENOUN, A. SCHALCHLI, D. SENTENAC, J.W. MAYS, J.J. BENATTAR, *Free-Standing Black Films of Polymers: a Model of Charged Brushes in Interaction*, Physical Review Letters **74**(18), 3628-3631 (1995).

- [Ibb69] G. IBBOTSON, M.N. JONES, *Effects of Ion Valency on Formation of Second Black Soap Films*, Transactions of the Faraday Society **65**, 1146-1152 (1969).
- [Isr91] J. ISRAELACHVILI, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press: San Diego, second ed., 1991.
- [Jam82] R.W. JAMES, *The Optical Principles of the Diffraction of X-Rays*, Oxbow Press: Woodbridge, Connecticut, 1982 p135.
- [Jon66] M.N. JONES, K.J. MYSELS, P. SCHOLTEN, *Stability and some Properties of the Second Black Film*, Transactions of the Faraday Society **62**, 1336-1348 (1966).
- [Kli01] R. VON KLITZING, H.J. MÜLLER, *Comparison of Different Polymer-like Structures in the Confined Geometry of Foam Films*, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **176**, 109-116 (2001).
- [Kru97] R. KRUSTEV, D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV, *Permeability of Common Black Foam Films to Gas, Part 2*, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **123-124**, 383-390 (1997).
- [Lan00] D. LANGEVIN, *Influence of Interfacial Rheology on Foam and Emulsion Properties*, Advances in Colloid and Interface Science **88**, 209-222 (2000).
- [Man01a] M. MANCIU, E. RUCKENSTEIN, *Role of the Hydration Force in the Stability of Colloids at High Ionic Strengths*, Langmuir **17**, 7061-7070 (2001).
- [Man01b] M. MANCIU, E. RUCKENSTEIN, *Oscillatory and Monotonic Polarization. The Polarization Contribution to the Hydration Force*, Langmuir **17**, 7582-7592 (2001).
- [Mar02] A.H. MARTIN, K. GROLLE, M.A. BOS, M.A. COHEN STUART, T. VAN VLIET, *Network Forming Properties of Various Proteins Adsorbed at the Air/Water Interface in Relation to Foam Stability*, Journal of Colloid and Interface Science **254**, 175-183 (2002).
- [Mil99] F. MILLET, J.J. BENATTAR, P. PERRIN, *Vertical Free-Standing Films of Amphiphilic Associating Polyelectrolytes*, Physical Review E **60**(2), 2045-2050 (1999).
- [Mys59] K.J. MYSELS, K. SHINODA, S. FRANKEL, *Soap Films: Studies of their Thinning*, Pergamon: London, 1959.
- [Mys66] K.J. MYSELS, M.N. JONES, *Direct Measurement of the Variation of Double-Layer Repulsion with Distance*, Discussions of the Faraday Society **42**, 42-50 (1966).
- [New04] I. NEWTON, *Opticks*, S. Smith & B. Walford: London, 1704.
- [Nie98] V.A. NIERSTRASZ, G. FRENS, *Marginal Regeneration in Thin Vertical Liquid Films*, Journal of Colloid and Interface Science **207**, 209-217 (1998).
- [Nin99] M.R.R. NIÑO, C.C. SANCHEZ, J.M.R. PATINO, *Interfacial Characteristics of β -Casein Spread Films at the Air/Water Interface*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **12**, 161-173 (1999).
- [Pau92] M. PAULSSON, P. DEJMEK, *Surface Film Pressure of β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin and Bovine Serum Albumin at the Air/Water Interface Studied by Wilhelmy Plate and Drop Volume*, Journal of Colloid and Interface Science **150**(2), 394-403 (1992).
- [Per03] L.G. CASCAO PEREIRA, C. JOHANSSON, C.J. RADKE, H.W. BLANCH, *Surface Forces and Drainage Kinetics of Protein-Stabilized Aqueous Films*, Langmuir **19**, 7503-7513 (2003).

- [Pes85] H. PESSEN, J.M. PURCELL, H.M. FARRELL JR, *Proton Relaxation Rates of Water in Dilute Solutions of β -Lactoglobulin. Determination of Cross Relaxation and Correlation with Structural Changes by the Use of two Genetic Variants of a Self-Associating Globular Protein*, Biochimica et Biophysica Acta **828**, 1-12 (1985).
- [Pet03] V. PETKOVA, C. SULTANEM, M. NEDYALKOV, J.J. BENATTAR, M.E. LESER, C. SCHMITT, *Structure of a Freestanding Film of β -Lactoglobulin*, Langmuir **19**, 6942-6949 (2003).
- [Pla81] D. PLATIKANOV, G.P. YAMPOL'SKAYA, N.I. RANGELOVA, Z.K. ANGARSKA, L.E. BOBROVA, V.N. IZMAILOVA, *Free Black Protein Films , 2. Thermodynamic Parameters*, Colloid Journal of the USSR **43**(1), 149-152 (1981).
- [Pos03] C. POSTEL, O. ABILLON, B. DESBAT, *Structure and Denaturation of Adsorbed Lysozyme at the Air/Water Interface*, Journal of Colloid Science **266**, 74-81 (2003).
- [Rad83] B. RADOEV, A. SCHELUDKO, E. MANEV, , Journal of Colloid and Interface Science **95**, 254- (1983).
- [Sch67] A. SCHELUDKO, *Thin Liquid Films*, Advances in Colloid and Interface Science **1**, 391-464 (1967).
- [Sch68] A. SCHELUDKO, B. RADOEV, T. KOLAROV, *Tension of Liquid Films and Contact Angles between Film and Bulk Liquid*, Transactions of the Faraday Society **64**, 2213-2220 (1968).
- [Sch94] A. SCHALCHLI, *Nouvelles Perspectives avec la Réflectivité X pour les Films Minces, les Films Noirs et les Membranes*, Thèse de l'Université de Paris VI (1994).
- [Sen97] D. SENTENAC, , Thèse de l'Université de Paris XI (1997).
- [Sen98] D. SENTENAC, J.J. BENATTAR, *Long Range Hydration Effects in Electrolytic Free Suspended Black Films*, Physical Review Letters **81**(1), 160-163 (1998).
- [Stu03] C. STUBENRAUCH, R. VON KLITZING, *Disjoining Pressure in Thin Liquid Foam and Emulsion Films-New Concepts and Perspectives*, Journal of Physics: Condensed Matter **15**, R1197-R1232 (2003).
- [Stu04] C. STUBENRAUCH, R. STREY, *Phase Diagrams of Nonionic Foam Films: New Interpretation of Disjoining Pressure vs Thickness Curves*, Langmuir **20**(13), 5185-5188 (2004).
- [Tos75] B.V. TOSHEV, I.B. IVANOV, *Thermodynamics of Thin Liquid Films. I. Basic Relations and Conditions of Equilibrium*, Colloid & Polymer Science **253**, 558-565 (1975).
- [Tra02] J.F. TRANCHANT, F. BONTÉ, S. LEROY, M. NEDYALKOV, D. PLATIKANOV, I. JAVIERRE, J.J. BENATTAR, *Black Foam Films from Aqueous Solutions of a Mixture of Phospholipids and a Permeation Enhancer*, Journal of Colloid and Interface Science **249**, 398-404 (2002).
- [Vri66] A. VRIJ, *Possible Mechanism for the Spontaneous Rupture of Thin Free Films*, Discussions of the Faraday Society **42**, 23-33 (1966).
- [Wit96] J.N. DE WIT, T. VAN KESSEL, *Effects of Ionic Strength on the Solubility of Whey Protein Products. A Colloid Chemical Approach*, Food Hydrocolloids **10**(2), 143-149 (1996).

Chapitre 4

Perméabilité à l'air des films minces de protéines

La perméabilité à l'air des films minces est un paramètre crucial pour étudier la stabilité des mousses. En effet, elle permet de caractériser le mûrissement d'Ostwald, phénomène au cours duquel l'air diffuse des petites bulles vers les plus grosses à travers le film qui les sépare. Comme nous le verrons au chapitre 6, le mûrissement d'Ostwald est en partie responsable de la déstabilisation des mousses. Les travaux déjà réalisés sur le sujet ont montré que la perméabilité des films noirs était étroitement corrélée à la structure des couches moléculaires adsorbées. Après avoir détaillé la méthode expérimentale de mesure de la perméabilité, nous passerons en revue les résultats déjà établis pour les films noirs de tensioactifs de petite taille. Nous les confronterons ensuite aux caractéristiques des films noirs de protéines que nous avons dégagées de nos expériences. Nous verrons que le comportement spécifique de ces films est déterminé par l'irréversibilité de l'adsorption des protéines et les propriétés rhéologiques des couches qu'elles forment à l'interface air/solution.

4.1 Technique expérimentale de mesure

4.1.1 Dispositif expérimental

Les expériences consistent à observer la décroissance d'une bulle qui se vide de son contenu en air par le film qui la sépare de la phase atmosphérique [Pla80] [Ned85].

Plus précisément, une bulle d'un rayon compris entre 200 et 250 μm est formée à l'aide d'une microseringue dans la solution de tensioactifs étudiée. Moins dense que la solution environnante, la bulle monte immédiatement à la surface. Un film apparaît alors sur le haut de la bulle, au point de contact avec la surface (Figure 4.1). Sa formation résulte de l'équilibre des forces verticales suivantes :

- $G = \frac{4}{3}\pi R^3 \rho g$, la poussée d'Archimède qui tend à presser la bulle contre la surface de la solution,
- et $F_\sigma = 2\pi r \sigma \sin \psi$, qui s'y oppose.

La poussée d'Archimède favorise la formation de grands films, tandis que F_σ tend à limiter leur taille.

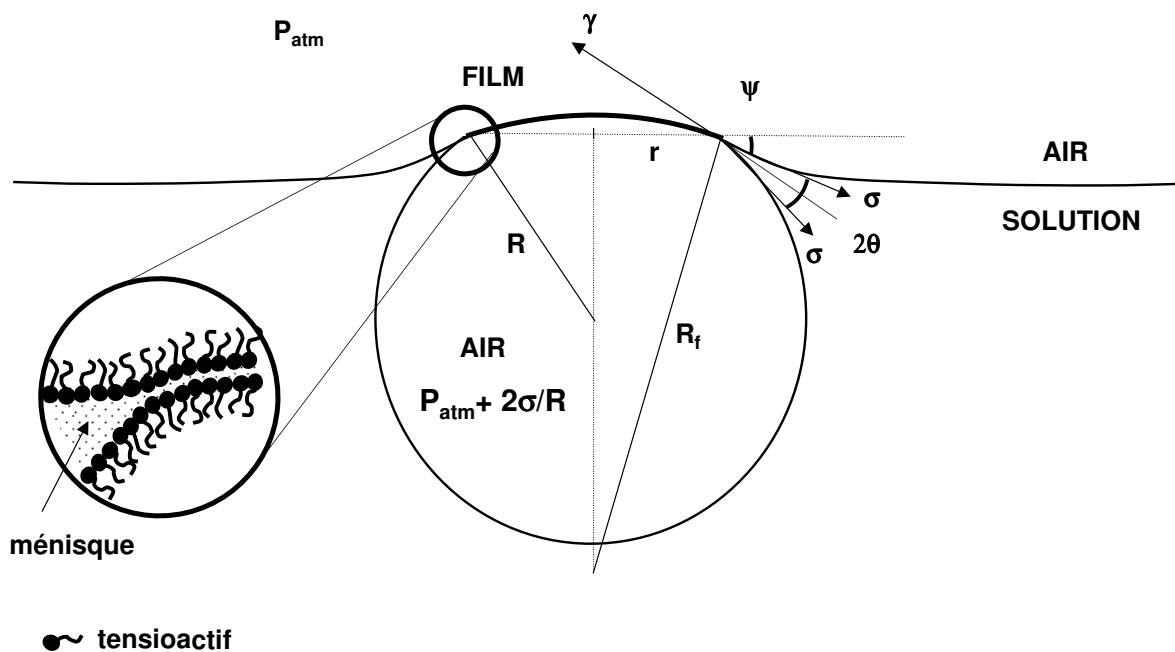


FIG. 4.1 – Bulle de tensioactifs adsorbée à la surface de la solution

La différence de pression de part et d'autre du film est égale à la pression de Laplace, aussi appelée pression capillaire ($p_c = \frac{2\sigma}{R}$). Elle est à l'origine de la diffusion des molécules d'air de l'intérieur de la bulle vers l'extérieur, en passant à travers le film. Cela se traduit expérimentalement par une diminution continue des rayons du film et de la bulle. Cependant, le processus diffusif étant relativement lent, on peut considérer que la bulle et son film sont en permanence à l'équilibre thermodynamique; il est donc possible de déterminer leurs dimensions à un instant donné. On utilise pour cela un microscope optique (en lumière blanche) connecté à une caméra CCD (Figure 4.2). Les photographies acquises sont ensuite traitées à l'aide du logiciel IMAQ Vision Builder 6.0 (National Instrument).

4.1.2 Description théorique : le modèle diffusif

D'après la loi de Fick exprimée pour un flux unidimensionnel, le nombre de moles de gaz dN transférées à travers un film de surface A pendant un intervalle de temps dt est proportionnel au gradient de concentration en gaz suivant l'épaisseur du film (h) :

$$\frac{dN}{dt} = -DA \frac{dC}{dh} \quad (4.1)$$

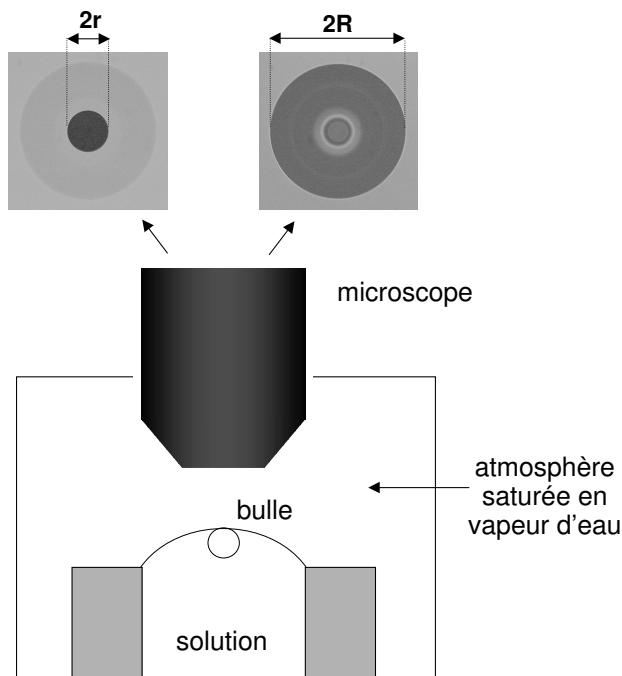


FIG. 4.2 – Schéma du dispositif expérimental : les bulles de tensioactifs sont formées dans une cellule en atmosphère confinée afin d'éviter la déshydratation des films. On suit leur décroissance en fonction du temps à l'aide d'un microscope placé au-dessus. A un instant donné, on photographie le rayon de la bulle et celui du film en modifiant le plan de focalisation de l'objectif.

D étant le coefficient de diffusion moléculaire. En régime permanent (stationnaire), il vient :

$$\frac{dN}{dt} = -DA \frac{\Delta C}{h} = -KA \Delta C \quad (4.2)$$

ΔC représente la différence de concentration en gaz de part et d'autre du film. Le coefficient de perméabilité du film (K) est défini par le rapport $K = D/h$ et a pour unité le $cm.s^{-1}$.

En considérant l'air comme un gaz parfait, on peut exprimer $N(t)$ et ΔC de la manière suivante:

$$N(t) = \frac{(p_{atm} + \frac{2\sigma}{R}) \frac{4}{3}\pi R^3}{R_{gp} T} \quad (4.3)$$

où R_{gp} est la constante universelle des gaz parfaits.

$$\Delta C = \frac{2\sigma}{R} \frac{1}{R_{gp} T} \quad (4.4)$$

On peut remarquer qu'en prenant $\frac{4}{3}\pi R^3$ pour le volume de la bulle, on néglige implicitement les déformations liées à la gravité. En effet, la longueur capillaire¹ (notée κ^{-1}) d'une solution de

1. La longueur capillaire est estimée en comparant la pression de Laplace σ/κ^{-1} à la pression hydrostatique $\rho g \kappa^{-1}$ lorsqu'on plonge à une profondeur κ^{-1} dans un liquide de densité ρ soumis au champ de gravité terrestre $g = 9.8 m.s^{-2}$. L'égalité de ces deux pressions permet de déterminer l'expression de κ^{-1} utilisée ci-dessus. Pour

protéines ($\sigma \sim 50 \text{ mN.m}^{-1}$) vaut typiquement :

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\sigma}{\rho g}} \simeq 2.26 \text{ mm} \quad (4.5)$$

L'approximation sphérique est donc acceptable pour des bulles d'un diamètre inférieur à $500 \mu\text{m}$ comme celles utilisées lors de nos expériences.

Nous supposons également que le film qui se forme au haut de la bulle est plan. En effet, en toute rigueur, on a :

$$p_c = \frac{2\gamma}{R_f} = \frac{2\sigma}{R} \quad (4.6)$$

où γ et R_f sont respectivement la tension et le rayon de courbure du film. En exprimant l'équilibre des forces au niveau de la ligne de contact du film, on a (Figure 4.1) :

$$\gamma = 2\sigma \cos \theta \quad (4.7)$$

θ étant l'angle de contact du film avec ses ménisques (*cf.* chapitre 5). Pour l'ensemble des films étudiés, $\cos \theta$ est très près de 1. Par conséquent, il vient :

$$\gamma \simeq 2\sigma \quad (4.8)$$

Soit, d'après (4.6) :

$$R_f \simeq 2R \quad (4.9)$$

La courbure du film étant presque deux fois plus petite que celle de la bulle, nous la négligerons dans la suite des calculs. L'aire du film A sera donc assimilée à πr^2 .

En remplaçant $N(t)$, ΔC et A par leurs expressions dans l'équation (4.2), on obtient :

$$K r^2 dt = -\frac{4}{3} \left(\frac{p_{atm}}{2\sigma} 3R^3 dR + 2R^2 dR \right) \quad (4.10)$$

Après intégration sur l'intervalle $[0;t]$, il vient [Kru96] :

$$K = \frac{\frac{p_{atm}}{2\sigma} (R_{t=0}^4 - R_t^4) + \frac{8}{9} (R_{t=0}^3 - R_t^3)}{\int_0^t r^2 dt} \quad (4.11)$$

C'est à l'aide de cette formule que l'on calcule expérimentalement la perméabilité des films en observant la décroissance simultanée des rayons de la bulle et du film sur un intervalle de temps $[0;t]$. La tension de surface σ est déterminée séparément par la méthode de Wilhelmy (*cf.* § 2.3).

On peut remarquer que l'expression de K , déduite d'un modèle purement diffusif, s'appuie implicitement sur les deux hypothèses suivantes :

- la barrière d'énergie qui s'oppose au passage des molécules d'air à travers le film reste constante dans le temps (à une température donnée),

des échelles de taille inférieure à κ^{-1} , on considère que l'effet de la gravité est négligeable [DeG02].

- la quantité de molécules d'air qui traverse les parois de la bulle et passe directement en solution est négligeable devant celle qui traverse le film.

Nous verrons par la suite que si ces hypothèses sont vérifiées pour des films stabilisés par des tensioactifs de petite taille, les films de protéines présentent eux un comportement plus complexe qui nécessitera un modèle plus élaboré.

4.1.3 Limites de la technique

L'incertitude sur la détermination de K est a priori d'autant plus petite que les rayons du film et de la bulle seront mesurés avec précision :

- le rayon d'une bulle est connu à ± 4 pixels près, ce qui correspond à une erreur d'environ $\pm 1,5 \mu m$. Les facteurs qui limitent la qualité de cette mesure dépendent essentiellement de l'optique du dispositif (finesse de la mise au point) et du traitement numérique de l'image,
- la détermination du rayon d'un film ne dépend pas uniquement de ces incertitudes expérimentales. Elle est plus aléatoire dans la mesure où la frontière qui délimite le film de son ménisque n'est pas franche. En effet, prenons le cas d'un film noir relativement épais ($\sim 150 \text{ \AA}$), caractérisé par un angle de contact petit ($\leq 2^\circ$) (Figure 4.3). L'image qu'on obtient de ce film est constituée d'un disque noir entouré de plusieurs anneaux (clairs et sombres) dits de Newton, qui correspondent aux franges d'interférences de la lumière du microscope sur chacune des faces du ménisque. Dans ce cas, le disque noir observé inclut le film et une partie du ménisque. Le rayon qu'on mesure expérimentalement est donc supérieur au rayon réel du film noir. Cependant, cette indétermination sur la position de la ligne de contact entre le film et le ménisque est considérablement réduite dans le cas d'un film noir fin ($\sim 40 \text{ \AA}$), caractérisé par un angle de contact grand ($\geq 7^\circ$) (Figure 4.3).

Par conséquent, cette méthode de détermination de la perméabilité est d'autant plus précise qu'elle est utilisée pour des films caractérisés par des angles de contact grands. On estime que l'erreur globale maximale engendrée sur les mesures de K est de l'ordre de $\pm 5 \%$. En pratique, on observe que les valeurs de K sont déterminées à $\pm 20 \%$ pour un film de protéines donné. Cette dispersion des résultats n'est pas due à la technique elle-même ; elle est intrinsèque à la structure des films de protéines qui varie sensiblement d'une expérience à une autre.

Il existe une autre technique, appelée technique de la « bulle stationnaire », qui est plus adaptée à l'étude des films dont les angles de contact sont petits [Ned87]. Le principe consiste à former un film sphérique connecté au réservoir de solution par l'intermédiaire d'un verre poreux (Figure 4.4). Spontanément, l'air se met à diffuser à travers le film. Les pertes en gaz sont périodiquement compensées à l'aide d'un piston de manière à ce que la taille du film reste la même (p_c reste constante). La perméabilité du film est alors calculée à l'aide de la formule suivante:

$$K = \frac{p\Delta V}{4\pi\gamma h\Delta t} \quad (4.12)$$

La pression p et le volume d'air ΔV qui s'est échappé pendant l'intervalle de temps Δt sont mesurés expérimentalement. La hauteur de la calotte sphérique (h) et $\gamma = R_f/2p_c$ sont obtenus à l'aide d'un microscope horizontal (R_f est le rayon de courbure du film).

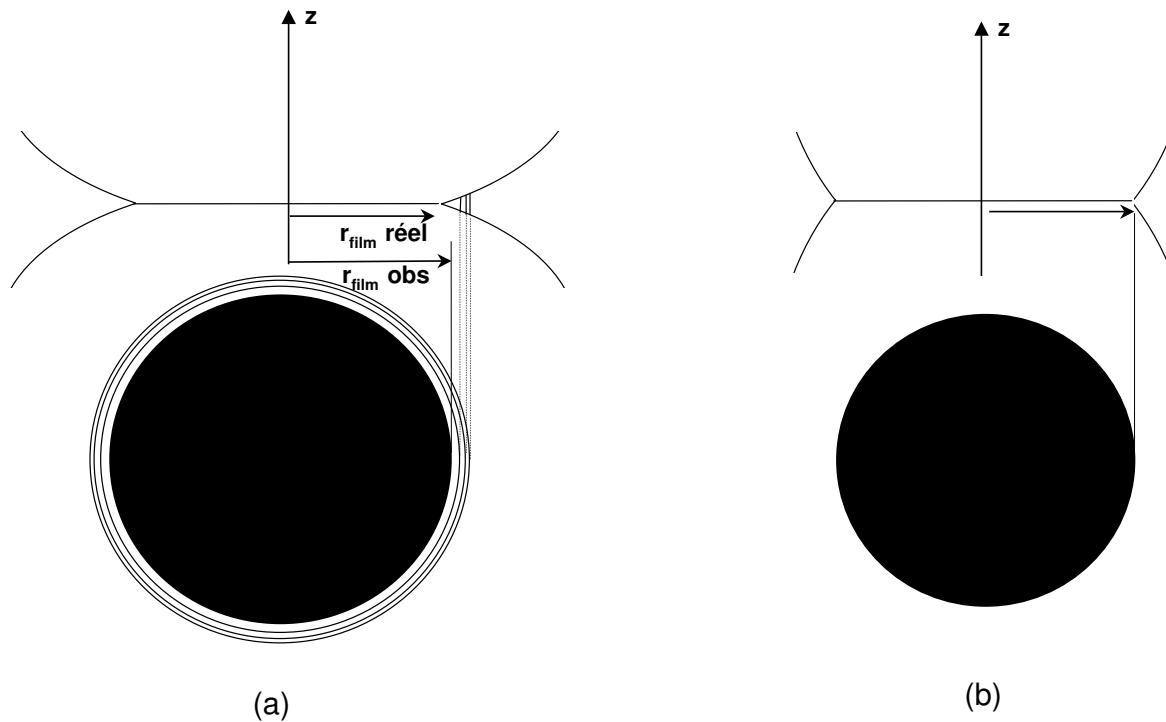


FIG. 4.3 – *Vue en coupe de deux films noirs : (a) l'un caractérisé par un angle de contact petit, (b) l'autre par un angle de contact grand. Les dessins situés au-dessous schématisent les images qu'on obtient par microscopie optique. Dans le cas (a), le rayon (r_{film}) observé expérimentalement ne correspond pas au rayon réel du film noir.*

L'avantage de cette technique réside dans le fait que les paramètres géométriques du film sont parfaitement connus. Cependant, elle requiert des films de plusieurs millimètres de rayon, c'est-à-dire d'une surface 1000 fois plus grande que celle des films étudiés avec la méthode précédente. Cette technique se prête donc bien à l'étude de films possédant de petits angles de contact, mais à condition que leur stabilité le permette! Les films noirs de protéines possèdent généralement des angles de contact bas, mais ils sont malheureusement très difficiles à obtenir pour des surfaces supérieures à quelques centièmes de mm^2 . C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas pu utiliser la technique de la « bulle stationnaire » pour déterminer leur perméabilité.

4.2 Perméabilités comparées des films noirs : du film commun au film de Newton

Les films communs possèdent une structure très distincte de celle des films de Newton (*cf.* § 3.1). Nous allons voir que ces différences structurelles confèrent à chacun des films des propriétés de perméabilité caractéristiques.

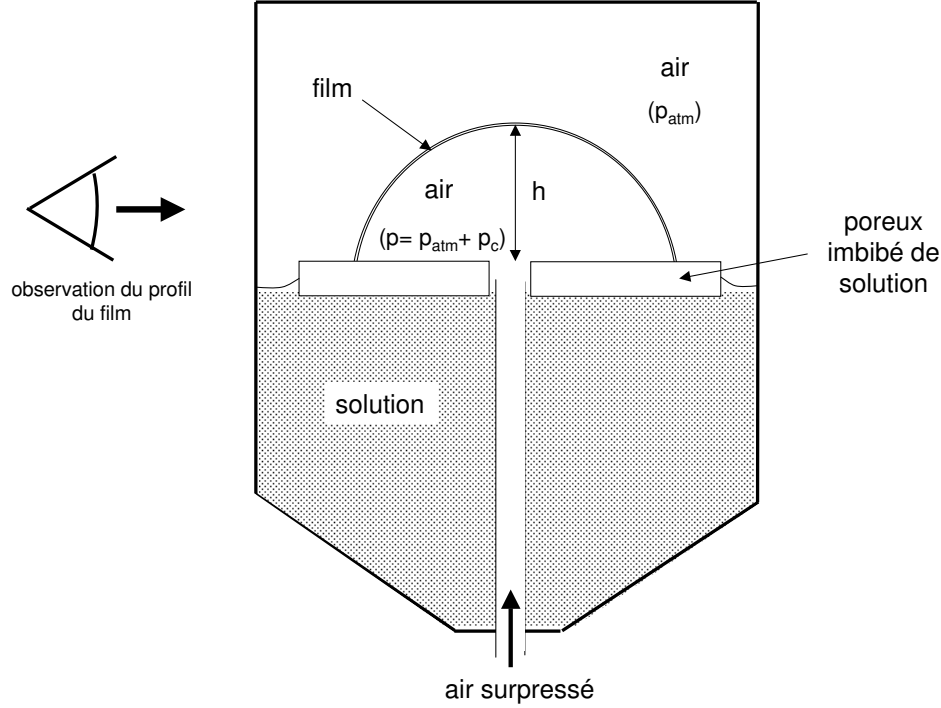


FIG. 4.4 – Vue en coupe d'un film sphérique raccordé au réservoir de solution par l'intermédiaire d'un verre poreux.

4.2.1 Expression de la perméabilité du film en fonction de celle des monocouches adsorbées

Princen et al ont proposé un modèle détaillé de la perméabilité des films en fonction des propriétés des différentes strates qui le composent, *i.e.* les deux couches de tensioactifs adsorbés et la couche centrale d'eau (Figure 4.5) [Pri65].

Le flux de gaz qui traverse le film en régime permanent est exprimé en appliquant l'équation (4.2):

$$\frac{dN}{dt} = -KA(C_2 - C_1) \quad (4.13)$$

On peut également exprimer ce même flux à travers la couche centrale d'eau et chacune des monocouches adsorbées :

$$\frac{dN}{dt} = -k_{eau}A(C'_2 - C'_1) = -\frac{D}{h_{eau}}A(C'_2 - C'_1) \quad (4.14)$$

$$\frac{dN}{dt} = -k_{mc}A(C'_1 - C_{sat1}) \quad (4.15)$$

$$\frac{dN}{dt} = -k_{mc}A(C_{sat2} - C'_2) \quad (4.16)$$

où k_{eau} et k_{mc} sont respectivement les perméabilités de la couche d'eau et des monocouches ; D est le coefficient de diffusion du gaz dans le liquide.

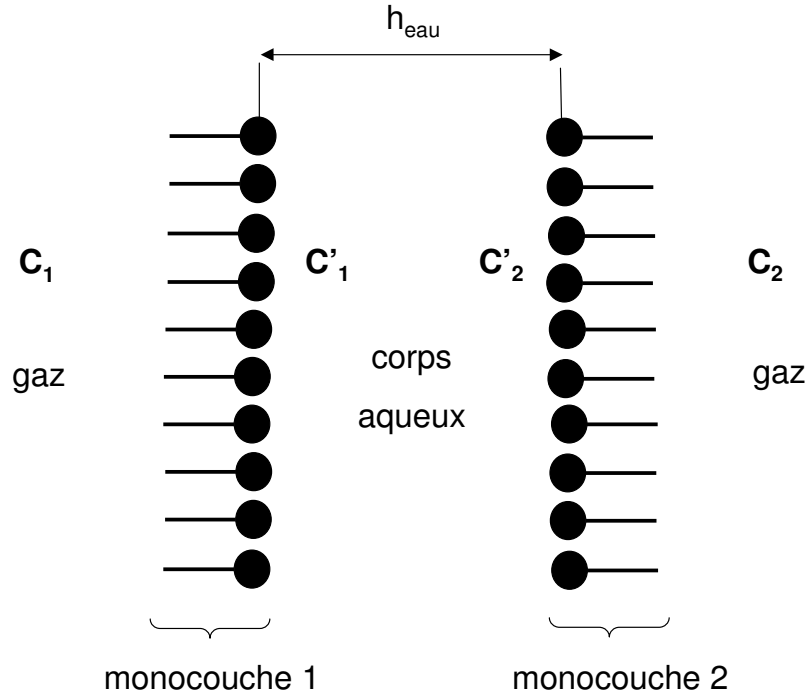


FIG. 4.5 – Représentation schématique d'un film mince plan constitué de deux parois de tensioactifs qui entourent une couche centrale de solution d'épaisseur h_{eau} . C_1 et C_2 sont les concentrations en gaz de part et d'autre du film ; C'_1 et C'_2 correspondent quant à elles aux concentrations en gaz solubilisé à chacune des extrémités de la couche aqueuse.

C_{sat1} correspond à la concentration à l'équilibre en gaz dissous dans une couche d'eau située au contact d'une atmosphère où règne C_1 (C_{sat2} est définie de manière analogue). On a donc $C_{sat1} = \beta C_1$ et $C_{sat2} = \beta C_2$, β étant le coefficient de solubilité du gaz.

En régime permanent, tous ces flux sont égaux. L'égalité entre (4.13) et (4.14) conduit à :

$$K = \frac{D}{h_{eau}} \frac{(C'_1 - C'_2)}{(C_1 - C_2)} \quad (4.17)$$

En égalisant (4.13) et (4.15), ainsi que (4.13) et (4.16), il vient :

$$C'_1 = -\frac{K}{k_{mc}}(C_1 - C_2) + \beta C_1 \quad (4.18)$$

$$C'_2 = \frac{K}{k_{mc}}(C_1 - C_2) + \beta C_2 \quad (4.19)$$

Soit, en remplaçant C'_1 et C'_2 par leurs expressions dans (4.17) :

$$K = \frac{D\beta}{h_{eau} + \frac{2D}{k_{mc}}} \quad (4.20)$$

On distingue alors deux cas limites :

- lorsque $h_{eau} \gg \frac{2D}{k_{mc}}$,

$$K = \frac{D\beta}{h_{eau}} \quad (4.21)$$

La perméabilité du film est déterminée par celle de la couche centrale d'eau.

- lorsque $h_{eau} \ll \frac{2D}{k_{mc}}$,

$$K = \frac{\beta k_{mc}}{2} \quad (4.22)$$

La perméabilité du film est déterminée par celles des monocouches adsorbées.

4.2.2 Perméabilité des films communs

Krustev et al ont mesuré la perméabilité à l'air de toute une gamme de films communs stabilisés par du SDS [Kru93] [Kru97a]. Expérimentalement, l'épaisseur des films est ajustée en modifiant la concentration en électrolyte (NaCl), c'est-à-dire en écrantant plus ou moins les répulsions électrostatiques qui agissent entre les deux parois du film.

Ils ont mis en évidence la présence de deux régimes pour décrire la perméabilité des films communs :

- lorsque l'épaisseur de la couche centrale d'eau est inférieure à $\sim 100 \text{ \AA}$, la perméabilité des films communs diminue en fonction de leur épaisseur. Une analyse plus fine (basée sur l'équation (4.20)) révèle que la perméabilité des films est déterminée, non pas par l'épaisseur de la couche centrale d'eau, mais par la structure des couches adsorbées. En effet, lorsque les films s'amincissent, les interactions normales qui se développent entre les monocouches à petite distance les rendent plus denses et ordonnées.² Ils offrent alors une meilleure résistance au passage de l'air,
- lorsque l'épaisseur de la couche centrale d'eau dépasse $\sim 100 \text{ \AA}$, la perméabilité des films entre dans un nouveau régime où la taille du corps aqueux devient le paramètre essentiel. Dans ce régime, les couches adsorbées ressentent peu l'influence l'une de l'autre et se comportent davantage comme des monocouches isolées à la surface d'une solution. Leur structure est moléculaire est moins organisée. Expérimentalement on observe un comportement assez intuitif: la diminution de la perméabilité des films lorsque leur épaisseur augmente.

On peut donc retenir que la perméabilité des films communs reflète indirectement l'organisation du réseau de molécules qui constituent les deux parois du film. Cette organisation est quand à elle étroitement corrélée aux interactions mutuelles qui s'exercent entre ces deux parois.

4.2.3 Perméabilité des films de Newton

Dans un film de Newton, le corps aqueux qui sépare les deux monocouches amphiphiles se réduit à quelques molécules d'eau d'hydratation. La perméabilité du film est alors entièrement

2. Cette conclusion corrobore les résultats relatifs aux rugosités des différents films noirs, 2.7 \AA pour un film de Newton de SDS et 3.6 \AA pour un film commun [Ben92].

conditionnée par celles des deux monocouches adsorbées:

$$K = \frac{k_{mc}}{2} \quad (4.23)$$

Les films de Newton sont caractérisés par une structure plus dense et ordonnée que celle des films communs (cf. § 3.1). C'est la raison pour laquelle ils possèdent une perméabilité plus faible. Ainsi, un film de Newton de SDS, d'une épaisseur de 33 Å, est environ trois fois moins perméable qu'un film commun de 84 Å d'épaisseur [Kru97a].

La perméabilité des films de Newton a fait l'objet de nombreuses investigations. La plupart concerne des films stabilisés par du SDS, considéré comme un tensioactif de référence. Ces travaux s'articulent majoritairement autour de deux axes :

- l'étude de la perméabilité en fonction de la température; les résultats montrent que K augmente avec la température (Figure 4.6),
- l'étude de la perméabilité en fonction de la concentration en tensioactifs (C_{ta}) dans la solution (à partir de laquelle les films sont formés); expérimentalement, la perméabilité décroît lorsque C_{ta} augmente. Au-delà d'une certaine concentration, elle atteint sa valeur minimum pour le film étudié. La perméabilité reste alors sur un plateau (Figure 4.6).

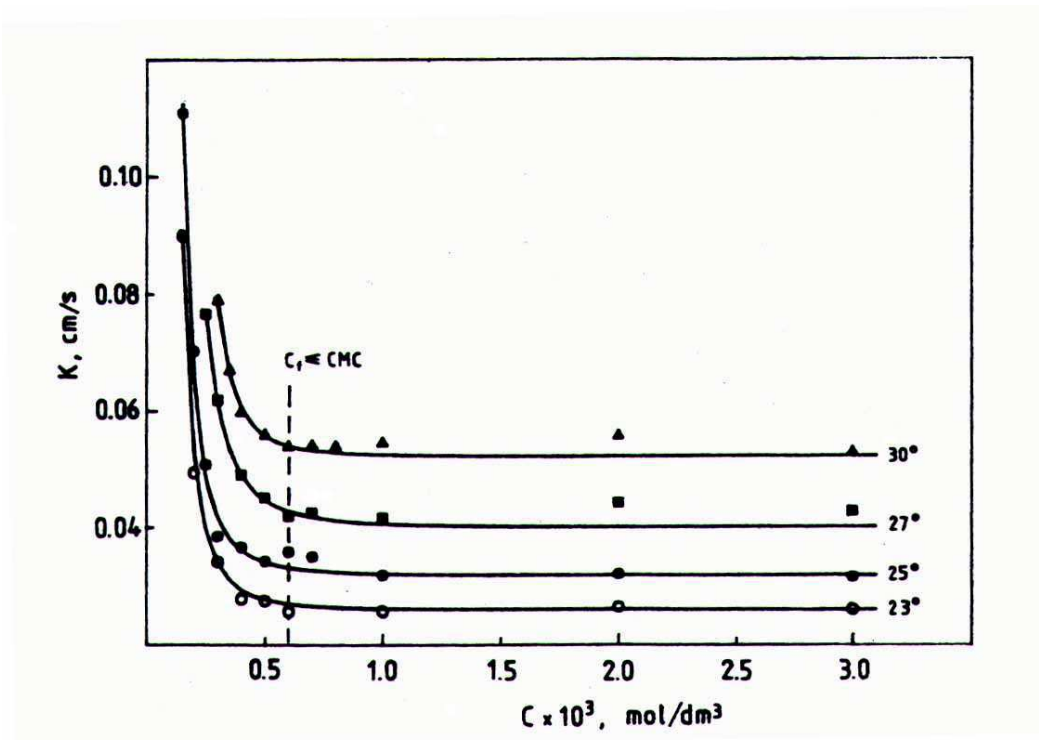


FIG. 4.6 – Evolution de la perméabilité d'un film de Newton de SDS en fonction de la concentration en tensioactifs (C) pour quatre températures différentes [Ned92].

Plusieurs modèles théoriques ont été proposés pour interpréter ces différents résultats. Les principaux sont présentés ci-dessous :

Théorie de la barrière d'énergie

Cette théorie a été initialement élaborée pour discuter de l'efficacité de certaines monocouches, déposées à l'interface air/eau, à s'opposer à l'évaporation de l'eau [Arc55]. Elle a ensuite été appliquée avec succès au cas de monocouches impliquées dans des films de Newton. Dans ce modèle, le film est supposé agir comme une barrière d'énergie qui s'oppose au passage des molécules de gaz. La perméabilité du film s'exprime alors ainsi :

$$\ln K = -\frac{\Delta E^*}{R_{GPT}} + \text{constante} \quad (4.24)$$

où ΔE^* est l'énergie d'activation du processus de passage de l'air à travers le film.

Ce modèle prédit donc une diminution linéaire du $\ln K$ en fonction de $\frac{1}{T}$ (coordonnées d'Arrhénius), vérifiée sur différents type de films pour des températures de l'ordre de 20 à 30°C [Ned92] [Kru96]. Certaines courbes présentent cependant des ruptures de pente sur certains intervalles de température. Ces déviations par rapport au modèle linéaire suggèrent qu'un modèle plus complexe s'impose. Krustev et al ont également montré que l'énergie d'activation dépendait de la longueur de la chaîne alkyl du tensioactif utilisé pour stabiliser le film ; plus cette chaîne est longue, plus l'énergie d'activation est grande [Kru97b].

Barnes et La Mer ont ensuite amélioré ce modèle en utilisant ΔG^\ddagger , l'enthalpie libre d'activation (ou énergie libre de Gibbs) [Bar97] :

$$\ln K = -\frac{\Delta G^\ddagger}{R_{GPT}} + \text{constante} \quad (4.25)$$

ΔG^\ddagger peut se décomposer en trois termes, relatifs à l'énergie U , à l'entropie S et à l'aire occupée par une molécule de tensioactif dans la couche adsorbée A :

$$\Delta G^\ddagger = \Delta U^\ddagger + \Pi \Delta A^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad (4.26)$$

où Π est la pression de surface de la monocouche. $\Pi \Delta A^\ddagger$ correspond au travail qu'il faut fournir pour dilater la surface de la monocouche de ΔA^\ddagger afin de créer un espace suffisant entre les molécules de tensioactifs pour que le gaz passe. Plus la densité des arrangements moléculaires dans la monocouche est faible, plus le travail à fournir est petit.

Ce modèle prend en compte la pression de surface, i.e., la densité d'adsorption des monocouches de tensioactifs, pour prédire la perméabilité des films. Il permet également de décrire de manière plus subtile le comportement des films en fonction de la température dans la mesure où la densité d'adsorption dépend elle-même de la température (elle tend généralement à décroître lorsque T augmente) [Mur03].

Théorie de la surface accessible

Tout comme la théorie précédente, la théorie de la surface accessible a été énoncée pour l'étude de la perméabilité de monocouches situées à l'interface air/eau [Bar70]. Elle postule que les molécules de gaz traversent la couche adsorbée par l'intermédiaire de trous naturellement

présents à la surface.³ L'ensemble de tous ces sites vacants constitue la surface accessible pour les molécules gazeuses (notée A_{acc}). La perméabilité à travers chacun de ces trous est supposée être égale à celle de la surface nue (en l'absence de tensioactifs). Ce modèle a été appliqué de manière probante pour décrire l'évolution de la perméabilité des films de SDS lors de la transition film commun/ film de Newton (en présence de NaCl et de LiCl) [Kru99]. La perméabilité des monocouches du film est définie de la manière suivante :

$$k_{mc} = \frac{DA_{acc}}{h_{mc}A} \quad (4.27)$$

où D est le coefficient de diffusion à travers la surface nue, A l'aire totale du film et h_{mc} l'épaisseur de la monocouche. A_{acc} est calculée à l'aide de considérations théoriques reliant la densité d'adsorption des parois du film à l'énergie libre de formation du film.

Théorie de nucléation des trous

Ce dernier modèle prend également en compte la présence de carences moléculaires au sein des monocouches de tensioactifs qui forment le film. Il considère que ces sites vacants peuvent diffuser au sein des films et conduire à la nucléation de trous plus grands (qu'on peut décrire comme des agrégats de sites vacants) [Kas80] [Exe83]. La perméabilité des films de Newton est alors exprimée en fonction de deux composantes :

$$K = K_0 + \sum_{i=1}^{\infty} K_i \quad (4.28)$$

où K_0 se réfère à la perméabilité des zones du film qui ne présentent pas de trous tandis que K_i correspond à celle des trous composés de i carences moléculaires [Ned88].

K_0 dépend de la longueur des chaînes alkyles des tensioactifs et suit la théorie de la barrière d'énergie développée précédemment [Kru97b]. Nedyalkov et al ont aussi montré que pour des films de SDS formés à partir de solutions de tensioactifs très concentrées, la contribution de la perméabilité à travers les trous est négligeable entre 23 et 25°C [Ned92]. Cependant, ce terme reprend de l'importance dès que la température atteint 27 °C.

Cette théorie permet donc de décrire de manière détaillée la variation de la perméabilité totale des films en fonction de la température. Elle rend compte notamment des déviations à la linéarité observées sur certains diagrammes d'Arrhénius, dont la présence n'est pas prévue par la théorie de la barrière d'énergie [Ned92] [Kru96]. D'autre part, elle explique de manière satisfaisante la dépendance de la perméabilité des films de SDS en fonction de la concentration en tensioactifs dans la solution [Ned88].

En conclusion, il existe déjà de nombreuses études qui s'attachent à corrélérer la perméabilité des films noirs à leurs propriétés de structure. Tous ces travaux concernent exclusivement des tensioactifs de petite taille comme le SDS (*cf.* références discutées ci-dessus) ou les chlorures

3. Dans tous les modèles thermodynamiques réalistes, les couches d'adsorption ne sont jamais complètement saturées en tensioactifs; lorsqu'une molécule se désorbe, elle n'est pas instantanément remplacée par une autre [Kru99].

d'alkyltriméthylammonium [Kru97b]. Des molécules d'intérêt biologique comme le dodécyl maltoside [Mur03] et certains phospholipides [Pla03] [Pet03] ont également été étudiées. A notre connaissance, il n'existe pas de résultats concernant la perméabilité de films stabilisés par des macromolécules, qu'elles soient synthétiques ou naturelles comme les protéines.

4.3 Perméabilité de la paroi d'une bulle de protéines

Nous avons mesuré la perméabilité à l'air d'une série de films de protéines dont les caractéristiques ont été présentées au chapitre 2. Tous les films ont été obtenus à partir de solutions préparées au point isoélectrique des protéines de manière à ce qu'ils soient initialement noirs. Nous les avons étudié à l'aide de la méthode décrite au début de ce chapitre. La figure 4.7 présente la décroissance en fonction du temps des rayons du film et de la bulle pour différentes protéines ainsi que pour un film de Newton de SDS. Ces courbes montrent clairement que la disparition des bulles de SDS est environ trois fois plus rapide que celles des bulles de protéines, dont l'étude peut durer plus de 5 heures. Dans ces conditions, on peut se demander s'il est encore légitime de négliger le processus de diffusion de l'air (enfermé dans la bulle) à travers la couche adsorbée qui constitue la paroi de la bulle. C'est ce que nous allons vérifier expérimentalement au paragraphe suivant.

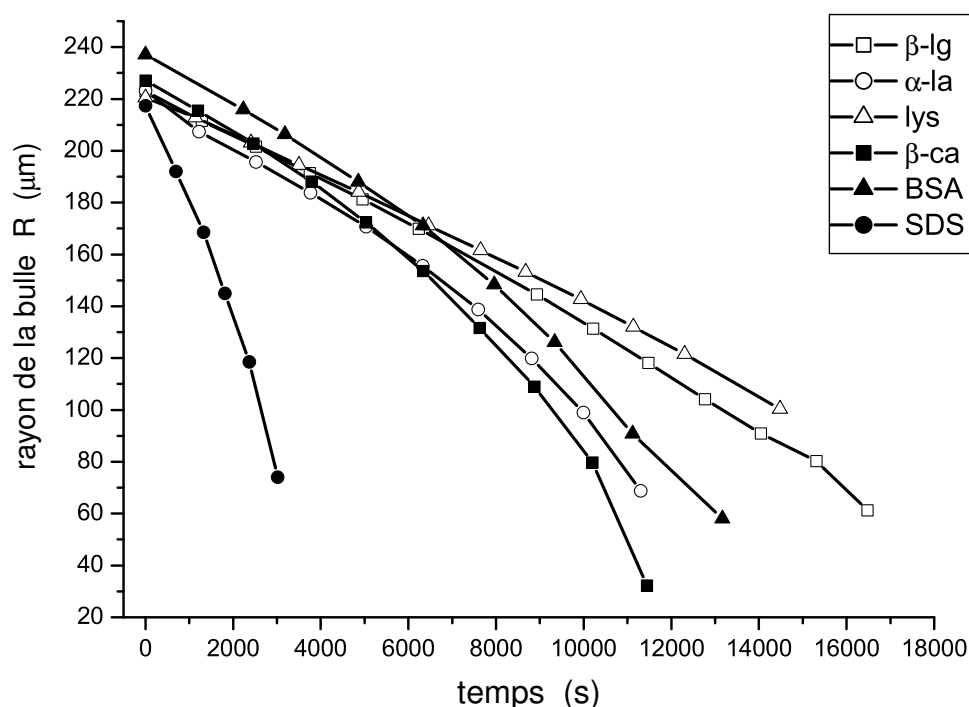


FIG. 4.7 – Dissolution d'une bulle de protéines à la surface de la solution : le graphique présente la décroissance des rayons de différentes bulles en fonction du temps. Quelle que soit la protéine considérée, la dissolution de la bulle est nettement plus lente que celle observée pour une bulle de SDS de même taille.

4.3.1 Méthode expérimentale

Tout comme pour la mesure de la perméabilité des films, on forme des bulles d'un rayon compris entre 200 et 250 μm dans la solution de protéines étudiée. On recouvre ensuite immédiatement la surface de la solution par une lamelle en verre afin de bloquer le processus de diffusion de l'air à travers le film (Figure 4.8). Ces lamelles ont été préalablement nettoyées dans un mélange 3:1 d'acide sulfurique et d'eau oxygénée (pirahna), puis abondamment rincées à l'eau ultra-pure (18.2 $M\Omega\cdot\text{cm}$, système milli-Q) afin de ne pas introduire d'impuretés dans le système. Cette opération de nettoyage présente également l'avantage de rendre la surface de verre très hydrophile. Dans ces conditions, le film noir qui surmonte la bulle est détruit au moment où la lamelle est déposée ; le haut de la bulle et la surface en verre sont alors séparés par une couche d'eau relativement épaisse (typiquement de l'ordre de 700 Å). Par conséquent, l'air enfermé dans la bulle ne s'échapper qu'en traversant la paroi de la bulle.

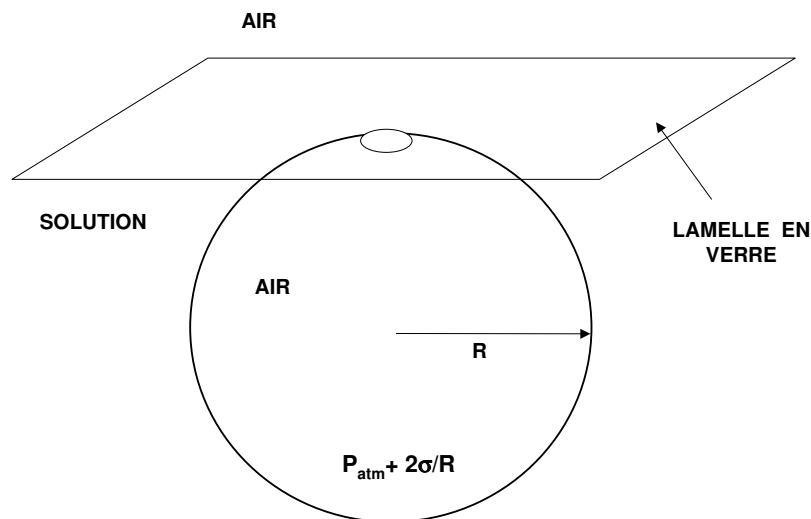


FIG. 4.8 – Bulle attachée à la surface de la solution, elle-même recouverte par une lamelle de verre

4.3.2 Description théorique

Le flux de molécules d'air à travers la paroi de la bulle s'écrit :

$$\frac{dN}{dt} = -K_{\text{bulle}} 4\pi R^2 (S_{p_{\text{atm}}+p_c} - S_{p_{\text{atm}}}) \quad (4.29)$$

$S_{p_{\text{atm}}}$ et $S_{p_{\text{atm}}+p_c}$ correspondent aux coefficients de la solubilité de l'air dans l'eau, au contact d'une atmosphère où la pression vaut respectivement p_{atm} et $p_{\text{atm}} + p_c$. En effet, la quantité de gaz dissoute dans un liquide est proportionnelle à la pression partielle du gaz dans l'atmosphère située au-dessus du liquide (loi de Henry). Dans notre cas, la solution dans laquelle baigne la bulle est globalement en équilibre avec l'air à la pression p_{atm} . Il y a donc localement un déséquilibre

entre la solution et l'air enfermé dans la bulle (à la pression $p_{atm} + p_c$). Par conséquent, un processus de diffusion se produit afin que la solution au contact de la bulle s'enrichisse en air.

D'après la loi de Henry :

$$S_{p_{atm}+p_c} = \left(1 + \frac{2\sigma}{p_{atm}R}\right) S_{p_{atm}} \quad (4.30)$$

En injectant (4.3) et (4.30) dans (4.29), il vient :

$$-\frac{1}{3R_{RG}T} (3p_{atm}RdR + 4\sigma dR) = K_{bulle} \frac{2\sigma}{p_{atm}} S_{p_{atm}} dt \quad (4.31)$$

Après intégration sur l'intervalle $[0;t]$, on a :

$$K_{bulle} = \frac{p_{atm}}{R_{GPT} S_{p_{atm}} t} \left(\frac{p_{atm}}{4\sigma} (R_{t=0}^2 - R_t^2) + \frac{2}{3} (R_{t=0} - R_t) \right) \quad (4.32)$$

La grandeur $S_{p_{atm}}$ est calculée à l'aide de la loi de Henry à partir des coefficients de solubilité dans l'eau de chacun des gaz présents dans l'air. Typiquement, la solubilité de l'air dans l'eau à 25°C pour une pression de 1 atmosphère vaut $7.9698 \cdot 10^{-4}$ mol/L (en prenant comme composition de l'air 20.93 % d'oxygène, 79.04 % d'azote et 0.03 % de dioxyde de carbone). La valeur de σ , utilisée pour le calcul de K_{bulle} , est déterminée indépendamment par la méthode de Wilhelmy (*cf.* § 2.3).⁴ On supposera en première approximation que la tension de surface des bulles reste constante tout au long de leur étude. Nous discuterons par la suite de la légitimité de cette approximation (*cf.* § 4.4.5).

4.3.3 Résultats expérimentaux

Les résultats obtenus pour des solutions contenant 0.5 mg/mL de protéines au point isoélectrique sont regroupés dans le tableau suivant :

Protéines	α -la	β -lg	β -ca	lysozyme	BSA
$K_{bulle}(\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$	0,007	0,006	0,009	0,005	0,006

Toutes les mesures ont été réalisées à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ pour des études d'une durée de trois heures (après la formation de la bulle). Chaque valeur est la moyenne d'au moins cinq mesures indépendantes ; les valeurs de K_{bulle} déterminées expérimentalement présentent une dispersion de ± 20 % autour de la valeur moyenne. Malgré de nombreuses précautions (propreté de la verrerie...), nous ne sommes pas parvenus à obtenir des valeurs de K moins dispersées. Cette limitation expérimentale semble être intrinsèque à la structure des couches de protéines qui forment la bulle.

Dans la série de protéines étudiées, les valeurs de K_{bulle} s'échelonnent entre 0,005 et 0,009 $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$. La valeur la plus haute a été obtenue pour les bulles de β -caséine, tandis que la plus basse correspond aux bulles de lysozyme. D'un point de vue rhéologique, les couches adsorbées de β -caséine sont très flexibles alors que celles de lysozyme s'illustrent par leur rigidité (*cf.* chapitre 2). Nos

4. On fait l'hypothèse que la tension de surface des bulles de protéines atteint rapidement sa valeur à l'équilibre dans la gamme de concentrations dans laquelle on travaille (typiquement 0.5 mg/mL). Cette approximation semble légitime d'après les cinétiques d'adsorption observées à l'interface air/solution par la méthode de Wilhelmy ; seul le cas de la lysozyme est discutable (§ 2.3).

résultats semblent confirmer cette tendance : la basse perméabilité observée pour les bulles de lysozyme pourrait indiquer que les couches de lysozyme sont plus difficiles à comprimer que celles des autres protéines. A l'inverse, les bulles de β -caséine décroissent plus rapidement du fait de la flexibilité de la structure de leur paroi.

Une analyse plus fine des résultats montre que la perméabilité de la bulle tend à décroître en fonction du temps (Figure 4.9). La couche de protéines adsorbées devient donc plus résistante au passage de l'air, ce qui reflète indirectement un changement au niveau de sa structure. En d'autres termes, la barrière d'énergie que les molécules de gaz doivent franchir avant de passer en solution augmente avec le temps. Une interprétation de ces observations sera proposée dans la partie suivante, à la lumière des résultats concernant l'étude de la perméabilité des films. Par ailleurs, l'augmentation de K_{bulle} au début de chaque expérience doit probablement correspondre à un temps de mise à l'équilibre de la paroi de la bulle.⁵

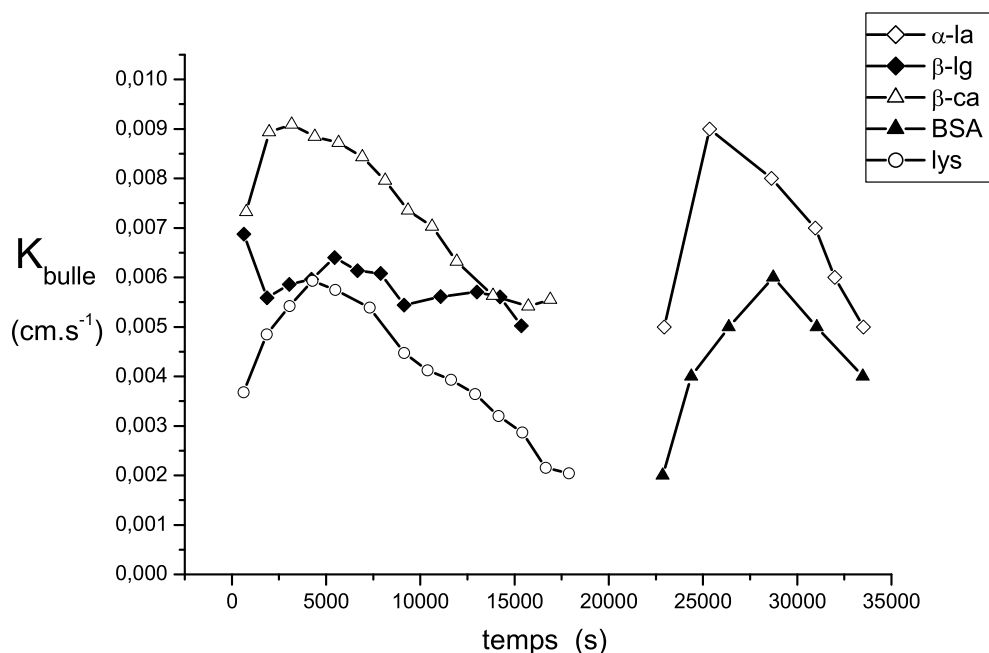


FIG. 4.9 – Evolution du coefficient de perméabilité des bulles de protéines en fonction du temps. Les courbes relatives à l' α -lactalbumine et à la BSA ont été décalées horizontalement pour une meilleure lisibilité du graphique. Dans un premier temps, la perméabilité augmente : cette étape correspond probablement à un temps de mise à l'équilibre des bulles. Elle se met ensuite à décroître continûment. Ces résultats seront interprétés ultérieurement. On peut noter que les courbes ci-dessus sont issues d'une seule mesure expérimentale, tandis que les valeurs de K_{bulle} du tableau précédent sont moyennées sur plusieurs expériences. C'est ce qui explique les éventuels écarts numériques qui les séparent.

En conclusion, la diffusion de l'air à travers la paroi d'une bulle de protéines est à l'origine d'une diminution de sa taille d'au moins 30 % sur une durée de trois heures. Il est donc nécessaire

5. Il peut s'agir de réarrangement moléculaire de la conformation des protéines adsorbées afin de minimiser la tension de surface.

de prendre en compte ce phénomène lors de la détermination de la perméabilité des films de protéines.

4.4 Perméabilité des films de protéines

4.4.1 Extension du modèle diffusif

Pour rendre compte de la perméabilité des films de protéines, il faut donc apporter un terme correctif à l'expression de la perméabilité présentée à l'équation (4.11). Le flux de gaz qui s'échappe de la bulle se produit simultanément à travers le film vers la phase gazeuse située au-dessus, et à travers la paroi de la bulle vers la solution. D'où l'équation de diffusion suivante en régime permanent :

$$-\frac{dN}{dt} = KA_{film} \Delta C + K_{bulle}A_{paroi} \Delta S \quad \text{avec} \quad \Delta S = S_{p_{atm}+p_c} - S_{p_{atm}} \quad (4.33)$$

L'aire de la paroi de la bulle est celle d'une sphère tronquée par la présence du film. Elle vaut : $A_{paroi} = 2\pi R^2(1 + \cos \phi)$ avec $\phi = \arcsin \frac{r}{R}$ (cf. annexe A).

En remplaçant ΔC , ΔS , A_{film} et A_{paroi} par leurs expressions dans (4.33), il vient :

$$-\frac{dN}{dt} = K\pi r^2 \frac{2\sigma}{RR_{GPT}} + K_{bulle}2\pi R^2 (1 + \cos \phi) \frac{2\sigma}{p_{atm}R} S_{p_{atm}} \quad (4.34)$$

Par une méthode de calcul analogue à celle utilisée dans la partie 4.1, on obtient :

$$K = \frac{\frac{p_{atm}}{2\sigma}(R_{t=0}^4 - R_t^4) + \frac{8}{9}(R_{t=0}^3 - R_t^3)}{\int_0^t r^2 dt} - \frac{K_{bulle} 2 S_{p_{atm}} R_{GPT} \int_0^t R^2(1 + \cos(\arcsin \frac{r}{R})) dt}{p_{atm} \int_0^t r^2 dt} \quad (4.35)$$

C'est l'expression que nous utiliserons pour calculer la perméabilité des films de protéines. Le premier terme correspond à la perméabilité du film en l'absence de diffusion par la paroi de la bulle (cf. équation (4.11)); nous l'appellerons par la suite K' . Le second terme tient compte des molécules de gaz qui passent en solution; il sera noté K_{corr} .

4.4.2 Description des films microscopiques de protéines

Les films étudiés sont formés à partir de solutions contenant 0.5 mg/mL de protéines au point isoélectrique. Dans le cas de l' α -lactalbumine, de la β -lactoglobuline et de la β -caséine, le drainage des films dure à peine quelques secondes, i.e., les films sont presque instantanément noirs. Il arrive fréquemment que leur forme ne soit pas parfaitement circulaire, mais ces irrégularités s'estompent avec le temps (Figure 4.10). On n'observe jamais de telles déformations de la ligne de contact pour les films de SDS. Elles sont probablement dues au fait que les couches de protéines adsorbées (au point isoélectrique) possèdent une viscosité interfaciale nettement plus haute que celle des couches de petites molécules tensioactives [Pri98] [Bos01].

Les films de lysozyme et de BSA présentent eux un comportement plus singulier; ils sont initialement mixtes, c'est-à-dire constitués d'une zone centrale noire entourée d'une couronne grise

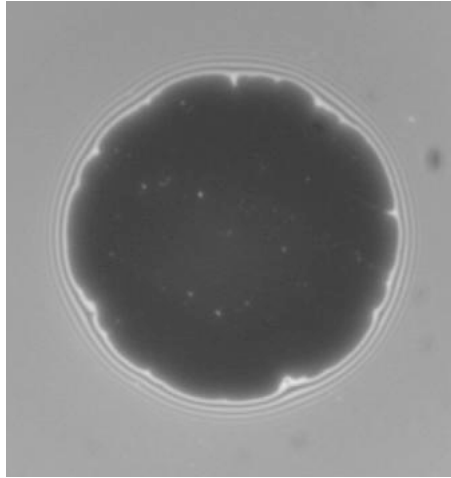


FIG. 4.10 – *Film d' α -lactalbumine formé au sommet d'une bulle, à partir d'une solution préparée au point isoélectrique de la protéine : la ligne de contact présente des irrégularités qui traduisent une viscosité de surface importante.*

(Figure 4.11). La frontière noir/gris est fluctuante et il faut parfois attendre plusieurs dizaines de minutes avant que le film soit uniformément noir. Ces films semblent donc correspondre à des états métastables, où deux phases d'épaisseur différentes coexistent. Les raisons de leur formation ne sont pas claires.

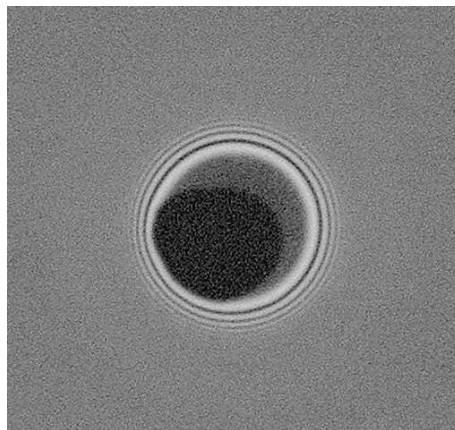


FIG. 4.11 – *Film de lysozyme formé au sommet d'une bulle, à partir d'une solution préparée au point isoélectrique de la protéine : deux phases d'épaisseur différente coexistent.*

On peut également noter que la formation des films de lysozyme nécessitent des précautions particulières ; il faut laisser la surface de la solution s'équilibrer pendant environ une heure avant de pouvoir former des bulles stables. Cette protéine est effectivement plus lente que les autres pour abaisser la tension de surface de la solution (*cf.* § 2.3) et la valeur atteinte à l'équilibre est plus haute.

4.4.3 Les films de protéines : films communs ou films de Newton ?

On ne possède pas assez d'information sur la structure interne des films de protéines qu'on étudie pour affirmer si ce sont des films communs ou bien des films de Newton. On peut malgré tout avoir une estimation de leur pression de disjonction : c'est un paramètre-clef de la structure des films qui traduit les interactions qui agissent entre ses deux parois [Ber99]. La pression de disjonction d'un film légèrement courbe, comme c'est le cas ici, est définie par le quotient $\Pi = \frac{p_c}{2}$, où p_c correspond à la différence de pression de part et d'autre du film [Iva88]. Dans notre système, on a donc $p_c = \frac{2\sigma}{R}$. La tension de surface des solutions de protéines qu'on étudie est comprise entre 45 et 55 mN/m. Pour des bulles d'un rayon de 230 μm , les pressions de disjonction des films correspondant sont comprises entre 196 et 240 Pa. Pereira et al ont mesuré les isothermes de pression de disjonction de films de BSA et de β -caséine près de leur point isoélectrique [Per03]. Leurs résultats indiquent que les films de BSA obtenus autour de 200 Pa ont une structure proche d'une tricouche (140 Å), tandis que les films de β -caséine semblent être des bicouches (180 Å).

En conclusion, il semble que l'on travaille dans des conditions où l'épaisseur des films est presque minimale [Per03]; on ne s'attend donc pas à ce qu'ils possèdent une couche centrale d'eau épaisse (de plusieurs dizaines d'angströms).

4.4.4 Résultats expérimentaux

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Protéines	α -la	β -lg	β -ca	lysozyme	BSA
$K(\text{cm.s}^{-1})$	0,009	0,008	0,006	0,004	0,014

Toutes les mesures ont été réalisées à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ pour des études d'une durée de trois heures (après la formation de la bulle). Chaque valeur est la moyenne d'au moins cinq mesures indépendantes; les valeurs de K_{bulle} déterminées expérimentalement présentent une dispersion de $\pm 20\%$ autour de la valeur moyenne. Là encore, malgré de nombreuses précautions (propreté de la verrerie...), nous ne sommes pas parvenus à obtenir des valeurs de K moins dispersées. Cette limitation expérimentale semble être intrinsèque à la structure des couches de protéines du film. Le manque de reproductibilité est peut-être lié à la présence d'amas protéiques aux interfaces, dont la formation est favorisée près du point isoélectrique des protéines.

Quelle que soit la protéine considérée, la valeur de la perméabilité du film est largement inférieure aux valeurs mesurées pour des films de Newton de SDS ($K = 0.034 \text{ cm.s}^{-1}$ à 25°C d'après [Kru96]). Les réseaux de protéines constituent donc une barrière efficace au passage de l'air. Les films de lysozyme sont les moins perméables. A l'opposé, les films de BSA sont ceux qui résistent le moins au passage de l'air. Ces différences de perméabilité reflètent probablement la spécificité de l'organisation moléculaire de chacun de ces films.

Il est surprenant de constater que pour toutes les protéines, la perméabilité de la paroi de la bulle est plus faible ou quasiment égale à celle du film. On s'attendait a priori à la tendance inverse, comme prévue dans le modèle de Princen (*cf.* § 4.2.1).⁶ Nous reviendrons sur l'interprétation de

6. La perméabilité des films est au moins deux fois plus petite que celle des monocouches qui le composent (équation 4.22).

ce point ultérieurement (*cf.* § 4.4.7).

La figure 4.12 présente l'évolution du coefficient de perméabilité en fonction du temps. Pour chaque protéine, les courbes ont été calculées en utilisant les valeurs moyennes de K_{bulle} déterminées précédemment. On observe globalement que la perméabilité des films diminue en fonction du temps.

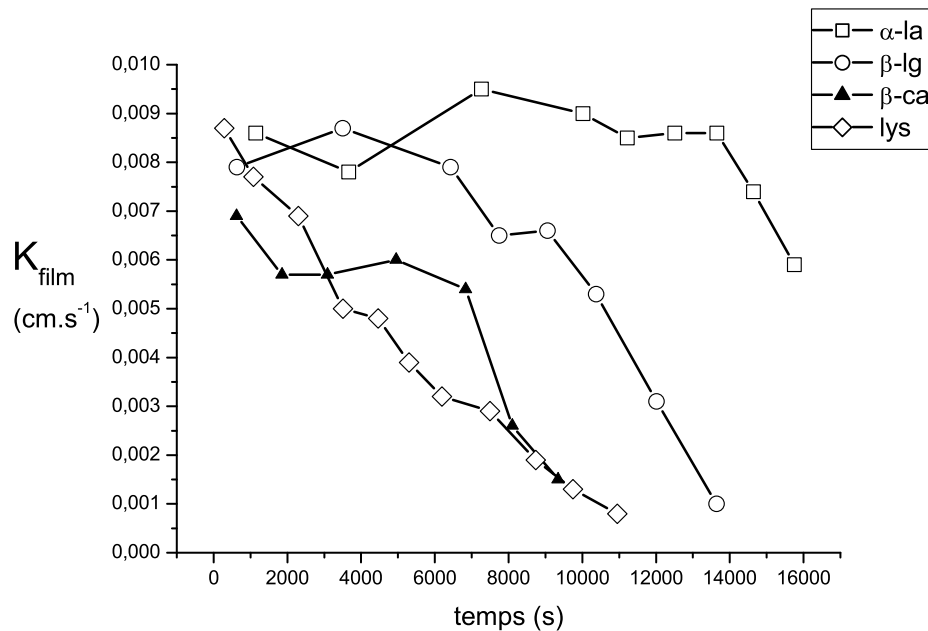


FIG. 4.12 – Evolution du coefficient de perméabilité des films de protéines en fonction du temps. La perméabilité des films décroît progressivement. On peut noter que les courbes ci-dessus sont issues d'une seule mesure expérimentale, tandis que les valeurs de K_{film} du tableau précédent sont moyennées sur plusieurs expériences. C'est ce qui explique les éventuels écarts numériques qui les séparent.

L'évolution générale de K suit un cheminement analogue à celle de K_{bulle} (Figure 4.9). Il semble que les structures du film et de la paroi de la bulle se modifient simultanément au cours des expériences. On peut se demander si ces changements de structure sont dus à un simple effet de vieillissement des couches de protéines adsorbées⁷, ou bien s'ils sont liés à la diminution de la taille de la bulle. La figure 4.13 présente deux séries de clichés qui montrent l'évolution de films de β -lactoglobuline, initialement noirs, en fonction du temps. Le premier film (cas (a)) est formé au-dessus d'une bulle dont le rayon initial vaut $R=235 \mu\text{m}$, contre $285 \mu\text{m}$ pour le second (cas (b)). Dans les deux cas, les films ont tendance à s'éclaircir au fur et à mesure de l'expérience ; ce changement de teinte traduit le fait que les films deviennent plus épais. Au bout de 3h30, le premier film est cependant beaucoup clair que le second pour un temps équivalent. Il faut attendre une heure de plus (soit 4h30) pour que le second film présente une teinte comparable. L'épaisseur

7. Cette hypothèse semble a priori peu probable d'après les expériences de réflectivité de rayons X réalisées sur des films noirs de β -lactoglobuline (§ 3.3) : la structure moléculaire des films a pu être étudiée pendant plus de 5 h sans qu'un quelconque effet de vieillissement ne soit observé.

des films n'est donc pas déterminée par l'âge des couches de protéines adsorbées ; elle dépend du taux de décroissance de la surface de la bulle. En effet, la première bulle a perdu 75 % de sa surface initiale au bout de 3h30, chiffre comparable à celui calculé pour la seconde bulle au bout de 4h30.

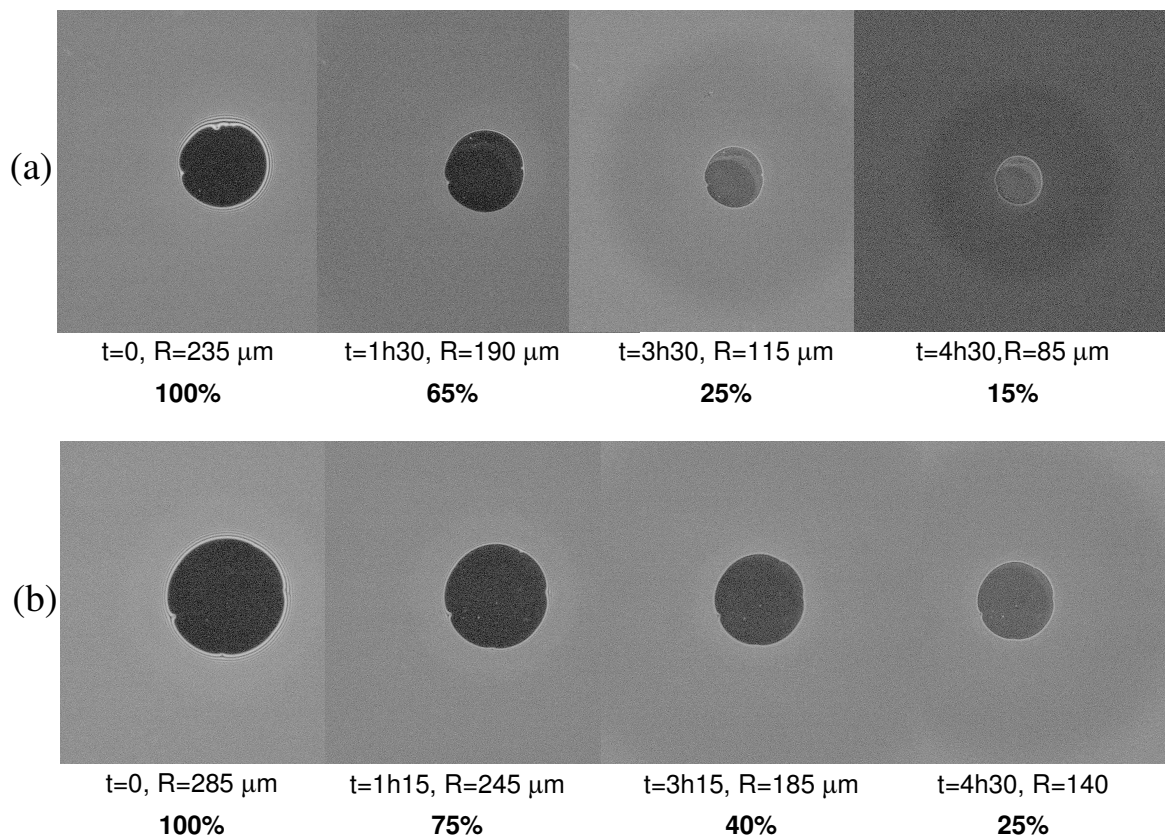


FIG. 4.13 – Evolution comparée de l'épaisseur de deux films de β -lactoglobuline en fonction du temps. Les séries de photographies (a) et (b) se rapportent à deux bulles dont le rayon initial vaut respectivement $235 \mu\text{m}$ et $285 \mu\text{m}$. Pour chaque cliché, la surface de la bulle correspondante est indiquée en pourcentage par rapport à sa valeur à l'instant $t=0$. Dans les deux cas, les films ont tendance à s'éclaircir, c'est-à-dire à s'épaissir au fur et à mesure de la décroissance de la bulle. On peut remarquer qu'au bout de 4h30, le contraste s'est inversé pour le film (a) : il est devenu plus clair que la solution environnante.

Des observations similaires ont été réalisées pour les autres films de protéines.

4.4.5 Influence de la rhéologie des couches de protéines adsorbées sur la vitesse de décroissance des bulles

A une température donnée, la vitesse de dissolution d'une bulle stabilisée par un tensioactif de petite taille dépend de la structure moléculaire de la couche adsorbée. Au fur et à mesure que la bulle diminue de taille, une partie des molécules amphiphiles impliquées dans la paroi se désorbent et repartent en solution. Le film et la paroi de la bulle gardent donc a priori la même structure tout au long du processus de dissolution (Figure 4.14).

Le cas des bulles stabilisées par des protéines est plus subtil du fait de l'irréversibilité de leur adsorption (*cf.* chapitre 2). Dans ces conditions, lorsque la bulle décroît, la couche de protéines adsorbées est progressivement comprimée. L'interface air/solution étant de plus en plus réduite, l'excédent de protéines est expulsé vers la solution. La couche de protéines adopte alors une structure tridimensionnelle, dite « collapsée », qui compense la diminution de surface de la bulle (Figure 4.14). La présence d'une telle structure a déjà été maintes fois rapportée sur des surfaces horizontales comprimées à l'aide d'une barrière de Langmuir [Bos96] [Nin99]. Elle a également été observée directement pour des bulles stabilisées dans une solution de β -lactoglobuline à pH 7 en présence d'électrolyte [Dic02]. Nos résultats vérifient ces observations : la diminution de K_{bulle} avec le temps est probablement liée à la compression des couches de protéines lorsque la bulle rétrécit. De même, l'épaississement progressif des films correspond sûrement à une forme « collapsée » des films noirs formés initialement. En observant attentivement la figure 4.15, on s'aperçoit que la structure du film au bout de quelques heures est assez hétérogène. Elle présente des plis, qui pourraient s'apparenter à des fronts de compression. Cela semble confirmer que les couches de protéines impliquées dans le film sont mécaniquement sous contrainte.

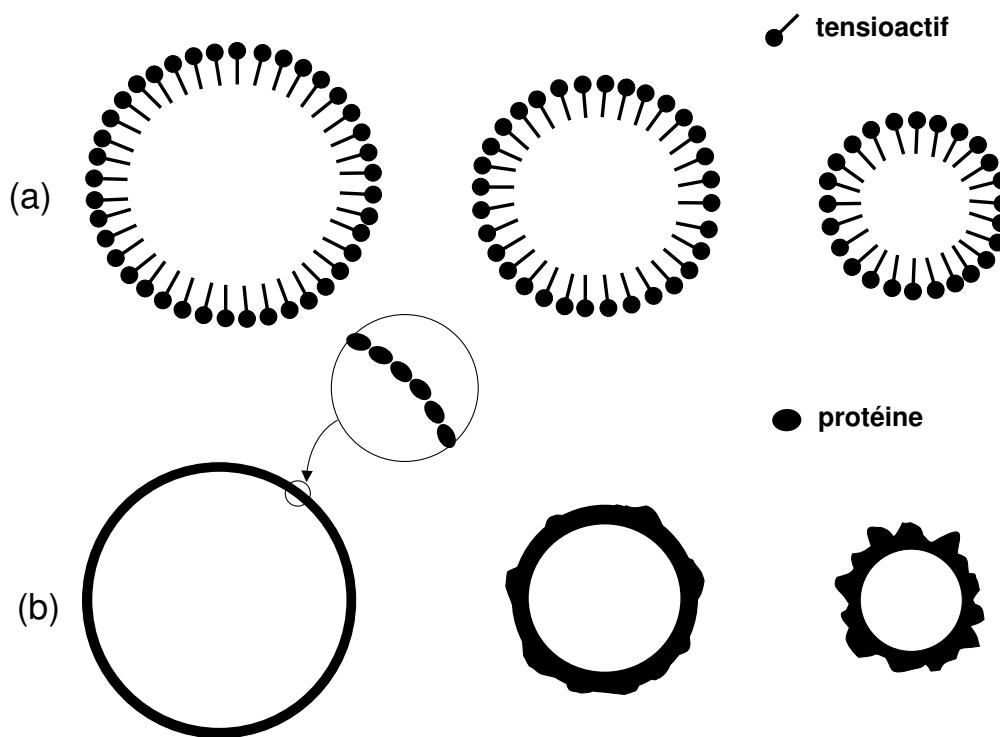


FIG. 4.14 – Dissolution d'une bulle stabilisée : (a) par une couche de tensioactifs de petite taille, (b) par une couche de protéines.

Dans quelle mesure les propriétés rhéologiques des surfaces influencent-elles le processus de dissolution des bulles? Dickinson *et al* ont montré qu'il n'était pas possible de décrire fidèlement la décroissance d'une bulle de β -lactoglobuline (solution à pH 7, 0.05 M NaCl) avec un modèle

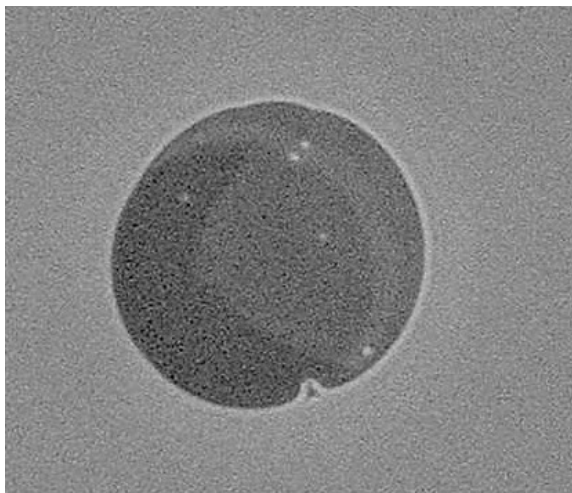


FIG. 4.15 – *Film de β -lactoglobuline au point isoélectrique de la protéine ; au bout de quelques heures, la surface du film est hétérogène. Elle présente différentes teintes qui indiquent que les couches de protéines adsorbées sont plissées.*

qui néglige l'élasticité de la couche de protéines adsorbées (Figure 4.16) [Dic02]. En effet, la tension de surface de la bulle baisse significativement au-delà d'un certain seuil de compression. Il est donc nécessaire de prendre en compte la dépendance de σ en fonction du rayon de la bulle à l'aide de l'expression suivante, proposée par Kloek *et al* [Klo01] :

$$\sigma = \sigma_0 + 2 \varepsilon \ln\left(\frac{R}{R_i}\right) + \frac{2\eta}{R} \frac{dR}{dt} \quad (4.36)$$

où σ , ε et η sont respectivement la tension de surface à l'équilibre, le module élastique de dilatation et le coefficient de viscosité associé de la couche de protéines adsorbées .

Dickinson *et al* ont toutefois observé qu'un modèle à tension de surface constante suffisait pour rendre compte convenablement de la dissolution d'une bulle de β -caséine formée dans des conditions analogues (Figure 4.16) [Dic02]. Ce n'est pas surprenant a priori puisque cette protéine possède des coefficients rhéologiques nettement plus bas que ceux des protéines globulaires [Bos01].

A la lumière de ces résultats, on peut déduire que le coefficient de perméabilité du film, dans le cas d'une bulle de protéines, ne reflète pas uniquement la structure des couches adsorbées via la résistance qu'elles opposent au passage de l'air. En-dessous d'un certain seuil de compression de la surface de la bulle, le coefficient de perméabilité traduit également une augmentation de la rigidité de la paroi de la bulle, qui freine le processus de dissolution. Dans le cadre de la théorie de la barrière d'énergie, il faudrait donc distinguer deux composantes dans l'expression de l'énergie d'activation ΔE^* (*cf.* § 4.2.3) :

- une composante relative aux propriétés du réseau de molécules qui forme le film (densité des arrangements moléculaires, taille des molécules adsorbées),
- et une autre relative à la rhéologie interfaciale des couches adsorbées (compressibilité).

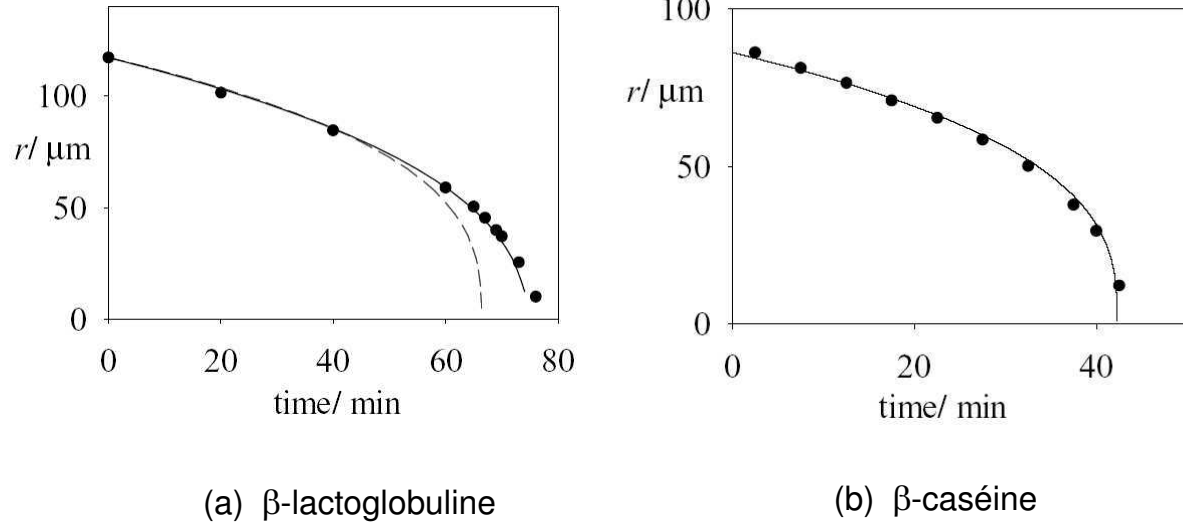


FIG. 4.16 – Décroissance du rayon d'une bulle : (a) de β -lactoglobuline ; (b) de β -caséine en fonction du temps (solutions à pH 7, 0.05 M NaCl). Dans les deux cas, les points correspondent aux données expérimentales. Dans le cas (a), la courbe en pointillés est issue d'un calcul théorique qui ne prend pas en compte les propriétés rhéologiques de la couche de protéines, tandis que la courbe continue utilise un modèle plus réaliste, qui introduit le module d'élasticité $\varepsilon = 7 \text{ mN.m}^{-1}$ [Dic02]. Dans le cas (b), la courbe continue est issue d'un calcul théorique qui ne prend pas en compte l'élasticité de la couche de protéines [Dic02].

4.4.6 Optimisation du modèle utilisé pour le calcul de la perméabilité

Finalement, les valeurs de la perméabilité des films et des bulles que nous avons déterminées au cours de ce travail ne prennent pas en compte les variations de la tension de surface de la bulle sous l'effet de la compression des couches d'adsorption. Pour ce faire, il faudrait intégrer dans le modèle diffusif à l'origine de K et de K_{bulle} l'expression de $\sigma(R)$ proposée à l'équation (4.36). En toute rigueur, il faudrait donc déterminer de manière indépendante les coefficients ε et η des couches de protéines étudiées dans des conditions proches de celles de nos expériences. En l'occurrence, la paroi des bulles se comprime à une vitesse moyenne très basse, de l'ordre de $0,2 \text{ mm}^2/\text{h}$. Dans la littérature, les coefficients rhéologiques des interfaces sont déterminés pour des déformations nettement plus rapides, *i.e.* incomparables à celles subies par la paroi des bulles au cours de leur dissolution.

En conclusion, nous ne disposons pas des données nécessaires pour pouvoir affiner le calcul de la perméabilité de nos systèmes. La perspective de nouvelles expériences s'impose pour pouvoir y parvenir.

4.4.7 Structure d'un film de protéines « collapsé »

Lors de la dissolution d'une bulle de protéines, nous avons vu que la compression de la surface de la bulle se répercutait au niveau de la structure du film. En effet, le film s'épaissit à mesure que la bulle rétrécit, ce qui se traduit par une diminution de sa perméabilité. Le film présente alors une structure dissymétrique : sa paroi interne est constituée d'une couche de protéines

« collapsée », tandis que sa paroi externe possède a priori une structure plus proche de celle de l'interface air/solution. La structure résultante est assez torturée. Au bout de 8h, les films sont quasiment blancs et présentent des zones colorées, qui témoignent du relief de la surface.

Cependant, jusqu'où peut-on comparer la structure de la paroi de la bulle à celle du film associé? En effet, les mesures de perméabilité suggèrent que la paroi de la bulle offre une meilleure résistance au passage de l'air que le film lui-même, pourtant constitué de deux couches de protéines. Comment se produit le « collapse » au niveau du film? Dans quelle mesure la présence de la surface de la solution affecte-elle ce processus? Autant de questions auxquelles nous ne pouvons pas répondre pour le moment. L'observation des films in situ par microscopie à force atomique pourrait apporter des éléments de réponse. Il faudrait ensuite confronter la topographie des films à celle d'une monocouche de protéines, lentement comprimée à l'aide d'une barrière de Langmuir.

La différence de perméabilité entre le film et la paroi de la bulle pourrait aussi s'expliquer par des différences au niveau de l'hydratation des couches de protéines considérées. Supposons que l'on puisse assimiler le film à une solution 2D de protéines dans un régime concentré. Au fur et à mesure que le film se comprime, la phase de protéines devient plus concentrée. Comment évolue alors le potentiel chimique de l'eau dans le film? Peut-on s'attendre à un gonflement osmotique du réseau de protéines par diffusion de molécules d'eau à travers le ménisque? Flory s'est intéressé à la capacité d'un réseau de polymères à absorber une grande quantité de solvant [Flo53]. En effet, un réseau de polymères placé au contact d'un réservoir de solvant gonfle spontanément. D'un point de vue énergétique, le mélange polymère/solvant est favorisé: il se traduit par une augmentation du volume du réseau, donc par un gain entropique pour le système (entropie de dilution). Ce processus est contrebalancé par l'existence d'une force élastique qui assure le maintien de la structure du réseau et limite donc son taux de gonflement à l'équilibre. On peut penser que les films de protéines suivent un comportement similaire, de type gel; connectés à la solution par l'intermédiaire de leur ménisque, ils gonflent pour optimiser leur interface avec le solvant. Au fur et à mesure que la bulle rétrécit, la structure du film change, modifiant ainsi l'interaction entre le réseau de protéine et le solvant. C'est peut-être la différence d'hydratation entre les couches de protéines qui participent au film et celle qui constitue la paroi de la bulle qui pourrait expliquer les valeurs des perméabilités obtenues expérimentalement.

4.5 Conclusion

La dissolution d'une bulle de protéines est en partie contrôlée par les propriétés rhéologiques des couches de protéines adsorbées. En effet, les protéines forment un réseau viscoélastique aux interfaces, qui se re-dissout difficilement en solution. Lorsque la bulle rétrécit, la structure de sa paroi et celle du film associé s'affaissent sous l'effet des contraintes mécaniques. La bulle est alors entourée d'une coquille qui devient de plus en plus épaisse et de moins en moins compressible. Expérimentalement, cela se traduit par une diminution simultanée des coefficients de perméabilité (à l'air) de la bulle et du film. Le comportement des bulles de protéines face au mûrissement d'Ostwald se distingue donc nettement de celui des bulles stabilisées par des tensioactifs de petite taille, dont la structure des couches adsorbées reste constante tout au long de la dissolution de

la bulle. Ainsi, les bulles de protéines, étudiées au point isoélectrique, ont une durée de vie beaucoup plus longue que celle des bulles de SDS. On peut donc conclure que les protéines, à défaut de pouvoir stopper le mûrissement d'Ostwald, contribuent à le ralentir. Le ralentissement sera d'autant plus grand que la couche de protéines sera rigide. En effet, Du *et al* ont montré qu'en entourant une bulle d'une carapace rigide, formée de particules solides hydrophobes, il était possible de bloquer complètement le mûrissement d'Ostwald [Du03].

Bibliographie

- [Arc55] R.J. ARCHER, V.K. LA MER, *The Rate of Evaporation of Water through Fatty Acid Monolayers*, Journal of Physical Chemistry **59**, 200-208 (1955).
- [Bar70] G.T. BARNES, T.I. QUICKENDEN, J.E. SAYLOR, *A Statistical Calculation of Monolayer Permeation by Water*, Journal of Colloid and Interface Science **33**(2), 236-243 (1970).
- [Bar97] G.T. BARNES, *Permeation through Monolayers*, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **126**, 149-158 (1997).
- [Ben92] J.J. BENATTAR, A. SCHALCHLI, O. BÉLORGEY, *X-Ray Reflectivity Investigation of Newton and Common Black Films*, Journal de Physique, I. **2**, 955-968 (1992).
- [Ber99] V. BERGERON, *An Introduction to Forces and Structure in Individual Foam and Emulsion Films in Foams and Emulsions*, J.F. Sadoc and N. Rivier (eds), the Netherlands: Kluwer Academic Publishers (1999) p45.
- [Bos96] M.A. BOS, T. NYLANDER, *Interaction between β -lactoglobulin and Phospholipids at the Air/Water Interface*, Langmuir **12**, 2791-2797 (1996).
- [Bos01] M.A. BOS, T. VAN VLIET, *Interfacial Rheological Properties of Adsorbed Protein Layers and Surfactants: a Review*, Advances in Colloid and Interface Science **91**, 437-471 (2001).
- [DeG02] P.G. DE GENNES, F. BROCHARD-WYART, D. QUÉRÉ, *Gouttes, Bulles, Perles et Ondes*, Collection Echelles; Editions Belin, 2002, p71.
- [Dic02] E. DICKINSON, R. ETTELAIE, B. S. MURRAY ET Z. P. DU, *Kinetics of Disproportionation of Air Bubbles beneath a Planar Air-Water Interface Stabilized by Food Proteins*, Journal of Colloid and Interface Science **252**(1), 202-213 (2002).
- [Du03] Z. P. DU, M. P. BILBAO-MONTOYA, B. P. BINKS, E. DICKINSON, R. ETTELAIE ET B. S. MURRAY, *Outstanding Stability of Particle-Stabilized Bubbles*, Langmuir **19**(8), 3106-3108 (2003).
- [Exe83] D. EXEROWA, B. BALINOV, D. KASHCHIEV, *Nucleation Mechanism of Rupture of Newtonian Black Films, II. Experiment*, Journal of Colloid and Interface Science **94**(1), 45-53 (1983).
- [Flo53] P.J. FLORY, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press: Ithaca, New York, 1953, p576.
- [Iva88] I.B. IVANOV, ED., *Thin Liquid Films*, Surfactant Science Series; Marcel Dekker: New York, 1988, p56.
- [Kas80] D. KASHCHIEV, D. EXEROWA, *Nucleation Mechanism of Rupture of Newtonian Black Films, I. Theory*, Journal of Colloid and Interface Science **77**(2), 501-511 (1980).

- [Klo01] W. KLOEK, T. VAN VLIET, M. MEINDERS, *Effect of Bulk and Interfacial Rheological Properties on Bubble Dissolution*, Journal of Colloid and Interface Science **237**, 158-166 (2001).
- [Kru93] R. KRUSTEV, D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV, *Permeability of Common Black Foam Films to Gas, Part 1*, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **79**, 129-136 (1993).
- [Kru96] R. KRUSTEV, D. PLATIKANOV ET M. NEDYALKOV, *Temperature Dependence of Gas Permeability of Newton Black Films*, Langmuir **12**, 1688-1689 (1996).
- [Kru97a] R. KRUSTEV, D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV, *Permeability of Common Black Foam Films to Gas, Part 2*, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **123-124**, 383-390 (1997).
- [Kru97b] R. KRUSTEV, D. PLATIKANOV, A. STANKOVA ET M. NEDYALKOV, *Permeation of Gas through Newton Black Films at Different Chain Length of the Surfactant*, Journal of Dispersion Science and Technology **18**(6-7), 789-800 (1997).
- [Kru99] R. KRUSTEV ET H. J. MULLER, *Effect of Film Free Energy on the Gas Permeability of Foam Films*, Langmuir **15**(6), 2134-2141 (1999).
- [Mur03] R.M. MURUGANATHAN, R. KRUSTEV, N. IKEDA ET H.J. MÜLLER, *Temperature Dependence of the Gas Permeability of Foam Films Stabilized by Dodecyl Maltoside*, Langmuir **19**, 3062-3065 (2003).
- [Ned85] M. NEDYALKOV, D. PLATIKANOV, Abhandlungen Akad. Wiss.DDR; No. 1N, VI Intern. Tagung Grenzfl. Stoffe; Akademie-Verlag: Berlin, 1985, p123.
- [Ned87] M. NEDYALKOV, R. KRUSTEV, D. PLATIKANOV, *Experimental Possibilities for Measuring the Gas Permeability Coefficient of Black Foam Films*, Compte Rendus de L'Académie Bulgare des Sciences **40**(3), 59-62 (1987).
- [Ned88] M. NEDYALKOV, R. KRUSTEV, D. KASHCHIEV, D. PLATIKANOV, D. EXEROWA, *Permeability of Newtonian Black Foam Films to Gas*, Colloid and Polymer Science **266**, 291-296 (1988).
- [Ned92] M. NEDYALKOV, R. KRUSTEV, A. STANKOVA, D. PLATIKANOV, *Mechanism of Permeation of Gas through Newton Black Films at Different Temperatures*, Langmuir **8**, 3142-3144 (1992).
- [Nin99] M.R.R. NINO, C.C. SANCHEZ, J.M.R. PATINO, *Interfacial Characteristics of β -Casein Spread Films at the Air-Water Interface*, Colloids and Surfaces b-Biointerfaces **12**, 161-173 (1999).
- [Per03] L.G. CASCAO PEREIRA, C. JOHANSSON, C.J. RADKE, H.W. BLANCH, *Surface Forces and Drainage Kinetics of Protein-Stabilized Aqueous Films*, Langmuir **19**, 7503-7513 (2003).
- [Pet03] V. PETKOVA, D. PLATIKANOV ET A. NEDYALKOV, *Phospholipid Black Foam Films: Dynamic Contact Angles and Gas Permeability of DMPC plus DMPG Black Films*, Advances in Colloid and Interface Science **104** 37-51 (2003).
- [Pla80] D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV, V. NASTEVA, *Line Tension of Newton Black Films, II. Determination by the Diminishing Bubble Method*, Journal of Colloid and Interface Science **75**(2), 620-628 (1980).

- [Pla03] D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV ET V. PETKOVA, *Phospholipid Black Foam Films: Dynamic Contact Angles and Gas Permeability of DMPC Bilayer Films*, Advances in Colloid and Interface Science **100** 185-203 (2003).
- [Pri65] H.M. PRINCEN, S.G. MASON, *The Permeability of Soap Films to Gases*, Journal of Colloid and Interface Science **20**, 353-375 (1965).
- [Pri98] A. PRINS, M.A. BOS, F.J.G. BOERBOOM, H.K.A.I. VAN KALSBEK, *Relation between Surface Rheology and Foaming Behaviour of Aqueous Protein Solutions*, D. Möbius and R. Miller (eds), Elsevier:Amsterdam (1998) p221.

Chapitre 5

Angle de contact d'un film noir de protéines

L'objectif de ce chapitre est de quantifier les interactions qui existent entre les différentes couches de protéines adsorbées dans les films noirs. Une méthode pour cela consiste à mesurer l'angle de contact qui se forme à la jonction entre le film et son ménisque. Nous discuterons d'abord des différentes techniques qui permettent de remonter à ce paramètre-clé de la structure des films. Cependant, nous verrons que toutes ne se prêtent pas à l'étude des films de protéines. En effet, nous montrerons que dans certaines conditions dynamiques, il se produit un hysteresis de l'angle de contact lié à la rhéologie des couches de protéines et à l'adhésion entre les deux parois du film. Nous proposerons alors une nouvelle technique, développée au laboratoire, qui permet de déterminer l'angle de contact des films de protéines à l'équilibre. Le but à terme est de voir s'il est possible d'établir une corrélation entre les propriétés de perméabilité des films (*cf.* chapitre 4) et leur énergie d'interaction.

5.1 L'angle de contact : un révélateur des interactions intermoléculaires au sein des films

Considérons un film liquide plan connecté à un réservoir de solution par l'intermédiaire d'un ménisque (Figure 5.1). La tension de surface de la solution sera notée σ . On peut distinguer trois zones dans ce système, caractérisées par des propriétés interfaciales différentes :

- *le film* : il possède une épaisseur constante h , déterminée par les interactions qui agissent entre les deux surfaces. Ces interactions donnent naissance à une pression supplémentaire, appelée pression de disjonction [Der76] [Der78]. Elle traduit un changement de la tension de surface des deux parois en interaction ; la tension des parois du film est notée σ^f .
- *le ménisque* : loin du film, la pression de disjonction est nulle, ce qui signifie que les deux faces du ménisque s'ignorent. Leur tension de surface est donc constante et égale à σ . Le profil du ménisque obéit alors à l'équation de Laplace.
- *la zone de transition film/ménisque* : cette région intermédiaire assure le raccord entre le film et son ménisque. Les deux parois s'écartent l'une de l'autre, mais elles restent

suffisamment proches pour interagir ensemble. La pression de disjonction varie donc suivant Ox , tout comme la tension de surface : elle passe progressivement de sa valeur dans le film (σ^f) à celle dans le ménisque (σ). Il y a peu d'information directe sur la structure de cette zone de transition et la détermination de son profil est encore sujet à débat [Iva88].

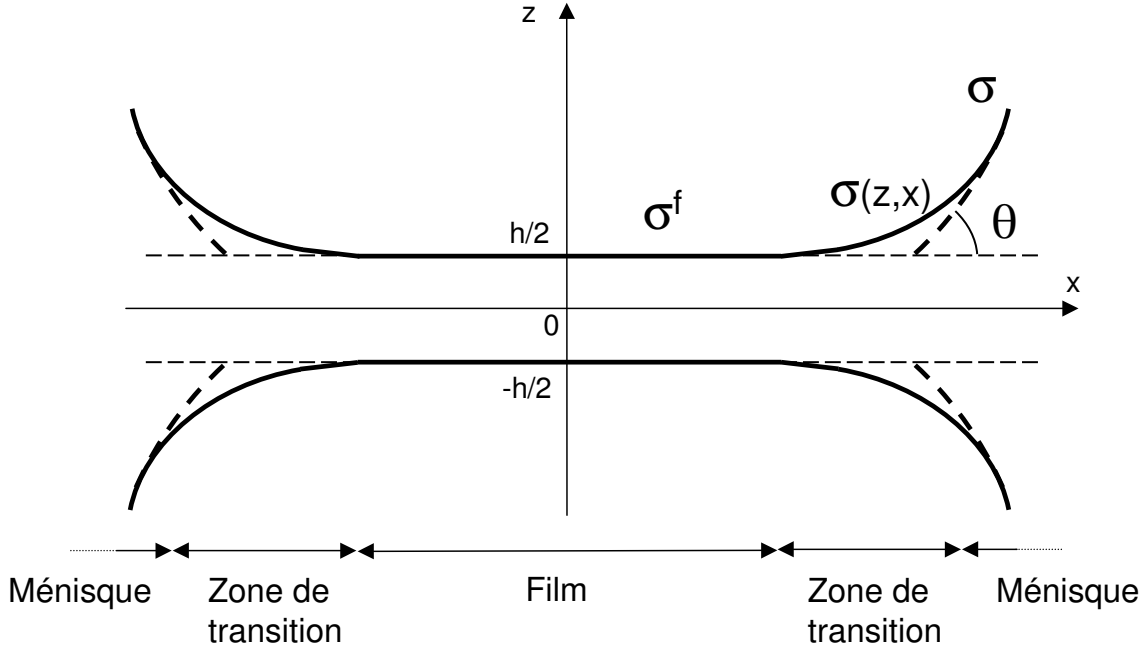


FIG. 5.1 – Représentation schématique de la transition entre un film mince et son ménisque. Les lignes continues correspondent aux interfaces réelles tandis que celles en pointillés se rapportent aux interfaces extrapolées.

On fait couramment abstraction de la présence de cette zone où la tension de surface est variable et on idéalise la jonction film/ménisque en extrapolant le profil du ménisque (caractérisé par σ) jusqu'à son intersection avec la surface du film (courbe en pointillés sur la figure 5.1). D'un point de vue géométrique, l'angle de contact θ définit l'inclinaison du ménisque par rapport au plan du film le long de la ligne d'intersection (aussi appelée ligne de contact). On peut remarquer que l'angle de contact est un concept purement macroscopique, dans la mesure où la jonction microscopique entre le film et le ménisque se traduit forcément par un angle de contact nul au début de la zone de transition film/ménisque.

Pour une ligne de contact rectiligne, l'équilibre mécanique des forces, projeté dans le plan du film, s'écrit :

$$2\sigma^f = 2\sigma \cos \theta \quad (5.1)$$

C'est la relation de Neumann-Young. Or, σ^f peut s'exprimer en fonction de σ et de l'énergie libre d'interaction du film $\Delta F(h)$ ¹ de la manière suivante (cf. annexe B pour plus de détails) :

$$2\sigma^f = 2\sigma + \Delta F(h) \quad \text{avec} \quad \Delta F(h) < 0 \quad (5.2)$$

1. par unité de surface

En reprenant (5.1), il vient :

$$\Delta F(h) = 2\sigma(\cos \theta - 1) \quad (5.3)$$

On peut donc déterminer expérimentalement $\Delta F(h)$ à condition de savoir mesurer σ et θ . Tout comme $\Delta F(h)$ et σ , θ est un paramètre thermodynamique qui rend compte de l'état du film². Dans le cas des films noirs, les angles de contact sont relativement grands, ce qui rend a priori la détermination de θ plus aisée (par comparaison avec des films épais).

5.2 Les principales techniques de mesure

Une première approche consiste à mesurer expérimentalement la tension du film et à calculer θ à l'aide de l'équation (5.1) [Pri69] [Cli69]. Cependant, pour des angles de contact petits, la différence entre σ^f et σ est tellement faible qu'il est difficile de la déterminer précisément. Par conséquent, toutes les autres techniques présentées ci-dessous proposent de mesurer directement θ .

Huisman et Mysels ont développé une méthode qui consiste à étudier une bulle formée juste au-dessous de la surface de la solution [Mys66] [Hui69]. La bulle, maintenue au bout d'un capillaire, est positionnée verticalement de manière à ce que la surface de la solution qui l'entoure soit parfaitement plane (Figure 5.2). Le film ainsi obtenu présente la forme d'une calotte sphérique dont les paramètres géométriques sont déterminés à l'aide d'un microscope horizontal et permettent de remonter à l'angle de contact.

La plupart des autres méthodes cherchent à reconstituer le profil du ménisque (parfois appelé « bord de Plateau ») à l'aide de diagrammes d'interférences afin d'en déduire θ . La précision de ces méthodes interférométriques est prometteuse, dans la mesure où les franges d'interférence permettent de remonter à des distances dont la valeur est inférieure à la résolution d'un microscope optique traditionnel. Ainsi, Princen et al ont déterminé l'angle de contact d'un film vertical par le biais d'expériences de diffraction laser sur son ménisque [Pri68] [Pri71]. Ce dernier se comporte en quelque sorte comme un prisme (Figure 5.3). Cette technique permet de mesurer avec une précision de $\pm 0,05^\circ$ des angles de contact supérieurs à 1° .

Scheludko *et al* ont proposé une autre méthode, dite topographique, basée sur l'analyse des anneaux de Newton qui se forment autour d'un film lorsqu'on l'illumine par un faisceau normal de lumière monochromatique [Sch68] [Kol68]. Les films en question sont formés au centre d'une goutte biconcave dans une cellule de Scheludko-Exerowa (Figure 5.4) [Exe98].

Les anneaux de Newton correspondent aux franges d'interférence des faisceaux lumineux qui se réfléchissent sur chacune des faces du ménisque. Connaissant l'épaisseur du film et la position des premières franges, on peut reconstruire la surface du ménisque. En assimilant son profil à une parabole, la valeur de θ est extrapolée au contact du film. Cette technique est particulièrement adaptée pour la caractérisation de petits angles de contact, qui correspondent à des ménisques de faible pente pour lesquels les franges d'interférence sont bien résolues. Pour les angles de contact

2. Il existe une autre convention qui définit l'angle de contact par rapport au plan médian du film, et non pas par rapport au plan d'une de ses parois [Mar76]. L'équilibre mécanique s'écrit alors: $\gamma^f = 2\sigma \cos \theta$, où γ^f est la tension globale du film définie comme $\gamma^f = 2\sigma^f + \Pi h$. Dans ce contexte, $\Delta F(h) + \Pi h = 2\sigma(\cos \theta - 1)$. Cette convention étant rarement utilisée, nous nous en tiendrons à celle présentée ci-dessus.

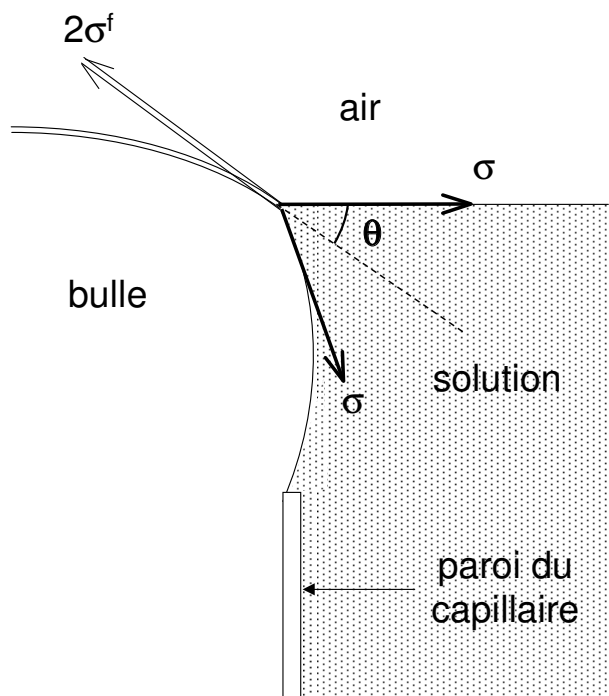


FIG. 5.2 – Profil d'une bulle à la surface de la solution. Dans cette configuration spéciale, la position de la bulle est ajustée afin que la surface de la solution au contact soit plane [Hui69].

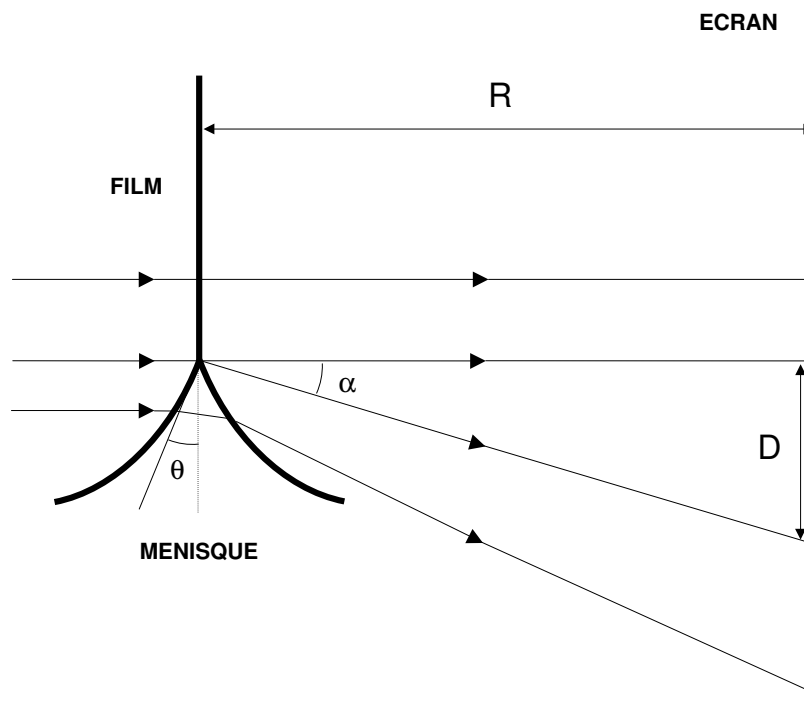


FIG. 5.3 – Trajet optique d'un faisceau de lumière horizontale à travers le bord de Plateau d'un film plan caractérisé par un angle de contact θ [Pri68].

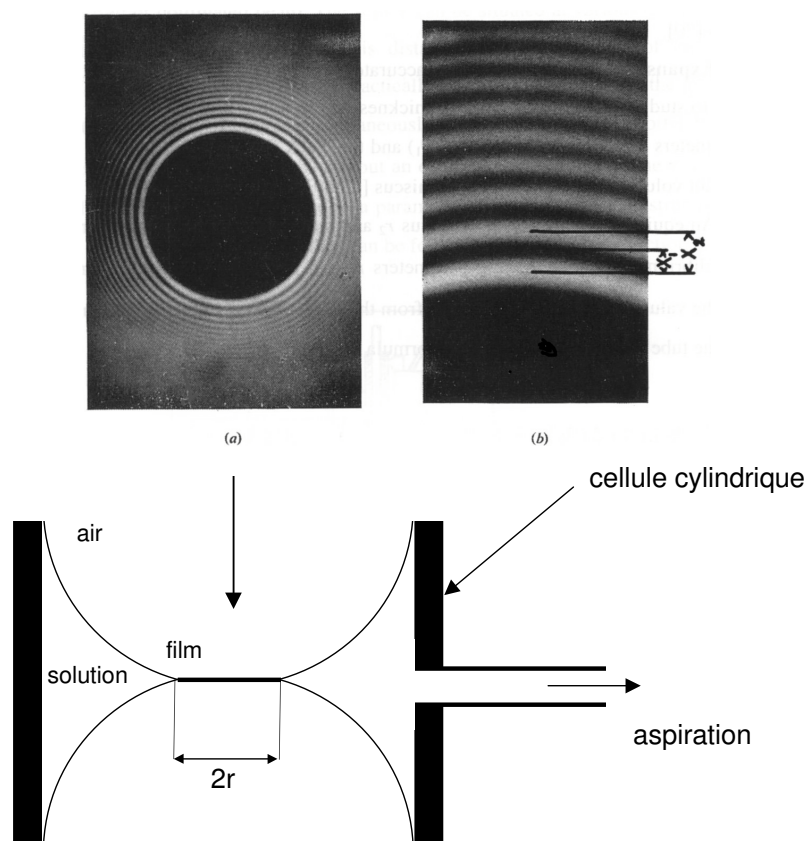


FIG. 5.4 – Cellule de Scheludko-Exerowa : les films sont formés au centre d’une goutte biconcave dont on contrôle la pression au niveau du ménisque. Les films obtenus sont plans, de forme sphérique et de taille micrométrique. On les observe expérimentalement du dessus, à l’aide d’un microscope optique (clichés (a) et (b)). En analysant la position des anneaux de Newton, on peut reconstruire le profil du ménisque et en déduire l’angle de contact du film [Exe98].

supérieurs, Scheludko *et al* recommandent l’utilisation d’une autre technique, dite de l’expansion des films (pour plus de détails, voir [Sch68] [Kol68]).

Plus récemment, d’autres méthodes ont été proposées pour déterminer l’angle de contact d’un film courbe formé sur le haut d’une bulle à la surface de la solution (Figure 4.1). Le calcul de θ se base sur la résolution numérique de l’équation de Laplace, qui décrit le profil de la bulle déformée par la gravité. Pour les petits angles de contact, le profil de la bulle près du film est reconstitué à l’aide des anneaux de Newton [Lob90] [Dim90]³. Pour des angles plus grands ($> 4^\circ$), les anneaux de Newton se confondent avec la ligne de contact du film, dont le rayon peut donc être déterminé avec précision. Dans ces conditions, Platikanov *et al* ont proposé une expression simplifiée de θ , qui ne dépend que de paramètres géométriques du système facilement mesurables [Pla80a]. Cette

3. Ces deux articles traitent également d’une technique interférométrique différentielle qui s’est révélée inadaptée à l’étude de films formés en haut d’une bulle : les diagrammes d’interférences du ménisque sont parasités par d’autres interférences provenant de faisceaux réfléchis sur le fond de la bulle (voir la fin de la discussion dans la référence [Pla88]).

approche a le mérite de ne pas nécessiter de traitement numérique lourd. Elle sera présentée de manière plus détaillée au paragraphe suivant, puis nous l'utiliserons à titre préliminaire pour déterminer l'angle de contact des films noirs de protéines.

Toutes ces techniques ont été mises au point en étudiant des films noirs de SDS, qui sert là-encore de tensioactif de référence. On peut retenir que la transition film commun/ film de Newton se traduit par une nette augmentation de l'angle de contact : les films communs de SDS sont caractérisés par des angles d'environ 1° , tandis qu'ils peuvent atteindre jusqu'à 12° pour les films de Newton [Kol68]. De Feijter and Vrij ont proposé une étude très complète qui analyse l'évolution de l'énergie libre d'interaction de toute une gamme de films de Newton de SDS en fonction de la température et de la concentration en électrolyte dans la solution [DeF78] [DeF79]. Par ailleurs, Nedyalkov *et al* ont également montré que l'angle de contact des films de Newton de SDS augmentait avec la concentration de tensioactifs dans la solution [Ned92].

Quelques travaux plus récents se sont intéressés à l'étude des interactions dans les films noirs de dodecyl maltoside [Mur04] et de phospholipides [Toc99] [Toc00a] [Toc00b] [Pla03] [Pet03]. Il y a cependant très peu d'informations concernant les films minces de protéines [Pla81] [Ran90] [Mar97].

5.3 Hysteresis dynamique de l'angle de contact des films minces de protéines

5.3.1 Méthode expérimentale

Nous avons étudié au chapitre 4 la dissolution d'une bulle de protéines attachée à la surface de la solution. Nous en avons déduit le coefficient de perméabilité du film en fonction du temps. Parallèlement à ces mesures, nous avons suivi l'évolution de l'angle de contact des films de protéines tout au long de la décroissance de la bulle. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de Platikanov évoquée au paragraphe précédent.

L'équilibre mécanique de la bulle, supposée parfaitement sphérique, s'écrit (*cf.* chapitre 4) :

$$\frac{4}{3}\pi R^3 \rho g + 2\pi r \sigma \sin \psi = 0 \quad (5.4)$$

Soit :

$$\psi = \arcsin\left(\frac{2\rho g R^3}{3\sigma r}\right) \quad (5.5)$$

On peut remarquer sur la figure 5.5 que :

$$\sin(2\theta + \psi) = \frac{r}{R} \quad (5.6)$$

On obtient aisément l'expression de θ suivante :

$$2\theta = \arcsin\left(\frac{r}{R}\right) - \arcsin\left(\frac{2\rho g R^3}{3\sigma r}\right) \quad (5.7)$$

Pour une bulle légèrement déformée par la gravité, Dimitrov y a apporté la correction sui-

qu'on étudie est de l'ordre de quelques dizaines de micromètres. On a donc :

$$\frac{\chi}{r} \sim 5.10^{-5} \text{ N.m}^{-1} \quad (5.10)$$

Ce terme est donc négligeable devant :

$$2\sigma \cos \theta \approx 2\sigma \sim 0.1 \text{ N.m}^{-1} \quad (5.11)$$

Dans le cas des films de protéines étudiés, on peut donc conclure que l'équilibre mécanique de la ligne de contact se réduit à :

$$2\sigma^f = 2\sigma \cos \theta \quad (5.12)$$

5.3.3 Application au cas des films de protéines : observation d'un phénomène d'hystérésis

Nous avons vu au chapitre 4 que lors de la dissolution d'une bulle de protéines, la tension de surface de la paroi de la bulle tendait à diminuer alors que celle de la solution restait constante. Par conséquent, le film perd progressivement les propriétés de symétrie des couches de protéines qui le constituent.

L'équilibre mécanique de la ligne de contact s'écrit alors :

$$\sigma_1 \cos \theta_1 + \sigma_2 \cos \theta_2 = \sigma_1^f + \sigma_2^f \quad (5.13)$$

où σ_1 est la tension de surface de la bulle et σ_2 celle de la solution.

σ_1^f et σ_2^f représentent la tension de chacune des faces du film.

D'autre part, les équations (5.5) et (5.8) deviennent :

$$\psi = \arcsin\left(\frac{2\rho g R^3}{3\sigma_1 r}\right) \quad (5.14)$$

$$\theta_1 + \theta_2 = \arcsin\left(\frac{r}{R} - \frac{2\rho g R^3}{3\sigma_2 r}\right) - \arcsin\left(\frac{2\rho g R^3}{3\sigma_1 r}\right) \quad (5.15)$$

Résultats expérimentaux

La figure 5.6 présente l'évolution de $\theta_1 + \theta_2$ en fonction du temps pour différents films de protéines. Dans tous les cas, $\theta_1 + \theta_2$ augmente au fur et à mesure que la bulle décroît. Cette augmentation suit étroitement l'évolution du rapport $\frac{r}{R}$, qui indique que le rayon du film décroît plus lentement que le rayon de la bulle, proportionnellement parlant⁴. A titre de comparaison, la dernière courbe de la figure 5.6 montre la dépendance de θ en fonction du temps dans le cas d'un film de Newton de SDS⁵ : il apparaît clairement que la grandeur θ , tout comme le rapport $\frac{r}{R}$, reste quasiment constante quelque soit la taille de la bulle.

4. Le poids des termes qui font intervenir la tension de surface est très faible dans l'expression de l'angle de contact ; il n'est pas nécessaire de les considérer pour rendre compte de l'augmentation de $\theta_1 + \theta_2$.

5. Pour un film de Newton de SDS, nous avons vu que la structure des couches de tensioactifs adsorbés ne variait pas lors de la décroissance de la bulle. Par conséquent : $\theta_1 = \theta_2 = \theta$

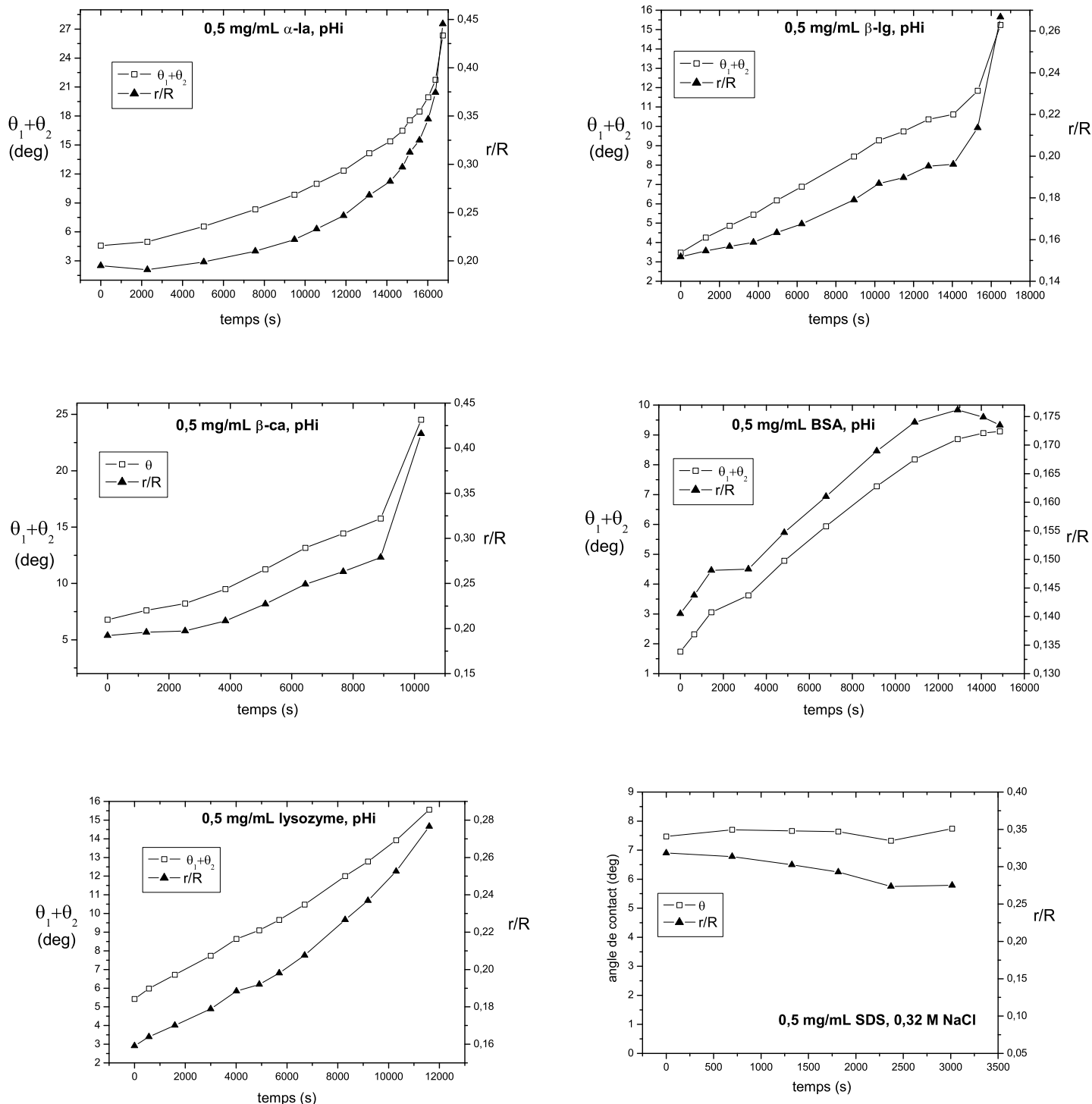


FIG. 5.6 – Hystérésis de l'angle de contact de divers films de protéines en fonction du temps. La dernière courbe montre que l'angle de contact d'un film de Newton de SDS reste constant lorsque le rayon de la bulle décroît. Le phénomène d'hystérésis dépend des propriétés rhéologiques des couches de protéines adsorbées et de l'énergie d'adhésion entre les parois du film. On peut remarquer qu'on n'observe pas de boucle complète d'hystérésis. En effet, les bulles en diminuant de taille, s'éloignent toujours davantage de l'état d'équilibre où leur pression interne serait égale à celle de l'atmosphère environnante.

Interprétation

L'augmentation de l'angle de contact des films de protéines est la signature d'un phénomène d'hystérésis, déjà observé par Rangelova *et al* dans le cas de films noirs de HSA (Human Serum Albumin)[Ran90]. En effet, leurs expériences montrent que l'angle de contact des films croît lorsque la pression du ménisque est soumise à une brutale augmentation de quelques pascals (Figure 5.7). Le film commence ensuite à se contracter permettant ainsi à l'angle de contact de retrouver sa valeur à l'équilibre au bout de quelques minutes.

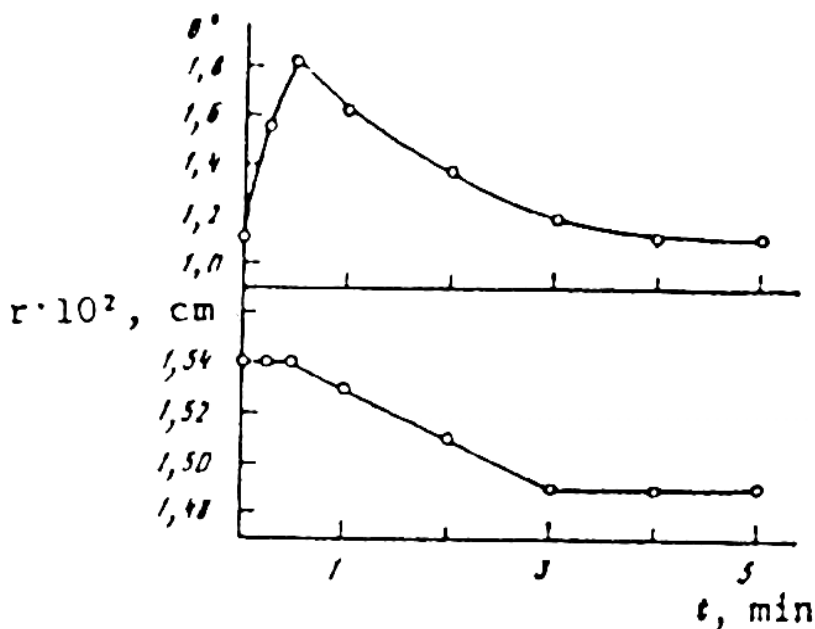


FIG. 5.7 – Hysteresis de l'angle de contact d'un film de HSA formé au point isoélectrique de la protéine. Suite à une brutale variation de la pression dans le ménisque, l'angle de contact augmente. Le film (de rayon r) commence alors à se contracter, permettant ainsi à l'angle de contact de retrouver progressivement sa valeur à l'équilibre [Ran90].

Le phénomène d'hystérésis est interprété de la manière suivante : tout d'abord, il est étroitement lié aux propriétés rhéologiques des couches d'adsorption au niveau du ménisque. Lorsque la pression capillaire augmente, la surface du ménisque diminue comprimant ainsi les protéines adsorbées à sa surface. Le film auquel il est raccordé se trouve alors sous contrainte. Son rayon va progressivement diminuer afin de permettre au ménisque (élastique) de relaxer. Cependant, pour que la taille du film puisse décroître, il faut nécessairement que les deux couches de protéines impliquées dans la structure du film se décollent. La contrainte qui s'applique sur le film doit donc être suffisante pour contrebalancer la force d'adhésion entre les deux parois. Ce seuil est atteint lorsque l'angle de contact atteint la valeur maximale observée sur la figure 5.7.

On peut donc conclure que l'origine du phénomène d'hystérésis est double :

- il est d'une part corrélé aux propriétés rhéologiques des couches de protéines irréversiblement adsorbées,
- d'autre part, il dépend de l'énergie d'adhésion entre les deux parois du film.

Dans le cas des bulles de protéines qu'on étudie, la pression dans la bulle augmente de manière continue au fur et à mesure que le gaz s'en échappe. Par conséquent, le rayon de courbure de la bulle, *i.e.* donc du ménisque, diminue continûment. La couche de protéines qui forme la paroi de la bulle est comprimée en permanence sans jamais pouvoir relaxer. Elle exerce donc une contrainte croissante sur le film dont les parois finissent par se décoller progressivement. On observe expérimentalement que le rapport $\frac{r}{R}$, qui détermine la valeur de $\theta_1 + \theta_2$, suit l'augmentation de la pression dans la bulle (qui augmente en fonction du temps). Cette évolution traduit le fait que la taille du film diminue plus lentement que la taille de la bulle. Le film est donc en retard par rapport à la bulle, et ce retard se creuse d'autant plus que la bulle décroît vite. L'équilibre thermodynamique film/ménisque est donc rompu du fait de la rhéologie des couches de protéines et de l'énergie d'adhésion qui s'oppose à la séparation des deux faces du film (d'où le retard précédent).

En conclusion, l'augmentation de $\theta_1 + \theta_2$ observée pour les films de protéines est due à un phénomène d'hystérésis dynamique tout au long de la décroissance de la bulle. De plus, on peut remarquer qu'on n'observe pas de boucle complète d'hystérésis. En effet, les bulles, en diminuant de taille, s'éloignent toujours davantage de l'état d'équilibre où leur pression interne serait égale à celle de l'atmosphère environnante. Les films de Newton de DMPC semblent présenter un comportement similaire du fait de la présence d'un réseau de liaisons hydrogène qui renforce les interactions entre les parois du film [Pla03]. En revanche, on n'observe pas un tel hystérésis pour les films noirs de SDS pour lesquels il est possible de déterminer précisément l'angle de contact à l'équilibre. Pour en faire de même avec les films noirs de protéines, nous avons mis au point une nouvelle méthode, présentée au paragraphe suivant. Cette méthode a le mérite de répondre aux critères suivants :

- elle ne nécessite que des films de protéines microscopiques, c'est-à-dire relativement faciles à obtenir en terme de stabilité,
- les films en question sont à l'équilibre thermodynamique, permettant ainsi de s'affranchir du phénomène d'hystérésis décrit ci-dessus,
- enfin, elle est relativement peu lourde à mettre en oeuvre au regard du matériel nécessaire.

5.4 Une nouvelle méthode pour étudier les interactions entre couches de protéines dans un film noir

5.4.1 Préliminaire

Evans a proposé en 1980 une procédure expérimentale pour mesurer l'énergie libre d'adhésion d'une membrane sur une autre surface (vésicule, sphère rigide...) [Eva80] [Eva95]. Cette approche a été appliquée avec succès au cas de bicouches de phospholipides appartenant à de larges vésicules. En jouant sur la fonctionnalisation des lipides incorporés dans la membrane, cette technique permet d'étudier et de modéliser un grand nombre d'interactions présentes dans les systèmes biologiques (*cf.* [Pin01] [Tar02] par exemple) . Dans ces expériences, les vésicules sont manipulées par des micropipettes, dont l'aspiration permet de contrôler la tension de la membrane. Une fois que l'adhésion entre les deux surfaces est réalisée et qu'elles ont adopté

leur configuration à l'équilibre, l'angle de contact (θ) est déduit numériquement de la géométrie du système. Il est ainsi possible de calculer l'énergie d'adhésion macroscopique entre les deux surfaces étudiées. En effet, considérons deux vésicules dont l'une est beaucoup plus tendue que l'autre (Figure 5.8). Au moment de l'adhésion, la vésicule la plus flasque va venir épouser la forme de l'autre.

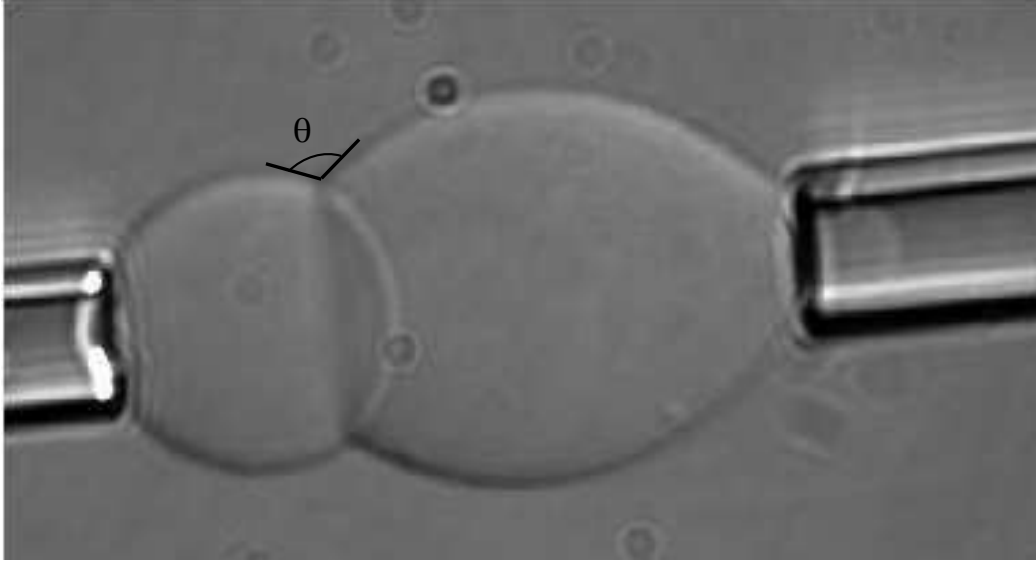


FIG. 5.8 – Adhésion entre deux vésicules micromanipulée : l'une des vésicules est tendue tandis que l'autre se déforme pour s'enrouler autour de la première.

L'énergie d'adhésion correspond au travail qu'il faut fournir pour les détacher. Ce travail est donné par l'équation de Dupré :

$$W = \gamma_t + \gamma_{fl} - \gamma_{fl-t} \quad (5.16)$$

où γ_{fl-t} est la tension de l'interface entre les deux vésicules ; γ_t et γ_{fl} sont respectivement les tensions de surface de la vésicule tendue et celle de la vésicule flasque.

Lorsque les deux vésicules sont à l'équilibre mécanique, la relation de Young-Neumann s'écrit (Figure 5.9) :

$$\gamma_{fl-t} - \gamma_t - \gamma_{fl} \cos \theta = 0 \quad (5.17)$$

Soit :

$$W = \gamma_{fl}(1 - \cos \theta) \quad (5.18)$$

Notre idée est la suivante : il s'agit non plus d'étudier l'adhésion entre deux vésicules, mais entre deux (hémi)bulles de protéines. L'interface entre les deux bulles est un film mince dont l'angle de contact sera déterminé à partir des propriétés géométriques des bulles. En appliquant la relation de Dupré et celle de Young-Neumann à ce nouveau système, il vient :

$$W = 2\sigma(1 - \cos \theta) \quad (5.19)$$

On retrouve bien l'équation (5.3) qui avait été établie dans un formalisme purement thermodyna-

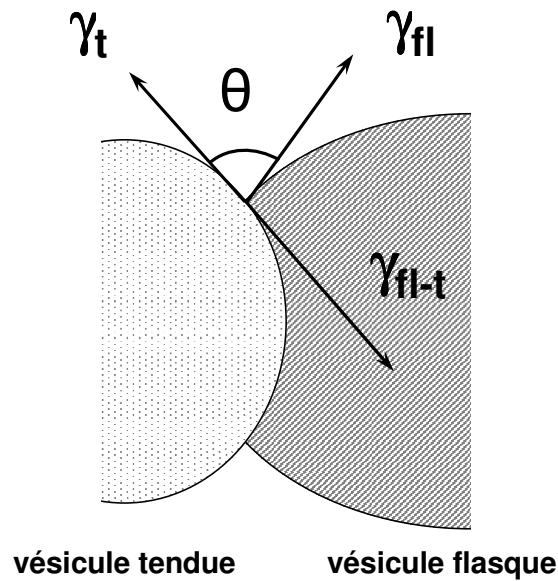


FIG. 5.9 – Représentation schématique de deux vésicules à l'équilibre mécanique.

mique (cf. annexe B). L'énergie d'adhésion entre les deux bulles (W) correspond donc à l'opposé de l'énergie d'interaction entre les deux parois du film (précédemment notée ΔF)⁶.

5.4.2 Principe

On propose de mesurer l'angle de contact d'un film microscopique plan formé à l'intersection de deux bulles en solution (Figure 5.10). La pression dans chacune des bulles est identique et maintenue constante tout au long de l'expérience de manière à ce que le film reste à l'équilibre thermodynamique.⁷ L'angle de contact est déduit numériquement de l'équation de Laplace qui permet de décrire le profil des bulles. Leur forme est modélisée d'une part par les forces capillaires qui tendent à rendre les bulles sphériques, et d'autre part par la gravité qui les allonge. Le principe du calcul est exposé ci-dessous. Le raisonnement est appliqué à la bulle supérieure, mais il est possible d'en faire de même pour la bulle inférieure.

L'équation de Laplace s'écrit :

$$\Delta p = \sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (5.20)$$

σ représente la tension de surface de la bulle et Δp la pression capillaire. R_1 et R_2 sont les deux rayons qui caractérisent la courbure de la surface en un point M. Ils correspondent aux rayons de courbure du profil de la bulle dans deux plans orthogonaux qui se coupent selon \vec{N} , le vecteur

6. On dit que deux surfaces adhèrent si pour les séparer il est nécessaire d'appliquer une force au moins supérieure à celle qui les lie. Dans ce cas, les surfaces se détachent brusquement et se retrouvent loin l'une de l'autre ; on parle alors de saut adhésif. Dans le cas de deux surfaces simplement en interaction, il est possible de les éloigner continûment l'une de l'autre en appliquant juste la force nécessaire pour compenser la différence d'interaction entre les surfaces sur le déplacement considéré.

7. On compense ainsi les pertes de pression liée au passage de l'air de l'intérieur de la bulle vers la solution ainsi que les pertes liées au fait que l'étanchéité du montage n'est jamais parfaite. On évite ainsi le phénomène d'hystérésis décrit au paragraphe précédent.

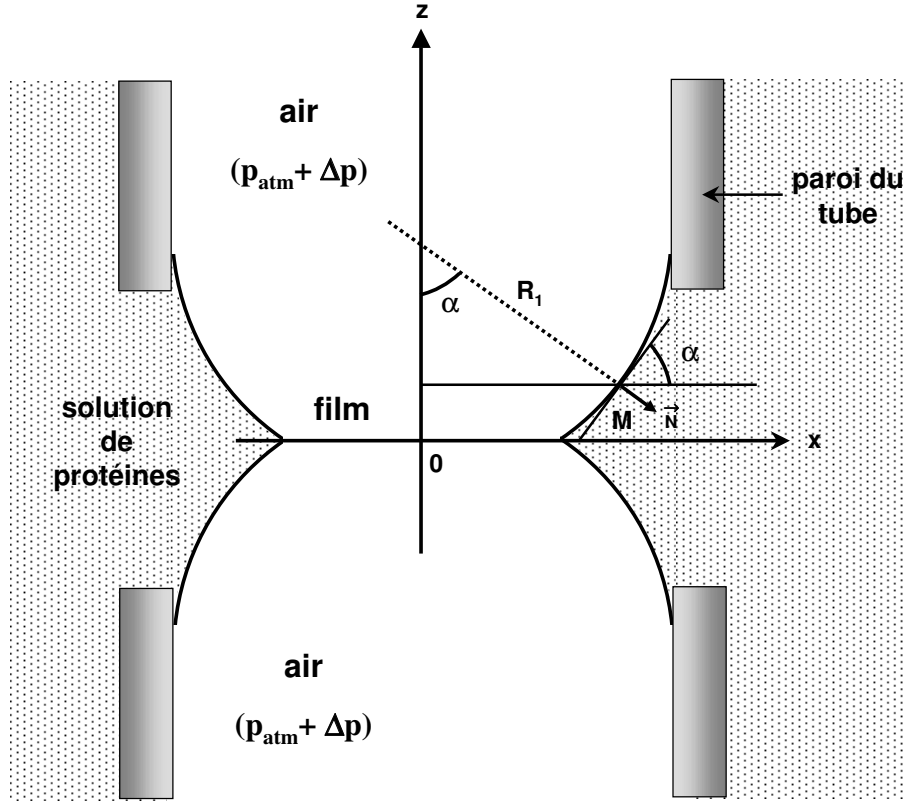


FIG. 5.10 – Profil de deux bulles accolées en solution : un film horizontal se forme à leur intersection. L'angle de contact de ce film peut être déduit numériquement de la forme des bulles à l'aide de l'équation de Laplace.

normal à la surface en M (Figure 5.10).

Si s est la coordonnée curviligne qui suit le profil de la bulle dans le plan méridien, i.e., le plan de la feuille, on peut écrire (Figure 5.10) :

$$R_1 = \frac{ds}{d\alpha} \quad \text{et} \quad R_2 = \frac{x}{\sin \alpha} \quad (5.21)$$

D'autre part, la pression capillaire au point M vaut :

$$\Delta p = p_{int} - (p_0 + \rho g(h - z)) \quad (5.22)$$

où p_{int} est la pression dans la bulle, p_0 la pression atmosphérique et ρ la masse volumique de la solution. h correspond à la distance qui sépare le film de la surface de la solution. Appelons Δp_f l'excès de pression au niveau du film⁸ :

$$\Delta p_f = p_{int} - (p_0 + \rho gh) \quad (5.23)$$

8. Δp_f correspond également à la pression de disjonction du film à l'équilibre.

Alors :

$$\Delta p = \Delta p_f + \rho g z \quad (5.24)$$

En remplaçant R_1 , R_2 et Δp par leur expression dans l'équation (5.20), il vient :

$$\Delta p_f + \rho g z = \sigma \left(\frac{d\alpha}{ds} + \frac{\sin \alpha}{x} \right) \quad (5.25)$$

En posant :

$$\kappa = \frac{g\rho}{\sigma} \quad (5.26)$$

Il vient :

$$\frac{\Delta p_f}{\sigma} + \kappa z = \frac{d\alpha}{ds} + \frac{\sin \alpha}{x} \quad (5.27)$$

Or :

$$\frac{d\alpha}{ds} = \frac{d\alpha}{dx} \frac{dx}{ds} = \frac{d\alpha}{dx} \cos \alpha \quad (5.28)$$

Soit, en reprenant (5.27) :

$$\frac{\Delta p_f}{\sigma} + \kappa z = \frac{1}{x} \frac{d}{dx} (x \sin \alpha) \quad (5.29)$$

En intégrant l'expression sur l'intervalle $[r_f ; r]$, on obtient :

$$\frac{\Delta p_f}{2\sigma} (r^2 - r_f^2) + \kappa \int_{r_f}^r z x dx = r \sin \theta - r_f \sin \theta_f \quad (5.30)$$

θ_f et r_f sont respectivement l'angle de contact et le rayon du film, tandis que θ correspond à l'angle réalisé par la tangente au point de coordonnées $(r; z)$ du profil la bulle avec l'horizontale. Par changement de variable, on a l'égalité suivante :

$$\int_{r_f}^r z x dx = \int_0^z z x dz \quad (5.31)$$

Puis, en intégrant par parties, il vient :

$$2 \int_0^z z x dz = r^2 z - \int_0^z x^2 dz = r^2 z - \frac{V(z)}{\pi} \quad (5.32)$$

où $V(z)$ est le volume de la portion de la bulle comprise entre le film et le plan horizontal d'ordonnée z .

L'équation (5.30) devient alors :

$$r \sin \theta - r_f \sin \theta_f = \frac{\Delta p_f}{2\sigma} (r^2 - r_f^2) + \frac{\kappa}{2} \left(r^2 z - \frac{V(z)}{\pi} \right) \quad (5.33)$$

Soit :

$$\theta_f = \arcsin \left(\frac{r \sin \theta - \frac{\Delta p_f}{2\sigma} (r^2 - r_f^2) + \frac{\kappa}{2} \left(\frac{V(z)}{\pi} - r^2 z \right)}{r_f} \right) \quad (5.34)$$

C'est en utilisant cette expression que les angles de contact des films de protéines étudiés ont été calculés. Le volume $V(z)$ est intégré numériquement (méthode des rectangles) à partir des photographies des bulles. Comme les calculs de θ_f sont assez bruités, chaque valeur proposée est la moyenne d'au moins une vingtaine de valeurs obtenues pour différents volumes $V(z)$ de la même bulle. En d'autre terme, cela revient à effectuer le même calcul sur différentes portions de la bulle, et donc à faire varier la borne d'intégration supérieure de l'équation (5.30).

La faiblesse de cette méthode réside dans le fait que la région du ménisque près de la ligne de contact est mal définie sur les photographies. Pour connaître les coordonnées du point d'intersection entre le film et le ménisque, il est nécessaire d'extrapoler les profils des deux bulles jusqu'à ce qu'ils se croisent. Dans la gamme de taille dans laquelle on travaille ($R \simeq 0.5 \text{ mm}$), les bulles sont très peu déformées par la gravité. On détermine alors la position de la jonction film/ménisque en prolongeant la surface des deux bulles dans l'hypothèse où celle-ci est parfaitement sphérique. Cette méthode repose donc sur l'idée que l'incertitude sur la position de la ligne de contact est compensée par le fait que le calcul de θ_f se base sur une portion du ménisque de grande taille (via la détermination de $V(z)$), dont la forme est elle bien connue expérimentalement.

5.4.3 Dispositif expérimental

Les films étudiés sont formés à l'intersection de deux bulles délicatement compressées l'une sur l'autre, le tout immergé dans une solution de protéines. Chacune des bulles est soufflée à l'extrémité d'un tube en teflon vertical percé d'un trou d'1 mm de diamètre. La pression dans les bulles est contrôlée par l'intermédiaire de deux seringues, elles-même reliées à deux manomètres différentiels indépendants (Figure 5.11). En 1953, Derjaguin et Titievskaya avaient déjà proposé un montage analogue pour étudier le drainage de films microscopiques [Der53]. Dans leurs travaux, les films sont observés directement du dessus à l'aide d'un microscope, et non pas de profil comme nous allons le faire.

Au début de l'expérience, les deux tubes sont collés l'un à l'autre. On remplit alors la cellule de la solution de protéines à étudier. On impose un légère surpression (par rapport à la pression atmosphérique) dans les tubes et on les écarte à l'aide d'une table de translation micrométrique. Le ménisque ainsi formé (Figure 5.12) est utilisé pour ajuster la coaxialité du système. Puis, on augmente la dépression dans le ménisque jusqu'à le détruire. Les deux bulles sont ensuite formées et amenées au contact (Figure 5.12). La surpression imposée dans chacune des bulles est identique de manière à ce que le film qui les sépare soit plan. Expérimentalement, les surpressions sont connues à $\pm 5 \text{ Pa}$ près. Les deux bulles et le film sont observés de profil à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur. L'optique du dispositif est telle que chaque pixel correspond à environ $2 \mu\text{m}$. Les images sont traitées à l'aide du logiciel Image Tool.

La surpression maximale qu'on peut imposer dans chacune des bulles sans qu'elles ne se détachent du tube est conditionnée par le rayon du tube en teflon et la tension de surface de la solution. Dans notre cas, les tensions de surface des solutions qu'on étudie sont comprises entre 47 et 52 mN.m^{-1} et le rayon du tube vaut 0.45 mm. Par conséquent, on travaille avec des films

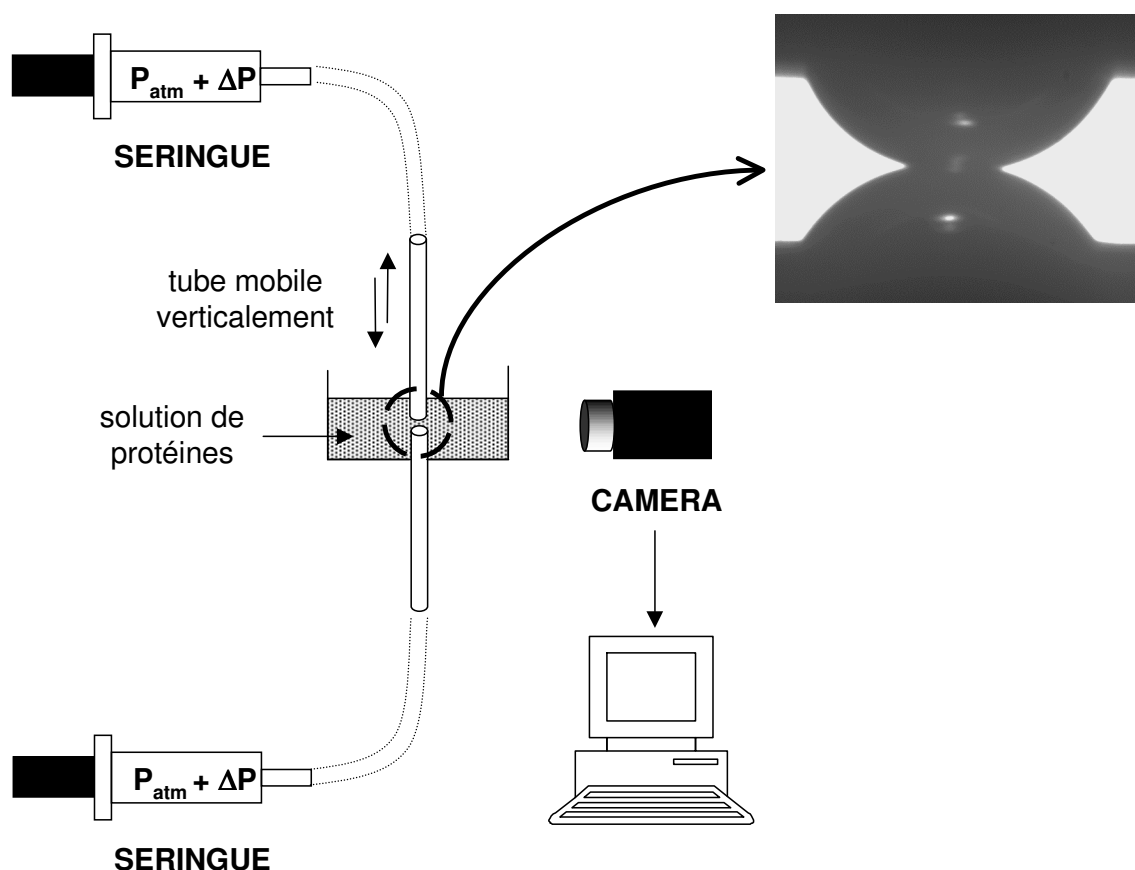


FIG. 5.11 – *Dispositif expérimental permettant de contrôler la formation de deux bulles en solution, ainsi que celle du film qui apparaît à leur intersection. Le système est observé de profil à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur.*

caractérisés par des pressions de disjonction comprises entre 210 et 230 Pa.⁹ La structure des films ainsi obtenus est donc comparable à celle des films présents en haut d'une bulle de 230 μm qui vient juste d'être formée (*cf.* chapitre 4).

5.4.4 Résultats

Nous avons tout d'abord testé notre technique avec une solution de SDS (0.5 mg/mL) dont la concentration en électrolyte (0.32 M) permet la formation de film noirs de Newton. Pour une pression de disjonction d'environ 120 Pa, nous avons déterminé une valeur de l'angle de contact comprise entre 7 et 8 degrés, ce qui est cohérent avec les valeurs déjà publiées [Ned88].

Les résultats obtenus pour des solutions contenant 0.5 mg/mL de protéines au point isoélectrique sont regroupés dans le tableau suivant ($T=25 \pm 1^\circ\text{C}$) :

protéine	α -la	β -lg	BSA
$\theta(\text{deg})$	0-3	2-6	2-6

9. A l'équilibre, la pression de disjonction du film est égale à la pression capillaire.

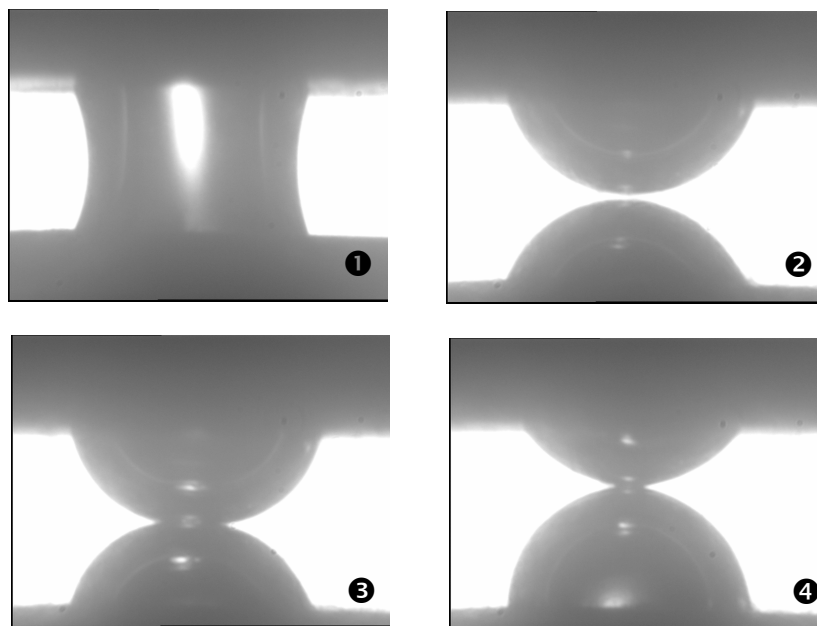


FIG. 5.12 – Photographie du ménisque formé entre deux tubes verticaux alignés (image 1). Deux bulles indépendantes sont ensuite soufflées à l'extrémité des tubes, puis amenées au contact (images 2 et 3). Quelques minutes après la formation du film, si l'on force mécaniquement les deux bulles à se détacher, on observe une résistance (image 4). En effet, le film constitue un point d'attache entre les deux bulles qui se déforment sous la contrainte. Il y a donc adhésion.

On obtient des valeurs de θ très dispersées, donc peu fiables. Les principales sources d'erreur de notre méthode sont les suivantes :

- on a travaillé avec des solutions de protéines préparées au point isoélectrique. Dans ces conditions, les solutions sont turbides du fait de l'agrégation des protéines. Par conséquent, on obtient des profils de bulle moins bien définis (plus flous) que si la solution avait été parfaitement claire.
- on a une grande incertitude sur la connaissance de la valeur de Δp_f , la surpression au niveau du film. D'après l'équation (5.23), on a en effet : $\Delta p_f = p_{int} - (p_0 + \rho gh)$, où h correspond à la hauteur de solution située au-dessus du film. Au cours de nos expériences, h est mesurée à l'aide d'une graduation située sur le tube supérieur. Malheureusement, la formation d'un ménisque au niveau du tube limite la précision de la lecture à $\pm 0,5$ mm. Cela induit donc un erreur de ± 5 Pa sur le terme ρgh . En outre, le terme $p_{int} - p_0$, qui correspond à la surpression indiquée par le manomètre, est également connu à ± 5 Pa. On a donc au total une incertitude de ± 10 Pa sur la valeur de Δp_f . Numériquement, cela entache la valeur de θ d'une erreur pouvant s'élever à plusieurs degrés.
- enfin, la tension de surface des solutions de protéines peut être une autre source d'incertitude. Au cours des expériences, les bulles subissent de nombreux événements : leur pression interne est réajustée à plusieurs reprises. La paroi des bulles est donc étendue puis comprimée plusieurs fois. Du fait de l'irréversibilité de l'adsorption des protéines, la structure de la surface de la bulle garde une empreinte de ces événements, ce qui explique qu'on observe

des tensions de surface variables (à ± 2 mN/m) d'une bulle à l'autre.¹⁰ C'est encore une nouvelle source d'erreur sur la valeur finale de l'angle de contact.

5.4.5 Conclusion

Notre montage expérimental est encore trop rudimentaire pour permettre une mesure précise de l'angle de contact par la méthode proposée ci-dessus. Avec plus de temps et de moyens, il serait techniquement possible de réduire certaines sources d'erreur décrites précédemment, notamment les incertitudes associées aux valeurs de $p_{int} - p_0$ et de h . Concernant la netteté des profils, on pourrait l'améliorer en substituant progressivement la solution turbide dans laquelle les bulles sont formées par une solution moins concentrée (une fois les bulles stabilisées). L'adsorption des protéines étant irréversible, les parois de la bulle ne devraient pas être affectées par ce changement. On pourrait ainsi obtenir des images mieux résolues de notre système.

A ce stade du travail, nous ne sommes pas en mesure de proposer une discussion quant aux énergies d'interaction dans les différents films de protéines.

10. La tension de surface des bulles est estimée à l'aide de l'expression : $p_{int} - p_0 - \rho gh = \frac{2\sigma}{R}$, R étant le rayon moyen de la bulle supposée sphérique. Dans le cas du SDS, où la valeur de σ est connue sans ambiguïté, on a pu déterminer h grâce à cette expression et limiter l'erreur sur la valeur finale de θ .

Bibliographie

- [Cli69] J.H. CLINT, J.S. CLUNIE, J.F. GOODMAN, J.R. TATE, *Direct Measurement of the Tensions of Liquid Films in Air*, Nature **223**, 291-293 (1969).
- [DeF78] J. A. DE FEIJTER, J. B. RIJNBOUT, A. VRIJ, *Contact Angles in Thin Liquid Films, II. Contact Angles Measurements in Newton Black Soap Films*, Journal of Colloid and Interface Science **64**(2), 269-277 (1978).
- [DeF79] J. A. DE FEIJTER, J. B. RIJNBOUT, A. VRIJ, *Contact Angles in Thin Liquid Films, III. Interactions Forces in Newton Black Soap Films*, Journal of Colloid and Interface Science **70**(3), 456-466 (1979).
- [DeG02] P.G. DE GENNES, F. BROCHARD-WYART, D. QUÉRÉ, *Gouttes, Bulles, Perles et Ondes*, Collection Echelles; Editions Belin, 2002, p71.
- [Der53] B.V. DERJAGUIN, A.S. TITIEVSKAYA, *The Repulsive Action of Free Liquid Films and its Role in the Stability of Foams*, Colloid Journal of the USSR **15**, 431-440 (1953).
- [Der76] B.V. DERJAGUIN, N.V. CHURAEV, *The Definition of Disjoining Pressure and its Importance in the Equilibrium and Flow of Thin Films*, Colloid Journal of the USSR **38** (3), 402-410 (1976).
- [Der78] B.V. DERJAGUIN, N.V. CHURAEV, *On the Question of Determining the Concept of Disjoining Pressure and its Role in the Equilibrium and Flow of Thin Films*, Journal of Colloid and Interface Science **66** (3), 389-398 (1978).
- [Dim77] D. DIMITROV, *Compte Rendus de L'Académie Bulgare des Sciences* **30**, 269 (1977).
- [Dim90] A.S. DIMITROV, P.A. KRALCHEVSKY, A.D. NIKOLOV, D.T. WASAN, *Contact Angles of Thin Liquid Films: Interferometric Determination*, Colloids and Surfaces **47**, 299-321 (1990).
- [Eva80] E.A. EVANS, *Analysis of Adhesion of Large Vesicles to Surfaces*, Biophysical Journal **31**, 425-432 (1980).
- [Eva95] E. EVANS in *Structure and Dynamics of Membranes: Generic and Specific Interactions*, Handbook of Biological Physics, Vol. 1B; Lipowsky Sackmann editors: North-Holland, 1995, p723.
- [Exe98] D. EXEROWA, P.M. KRUGLYAKOV, *Foam and Foam Films: Theory, Experiment, Application*, Studies in Interface Science, Vol.5; Elsevier: Amsterdam, 1998, p44.
- [Hui69] H.F. HUISMAN, K.J. MYSELS, *The Contact Angle and the Depth of the Free-Energy Minimum in Thin Liquid Films. Their Measurement and Interpretation*, Journal of Physical Chemistry **73**(3), 489-497 (1969).

- [Iva88] I.B. IVANOV, ED., *Thin Liquid Films*, Surfactant Science Series; Marcel Dekker: New York, 1988, p99.
- [Kol68] T. KOLAROV, A. SCHELUDKO, D. EXEROWA, *Contact Angles between Black Film and Bulk Liquid*, Transactions of the Faraday Society **64**, 2864-2873 (1968).
- [Lob90] L.A. LOBO, A.D. NIKOLOV, A.S. DIMITROV, P.A. KRALCHEVSKY, D.T. WASAN, *Contact Angle of Air Bubbles Attached to an Air-Water Surface in Foam Applications*, Langmuir **6**, 995-1001 (1990).
- [Mar76] G.A. MARTYNOV, I.B. IVANOV, B.V. TOSHEV, *The Mechanical Equilibrium of a Free Liquid Film with a Meniscus*, Colloid Journal of the USSR **38**(3), 431-436 (1976).
- [Mar97] K. G. MARINOVA, T. D. GURKOV, O. D. VELEV, I. B. IVANOV, B. CAMPBELL ET R. P. BORWANKAR, *The Role of Additives for the Behaviour of Thin Emulsion Films Stabilized by Proteins*, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **123** 155-167 (1997).
- [Mur04] R.M. MURUGANATHAN, R. KRUSTEV, H.-J. MÜLLER, H. MÖHWALD, B. KOLARIC, R. v. KLITZING, *Foam Films Stabilized by Dodecyl Maltoside, I. Film Thickness and Free Energy of Film Formation*, Langmuir **20**(15), 6352-6358 (2004).
- [Mys66] K.J. MYSELS, H.F. HUISMAN, R.I. RAZOUK, *Measurement of Contact Angle between Thin Film and Bulk of Same Liquid*, Journal of Physical Chemistry **70**(4), 1339-1340 (1966).
- [Ned88] M. NEDYALKOV, R. KRUSTEV, D. KASHCHIEV, D. PLATIKANOV, D. EXEROWA, *Permeability of Newtonian Black Foam Films to Gas*, Colloid and Polymer Science **266**, 291-296 (1988).
- [Ned92] M. NEDYALKOV, R. KRUSTEV, A. STANKOVA, D. PLATIKANOV, *Mechanism of Permeation of Gas through Newton Black Films at Different Temperatures*, Langmuir **8**, 3142-3144 (1992).
- [Pet03] V. PETKOVA, D. PLATIKANOV ET A. NEDYALKOV, *Phospholipid Black Foam Films: Dynamic Contact Angles and Gas Permeability of DMPC plus DMPG Black Films*, Advances in Colloid and Interface Science **104** 37-51 (2003).
- [Pin01] F. PINCET, E. PEREZ, J.C. LOUDET, L. LEBEAU, *From Macroscopic Adhesion Energy to Molecular Bonds: A Test of the Theory*, Physical Review Letters **87**(17) No. 178101 (2001).
- [Pla80a] D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV, V. NASTEVA, *Line Tension of Newton Black Films, II. Determination by the Diminishing Bubble Method*, Journal of Colloid and Interface Science **75**(2), 620-628 (1980).
- [Pla80b] D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV, A. SCHELUDKO, *Line Tension of Newton Black Films, I. Determination by the Critical Bubble Method*, Journal of Colloid and Interface Science **75**(2), 612-619 (1980).
- [Pla81] D. PLATIKANOV, G.P. YAMPOL'SKAYA, N.I. RANGELOVA, Z.K. ANGARSKA, L.E. BOBROVA, V.N. IZMAILOVA, *Free Black Protein Films, 2. Thermodynamic Parameters*, Colloid Journal of the USSR **43**(1), 149-152 (1981).
- [Pla88] D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV, A. SCHELUDKO, B. TOSHEV, *On the Curvature Dependence of the Film Tension of Newton Black Films*, Journal of Colloid and Interface Science **121**(1), 100-106 (1988).

- [Pla03] D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV ET V. PETKOVA, *Phospholipid Black Foam Films: Dynamic Contact Angles and Gas Permeability of DMPC Bilayer Films*, Advances in Colloid and Interface Science **100** 185-203 (2003).
- [Pri68] H.M. PRINCEN, *Contact Angles and Transition Regions in Soap Films*, Journal of Physical Chemistry **72**(9), 3342-3345 (1968).
- [Pri69] A. PRINS, *Contact Angle in Thin Liquid Film*, Journal of Colloid and Interface Science **29**(1), 177-178 (1969).
- [Pri71] H.M. PRINCEN, S. FRANKEL, *Contact Angles in Soap Films from Diffraction of Light Traversing a Plateau Border*, Journal of Colloid and Interface Science **35**(3), 386-394 (1971).
- [Ran90] N.I. RANGELOVA, V.N. IZMAILOVA, D. PLATIKANOV, G.P. YAMPOL'SKAYA, Z.D. TULOVSKAYA, *Free Black Films of Proteins: Dynamic Hysteresis of the Contact Angle (Film-Bulk Liquid) and the Rheological Properties Of Adsorption Layers*, Colloid Journal of the USSR **52**(3), 442-447 (1990).
- [Sch68] A. SCHELUDKO, B. RADOEV, T. KOLAROV, *Tension of Liquid Films and Contact Angles between Film and Bulk Liquid*, Transactions of the Faraday Society **64**, 2213-2220 (1968).
- [Tar02] D. TARESTE, F. PINCET, E. PEREZ, S. RICKLING, C. MIOSKOWSKI, L. LEBEAU, *Energy of Hydrogen Bonds Probed by the Adhesion of Functionalized Lipid Layers*, Biophysical Journal **83**, 3675-3681 (2002).
- [Toc99] J. L. TOCA-HERRERA, H. J. MULLER, R. KRUSTEV, T. PFOHL ET H. MOHWALD, *Influence of Ethanol on the Thickness and Free Energy of Film Formation of DMPC Foam Films*, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **152**(3), 357-365 (1999).
- [Toc00a] J. L. TOCA-HERRERA, R. KRUSTEV, H. J. MULLER ET H. MOHWALD, *Phospholipid Foam Films Studied by Contact Angle Measurements and Fluorescence Microscopy*, Colloid and Polymer Science **278**(8), 771-776 (2000).
- [Toc00b] J. L. TOCA-HERRERA, R. KRUSTEV, H. J. MULLER ET H. MOHWALD, *Effect of the Charged Lipid DMPG on the Thickness and Contact Angle of Foam Films*, Journal of Physical Chemistry B **104**(23), 5486-5491 (2000).

Chapitre 6

Vers l'étude des mousses de protéines

Les mousses sont des systèmes complexes très étudiés à l'heure actuelle, tant sur le plan expérimental que théorique [Wea99]. Très présentes dans notre quotidien, elles possèdent notamment de nombreuses applications dans l'industrie agroalimentaire. Dans ce secteur, les protéines font partie des composants élémentaires impliqués dans la stabilisation des interfaces. Ce chapitre est consacré à l'étude d'une série de mousses de protéines, formées à partir de solutions préparées dans diverses conditions de pH et de salinité. Nous verrons dans quelle mesure il est possible de corréler le comportement macroscopique des mousses aux propriétés de stabilité et de structure des films individuels de protéines. Nous avons vu au chapitre 4 que la rhéologie des couches de protéines adsorbées influençait considérablement le mûrissement d'Ostwald d'une bulle isolée. Qu'en est-il à l'échelle de la mousse? Nous essaierons de mettre en évidence la spécificité des mousses de protéines devant celle des tensioactifs de petite taille comme le SDS.

6.1 Généralités

6.1.1 Métastabilité des mousses

Une mousse est une dispersion de gaz dans un liquide. Comme tous les systèmes dispersés, les mousses sont caractérisées par une grande surface spécifique (surface par unité de volume). Considérons en effet un cube de 100 cm^3 de mousse, constituée de bulles d'un rayon moyen de $15 \mu\text{m}$, et dont la fraction liquide vaut 20 %. La surface spécifique de ce système est de $1,6 \cdot 10^5 \text{ m}^2/\text{m}^3$ tandis que celle du système équivalent, où les phases gazeuse et liquide sont parfaitement séparées, vaut seulement $22 \text{ m}^2/\text{m}^3$ (Figure 6.1).

La création d'une si grande interface air/liquide a un coût énergétique qu'on minimise en utilisant des molécules amphiphiles qui abaissent la tension de surface. Cependant, d'un point de vue thermodynamique, la mousse reste intrinsèquement instable. Elle est le siège de plusieurs phénomènes, détaillés ci-après, qui tendent à réduire l'aire interfaciale du système afin de minimiser son énergie libre. Par abus de langage, on parle couramment de la stabilité d'une mousse. Il s'agit en réalité de la durée de vie de la mousse, qui dépend de la cinétique de sa disparition.

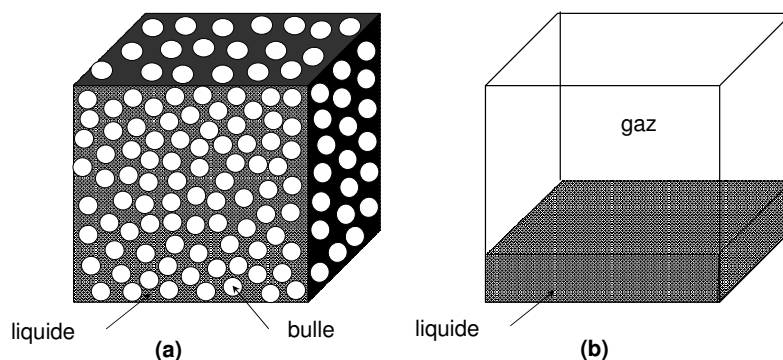


FIG. 6.1 – Représentations schématiques : (a) d'une dispersion d'air dans un liquide ; (b) d'une phase liquide et d'une phase air séparée au niveau macroscopique.

6.1.2 Phénomènes responsables de la destruction des mousses

Le drainage

La capillarité et la gravité sont les deux forces motrices à l'origine du drainage. La première engendre un flux de liquide de l'intérieur des films vers les bords de Plateau, où la pression est plus basse (Figure 6.2 (a)). Quant à la gravité, elle est responsable de l'apparition d'un gradient vertical de fraction liquide (ϕ_l) sur toute la hauteur de la mousse. Sur la figure 6.3, les bulles situées dans la partie haute, la plus sèche, présentent des formes polyédriques liées à la faible épaisseur du film liquide qui les sépare. En revanche, les bulles qui constituent la partie basse sont encore sphériques.

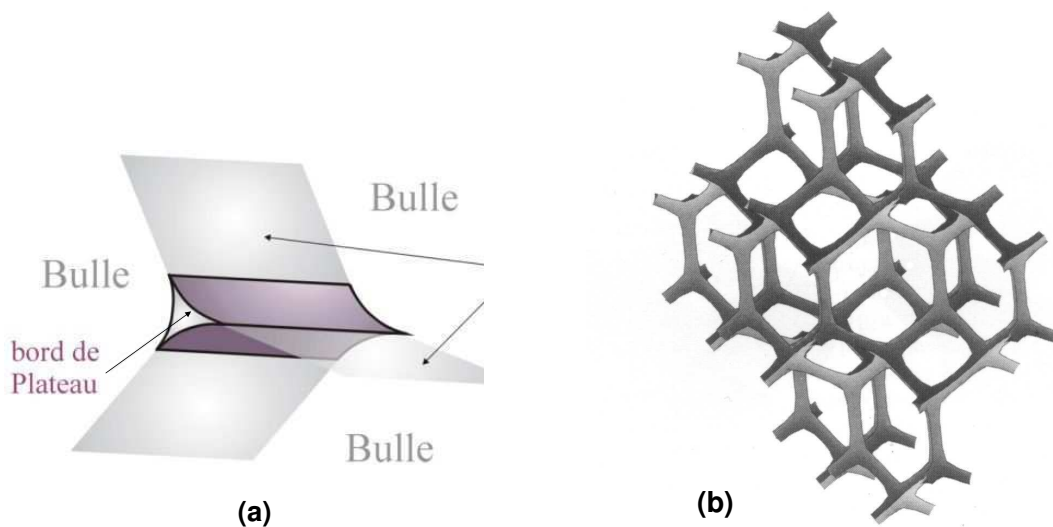


FIG. 6.2 – Schéma d'un bord de Plateau isolé (partie (a)). Les bords de Plateau sont les zones de liquide qui se forment à l'intersection de trois films. Dans une mousse, ils constituent un réseau continu de canaux [Wea99] (partie (b)). Ce réseau est connecté au réservoir de solution, situé au pied de la mousse, dans lequel le liquide draine.

Le drainage naturel d'une mousse est très difficile à interpréter d'un point de vue quantitatif. C'est pourquoi la plupart des études récentes, qui cherchent à modéliser ce phénomène, sont

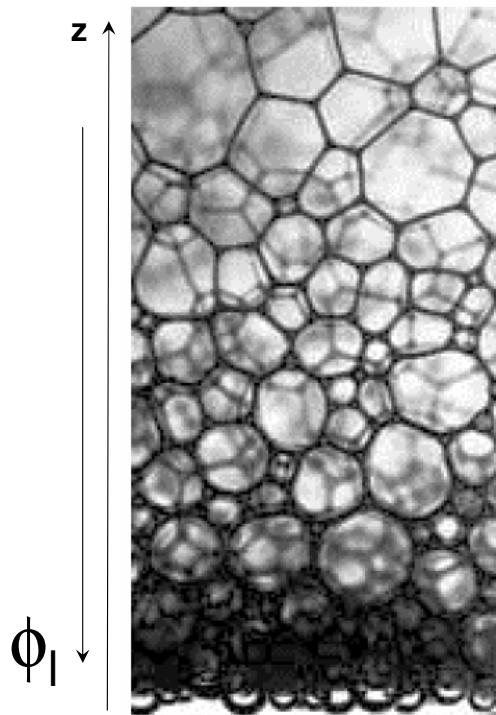


FIG. 6.3 – Photographie d'une mousse en train de drainer. Sous l'effet de la gravité, un gradient de fraction liquide (ϕ_l) s'installe le long de la colonne. La forme des bulles est conditionnée par l'épaisseur du film liquide qui les sépare : pour des films épais, les bulles sont sphériques tandis qu'elles deviennent polyédriques lorsque les films s'affinent (photographie : D.J. Durian).

réalisées dans des conditions de drainage forcé (cf. [Wea93] [Sto98] et [Wea99] ch.11). Dans ces expériences, on impose un flux constant de liquide à l'extrémité supérieure d'une colonne de mousse préalablement formée. Ensuite, la vitesse du front de liquide (V) qui descend le long de la colonne est analysée en fonction de la valeur du flux imposé (Q). Les résultats sont interprétés en négligeant la fraction de liquide contenu dans les films. En effet, le drainage se produit essentiellement à travers le réseau de canaux (Figure 6.2 (b)) constitué par les bords de Plateau (cf. [Wea99] p120).

Deux régimes de drainage ont été mis en évidence en fonction de la structure des bords de Plateau :

- dans le cas de parois rigides, i.e. caractérisées par une forte viscosité de surface, le déplacement du front liquide est décrit par la loi de puissance suivante [Wea93] :

$$V \sim Q^{\frac{1}{2}} \quad (6.1)$$

C'est un écoulement de type Poiseuille où la dissipation visqueuse se produit le long des parois des canaux,

- dans le cas de parois mobiles, i.e. caractérisées par une faible viscosité de surface, on a [Koe99] :

$$V \sim Q^{\frac{1}{3}} \quad (6.2)$$

Dans ce type d'écoulement, la dissipation visqueuse a lieu au niveau des noeuds qui connectent les bords de Plateau.

Ces régimes correspondent à deux cas limites. Durand *et al* ont montré qu'il était possible de passer de l'un à l'autre, à partir de mousses de SDS (parois mobiles) dont les parois sont progressivement rigidifiées en ajoutant des quantités croissantes de dodécanol dans le système [Dur99].

D'autres études ont montré que la vitesse V dépendait également de la viscosité volumique du liquide (η). Dans le cas d'écoulement de Poiseuille, la loi théorique $V \sim \eta^{-\frac{1}{2}}$ a pu être vérifiée en ajoutant progressivement du glycérol dans les solutions étudiées.

En conclusion, on peut retenir que la vitesse de drainage des mousses est conditionnée par les propriétés rhéologiques de l'interface air/solution et celles du liquide drainé.

Le mûrissement d'Ostwald

Les mousses sont constituées d'un ensemble de bulles de taille variable, donc caractérisées par des pressions de Laplace différentes. Cette distribution de pressions au sein du système est à l'origine du mûrissement d'Ostwald. Au cours de ce phénomène, le gaz diffuse des petites bulles vers les grosses bulles adjacentes à travers le film qui les sépare (Figure 6.4). D'un point de vue macroscopique, cela se traduit par une augmentation de la taille moyenne des bulles, donc par une diminution de la surface spécifique du système. Par conséquent, le mûrissement d'Ostwald est une source d'instabilité dans les mousses comme dans de nombreux systèmes colloïdaux [Eva94].

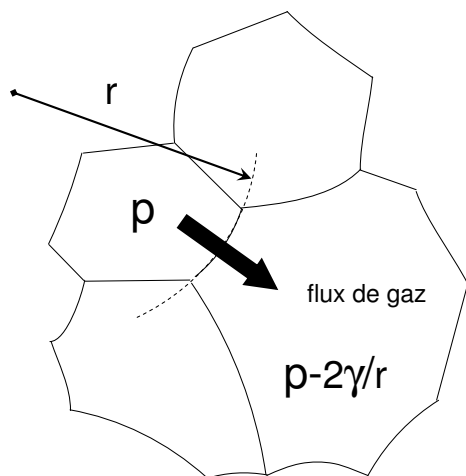


FIG. 6.4 – *Mûrissement d'Ostwald*: une mousse se présente sous la forme d'un ensemble de bulles d'air de taille variable, séparées par des films liquides. La courbure des films reflète les différences de pression entre les bulles. La mousse est donc le siège de flux d'air qui circulent des bulles les plus petites vers les plus grosses, où la pression est moindre.

Chaque bulle de la mousse est en interaction avec ses proches voisines et la phase liquide environnante; le mûrissement d'Ostwald est donc délicat à décrire sur le plan théorique car il nécessite une approche multicorps. La théorie la plus complète sur ce sujet a été proposée par Lifshitz, Slezov et Wagner au début des années 60 (elle est souvent appelée « théorie LSW »). Elle

prédit l'existence d'un régime stationnaire dans lequel le rayon moyen (r_m) des bulles contenues dans la mousse évolue en fonction du temps de la manière suivante :

$$r_m \sim t^{\frac{1}{3}} \quad (6.3)$$

Cette théorie n'est valable que pour des mousses dont les bulles sont sphériques et distantes les unes des autres d'une longueur au moins supérieure à leur taille. D'autre part, ce modèle suppose que la cinétique du mûrissement est uniquement limitée par le coefficient de diffusion du gaz dans la phase liquide. En d'autres termes, cela signifie que la couche de tensioactifs adsorbés, qui stabilise l'interface air/solution, ne s'oppose pas au passage des molécules gazeuses dans la solution. La théorie LSW n'est donc pas adaptée pour décrire le comportement des mousses sèches (typiquement $\phi_l < 10\%$) dans lesquelles les bulles sont séparées par des films minces voire noirs. En effet, on a vu que dans le cas de films noirs, il existe un régime dans lequel la perméabilité des films est contrôlée par la structure des couches de tensioactifs adsorbés (*cf.* § 4.2). On s'attend également à observer des déviations à cette théorie dans le cas de mousses stabilisées par des polymères, capables de former d'épaisses couches à l'interface air/solution. Vérifiée expérimentalement grâce à des techniques d'imagerie, cette théorie a été modifiée à plusieurs reprises pour étendre son champ d'application à des systèmes caractérisés par des fractions liquides basses [Kab92] [Tay98] [Ett03]. Dans le cas de mousses sèches, où les bulles sont arrangées de manière compacte, Durian *et al* ont montré que le rayon moyen des bulles augmentait selon la loi suivante [Dur91] :

$$r_m \sim t^{\frac{1}{2}} \quad (6.4)$$

Enfin, il est possible de contrôler la cinétique du mûrissement d'Ostwald dans une mousse en jouant sur la nature du gaz dispersé dans la solution ; le CO₂ très soluble dans l'eau diffuse plus vite d'une bulle à l'autre que le N₂.

La coalescence

La coalescence est liée à la stabilité des films qui séparent les bulles dans la mousse. En cas de rupture, les bulles concernées fusionnent. Par conséquent, ce mécanisme conduit aussi à une diminution de la surface spécifique du système. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le phénomène de rupture des films : ils considèrent pour cela les fluctuations thermiques d'épaisseur ou de concentration en tensioactifs adsorbés, susceptibles de déstabiliser la structure des films [Lan00].

Importance relative de chacun de ces phénomènes ?

Aujourd'hui encore, il est très difficile de prévoir la stabilité globale d'une mousse au regard de ces trois mécanismes de déstabilisation. En effet, tous sont couplés les uns aux autres. Par exemple, drainage et mûrissement d'Ostwald sont étroitement corrélés [Ver02] [StJ02]. On peut s'en rendre compte aisément en comparant la vitesse de drainage d'une mousse en fonction de la solubilité du gaz dispersé dans le système [Gan97]. D'autre part, nous avons vu ci-dessus que le

mûrissement d'Ostwald suivait des cinétiques différentes selon la fraction liquide contenue dans la mousse. On peut illustrer simplement ce phénomène en observant que le mûrissement d'Ostwald est plus rapide en haut d'une colonne de mousse en train de drainer qu'en bas, où la fraction liquide est plus élevée.

De la même manière, drainage et coalescence dépendent l'un de l'autre ; les films coalescent davantage lorsqu'ils deviennent plus fins. Au cours du drainage, les films sont soumis à des contraintes mécaniques liées à l'écoulement du liquide. Ils sont localement étirés et présentent des gradients de tension de surface. Dans le cas de films minces, il arrive qu'il n'y ait pas assez de tensioactifs disponibles dans le coeur du film pour résorber les gradients, ce qui conduit à la rupture. De plus, il existe une épaisseur critique pour laquelle les films sont très vulnérables aux fluctuations qui agitent sa surface. Cette situation est atteinte lorsque l'épaisseur moyenne du film est de l'ordre de l'amplitude des fluctuations [Exe98] [Ave99]. Lorsque la concentration en tensioactifs est suffisamment haute pour maintenir une densité d'adsorption élevée au niveau des parois du film, les films peuvent atteindre l'état noir et retrouver des conditions de stabilité meilleures.

Des expériences modèles ont été mises en place afin de permettre l'étude séparée de chacun des phénomènes de déstabilisation. Ainsi, on a vu que les expériences de drainage forcé permettent d'établir des lois d'échelle qui caractérisent l'écoulement du liquide dans une mousse. A l'inverse, les expériences dans des conditions de microgravité permettent de s'affranchir du drainage et offre l'opportunité d'étudier des mousses dites « humides » (typiquement $\phi_l > 20\%$) [And01] [Wea01]. Enfin, l'utilisation de gaz fluorés, hydrophobes, réduit de manière significative la cinétique de mûrissement d'Ostwald [Gan97].

6.1.3 Cas particulier des mousses de protéines

Les protéines ont la particularité de former des couches viscoélastiques aux interfaces [Mac99]. En outre, elles sont extrêmement peu mobiles une fois adsorbées : le coefficient de diffusion latéral d'une protéine adsorbée est très inférieur à celui d'un tensioactif de petite taille [Cla98]. Par conséquent, les mousses et les films de protéines possèdent des mécanismes de stabilisation qui leur sont propres [Wil96].

La structure des films dans une mousse est soumise à de nombreuses fluctuations, d'origine thermique ou mécanique. Par exemple, les films peuvent être localement étirés au cours du drainage ou suite à des réorganisations du réseau de bulles. La concentration en tensioactifs dans la zone concernée diminue, et sa tension de surface augmente (Figure 6.5). Dans le cas d'un film stabilisé par des tensioactifs de petite taille, les molécules adsorbées vont diffuser latéralement afin de restaurer au film une tension de surface uniforme et une épaisseur constante.¹ D'autres molécules de tensioactifs, présentes dans la solution, peuvent également s'adsorber à la surface. C'est l'effet Gibbs-Marangoni. Les films stabilisés par des protéines sont eux plus rigides ; ils résistent davantage aux fluctuations thermiques et aux contraintes mécaniques. En cas d'étirement, la couche de protéines adsorbées se déforme (Figure 6.5) : le film relaxe vers son

1. En effet, le flux de tensioactifs s'accompagne d'un flux de molécules d'eau situées dans les couches inférieures du film, au contact de l'interface.

état d'équilibre par un mécanisme de type viscoélastique. D'autre part, les mousses de protéines sont généralement caractérisées par un drainage lent, autre conséquence de la rigidité des couches adsorbées.

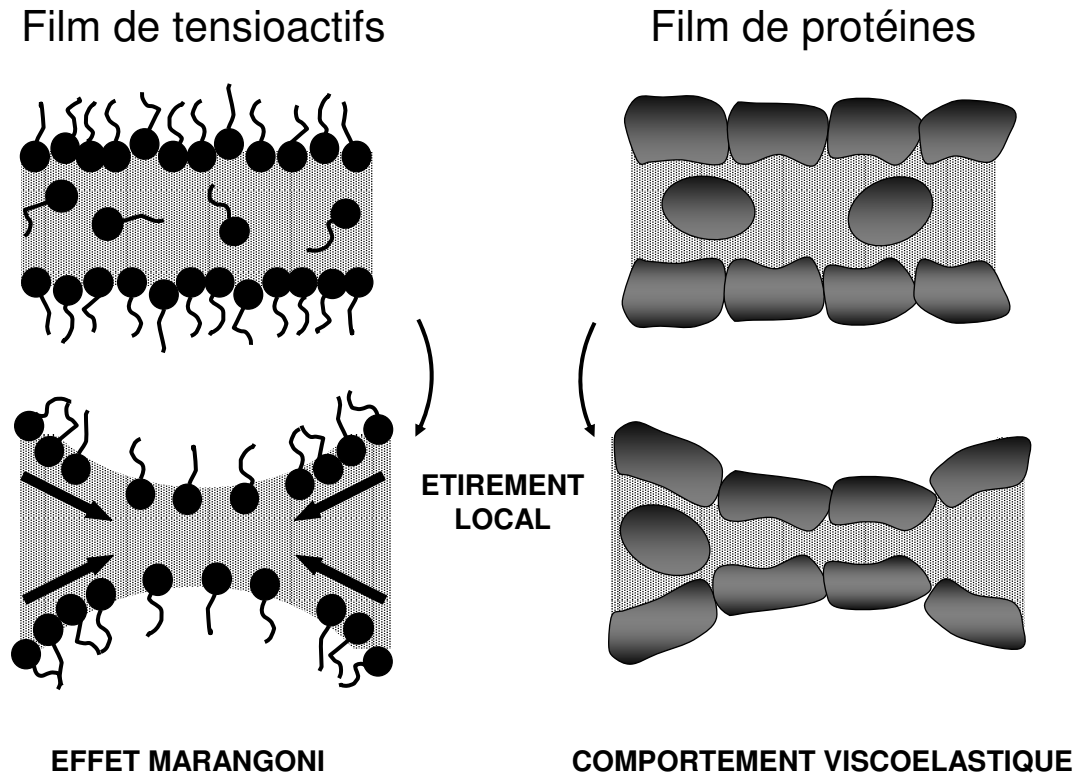


FIG. 6.5 – Mécanisme de stabilisation d'un film mince soumis à un étirement. Dans le cas d'un film de tensioactifs « classiques », les molécules diffusent latéralement afin que le film recouvre une tension de surface et une épaisseur homogènes (effet Marangoni). Dans le cas d'un film de protéines, les couches d'adsorption se déforment sous la contrainte mécanique, puis relaxent vers une situation d'équilibre par un processus de type viscoélastique.

Tout comme nous l'avons observé à l'échelle d'une bulle individuelle en train de décroître (*cf.* § 4.4.5), les propriétés rhéologiques des couches de protéines confèrent aux mousses résultantes un comportement spécifique, c'est-à-dire distinct de celui des mousses stabilisées par des tensioactifs de petite taille [Bos01] [Mar02] [Mur02]. C'est ce comportement que nous allons essayer de préciser à travers l'étude d'une série de mousses de protéines.

6.2 Dispositif expérimental pour l'étude des mousses

Le dispositif que nous avons utilisé, appelé « foamscan », a été conçu par la société I.T. Concept. Il est composé d'un tube cylindrique en verre raccordé à une cuve (25 cm³) contenant la solution à étudier (Figure 6.6). Le fond de la cuve est constitué d'un disque poreux sous lequel on a placé une arrivée de gaz. Les mousses sont formées par injection d'azote dans le liquide à travers le verre poreux.

La quantité de gaz injectée est mesurée à l'aide d'un débitmètre. Quant au volume de mousse

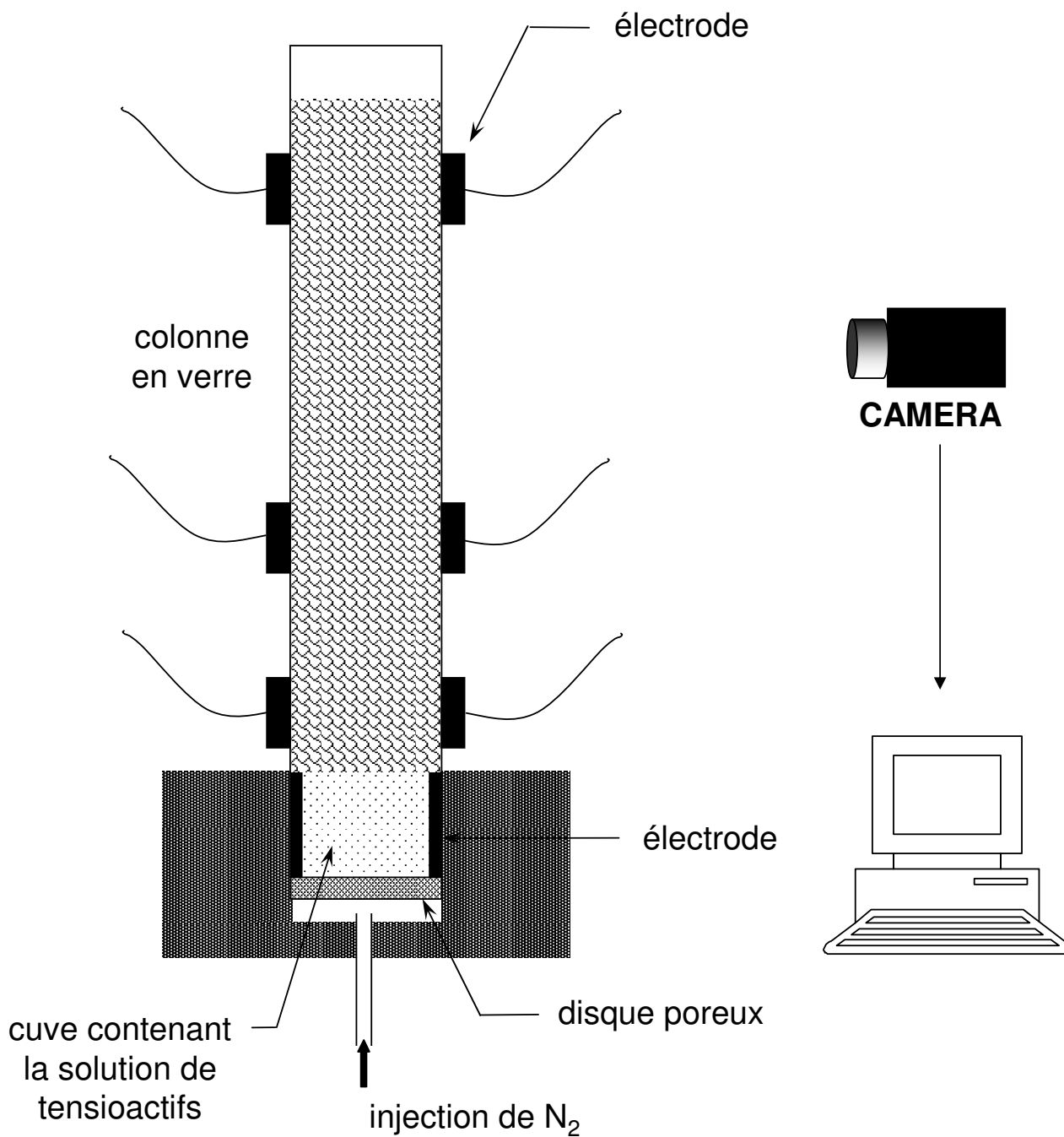


FIG. 6.6 – Dispositif expérimental utilisé pour former et caractériser les mousses. A un instant donné, on détermine optiquement le volume de mousse présent dans la colonne en utilisant une caméra numérique. De plus, on peut connaître le volume de solution injectée dans la mousse à l'aide d'électrodes situées dans la cuve. Enfin, on peut suivre le drainage grâce à un jeu d'électrodes disposées le long de la colonne ; on a ainsi accès au profil de fraction liquide dans la mousse.

présent dans la colonne, il est déterminé optiquement par transmission de la lumière. En effet, la mousse est éclairée uniformément d'un côté, tandis qu'une caméra, placée de l'autre côté, récolte des images à différents stades de son évolution. Le volume de la mousse est ensuite calculé numériquement par une analyse des teintes de gris qui constituent l'image. Ce calcul se base sur l'opacité d'un volume de référence, supposé homogène, situé en bas de la colonne. Ainsi, il est possible de déterminer correctement le volume d'une mousse qui s'effondre de manière irrégulière puisque l'opacité de l'image à une hauteur donnée dépend de l'épaisseur de la mousse traversée (Figure 6.7).

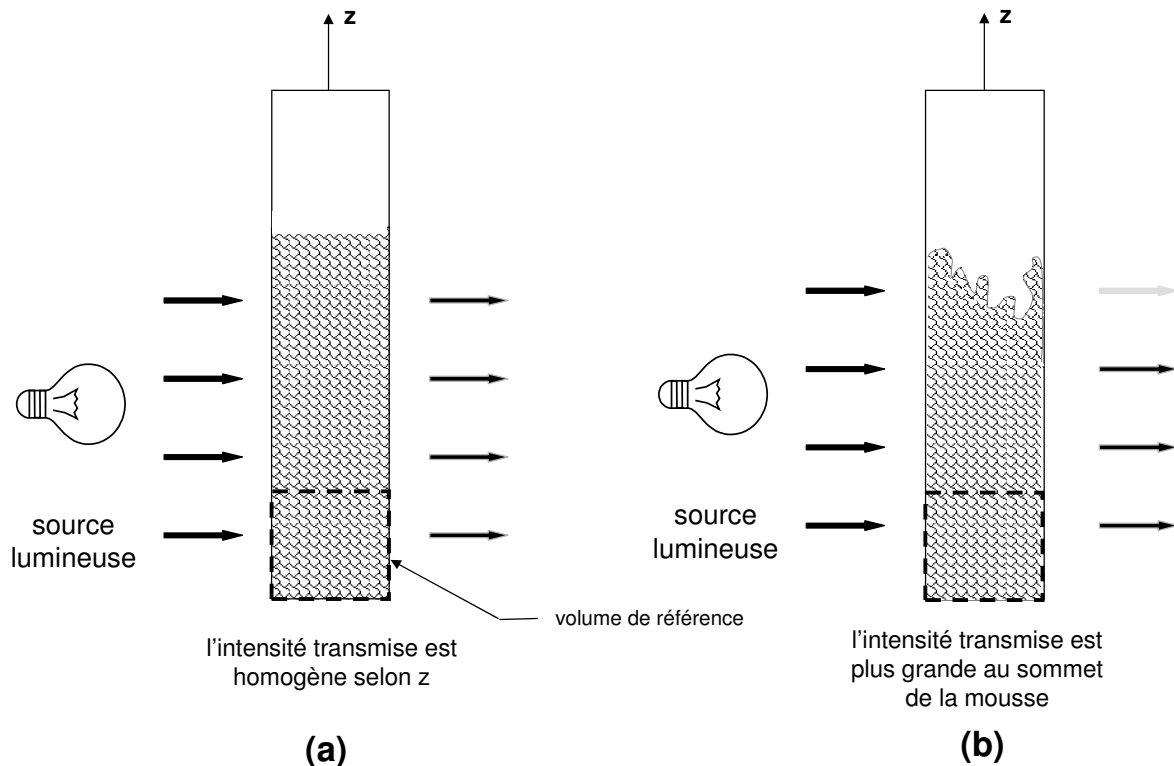


FIG. 6.7 – Détermination du volume de mousse présent dans la colonne par transmission de la lumière. Ce volume est mesuré en se basant sur l'opacité d'un volume de référence, homogène, situé en bas de la colonne (schéma (a)). Lorsque la mousse s'effondre de manière irrégulière (schéma (b)), le volume de mousse est malgré tout estimé correctement à l'aide d'une analyse des niveaux de gris le long de la colonne. En effet, l'intensité transmise est plus importante lorsque l'épaisseur de mousse traversée est plus faible.

Cependant, l'intensité de lumière transmise dépend aussi de la fraction liquide contenue dans la mousse : plus la mousse est riche en eau, plus elle apparaît sombre [StJ02].² Par conséquent, le volume de mousse est déterminé avec d'autant plus de précision que la structure de la mousse est uniforme le long de la colonne, c'est-à-dire qu'elle ne possède pas de fort gradient de fraction liquide. Expérimentalement, les mousses de protéines restent homogènes optiquement parlant (Figure 6.8 (a)), tandis que les mousses de SDS présentent de fort contraste (Figure 6.8 (b)). Ceci est dû au fait que les films de protéines restent blancs, *i.e.* riches en eau, durant toute l'expérience alors que les films de SDS finissent par atteindre l'état noir dans la partie supérieure

2. La fraction liquide d'une mousse peut d'ailleurs être déterminée par diffusion de lumière [Ver02].

de la mousse (Figure 6.8 (b)). Ainsi, le haut des mousses de SDS est plus clair que le bas. Par conséquent, le volume des mousses de SDS mesuré expérimentalement est toujours sous-estimé car le volume de référence n'est pas représentatif de l'ensemble de la mousse.

Enfin, ce dispositif expérimental permet de suivre le drainage de la mousse par conductimétrie. Le volume global de liquide contenu dans la mousse est connu à l'aide de deux électrodes situées à l'intérieur de la cuve. D'autres électrodes, disposées à différentes hauteurs de la colonne, donnent accès au profil de fraction de liquide dans la mousse. La relation entre conductivité de la mousse et fraction liquide n'est pas triviale. Dans le cas limite de fractions liquides très basses, typiquement $\phi_l < 0.03$, Lemlich a établi la formule suivante [Lem77] :

$$\frac{C_f}{C_l} = \frac{1}{3}\phi_l \quad (6.5)$$

C_f et C_l étant respectivement la conductivité de la mousse et celle du liquide.

Différents modèles géométriques de mousse ont été proposés pour établir une relation $\frac{C_f}{C_l} = f(\phi_l)$ non linéaire qui s'applique à une gamme de fraction liquide plus large (cf. [Phe96] et [Wea99] ch.9). A ce jour, de nombreuses questions subsistent et il est difficile d'obtenir une valeur absolue de la fraction liquide à partir d'une mesure conductimétrique unique. Dans les expériences présentées ci-après, nous nous sommes contentés d'observations très qualitatives sur le profil de fraction liquide dans les mousses. A un instant donné, la seule information quantitative que nous pourrions donner est le volume total de liquide dispersé dans la mousse (donc manquant dans la cuve).

6.3 Résultats expérimentaux

Dans ce paragraphe, nous allons étudier l'aptitude des diverses protéines présentées au chapitre 2 à former des mousses stables. Nous avons adopté une démarche assez systématique, dont le but est de mettre en évidence la spécificité des mousses de protéines par rapport à celles stabilisées par des tensioactifs de petite taille. Nous ne discuterons pas individuellement du cas de chacune des protéines ; nous nous contenterons d'une approche plus globale.

6.3.1 Protocole expérimental

Toutes les mousses ont été formées suivant le même protocole : on injecte de l'azote dans la solution étudiée jusqu'à former un volume de mousse défini au préalable (100 cm³ dans nos expériences). Ensuite, l'arrivée de gaz est bloquée et on suit la cinétique d'effondrement de la mousse (T=24±1°C). La figure 6.9 présente l'allure typique des courbes expérimentales sur lesquelles on se base pour discuter de la stabilité des mousses.

Avant chaque expérience, on effectue une étape de calibration de la solution de protéines. Le but est d'établir la loi linéaire qui lie le volume de liquide présent dans la cuve à la conductance électrique mesurée entre les deux électrodes (Figure 6.6). Connaissant cette loi, on peut remonter par conductimétrie à la quantité de liquide dispersé dans la mousse à un instant donné. Pour des solutions de grande conductivité comme celles contenant 0,1 M de NaCl, l'incertitude sur les volumes mesurés est de ±1 %. En revanche, elle s'élève à ±10 % pour des solutions de protéines préparées au point isoélectrique (en l'absence de sel ajouté). En effet, ces solutions sont

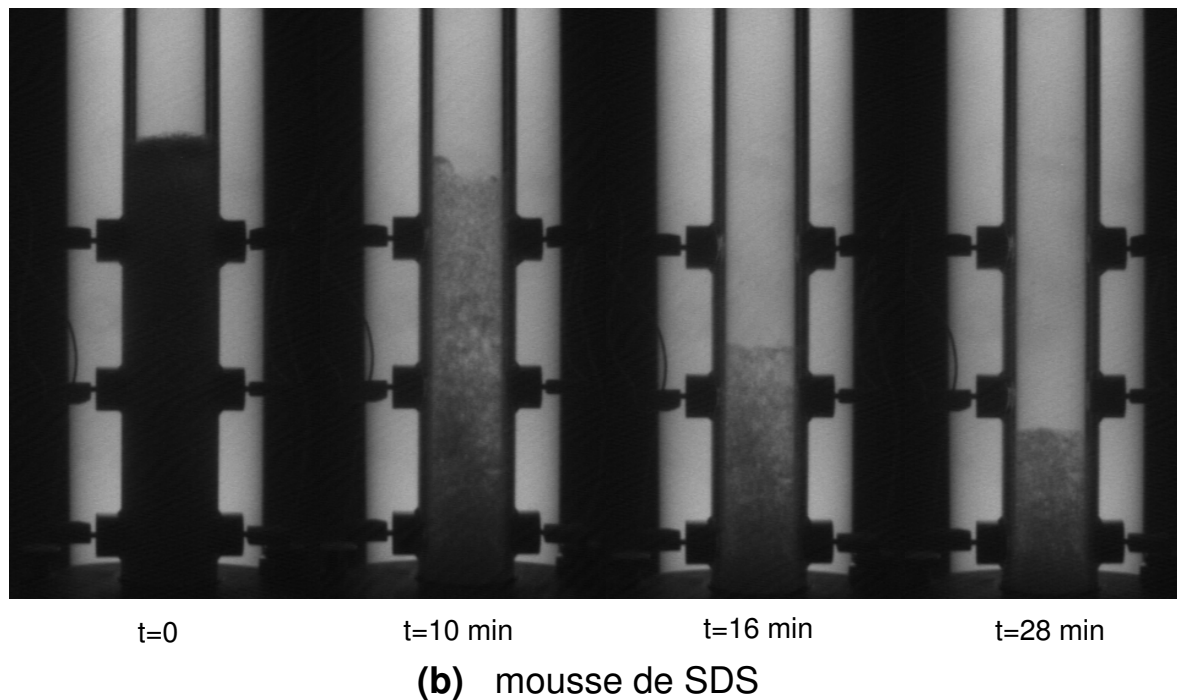
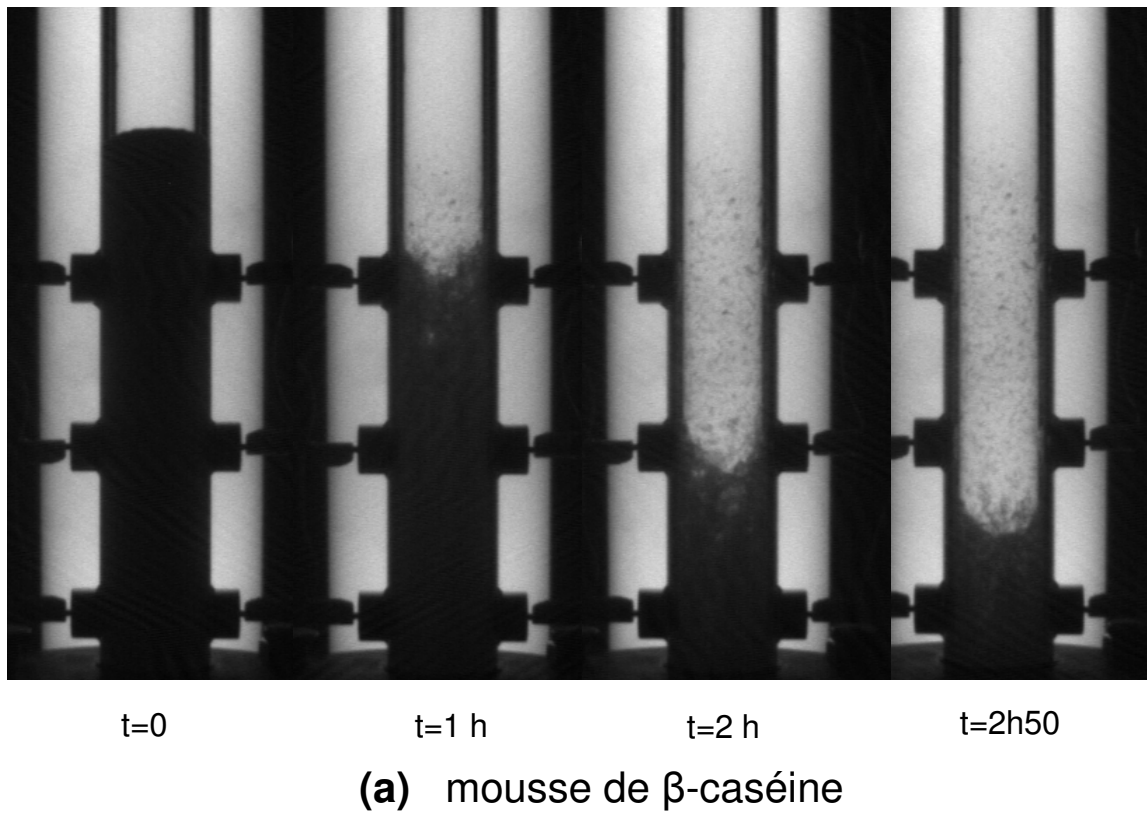


FIG. 6.8 – Evolution de l'intensité de lumière transmise en fonction du temps pour : (a) une mousse de β -caséine ($c_{\beta\text{-ca}}=0,5$ mg/mL, pHi); (b) une mousse de SDS ($c_{\text{SDS}}=0,5$ mg/mL, $c_{\text{NaCl}}=0,32$ M). Les films de β -caséine sont riches en eau même en fin de drainage, i.e. lorsque la quasi-intégralité du liquide injecté dans la mousse s'est écoulé dans la cuve. Le gradient de fraction liquide présent dans la mousse n'est pas suffisamment marqué pour qu'on le détecte optiquement avec notre appareillage. Par conséquent, on n'observe pas de fort contraste optique au cours des expériences (série (a)). A l'inverse, les mousses de SDS présentent un gradient de gris le long de la colonne (série (b)). En effet, les films de SDS deviennent noirs, i.e. très pauvres en eau, au sommet de la mousse alors qu'ils sont encore très épais en bas.

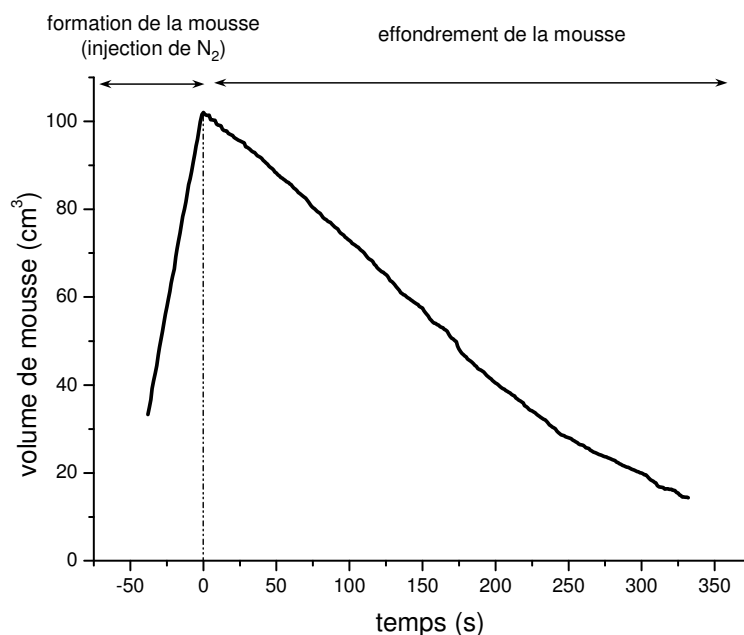


FIG. 6.9 – *Etude de la stabilité d'une mousse de protéines. On commence par former un volume de mousse de 100 cm^3 en injectant de l'azote dans la solution. On observe ensuite sa cinétique d'effondrement par des mesures optiques.*

caractérisées par des valeurs de conductivité basses, donc très sensibles à la présence d'impuretés chargées dans le système. Malgré une procédure rigoureuse de nettoyage du poreux³, on observe une augmentation de la conductivité au cours de l'expérience, *i.e.* après l'étape de calibration, qui biaise la valeur du volume de solution mesuré dans la cuve. Nous verrons ci-dessous que la quantité de liquide nécessaire pour former un volume de mousse donné est un paramètre pertinent pour évaluer le pouvoir moussant de la solution de tensioactifs étudiée.

6.3.2 Influence des conditions de formation de la mousse sur sa stabilité

Vitesse d'injection du gaz

Nous avons étudié dans quelle mesure la vitesse d'injection du gaz dans la solution de protéines (V_{inj}) influençait la stabilité de la mousse formée. La figure 6.10 présente la cinétique d'effondrement de diverses mousses de protéines ($c_{protéine}=0,5 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}\sim 7$) pour différentes valeurs de V_{inj} . On observe que la disparition des mousses est d'autant plus rapide que la vitesse d'injection du gaz est grande. Autrement dit, plus les mousses de protéines sont formées rapidement, moins elles sont stables. En revanche, on peut noter que cet effet ne se produit pas dans le cas des mousses de SDS (Figure 6.10).

Dans la gamme de vitesses d'injection utilisées, la stabilité des mousses de protéines est limitée par la cinétique d'adsorption des protéines à l'interface air/solution, ou plus précisément par leur aptitude à abaisser rapidement la tension de surface. On distingue traditionnellement trois étapes

3. Les poreux sont nettoyés à l'aide d'un mélange 3:1 d'acide sulfurique et d'eau oxygénée. Ils sont ensuite abondamment rincés à l'eau ultra-pure sur un Buchner. Enfin, ils sont chauffés dans un four à 500°C pendant 12h.

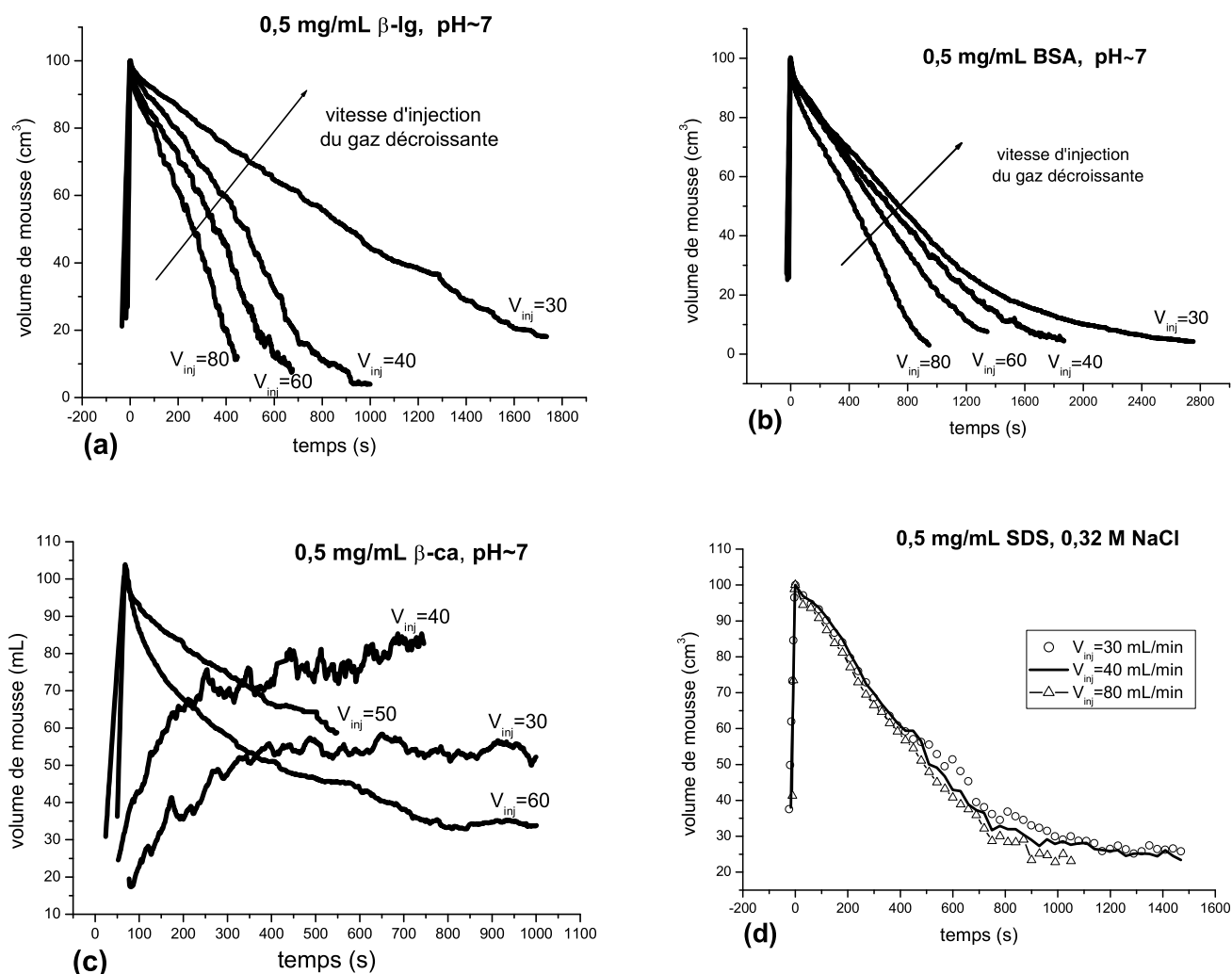


FIG. 6.10 – Dépendance de la stabilité des mousses en fonction de la vitesse d'injection du gaz (exprimée en mL/min sur les graphiques). Les mousses de protéines formées à pH~7 s'effondrent d'autant plus vite que le gaz est injecté rapidement. On n'observe pas de dépendance notable de la vitesse d'injection sur la stabilité des mousses de SDS.

pour décrire le mécanisme d'adsorption de ces objets: le transport vers la surface, l'adsorption proprement dite, et une réorganisation de la conformation des protéines qui contribue à abaisser la tension de surface. Plus l'interface air/solution est créée rapidement, moins les protéines disposent de temps pour abaisser l'énergie du système dispersé. La coalescence des films est probablement le principal facteur de déstabilisation des mousses de protéines lorsque la vitesse d'injection du gaz est grande. A l'inverse, les molécules de SDS s'adsorbent beaucoup plus rapidement à l'interface air/solution du fait de leur petite taille. La méthode de Wilhelmy ne nous permet pas d'observer expérimentalement la cinétique d'adsorption de ces objets: la tension de surface de la solution s'abaisse instantanément à 31,5 mN/m, soit une valeur à l'équilibre beaucoup plus basse que celles des solutions de protéines étudiées (cf. § 2.3). Ainsi, la stabilité des mousses de SDS n'est pas affectée par la vitesse d'injection du gaz (dans l'intervalle étudié). Les films de SDS sont donc résistants à la coalescence dès leur formation.

On peut remarquer que les mousses de β -caséine présentent un comportement plus complexe. Pour les faibles valeurs de V_{inj} (30 et 40 mL/min), lorsque l'injection du gaz commence, le volume de mousse augmente jusqu'à atteindre un palier situé au-dessous de la valeur de consigne (100 cm³) (Figure 6.10 (c)). A partir de ce point, on entre dans un régime stationnaire où il se forme autant de mousse qu'il en disparaît à un instant donné. Pour des vitesses plus élevées (≥ 50 mL/min), on retrouve la tendance décrite ci-dessus pour les autres protéines étudiées. Ces observations mettent en évidence un résultat assez intuitif : pour former un volume de mousse donné, la vitesse d'injection du gaz doit permettre de supplanter les phénomènes qui déstabilisent la mousse.

Porosité du verre

Nous avons comparé la stabilité de deux mousses formées à partir de la même solution ($c_{\alpha-la}=0,5$ mg/mL au pH_i), mais initialement constituées de bulles de taille différente. Nous avons pour cela utilisé deux types de verre poreux : l'un dont la taille des trous varie entre 16 et 40 μm (poreux de type 3), l'autre entre 10 et 16 μm (poreux de type 4). Les résultats sont présentés à la figure 6.11 pour deux vitesses d'injection de gaz différentes. On observe que les mousses dont les bulles sont initialement les plus petites sont également les plus stables. L'utilisation d'un poreux de type 4 à la place d'un poreux de type 3 permet d'augmenter la durée de vie de la mousse d'un facteur trois. En effet, plus les bulles sont grosses, plus la section des bords de Plateau est grande (Figure 6.12). Cela a pour conséquence une augmentation de la vitesse de drainage⁴, donc un amincissement plus rapide des films. Plus fins, les films sont moins stables et davantage perméables au gaz (avant d'atteindre le stade noir). La surface spécifique de la mousse diminue donc plus rapidement.

En conclusion, la stabilité d'une mousse n'est pas un paramètre intrinsèque aux propriétés physico-chimiques de la solution de tensioactifs utilisée. Elle dépend également des conditions dans lesquelles le gaz est incorporé dans le liquide.

6.3.3 Influence de la composition de la solution sur la stabilité des mousses

Nous avons vu dans la partie 3.3 que la stabilité d'un film de protéines dépendait de la structure des couches d'adsorption à l'interface air/solution, elle-même liée aux paramètres de la solution de protéines (pH, concentrations en protéines et en électrolyte). On s'attend donc intuitivement à ce que la stabilité d'une mousse de protéines varie elle-aussi en fonction de la composition de la solution.

Considérons le cas d'une solution d' α -lactalbumine ($c_{\alpha-la}= 0,5$ mg/mL). A $pH \sim 7$, on ne parvient pas à former de mousse quelque soit la vitesse d'injection du gaz. L'ajout de 0,1 M de NaCl dans la solution permet d'obtenir un volume de mousse de 100 cm³, mais dont la stabilité est médiocre (< 5 min). Il en est de même au point isoélectrique de la protéine (Figure 6.11). Ajouter du sel ou travailler au pH_i permet d'abaisser la tension de surface de la solution en minimisant les répulsions électrostatiques entre les protéines adsorbées. La création de l'interface

4. Cette tendance a été établie en étudiant le couplage drainage/mûrissement d'Ostwald. Expérimentalement, le mûrissement d'Ostwald conduit à la formation de bulles plus grosses et accélère le drainage [StJ02].

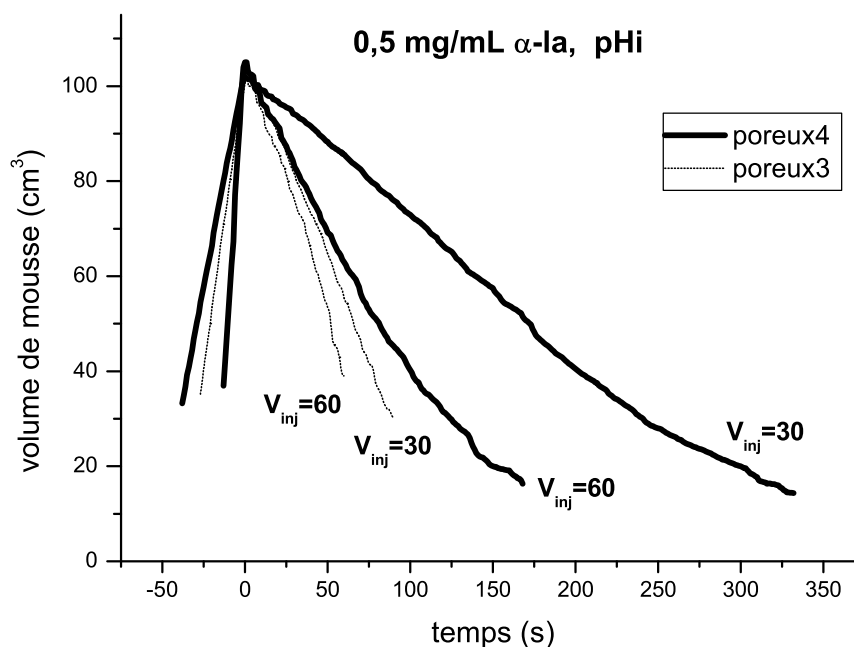


FIG. 6.11 – Influence de la taille des pores du disque poreux sur la stabilité des mousses. Les résultats présentés sur cette figure ont été obtenus pour des mousses d' α -lactalbumine au point isoélectrique pour différentes vitesses d'injection du gaz (en mL/min).

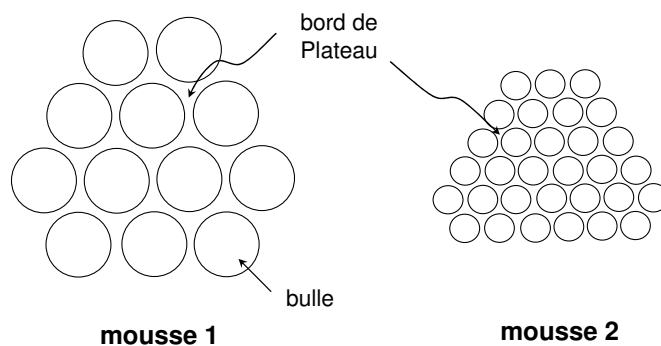


FIG. 6.12 – Influence de la taille des bulles dispersées dans la mousse sur les dimensions des bords de Plateau. Plus les bulles sont grosses, plus la section des bords de Plateau est grande.

air/solution est alors moins coûteuse en énergie. Toutefois, les films obtenus restent instables et les bulles coalescent rapidement.

Pour les solutions de β -caséine, abaisser le pH de 7,5 à 5,8 se traduit par une augmentation spectaculaire de la stabilité des mousses (Figure 6.13) : leur durée de vie est multipliée par dix. A l'approche du point isoélectrique, les couches de β -caséine adsorbées sont suffisamment denses pour permettre aux films minces contenus dans la mousse de résister aux perturbations mécaniques et thermiques, et donc d'éviter la rupture.

Les résultats concernant la BSA et la β -lactoglobuline suivent la même tendance : la stabilité

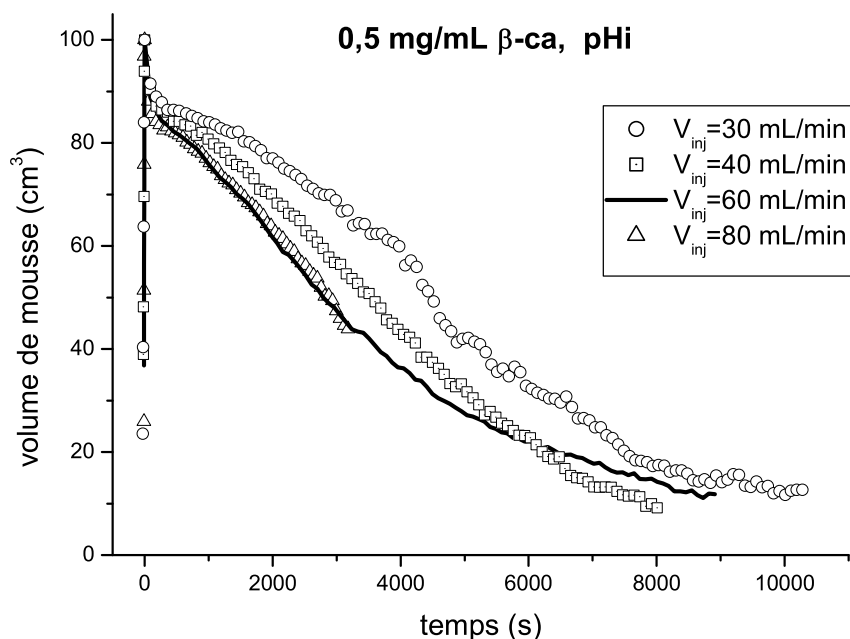


FIG. 6.13 – Effondrement d'une mousse de β -caséine à $\text{pH}=5,8$ ($c_{\beta\text{-ca}}=0,5$ mg/mL) pour différentes vitesses d'injection du gaz. Ces courbes sont à comparer avec celles obtenues à la figure 6.10(c). La stabilité des mousses de β -caséine augmente de manière significative à l'approche du point isoélectrique.

des mousses augmente lorsqu'on minimise les répulsions électrostatiques entre protéines dans la solution. Nous discuterons de leur cas plus en détails au paragraphe suivant à travers leurs propriétés de drainage.

On peut noter qu'au pH_i , la stabilité des mousses de β -caséine ne dépend quasiment plus de la vitesse d'injection du gaz, tandis que cette dépendance subsiste pour les autres protéines. Ceci est lié à la grande flexibilité de sa structure qui lui permet d'abaisser rapidement la tension de surface. La β -caséine possède un comportement interfacial intermédiaire entre celui d'un tensioactif de petite taille et celui d'une protéine globulaire.

Il est intéressant de remarquer que la quantité de liquide contenue dans le volume initial de mousse varie beaucoup d'une solution à l'autre. Nous avons reporté dans le tableau ci-dessous le volume de liquide ($V_{L_{t=0}}$) présent dans diverses mousses de protéines à $t=0$. Le temps $t=0$ marque la fin de l'injection du gaz dans la solution et la formation de 100 cm^3 de mousse.

	α -la	β -ca	β -lg	BSA
$V_{L_{t=0}}$ à $\text{pH}\sim 7$	-	7-12 mL	6-10 mL	12-16 mL
$V_{L_{t=0}}$ à $\text{pH}\sim 7$ + 0,1 M NaCl	10-15 mL	-	15 mL	21 mL
$V_{L_{t=0}}$ près du pH_i	9-15 mL	19,5 mL	13 mL	19 mL

Pour toutes les protéines étudiées, les mousses formées à $\text{pH}\sim 7$ en l'absence de sel sont systématiquement moins riches en liquide que celles obtenues en présence de 0,1 M de NaCl ou au point

isoélectrique. Les mousses à $\text{pH}\sim 7$ sont également les plus instables. Il est probable qu'au cours de leur formation, le phénomène de coalescence des films soit déjà important. Ainsi, la taille moyenne des bulles qui peuplent la mousse à $t=0$ doit être plus grande à $\text{pH}\sim 7$ en l'absence de sel que dans les autres conditions. Nous avons vu précédemment que la vitesse de drainage augmentait en présence de grosses bulles. Par conséquent, une grande partie de la solution injectée dans les mousses à $\text{pH}\sim 7$ a déjà dû retourner dans la cuve à $t=0$.

6.3.4 Drainage des mousses de protéines

Nous avons observé que les mousses de protéines pouvaient drainer suivant deux mécanismes différents. Dans le premier cas, l'écoulement du liquide dans la mousse est déterminé par la gravité. Dans le second cas, le processus gravitationnel est perturbé: le liquide contenu dans la partie basse de la mousse semble comme aspiré par le réservoir de solution. Nous proposerons une interprétation de ce phénomène dans la suite de ce paragraphe.

Drainage sous l'effet de la gravité

La figure 6.14 présente l'évolution du profil de fraction liquide d'une mousse de BSA ($c_{BSA}=0,5$ mg/mL, $\text{pH}\sim 7$) et de β -caséine ($c_{\beta-ca}=0,5$ mg/mL, $\text{pH}=5,8$) en fonction du temps. Les profils de fraction liquide sont déduits de mesures conductimétriques réalisées à différentes hauteurs de la mousse (*cf.* la conductance de la mousse est proportionnelle à la fraction liquide à la hauteur considérée.). Les courbes se découpent en deux périodes distinctes. La première, durant laquelle la mousse est formée, se caractérise par des valeurs croissantes de la conductance. Lorsqu'on arrête l'injection du gaz ($t=0$), elles atteignent leur maximum. C'est à ce moment-là que commence le drainage à proprement parler. Sous l'effet de la gravité, un gradient de fraction liquide s'installe le long de la colonne de mousse. A chaque instant, la partie basse de la mousse est toujours la plus riche en eau.

Drainage singulier

De manière surprenante, les mousses de β -lactoglobuline et de BSA, formées à $\text{pH}\sim 7$ en présence de NaCl ou au point isoélectrique, ne drainent pas suivant le schéma « classique » décrit ci-dessus. La partie basse de la mousse, au contact du réservoir de solution, s'appauvrit anormalement en liquide (Figure 6.15). En effet, dès que l'injection du gaz cesse ($t=0$), l'électrode la plus basse (notée électrode 1) n'est plus celle qui affiche la conductance la plus haute. Cette observation ne correspond pas à un artefact expérimental puisque les mousses concernées s'effondrent effectivement par le bas. On peut s'en rendre compte sur les clichés présentés à la figure 6.16: les parties basses de la mousse s'éclaircissent, confirmant ainsi qu'elles sont moins riches en eau que les parties supérieures. Elles se déstabilisent ensuite plus rapidement, créant un trou entre la solution contenue dans la cuve et le reste de la mousse.

Dans le cas des mousses de β -lactoglobuline et de BSA, ce drainage singulier ne se produit qu'à $\text{pH} 7$ en présence de sel ou bien au point isoélectrique. Autrement dit, il n'a lieu que lorsque les répulsions électrostatiques entre les protéines sont minimisées. Dans ces conditions, on favorise la formation de couches d'adsorption denses, mais également celle d'agrégats en solution. Comment

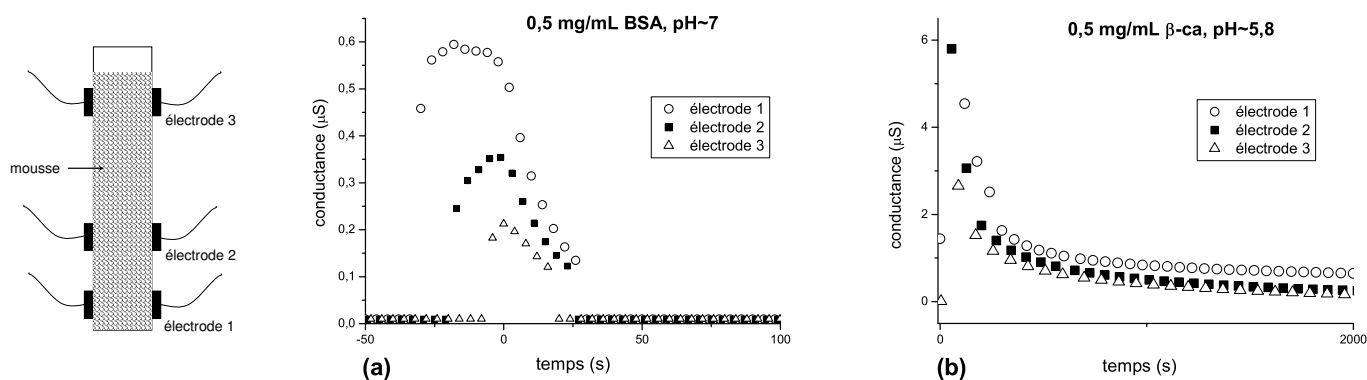


FIG. 6.14 – Schéma de drainage sous l'effet de la gravité. Les graphiques (a) et (b) présentent l'évolution en fonction du temps de la conductance de deux mousses, mesurée à différentes hauteurs de la colonne. On peut en déduire qu'à tout moment la partie basse de la mousse est la plus riche en solution. De plus, ces courbes nous renseignent sur la cinétique du drainage. En l'occurrence, il est beaucoup plus rapide dans le cas d'une mousse de BSA à $\text{pH}\sim 7$ que dans celui d'une mousse de β -caséine à $\text{pH}=5,8$. Ce résultat traduit que les solutions et les couches d'adsorption des protéines considérées possèdent des propriétés rhéologiques très différentes.

expliquer alors la carence de liquide observée en bas de la mousse pendant le drainage? Tout se passe comme si la distribution de liquide le long de la colonne, a priori conditionnée par la gravité, était perturbée par une aspiration anormale vers le réservoir de solution. On peut noter que cette perturbation se produit au niveau de la partie basse de la mousse, c'est-à-dire au raccord avec la solution située dans la cuve. Cela suggère que le potentiel chimique des protéines contenues dans le liquide en train de drainer n'est pas le même que celui des protéines solubilisées dans le réservoir de solution. La solution présente dans la mousse, qui s'écoule sous l'effet de la gravité, est a priori moins concentrée en protéines que la solution restée dans la cuve.⁵ On peut donc s'attendre à une différence de pression osmotique entre ces deux phases. On pourrait ainsi expliquer le flux supplémentaire de solution observé de la mousse vers la cuve, c'est-à-dire de la phase la moins concentrée en protéines vers la plus concentrée. La figure 6.15 (e) montre qu'augmenter la concentration en protéines d'un facteur 5 accélère l'assèchement de la mousse.

Cependant, pourquoi n'observe-t-on pas ce phénomène pour des mousses formées à $\text{pH}\sim 7$ en l'absence de sel? Dans ces systèmes, les répulsions électrostatiques entre protéines sont importantes. Ainsi, la densité de protéines adsorbées est moins grande que celle obtenue au point isoélectrique ou en présence de NaCl. Par conséquent, la différence de pression osmotique entre le liquide en train de drainer et celui dans la solution ne doit pas être suffisante pour assécher de manière significative le bas de la mousse.

Toutefois, les mousses de β -caséine formées à $\text{pH}\sim 5,8$ font figure d'exception. En effet, elles ne présentent pas systématiquement cet effet osmotique alors qu'elles sont remarquablement stables. Ce comportement particulier est peut-être lié à la spécificité de la structure de la β -caséine. Très flexible, elle possède des propriétés d'agrégation particulières. A l'approche du point isoélec-

5. Une partie des protéines de la solution injectée dans la mousse sont désormais adsorbées à l'interface air/solution.

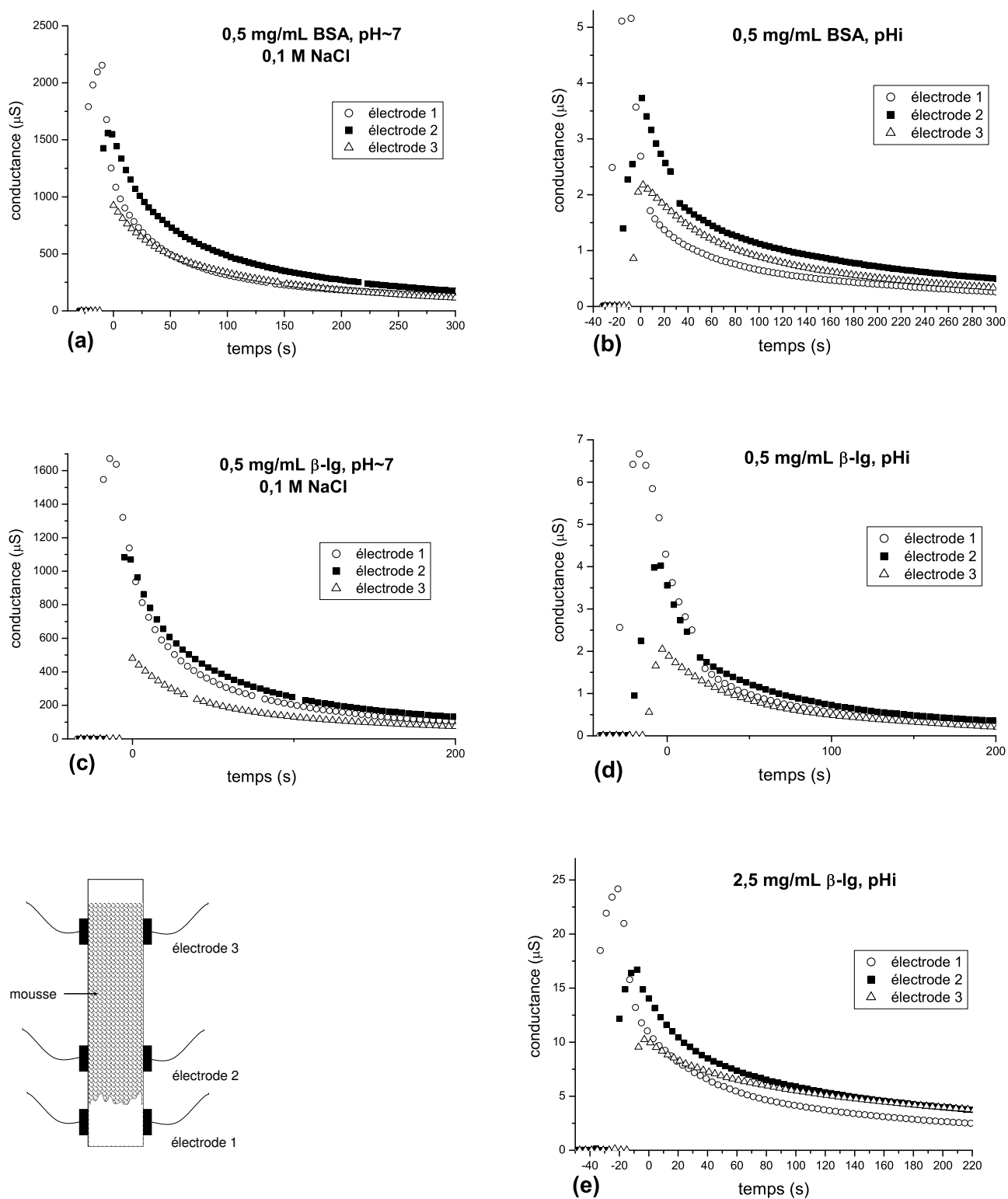


FIG. 6.15 – Schéma singulier de drainage d'une mousse. Les graphiques présentent l'évolution en fonction du temps de la conductance de diverses mousses, mesurée à différentes hauteurs de la colonne. Dans tous les cas présentés ici, l'électrode la plus basse n'est pas celle qui indique la conductance la plus élevée (pour $t > 0$, lorsque l'injection du gaz est terminée). Le drainage du liquide sous l'effet de la gravité est donc perturbé par un autre phénomène qui tend à assécher la partie basse de la mousse.

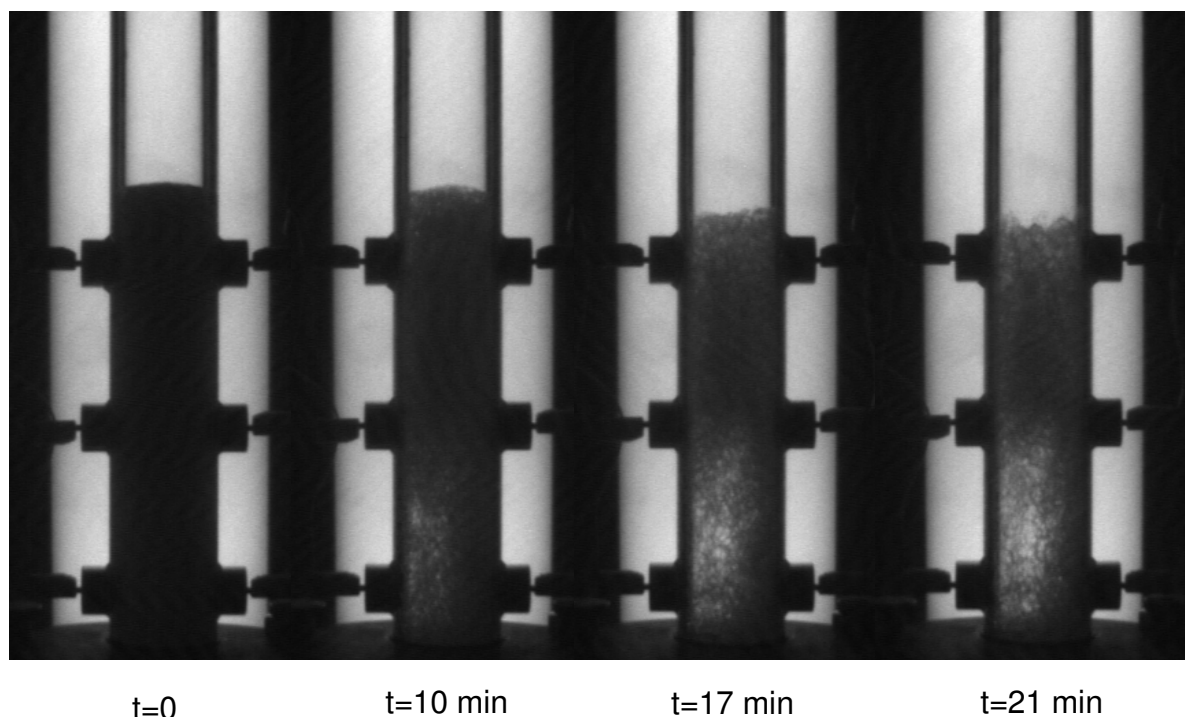


FIG. 6.16 – *Evolution temporelle de l'intensité de lumière transmise par une mousse de β -lactoglobuline préparée dans les conditions suivantes: $c_{\beta\text{-lg}}=0,5 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}\sim 7$, $c_{\text{NaCl}}=0,1 \text{ M}$. On observe que la mousse s'effondre rapidement par le bas. Ces images corroborent les mesures conductimétriques présentées à la figure 6.15 qui indiquent que la partie basse de la mousse est anormalement sèche.*

trique, la solubilité de la protéine chute de manière dramatique. De gros agrégats, peu actifs aux interfaces, apparaissent dans la solution (opaque). Leur présence affecte sûrement la pression osmotique de la solution utilisée pour former les mousses.

Limitation expérimentale

D'un point de vue expérimental, l'effondrement des mousses par le bas biaise la détermination optique du volume V_{mousse} présent dans la colonne. En effet, le logiciel d'acquisition intègre V_{mousse} en se basant sur l'opacité d'un volume de référence situé en bas de la colonne. Ce volume, supposé homogène, est théoriquement plus sombre que la partie haute de la mousse, susceptible de s'effondrer de manière irrégulière. Dans le cas des mousses qui se déstabilisent par le bas, le contraste est inversé (le bas de la mousse est plus clair que le haut). Par conséquent, le volume de mousse mesuré expérimentalement est supérieur au volume réel. C'est ce qui explique la présence anormale de plateaux sur les courbes $V_{\text{mousse}}(t)$ (figure 6.17). L'éclaircissement du bas de la colonne compense la réelle diminution du volume de mousse. Il est donc difficile de suivre l'effondrement des mousses dans ces conditions.

En conclusion, la discussion présentée ci-dessus propose une interprétation qualitative du mécanisme de drainage des mousses. Pour vérifier le bien-fondé de ces explications, de nouvelles expériences s'imposent. On pourrait par exemple former une mousse dont le profil de drainage est dominé par la gravité, puis remplacer la solution de tensioactifs restant dans la cuve par une

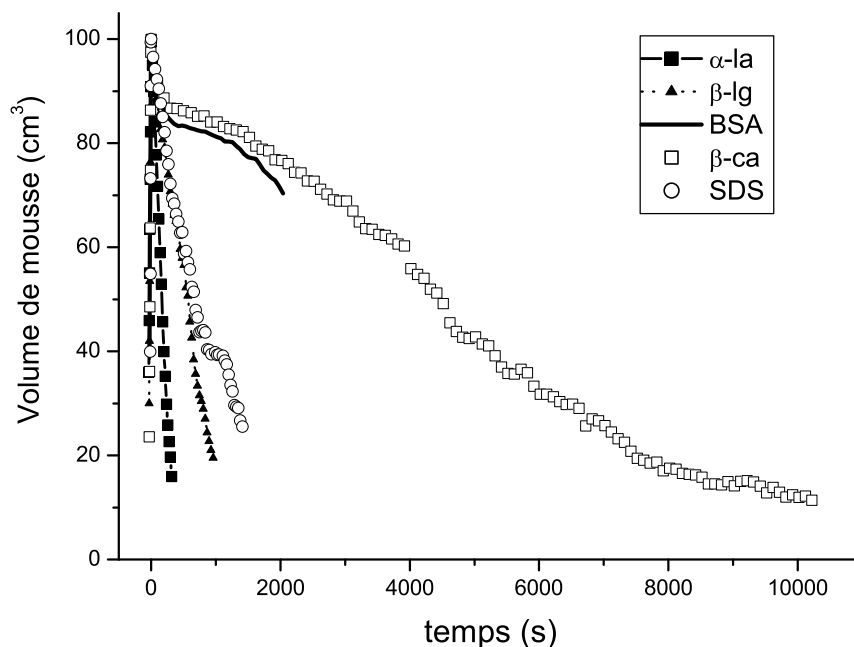


FIG. 6.18 – Comparaison de la vitesse d'effondrement de diverses mousses de protéines ($c_{\text{protéine}}=0,5 \text{ mg/mL}$, pH_i) et de SDS ($c_{\text{SDS}}=0,5 \text{ mg/mL}$, $0,32 \text{ M NaCl}$). Toutes les mousses ont été obtenues en injectant le gaz à la vitesse de 30 mL/min . Dans les conditions de l'expérience, on n'est pas parvenu à former de mousse de lysozyme.

où le symbole "<" signifie "plus stable que" et les chiffres rappelés au-dessous correspondent aux tensions de surface à l'équilibre des solutions utilisées pour les expériences (*cf.* § 2.3).

Ce classement appelle quelques commentaires :

- sur la gamme de protéines étudiées, on a observé des comportements très divers. D'un côté, les solutions de lysozyme ne possèdent pas une activité de surface suffisante pour former des mousses dans les conditions de cette étude. A l'autre extrémité du classement, les mousses de β -caséine sont de loin les plus stables. Pourtant, ce ne sont pas celles dont la tension de surface à l'équilibre est la plus basse. La β -caséine est néanmoins la plus flexible de toutes les protéines étudiées : elle est capable d'abaisser la tension de surface plus rapidement que les protéines globulaires dont la structure est plus rigide [Gra79] [Mar02]. Ainsi, les films de β -caséine impliqués dans les mousses sont plus stables au moment de leur formation ; ils résistent mieux à la coalescence dans les mousses « jeunes ».
- on observe également que les mousses de SDS sont environ 5 fois moins stables que les mousses de β -caséine. En premier lieu, ce résultat est surprenant puisque les solutions de SDS possèdent une tension de surface nettement plus faible, dont la valeur à l'équilibre est atteinte de manière instantanée. Analysons de plus près les caractéristiques de ces deux mousses. Comme le montre la figure 6.19, le drainage des mousses de β -caséine est beaucoup plus lent que celui des mousses de SDS. Par conséquent, leur structure respective évolue

de manière très différente avec le temps. En effet, au bout de cinq minutes, les mousses de SDS sont sèches ; la quasi-intégralité du liquide qu'elles contenaient initialement a drainé. On observe expérimentalement l'apparition de films noirs au sommet de la mousse, puis sur une grande portion de la colonne. A l'inverse, les films de β -caséine restent blancs tout au long de la vie de la mousse. A priori, les films noirs de SDS sont donc plus fragiles face aux éventuelles perturbations mécaniques que ceux de β -caséine dont la structure semble plus gélifiée. De plus, vues les différences d'épaisseurs qui caractérisent ces deux types de films, la cinétique du mûrissement d'Ostwald doit être beaucoup plus rapide dans les mousses noires de SDS que dans les autres. Cela pourrait expliquer pourquoi les mousses de SDS sont moins stables que celles de β -caséine malgré la grande activité de surface du SDS.

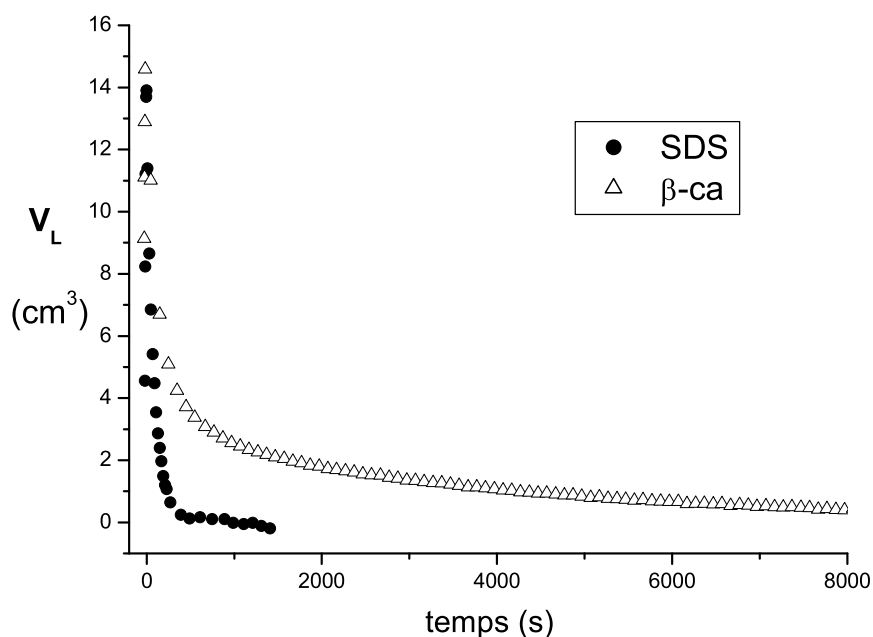


FIG. 6.19 – Comparaison des vitesses de drainage d'une mousse de β -caséine ($c_{\beta\text{-ca}}=0,5$ mg/mL, $\text{pH}\sim 5,8$) et d'une mousse de SDS ($c_{\text{SDS}}=0,5$ mg/mL, $0,32$ M NaCl), formées à une vitesse d'injection de 30 mL/min.

Ces observations expérimentales nous amènent à la conclusion suivante : la stabilité d'une mousse résulte d'un compromis subtil entre plusieurs critères. Le premier critère est de nature thermodynamique : pour obtenir une mousse stable, il est nécessaire que la solution de tensioactifs possède une tension de surface à l'équilibre basse. Cependant, ce critère est nécessaire, mais pas suffisant. Il faut y ajouter une contrainte cinétique : les tensioactifs doivent être capables d'abaisser rapidement la tension de surface au fur et à mesure de la formation de l'interface air/solution (au coeur de la mousse). Le cas contraire, les films sont à peine formés qu'ils se cassent déjà. Enfin, au-delà de la question de la stabilité des films, le drainage de la mousse est un paramètre crucial. Il dépend des propriétés rhéologiques du système. La rapidité du drainage conditionne la structure de la mousse (via l'épaisseur des films entre les bulles) à un instant

donné, et donc les phénomènes responsables de sa déstabilisation.

6.4 Digression : de l'utilisation du perfluorohexane pour bloquer le mûrissement d'Ostwald

Nous avons vu précédemment que l'effondrement des mousses obéissait simultanément aux trois mécanismes suivants : le drainage, le mûrissement d'Ostwald et la coalescence. L'une des difficultés de l'étude des mousses est de parvenir à isoler les effets de chacun de ces phénomènes. Dans cette optique, certains travaux forment des mousses en utilisant un mélange gazeux de perfluorohexane (C_6F_{14}) et d'azote [Gan97] [Saf01]. D'un point de vue expérimental, la présence de perfluorohexane, gaz très hydrophobe, permet de limiter considérablement la cinétique du mûrissement d'Ostwald. L'objectif de cette partie est d'étudier cet effet à l'échelle d'une seule bulle. Pour cela, nous avons repris la technique présentée au chapitre 4 afin de comparer la vitesse de disparition d'une bulle remplie d'air à celle d'une bulle remplie d'un mélange d'air et de perfluorohexane (Figure 6.20).

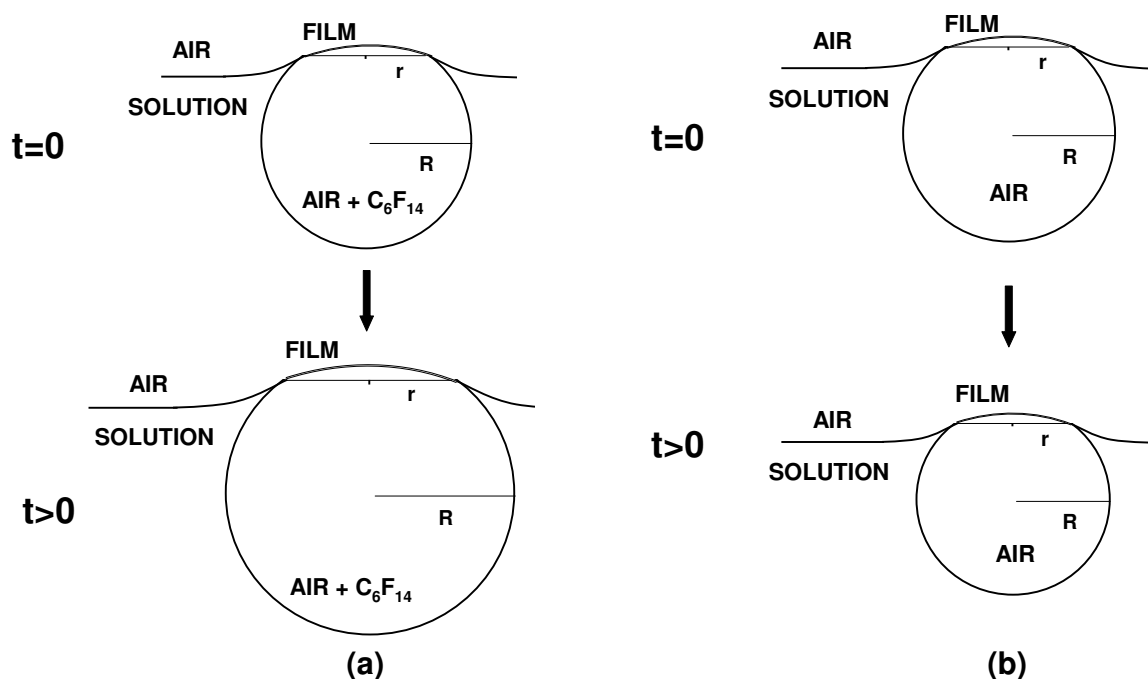


FIG. 6.20 – Comparaison de l'évolution d'une bulle remplie d'air à celle d'une bulle remplie d'un mélange d'air et de perfluorohexane. La présence de perfluorohexane, au lieu de ralentir la décroissance de la bulle, est à l'origine d'une augmentation spectaculaire de sa taille.

6.4.1 Protocole et résultats expérimentaux

Le perfluorohexane, liquide à température ambiante, est très volatil. On en place quelques millilitres dans un récipient hermétique, dans lequel on peut introduire une micro-seringue. Ce récipient est légèrement chauffé ($T \sim 30^\circ C$) afin d'enrichir la phase vapeur en perfluorohexane.

On remplit ensuite la seringue de ce mélange et on forme une bulle d'environ $200 \mu\text{m}$ de rayon dans la solution de protéines étudiée (Figure 6.21).

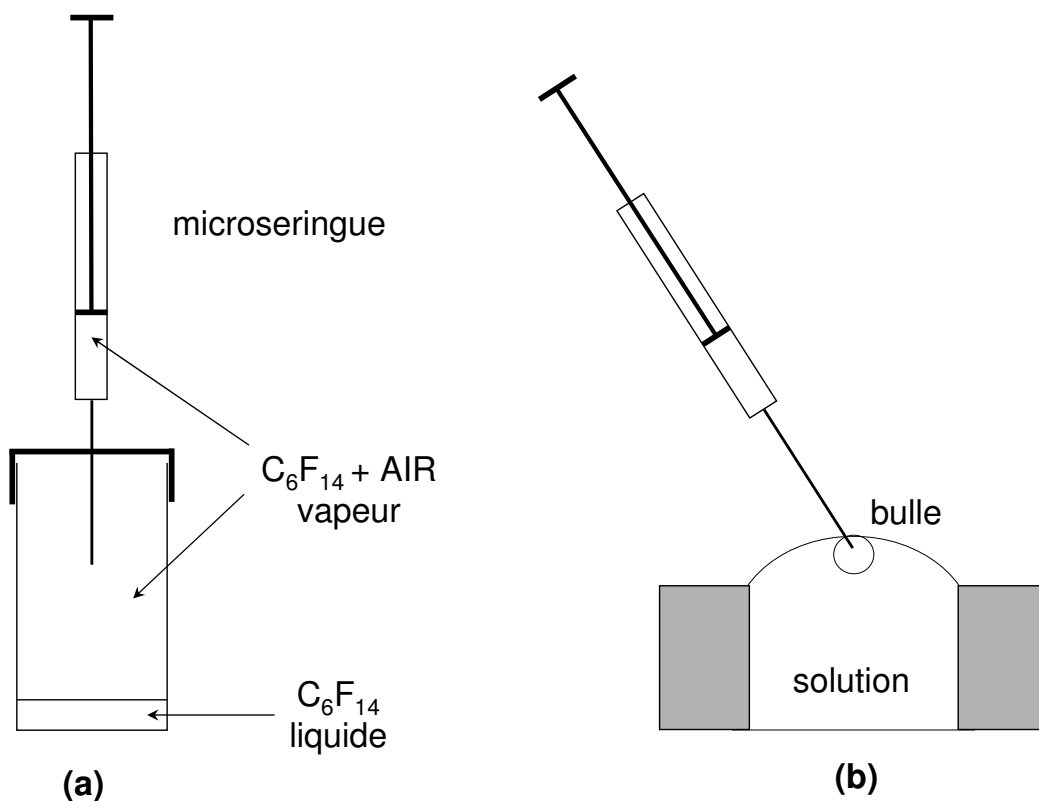


FIG. 6.21 – *Protocole expérimental pour former une bulle remplie d'un mélange d'air et de perfluorohexane (voir texte).*

L'évolution de la taille de la bulle est observée en fonction du temps à l'aide d'un microscope. Les résultats obtenus à partir d'une solution de BSA au point isoélectrique sont présentés à la figure 6.22. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres protéines. Contre toute attente, la taille des bulles augmente de manière spectaculaire au lieu de stagner. En moins d'une demi-heure, elles doublent leur rayon. On peut remarquer que le système n'atteint pas son état d'équilibre sur la durée de l'expérience. L'origine de cette instabilité est probablement liée à la différence de composition entre la phase gazeuse contenue dans la bulle et l'atmosphère extérieure.⁶ En effet, le perfluorohexane est emprisonné dans la bulle : très hydrophobe, il ne peut ni passer en solution, ni traverser la partie aqueuse du film de protéines. Un flux d'air s'instaure alors de l'extérieur vers l'intérieur de la bulle afin de diminuer la concentration en perfluorohexane. C'est ce qui explique l'augmentation de la taille de la bulle.

En conclusion, la présence de perfluorohexane inverse la direction du flux de l'air entre la bulle et le milieu extérieur (Figure 6.20). Dans le cas d'une mousse macroscopique, ce phénomène ne doit pas se produire pour les bulles situées dans le volume ; on doit uniquement l'observer pour les bulles situées à la périphérie de la mousse, au contact de l'air.

6. D'un point de vue thermodynamique, le potentiel chimique du perfluorohexane dans la bulle n'est pas égal à celui dans l'atmosphère située au-dessus.

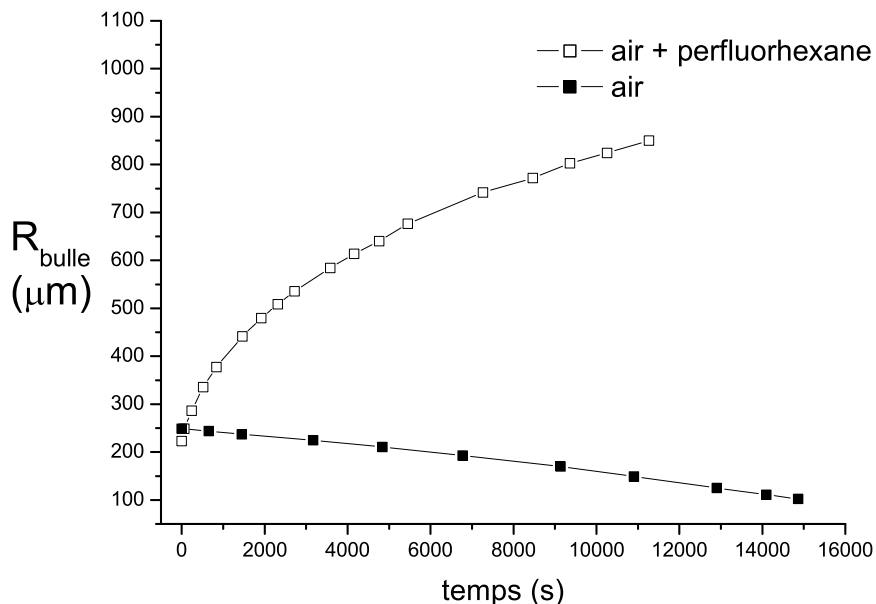


FIG. 6.22 – Evolution du rayon d’une bulle en fonction de la composition du mélange gazeux qu’elle contient. Dans les deux cas, on utilise une solution de BSA préparée au point isoélectrique ($c_{BSA}=0,5$ mg/mL).

6.4.2 Influence du perfluorohexane gazeux sur la tension de surface d’une solution de protéines

La vitesse à laquelle la bulle grossit en présence de perfluorohexane est surprenante. Elle est beaucoup plus grande que la vitesse de diminution d’une bulle qui ne contient que de l’air (Figure 6.22). A titre de comparaison, une bulle de BSA ($R \simeq 240$ μm) divise sa taille par deux au bout de 3h30 en présence d’air, tandis qu’elle double sa taille par deux au bout de 25 min en présence de perfluorohexane.

L’équation exprimant le flux de gaz qui s’échappe d’une bulle remplie d’air est rappelée ci-dessous (cf. chapitre 4) :

$$-\frac{dN}{dt} = KA_{film} \Delta C + K_{bulle} A_{paroi} (S_{p_{atm}+p_c} - S_{p_{atm}}) \quad (6.6)$$

où: ΔC est la différence de concentration en air de part et d’autre du film ; $S_{p_{atm}}$ et $S_{p_{atm}+\frac{2\sigma}{R}}$ correspondent au coefficient de solubilité de l’air dans l’eau lorsque la pression vaut respectivement p_{atm} et $p_{atm} + \frac{2\sigma}{R}$.

Dans le cas d’une bulle remplie d’un mélange d’air et de perfluorohexane, le flux de gaz qui entre dans la bulle vaut :

$$\frac{dN}{dt} = KA_{film} C_{C_6F_{14}} \quad (6.7)$$

où: $C_{C_6F_{14}}$ est la concentration en perfluorohexane dans la bulle. Cette concentration diminue au fur et à mesure que le rayon de la bulle augmente. La solubilité du perfluorohexane dans l’eau

étant très faible, le second terme de l'équation de diffusion est négligeable.⁷

La grande différence entre ces deux flux, observée expérimentalement, est-elle uniquement due à l'intensité des gradients de concentration qui contrôlent le transfert de l'air? Cette hypothèse, plausible a priori, est renforcée par le fait que la bulle et le film subissent une extension très rapide de leur surface en présence de perfluorohexane. Ainsi, les couches moléculaires qui les constituent doivent être plus poreuses, accroissant ainsi la perméabilité à l'air du film et de la bulle. Par ailleurs, on peut se demander si le perfluorohexane lui-même ne modifierait pas également la structure des couches de protéines adsorbées (et donc leur perméabilité). Pour répondre à cette question, on propose de regarder si la présence de perfluorohexane en phase vapeur est capable de modifier la tension de surface d'une solution de protéines.

Pour cela, on procède comme suit. Dans un premier temps, on mesure simplement la tension de surface d'une solution de BSA (0,5 mg/mL BSA, pH_i) à l'aide de la méthode de Wilhelmy. On laisse le système s'équilibrer pendant environ 24 h. On injecte ensuite un mélange d'azote et de perfluorohexane dans l'enceinte qui contient la solution à l'aide d'un petit dispositif présenté à la figure 6.23.

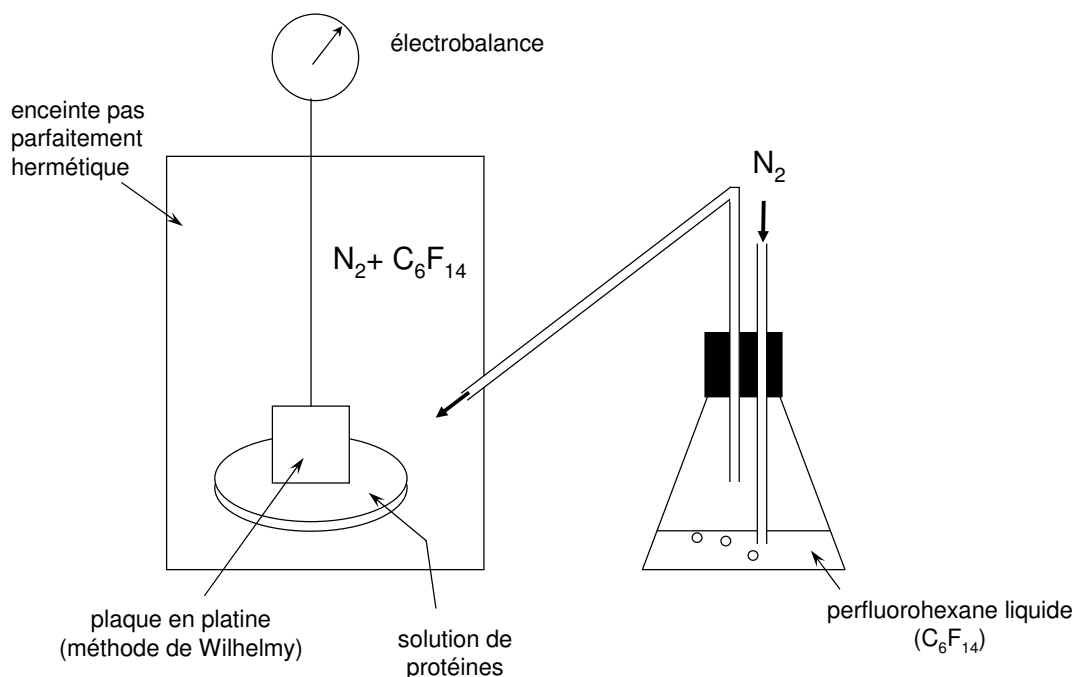


FIG. 6.23 – Dispositif expérimental utilisé pour mesurer la tension de surface d'une solution de protéines au contact d'une atmosphère gazeuse contenant du perfluorohexane.

L'enceinte en question n'est pas parfaitement hermétique afin d'éviter que le système soit sous pression. La tension de surface se met alors à chuter (Figure 6.24); elle perd environ 7 mN/m. Cette valeur ne signifie rien dans l'absolu puisqu'elle dépend de la vitesse d'injection du perfluorohexane, c'est-à-dire de sa concentration stationnaire dans le milieu (compte tenu du fait que l'enceinte possède une légère fuite). Lorsqu'on arrête l'injection, la tension de surface

7. Il faudrait vérifier ceci expérimentalement en étudiant l'évolution d'une bulle adsorbée sous une lamelle de verre, afin de bloquer le processus de diffusion par le film.

augmente de nouveau jusqu'à retrouver sa valeur initiale. Il semble donc que le perfluorohexane soit très actif aux interfaces. Même présent sous forme gazeuse, c'est-à-dire en petite quantité, il est capable de modifier les propriétés de l'interface air/solution (donc la perméabilité des films). Il interagit probablement avec les parties hydrophobes des protéines adsorbées. Lorsque l'injection cesse, la concentration en perfluorohexane dans le milieu diminue progressivement et les molécules se désorbent de l'interface.

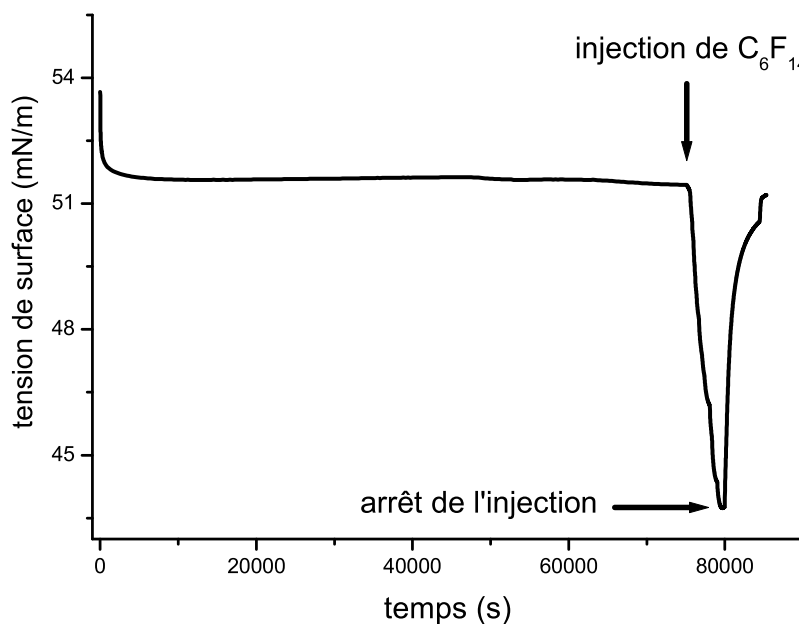


FIG. 6.24 – Influence du perfluorohexane gazeux sur la tension de surface d'une solution de BSA au point isoélectrique ($c_{BSA}=0,5 \text{ mg/mL}$, $T=24^\circ \text{C}$.)

On peut donc conclure que le perfluorohexane n'agit pas uniquement sur le mûrissement d'Ostwald. Même présent en petite quantité, il modifie la tension de surface des couches de tensioactifs. Son utilisation pour modéliser le drainage et la coalescence des mousses appelle donc quelques réserves.

A l'échelle d'une bulle individuelle, la présence de perfluorohexane a l'effet d'une véritable pompe à air ; la phase gazeuse enfermée dans la bulle n'est pas à l'équilibre avec l'atmosphère, ce qui explique l'augmentation du rayon de la bulle. En outre, le perfluorohexane influence la structure de la paroi de la bulle.

6.5 Conclusion

On peut retenir qu'il n'y a pas de corrélation simple entre les propriétés des films individuels de protéines et la stabilité globale des mousses correspondantes. En effet, on a étudié au chapitre 4 la perméabilité à l'air d'une série de films de protéines, obtenus à partir de solutions identiques à celles utilisées dans ce chapitre pour former les mousses. Dans tous les cas, les films microscopiques

de protéines étaient noirs au point isoélectrique. Pourtant, les mousses de protéines formées dans des conditions analogues ne sont pas noires. Même pour un stade de drainage avancé, les films de β -lactoglobuline contenus dans la mousse sont blancs et présentent par endroit des irisations colorées. Quant aux films de BSA et de β -caséine, ils semblent plus épais et riches en eau ; leur structure se rapproche davantage de celle d'un gel.

Il n'est donc pas possible d'assimiler le comportement de la mousse à celui d'un ensemble de films individuels. La structure des films dans une mousse est le résultat de leur histoire collective. D'une part, l'avancement du drainage détermine l'épaisseur des films dans la mousse. D'autre part, la coalescence et le mûrissement d'Ostwald induisent des réorganisations locales du réseau de bulles. En effet :

- lorsqu'un film se rompt, les films impliqués dans les bulles adjacentes doivent s'adapter à la nouvelle géométrie du système,
- de plus, la taille des bulles change sous l'effet du mûrissement d'Ostwald.

Les films sont donc en constante évolution au cours de l'effondrement de la mousse. Ils sont soumis à de nombreuses contraintes mécaniques qui affectent la structure des couches de protéines adsorbées. Nous avons déjà étudié au chapitre 4 l'effet du mûrissement d'Ostwald sur la structure de la paroi d'une bulle isolée. Nous avons alors montré que les couches de protéines, irréversiblement adsorbées, s'effondraient (« collapsaient ») lorsque le rayon de la bulle diminuait. Dans une mousse, l'évolution d'une bulle est plus complexe vue la multitude d'événements qu'elle subit au cours de son existence. D'un point de vue expérimental, il serait intéressant de pouvoir observer simultanément la structure globale de la mousse et celle des films qui séparent les bulles. Dans ce but, de récentes études essaient de développer une approche multi-échelle basée sur la technique de diffusion de neutrons [Axe03].

Toutefois, on peut remarquer que la corrélation entre films individuels et mousses est plus évidente dans le cas du SDS. Le drainage est rapide dans les deux systèmes. Expérimentalement, les solutions qui permettent la formation de films noirs microscopiques conduisent également à la formation de mousse noire (dont les bulles sont elles aussi de taille microscopique). Dans ces conditions, il semble possible de relier la stabilité de la mousse aux propriétés physico-chimiques de films isolés, étudiés de manière indépendante [Kru92].

Bibliographie

- [And01] M. ANDERSON, B. KRONBERG, C. LOCKOWANDT, B. PRUNET-FOCH, M. VIGNES-ADLER, *Foaming Mechanisms in Transient Foams under Microgravity Conditions*, Journal De Physique IV **11**(PR6), 227-230 (2001).
- [Ave99] R. AVEYARD, B.P. BINKS, J.H. CLINT, P.D.I. FLETCHER, *Foams and Emulsions: their Stability and Breakdown by Solid Particles and Liquid Droplets* in *Foams and Emulsions*, J.F. Sadoc and N. Rivier (eds), the Netherlands: Kluwer Academic Publishers (1999) p21.
- [Axe03] M.A.V. AXELOS, F. BOUÉ, *Foams as Viewed by Small-Angle Neutron Scattering*, Langmuir **19**, 6598-6604 (2003).
- [Bos01] M.A. BOS, T. VAN VLIET, *Interfacial Rheological Properties of Adsorbed Protein Layers and Surfactants: a Review*, Advances in Colloid and Interface Science **91**, 437-471 (2001).
- [Cla98] D.C. CLARK, P.J. WILDE, *Mobility of Adsorbed Protein Molecules as Studied by Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)*, D. Möbius and R. Miller (eds), Elsevier:Amsterdam, (1998) p267.
- [Dur99] M. DURAND, G. MARTINOTY, D. LANGEVIN, *Liquid Flow through Aqueous Foams: from the Plateau Border-Dominated Regime to the Node-Dominated Regime*, Physical Review E **82**(21), R6307-R6308 (1999).
- [Dur91] D.J. DURIAN, D.A. WEITZ, D.J. PINE, *Scaling Behavior in Shaving Cream*, Physical Review A **44**(12), R7902-R7905 (1991).
- [Ett03] R. ETTELAIE, E. DICKINSON, Z. DU, B. S. MURRAY, *Disproportionation of Clustered Protein-Stabilized Bubbles at Planar Air-Water Interfaces*, Journal of Colloid and Interface Science **263**, 47-58 (2003), et les références indiquées à l'intérieur.
- [Eva94] D.F. EVANS, H. WENNERSTRÖM, *The Colloidal Domain where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*, New York: VCH Publishers (1994) ch.2.
- [Exe98] D. EXEROWA, P.M. KRUGLYAKOV, *Foam and Foam Films: Theory, Experiment, Application*, Studies in Interface Science, Vol.5; Elsevier: Amsterdam, 1998, p115.
- [Gan97] F.G. GANDOLFO, H.L. ROSANO, *Interbubble Gas Diffusion and the Stability of Foams*, Journal of Colloid and Interface Science **194**, 31-36 (1997).
- [Gra79] D.E. GRAHAM, M.C. PHILLIPS, *Proteins at Liquid Interfaces. II. Adsorption Isotherms*, Journal of Colloid and Interface Science **70**(3), 415-426 (1979).
- [Kab92] A.S. KABALNOV, E.D. SHCHUKIN, *Ostwald Ripening Theory: Applications to Fluorocarbon Emulsion Stability*, Advances in Colloid and Interface Science **38**, 69-97 (1992), et les références indiquées à l'intérieur.

- [Koe99] S.A. KOEHLER, S. HILGENFELDT, H.A. STONE, *Liquid Flow through Aqueous Foams: the Node-Dominated Foam Drainage Equation*, Physical Review Letters **82**(21), 4232-4235 (1999).
- [Kru92] P.M. KRUGLYAKOV, D. EXEROWA, K. KHRISTOV, *New Possibilities for Foam Investigation: Creating a Pressure Difference in the Foam Liquid Phase*, Advances in Colloid and Interface Science **40**, 257-281 (1992).
- [Lan00] D. LANGEVIN, *Influence of Interfacial Rheology on Foam and Emulsion Properties*, Advances in Colloid and Interface Science **88**, 209-222 (2000), et les références indiquées à l'intérieur.
- [Lem77] R. LEMLICH, *A Theory for the Limiting Conductivity of Polyhedral Foam at Low Density*, Journal of Colloid and Interface Science **64**, 107-110 (1977).
- [Mac99] A.R. MACKIE, A.P. GUNNING, P.J. WILDE, V.J. MORRIS, *Orogenic Displacement of Protein from the Air/Water Interface by Competitive Adsorption*, Journal of Colloid and Interface Science **210**, 157-166 (1999).
- [Mar02] A.H. MARTIN, K. GROLLE, M.A. BOS, M.A. COHEN STUART, T. VAN VLIET, *Network Forming Properties of Various Proteins Adsorbed at the Air/Water Interface in Relation to Foam Stability*, Journal of Colloid and Interface Science **254**, 175-183 (2002).
- [Mur02] B.S. MURRAY, *Interfacial Rheology of Food Emulsifiers and Proteins*, Current Opinion in Colloid and Interface Science **7**, 426-431 (2002).
- [Phe96] R. PHELAN, D. WEAIRE, E.A.J.F. PETERS, G. VERBIST, *The Conductivity of Foam*, Journal of Physics: Condensed Matter **8**, L475-L482 (1996).
- [Saf01] M. SAFOUANE, M. DURAND, A. SAINT-JALMES, D. LANGEVIN ET V. BERGERON, *Aqueous Foam Drainage. Role of the Rheology of the Foaming Fluid*, Journal De Physique IV **11**(PR6), 275-280 (2001).
- [StJ02] A. SAINT-JALMES, D. LANGEVIN, *Time Evolution of Aqueous Foams: Drainage and Coarsening*, Journal of Physics: Condensed Matter **14**, 9397-9412 (2002)
- [Sto98] S. STOYANOV, C. DUSHKIN, D. LANGEVIN, D. WEAIRE, G. VERBIST, *Effect of the Rheology on Foam Drainage*, Langmuir **14**, 4663-4665 (1998).
- [Tay98] P. TAYLOR, *Ostwald Ripening in Emulsions*, Advances in Colloid and Interface Science **75**, 107-163 (1998), et les références indiquées à l'intérieur.
- [Ver02] M.U. VERA, D.J. DURIAN, *Enhanced Drainage and Coarsening in Aqueous Foams*, Physical Review Letters **88**(8), No.088304 (2002).
- [Wea93] D. WEAIRE, N. PITTET, S. HUTZLER, D. PARDAL, *Steady-State Drainage of an Aqueous Foam*, Physical Review Letters **71**(16), 2670-2673 (1993).
- [Wea99] D. WEAIRE, S. HUTZLER, *The Physics of Foams*, New York: Oxford University Press, 1999.
- [Wea01] D. WEAIRE, S.J. COX, S. HUTZLER, G. BRADLEY, *Foams in Microgravity*, Journal De Physique IV **11**(PR6), 213-220 (2001).
- [Wil96] P.J. WILDE, D.C. CLARK, *Foam Formation and Stability in Methods of Testing Protein Functionality*, G.M. Hall (ed), London: Blackie Academic & Professional, 1996.

Chapitre 7

Films noirs de cyclodextrines amphiphiles : une architecture moléculaire dominée par les forces d'hydratation

Ce travail a été mené en étroite collaboration avec le Laboratoire de Chimie Bio-Organique des Molécules Cages du CEA-Saclay et le Laboratoire des Glucides de la Faculté d'Amiens, respectivement dirigés par B. Perly et F. Djedaïni-Pilard. Les cyclodextrines amphiphiles utilisées dans cette étude ont été synthétisées par S. Moutard au cours de sa thèse.

Ce chapitre est consacré à l'étude des propriétés interfaciales d'une nouvelle classe de tensio-actifs, constitués d'un phospholipide greffé sur une cyclodextrine. Nous verrons que ces molécules originales forment des films noirs, dont l'architecture moléculaire est grandement influencée par l'hydratation des cyclodextrines. Nous montrerons par des mesures de réflectivité de rayons X qu'on peut jouer sur l'hydratation des films en modifiant le degré de méthylation des cyclodextrines, en complexant les cyclodextrines à diverses molécules liantes ou bien en irradiant les films par un rayonnement I.R. Enfin, nous discuterons de la perméabilité à l'air des films de phospholipidyl-cyclodextrines en fonction de la taille de leur coeur central d'hydratation [Sul04].

7.1 Les cyclodextrines amphiphiles : présentation générale

7.1.1 Propriétés structurales des cyclodextrines

Les cyclodextrines se présentent sous la forme d'une couronne constituée d'un assemblage de sucres. En toute rigueur, on parle d'oligosaccharide cyclique. Ces objets sont obtenus industriellement par dégradation enzymatique de brins d'amylose (amidon). Les trois cyclodextrines les plus fréquemment rencontrées sont l' α -, la β - et la γ -cyclodextrines, composées respectivement de 6, 7 et 8 unités de glucopyranose (Figure 7.1). Leur structure tridimensionnelle est celle d'un cône tronqué.

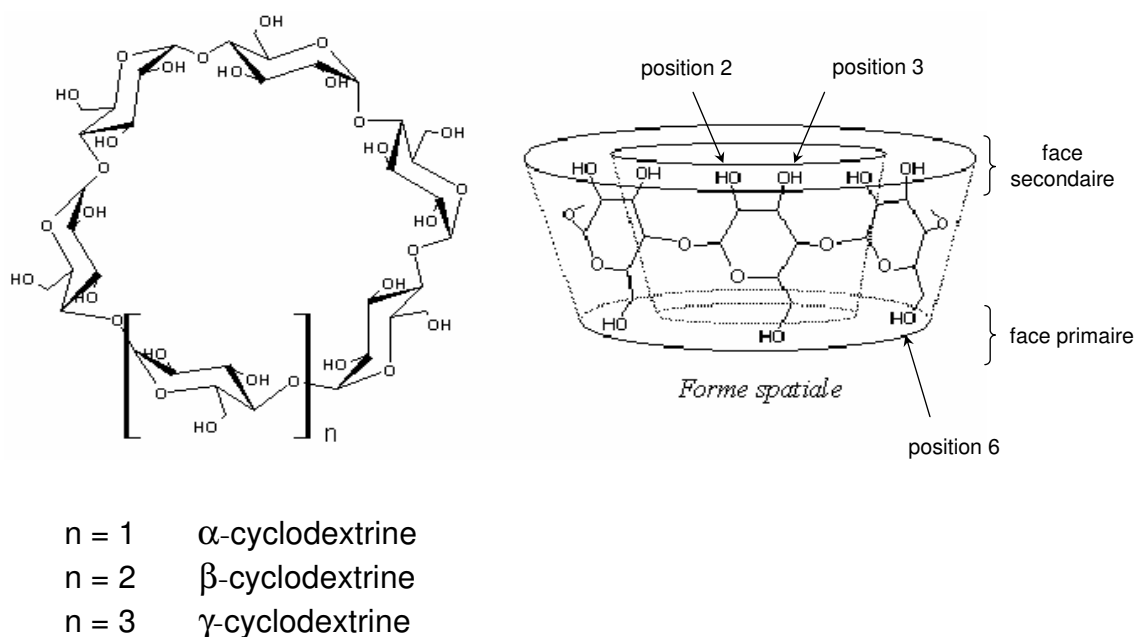


FIG. 7.1 – Formule développée générale des cyclodextrines et représentation schématique de leur structure tridimensionnelle. La face du cône la plus étroite est couramment appelée face primaire, tandis que la plus évasée est appelée face secondaire. La face primaire comporte les groupements hydroxyles situés en position 6. Quant à la face secondaire, elle comporte les groupement hydroxyles situés en position 2 et 3.

On peut noter que les groupements hydroxyles des sucres pointent à chacune des extrémités du cône. Leur présence a deux conséquences majeures :

- d'une part, elle assure la rigidité de l'édifice moléculaire. En effet, les hydroxyles situés sur la face la plus évasée interagissent entre eux pour former une véritable ceinture de liaisons hydrogène qui consolide la structure conique,
- d'autre part, elle confère un caractère hydrophile à la surface externe des cyclodextrines, au contact avec le solvant. A l'inverse, l'intérieur de la cavité est tapissée d'atomes d'hydrogène qui la rendent plutôt hydrophobe.

Le caractère amphiphile des cyclodextrines, associé à leur structure spatiale de type cage, leur permet de former des complexes d'inclusion avec de nombreuses molécules invitées hydrophobes. En pharmacologie, les cyclodextrines sont utilisées en tant que molécules cage, capables de piéger et de transporter en milieu aqueux des principes actifs insolubles.

7.1.2 Fonctionnalisation des cyclodextrines

Une grande partie de l'activité de recherche qui concerne les cyclodextrines consiste à les modifier chimiquement afin de moduler leurs propriétés physico-chimiques. Les enjeux sont multiples. Il s'agit par exemple d'augmenter la solubilité des cyclodextrines dans un solvant donné et/ou de promouvoir le pouvoir de complexation de leur cavité avec une molécule invitée. Un autre objectif est de parvenir à contrôler l'interaction des cyclodextrines avec la membrane des cellules-cible vers lesquelles on souhaite transporter la molécule invitée. Pour répondre à ces

exigences, les chimistes ont élaborés de nombreuses stratégies de fonctionnalisation. Nous allons discuter ci-dessous de deux d'entre-elles, qui ont servi à façonner les cyclodextrines amphiphiles que nous allons étudier dans ce chapitre.

Méthylation des cyclodextrines

Une des stratégies utilisées consiste à substituer sélectivement (ou pas) les hydroxyles des faces primaire et secondaire par des fonctions méthyles. Par exemple, la DIMEB est une β -cyclodextrine dont les hydroxyles en position 2 et 6 ont été méthylés. A température ambiante, cette molécule est trente fois plus soluble dans l'eau que la β -cyclodextrine¹ [Uek87]. De plus, la présence de méthyles influence les propriétés d'inclusion de la cavité. En supprimant des fonctions hydroxyles, on supprime également des liaisons hydrogène potentielles entre la molécule invitée et l'extrémité de la cavité. En contre-partie, les groupements méthyles présents sur le tour de la couronne peuvent interagir avec la molécule invitée; ils augmentent en quelque sorte la surface hydrophobe de la cyclodextrine.

Cyclodextrines monosubstituées par un bras hydrophobe

Une autre stratégie consiste à greffer un bras hydrophobe sur la face primaire de la cyclodextrine [Bel92] [Lin98] [Auz99]. Pour cela, il faut parvenir à substituer sélectivement un seul des hydroxyles de cette face. Le but d'une telle opération est de promouvoir l'ancrage des cyclodextrines dans une matrice de phospholipides. Dans cet esprit, des bras cholestérol ont été greffés sur des cyclodextrines. Les tests expérimentaux montrent que leur insertion dans les membranes est ainsi favorisée [Auz99]. De même, il est possible de former des films noirs mixtes, dont la structure est celle d'une bicouche de DMPC dans laquelle sont ancrées des cholesteryl-cyclodextrines [Jav02].

En outre, les cholesteryl-cyclodextrines présentent de remarquables propriétés d'auto-association en solution: elles s'assemblent pour former des micelles sphériques monodisperses [Auz00]. Par conséquent, au-delà de leur intérêt en pharmacologie, les cyclodextrines modifiées constituent une nouvelle famille de tensioactifs, dotés d'une très grande tête polaire. L'originalité de leur structure moléculaire en fait des objets stimulants à étudier d'un point de vue physico-chimique.

7.1.3 Les phospholipidyl-cyclodextrines

Dans ce chapitre, nous allons étudier un nouveau type de cyclodextrines amphiphiles où le bras hydrophobe est constitué d'un phospholipide. Il s'agit en l'occurrence d'une molécule de L- α -phosphatidylethanolamine (DMPE) fixée sur la cavité d'une β -cyclodextrine par l'intermédiaire d'un bras espaceur [Mou03]. De part leur structure, ces molécules tente de reproduire au plus près les caractéristiques des membranes naturelles. Nous avons plus particulièrement travaillé

1. La DIMEB possède des propriétés physico-chimiques surprenantes. Elle présente en particulier un coefficient de solubilité négatif: elle est plus soluble dans l'eau à 20°C qu'à 50°C! Ce comportement singulier provient de la structure de la coquille d'hydratation qui entoure les cyclodextrines. A basse température, cette coquille est très développée, tandis qu'elle se détruit lorsque la température augmente [Sta01].

avec les deux dérivés méthylés suivants (Figure 7.2) :

- la phospholipidyl-DIMEB (notée ph-DIMEB) pour laquelle les hydroxyles des positions 2 et 6 ont été méthylés,²
- la phospholipidyl-TRIMEB (notée ph-TRIMEB) pour laquelle l'intégralité des hydroxyles de la couronne de sucres ont été méthylés.³

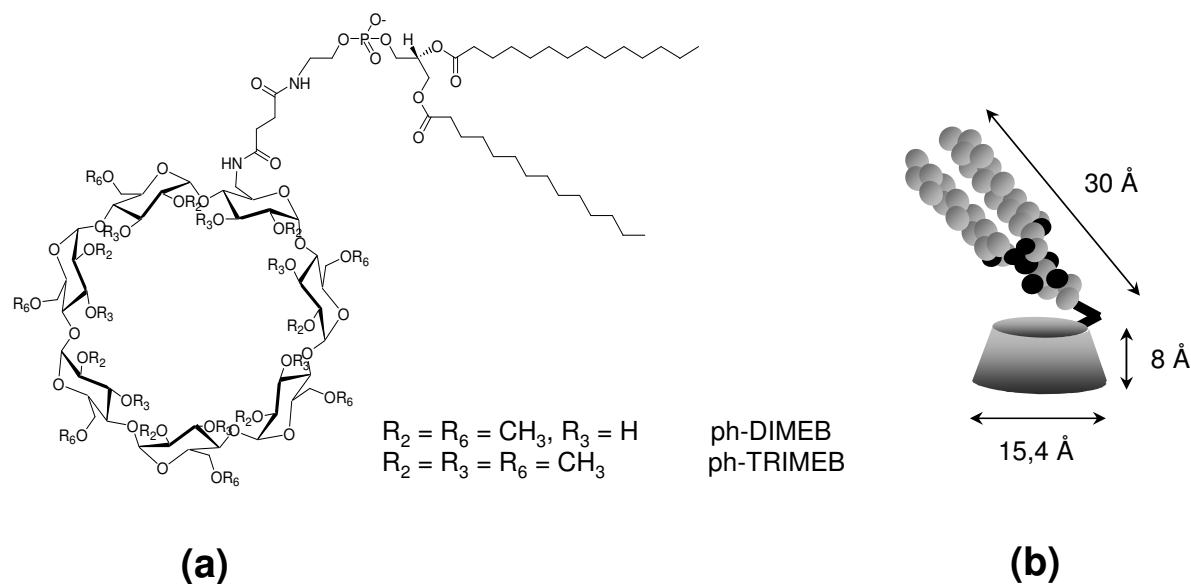


FIG. 7.2 – (a) Formule chimique développée de la ph-DIMEB et de la ph-TRIMEB ; (b) représentation schématique de leur structure tridimensionnelle.

La ph-DIMEB conserve donc 6 groupements hydroxyles, c'est-à-dire 6 positions potentielles pour former des liaisons hydrogène de type donneur ou accepteur avec le milieu environnant (Figure 7.3). Dans les molécules de ph-TRIMEB, ils ont été remplacés par des groupements O-CH₃, faiblement accepteurs. Par conséquent, les molécules de ph-TRIMEB présentent un schéma d'interaction plus pauvre que celui des ph-DIMEB en terme de liaisons hydrogène.

Ces deux composés sont très solubles dans l'eau. Ils possèdent une concentration micellaire critique (cmc) basse, qui est la signature d'un comportement auto-associatif très prononcé. En effet, les cmc de la ph-DIMEB et de la ph-TRIMEB valent respectivement 2×10^{-4} M et 10^{-5} M à T=20°C [Mou02]. Dans les deux cas, des micelles allongées (fibres micellaires) ont été observées par de diffusion de la lumière. Ces objets présentent une structure polydisperse et une taille supérieure à 200 nm [Mou03]. Par ailleurs, des expériences de RMN ont montré que ces composés conservaient les propriétés d'inclusion des β -cyclodextrines [Mou03].

En bref, les phospholipidyl-cyclodextrines combinent d'une part des propriétés d'auto-association en solution grâce à leur bras phospholipide, et d'autre part des propriétés d'inclusion grâce à leur partie cyclodextrine. Ce sont a priori de bons candidats pour vectoriser des principes

2. Nomenclature chimique: 6^I-(1,2-ditétradécanoyl- -glycero-3-phosphoethanolamido)succinylamido-6^I-desoxy-2^I- -methyl-hexakis(2^{II-VII},6^{II-VII}-di- -methyl)cyclomaltoheptaose

3. Nomenclature chimique: 6^I-(1,2-ditétradécanoyl- -glycero-3-phosphoethalomamido)succinylamido-6^I-deoxy-2^I,3^I-di- -methyl-hexakis(2^{II-VII},3^{II-VII},6^{II-VII}-tri- -methyl)cyclomaltoheptaose

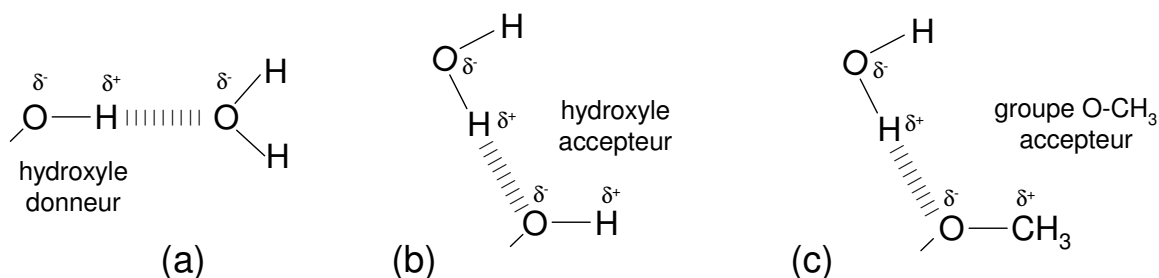


FIG. 7.3 – *Liaisons hydrogène* : les groupements hydroxyles peuvent être donneurs (cas(a)) ou accepteurs de liaison hydrogène (cas(b)). Cependant, les groupements O-CH₃ ne peuvent être que donneurs (cas(c)). Par conséquent, les molécules de *ph-TRIMEB* offrent moins de possibilités d'interaction avec l'eau que celles de *ph-DIMEB*.

actifs vers des cellules-cibles. Des tests ont montré que la *ph-DIMEB* était capable de traverser les membranes biologiques pour des concentrations inférieures à la cmc [Mou03]. Pour des concentrations supérieures ou égales à la cmc, ces molécules présentent des propriétés détergentes remarquables.⁴

7.2 Etude expérimentale des films noirs de phospholipidyl- cyclodextrines

7.2.1 Préambule

L'objectif de ce travail est d'étudier le comportement interfacial des phospholipidyl- cyclodextrines à travers l'organisation moléculaire des films noirs qu'elles forment. Nous verrons que la géométrie confinée des films noirs de Newton se prête particulièrement bien à l'étude de l'hydratation des cyclodextrines. De manière générale, les phénomènes d'hydratation jouent un rôle primordial dans la structure des objets biologiques (protéines) et les mécanismes élémentaires qui les concernent [Jef91] [Pal04]. Dans le sujet qui nous intéresse, la vectorisation d'un principe actif, l'hydratation des cyclodextrines peut être déterminante au moment du passage de la barrière transmembranaire. Une fois ancrée dans la membrane d'une cellule cible, la cyclodextrine amphiphile doit passer à l'intérieur de la cellule pour y délivrer le principe actif qu'elle contient. Ce passage se fait par un processus naturel appelé flip-flop [Str95] : il traduit le transfert spontané des lipides d'une couche à l'autre de la membrane (Figure 7.4). D'un point de vue thermodynamique, c'est un processus très défavorable puisque la tête polaire du lipide doit passer à travers le coeur hydrophobe de la membrane. Par conséquent, il a été suggéré que l'énergie d'activation d'un tel phénomène correspondait à celle nécessaire pour déshydrater la tête polaire du lipide considéré [Red90]. Dans le cas des phospholipidyl-cyclodextrines, la tête polaire est particulièrement imposante. Connaître son hydratation pourrait donc être une première étape vers la compréhension des mécanismes de passage à travers la barrière transmembranaire.

4. Les phospholipidyl-cyclodextrines détruisent les membranes dès que leur concentration est de l'ordre de la cmc.

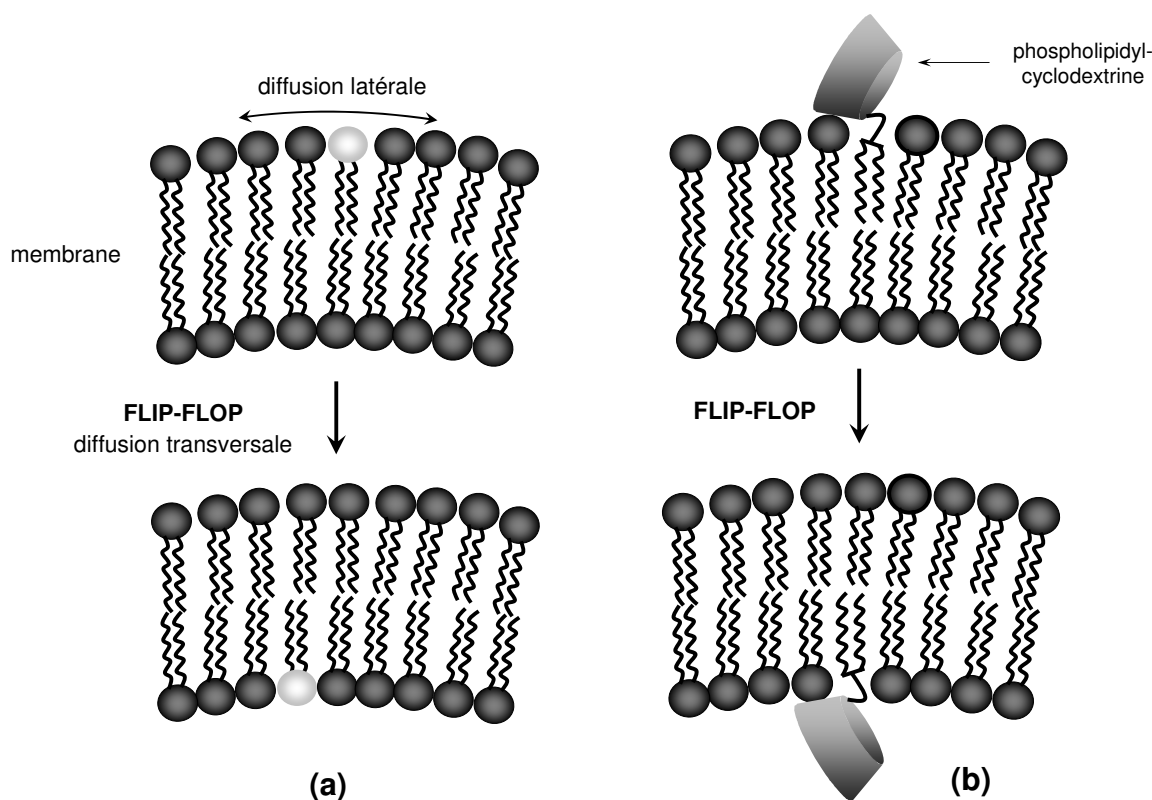


FIG. 7.4 – Illustration du flip-flop dans une membrane de phospholipides. Ce phénomène correspond à la diffusion spontanée des phospholipides d'un côté à l'autre de la bicouche (Figure (a)). Grâce à lui, les cyclodextrines amphiphiles ancrées à l'extérieur des membranes peuvent pénétrer dans les cellules (Figure (b)). L'énergie d'activation de ce phénomène, défavorable sur le plan thermodynamique, dépend de l'hydratation de la partie polaire de la molécule qui diffuse.

7.2.2 Comment favoriser la formation d'un film noir de Newton?

Parmi les films noirs, les films de Newton sont ceux qui possèdent la structure moléculaire la plus organisée. Dans ces films, les deux couches de tensioactifs sont directement au contact l'une de l'autre, tandis que dans les films communs elles sont séparées par une couche d'eau. Par conséquent, la structure des films de Newton est le reflet de la structure chimique des molécules de tensioactifs qui le composent. Les films de Newton possèdent donc a priori la structure la plus pertinente pour mettre en évidence la spécificité, en terme d'organisation aux interfaces, d'une nouvelle classe de tensioactifs. Nous allons donc essayer de réunir les conditions optimales pour former des films de Newton de phospholipidyl-cyclodextrines. Nous déterminerons ensuite leur structure moléculaire par réflectivité de rayons X (*cf.* § 3.2).

Quelle concentration en phospholipidyl-cyclodextrines choisir?

Les films de Newton se caractérisent par la grande compacité des arrangements moléculaires qui les composent. On ne peut les former qu'à partir de couches d'adsorption très denses à l'interface air/solution [Exe81]. Nous avons donc travaillé avec des solutions de phospholipidyl-cyclodextrines préparées bien au-dessus de la cmc (typiquement $c_{cyclodextrine}=0,5$ mg/mL, soit

~ 20 cmc). Dans ces conditions, on s'assure que la couverture moléculaire de l'interface air/solution est maximale au moment de la formation du film. Pour toutes les solutions utilisées dans cette étude, nous avons mesuré la tension de surface à l'aide de la méthode de Wilhelmy. Dans tous les cas, les cinétiques d'adsorption sont assez rapides et les valeurs à l'équilibre sont comprises entre 36 et 38 mN/m à $T=25^\circ\text{C}$. Ces valeurs (basses) sont déjà le signe d'une grande activité de surface.

Quelle concentration en électrolyte choisir ?

Les molécules de ph-DIMEB et de ph-TRIMEB portent toutes les deux une charge négative sur le groupement phosphate du bras phospholipide. Par conséquent, les films obtenus en l'absence d'électrolyte dans la solution sont gris clair à l'équilibre. Ce sont donc des films trop épais (>600 Å) pour être étudiés par réflectivité de rayons X. Les répulsions électrostatiques entre les parois du film imposent au film une épaisseur à l'équilibre relativement élevée. Pour pouvoir atteindre l'état noir, il est donc nécessaire d'ajouter du sel dans la solution afin d'écranter les charges du système.

Nous avons étudié l'effet de la concentration en électrolyte sur l'épaisseur des films de ph-DIMEB et de ph-TRIMEB. En présence de 0,07 M de NaCl, les films drainent très rapidement selon le processus de régénération marginale décrit par Mysels [Mys59] (*cf.* § 3.3.4). En 15 minutes, les films deviennent noirs et restent stables durant plusieurs heures. Les spectres de réflectivité des films à l'équilibre sont présentés sur la figure 7.5.

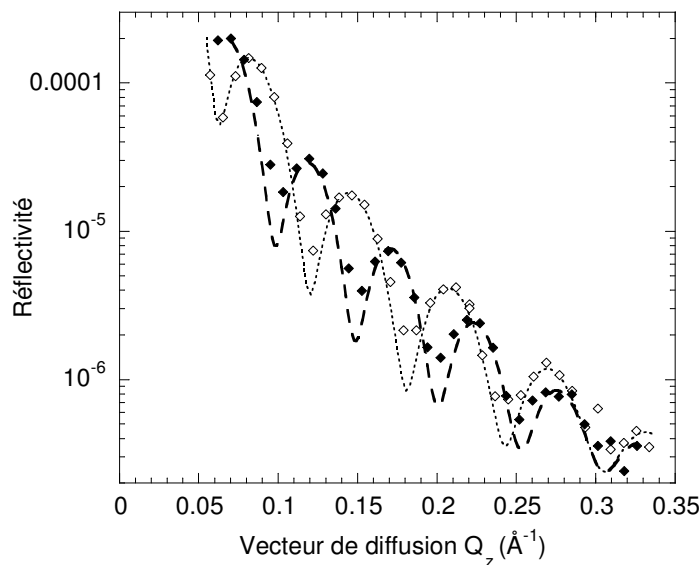


FIG. 7.5 – Courbes de réflectivité de rayons X des films noirs de ph-DIMEB et de ph-TRIMEB (solutions: 0,5 mg/mL de phospholipidyl-cyclodextrines, 0,07 M de NaCl). Les points correspondent aux courbes expérimentales. Dans les deux cas, il a fallu utiliser un modèle théorique à trois couches pour reproduire fidèlement les diagrammes d'interférences obtenus expérimentalement (courbes pointillés). La structure des films présente donc un gradient de densité électronique le long de la normale.

Dans le cas de la ph-DIMEB comme dans celui de la ph-TRIMEB, ils présentent des franges

d'interférences bien définies. Les paramètres structuraux des films, déduits de l'ajustement théorique des courbes expérimentales, sont regroupés dans le tableau 1. A l'aide de ces données, nous proposerons une description détaillée de la structure des films dans les paragraphes suivants. A ce stade, on peut remarquer qu'à concentrations égales en électrolyte, les films de ph-DIMEB sont plus épais que ceux de ph-TRIMEB : leur épaisseur vaut respectivement 125 et 104 Å. En augmentant la concentration en NaCl jusqu'à 0,1 M, on observe la formation de films plus minces, mais dont la durée de vie est nettement plus courte. Dans ces conditions de stabilité réduite (entre 20 et 60 min), les temps d'acquisition pour les courbes de réflectivité sont insuffisants pour résoudre la forme des franges d'interférence aux grands vecteurs de diffusion, *i.e.* là où l'intensité réfléchi est faible. Par conséquent, on ne peut pas extraire de ces courbes des informations sur la structure fine des films. Seule leur épaisseur totale peut être estimée correctement : on trouve 105 Å pour les films de ph-DIMEB et 94 Å pour ceux de ph-TRIMEB. On peut noter que là encore, les films de ph-DIMEB sont plus épais que ceux de pH-TRIMEB.

TABLEAU 1 - Paramètres structuraux déduits des courbes expérimentales de réflectivité de divers films de phospholipidyl-cyclodextrines ($c_{NaCl}=0,07$ M) ^a

paramètres	ph-DIMEB	ph-TRIMEB	ph-TRIMEB irr.	ph-DIMEB/ac. citr.
épaisseur totale (Å)	125	104	87	127
aire par molécule (Å ²)	280	240	240	285
rugosité (Å)	3,7	3,4	3,8	4
<i>couches externes</i> (<i>bras hydrophobe</i>)				
densité $\delta \times 10^6$ ^b	1,3	1,5	1,5	1,3
épaisseur (Å)	13	13	13	13
angle d'inclinaison (deg)	65	65	65	65
<i>coeur hydrophile</i>				
densité $\delta \times 10^6$ ^b	0,9	1,3	1,2	1
épaisseur (Å)	99	78	61	101
N_{eau} ^c	53	38	7	64

^a Tous les films décrits dans ce tableau sont à l'équilibre à l'exception des films de ph-DIMEB irradiés par I.R. Ces films sont dans un état stationnaire : leur température est plus élevée que celle du réservoir de solution et de l'atmosphère environnante. ^b La densité électronique réduite δ a pour expression : $\delta(z) = \frac{\lambda^2 r_e}{2\pi} \rho(z)$ (cf. § 3.2). A titre de référence, la densité réduite de l'eau liquide vaut : $\delta_{eau} = 3,56 \times 10^6$. ^c N_{eau} correspond au nombre de molécules d'eau impliquées dans l'hydratation des cyclodextrines.

7.2.3 Description de la structure moléculaire des films

Pour tous les films obtenus en présence de 0,07 M de NaCl, seul un modèle à trois couches est capable de rendre compte de la forme des courbes expérimentales de réflectivité (Figure 7.5). Le profil de densité électronique correspondant aux films de ph-TRIMEB est présenté à la figure 7.6

(celui des films de ph-DIMEB possède une forme analogue bien que les films soient plus épais).

En première analyse, on estime que la longueur maximale des molécules de ph-DIMEB et ph-TRIMEB étirées est de l'ordre de 38 Å, *i.e.* ~ 30 Å pour la partie phospholipide et le bras espaceur auxquels s'ajoutent 8 Å pour le cône de la cyclodextrine. Or, l'épaisseur totale des films de phospholipidyl-cyclodextrines présentés précédemment est comprise entre 94 et 125 Å. Par conséquent, les deux couches de molécules qui forment les parois du film ne sont pas accolées l'une sur l'autre. Elles sont séparées par une couche centrale dont la nature reste à préciser. Vue la taille des agrégats présents en solution (> 200 nm), il apparaît clairement que les films sont trop fins pour renfermer de tels objets dans leur coeur. On en déduit donc que les films se composent de deux couches de cyclodextrines amphiphiles séparées par un coeur aqueux, dont l'épaisseur dépend de la concentration en électrolyte dans la solution et du degré de méthylation des cyclodextrines.

Le principal gradient de densité électronique qui existe dans les films doit refléter les différentes parties chimiques des molécules de phospholipidyl-cyclodextrines. En effet, ces molécules sont constituées de deux parties dont les géométries sont radicalement différentes : la forme du bras hydrophobe est plutôt cylindrique, tandis que celle de la cyclodextrine est conique. Une telle dissymétrie dans les molécules doit conduire à la formation de couches de densités différentes au sein des films noirs. Ainsi, les couches de 13 Å situées au contact de l'air (tableau 1) doivent correspondre au bras hydrophobe des cyclodextrines modifiées (Figure 7.6). On peut ainsi en déduire les informations suivantes concernant la structure des films :

- tout d'abord, les chaînes de phospholipides sont inclinées de 65° par rapport à la normale au film. On peut le calculer aisément à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\cos \theta = \frac{e^{ext}}{l_{ph}} = \frac{13}{30} \quad (7.1)$$

où e^{ext} représente l'épaisseur des couches extérieures du film, situées au contact de l'air (voir tableau 1) et l_{ph} , la longueur du bras hydrophobe des cyclodextrines modifiées. Orientées de cette façon, les molécules peuvent s'arranger de manière plus compacte.

- de plus, l'aire moyenne occupée par une cyclodextrine amphiphile dans le film peut être calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\rho^{ext} = \frac{2\pi}{\lambda^2 r_e} \delta^{ext} = \frac{n_{e^-}^{ext}}{A e^{ext}} \quad (7.2)$$

où ρ^{ext} correspond à la densité électronique des couches extérieures du film. $n_{e^-}^{ext}$ est donc la somme des électrons d'un bras DMPE et des molécules d'eau qui participent à son hydratation.

D'après des simulations numériques, le groupement phosphate d'un phospholipide dans une membrane est entouré d'environ quatre molécules d'eau [Mar94]. On trouve alors que $n_{e^-}^{ext} = 451$. Dans ces conditions, les valeurs de A calculées à partir de l'équation (7.2) valent respectivement 280 et 240 Å² pour la ph-DIMEB et la ph-TRIMEB (en présence de 0,07 M NaCl). Ces résultats semblent réalistes si on les compare à l'aire de la base

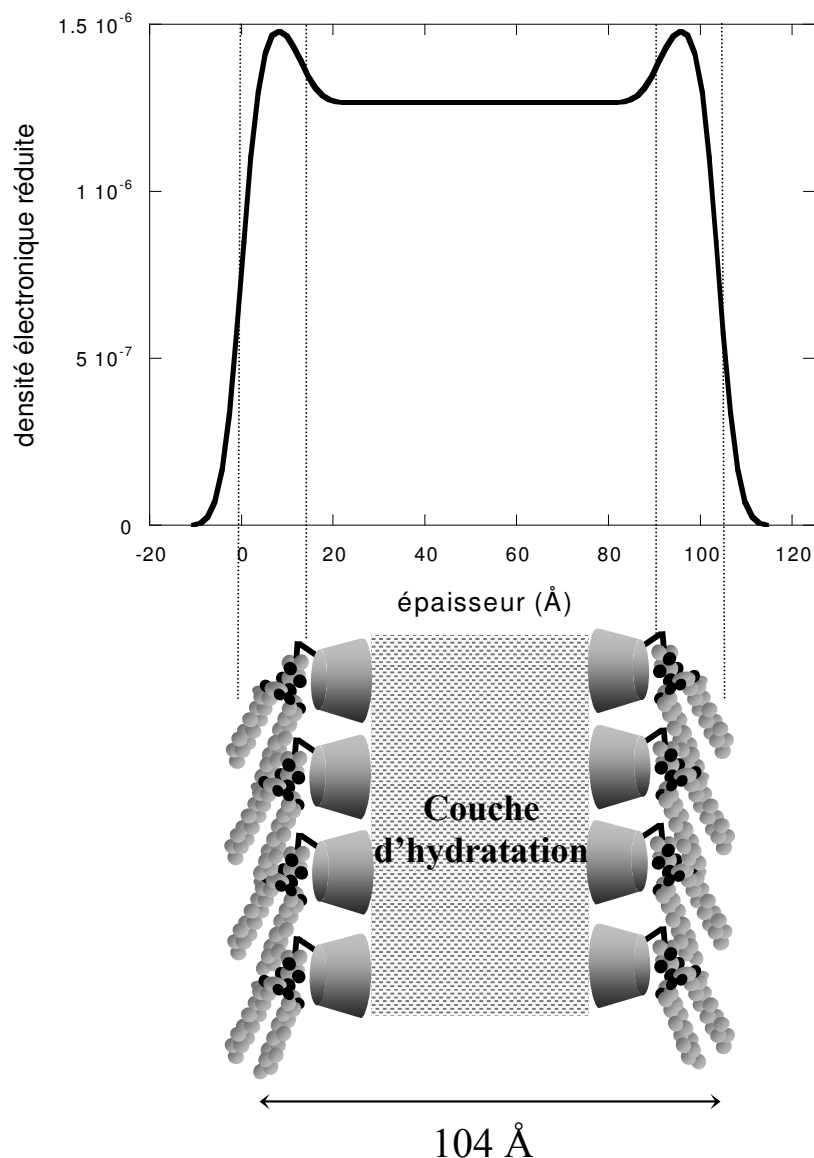


FIG. 7.6 – Profil de densité électronique d'un film noir de *ph-TRIMEB* (solution: 0,5 mg/mL de *ph-TRIMEB*, 0,07 M de NaCl). Ce profil est construit à partir des données structurales présentées au tableau 1 dans le cadre d'un modèle à trois couches. Une représentation schématique du film est proposée au-dessous. Il se compose de deux couches de cyclodextrines amphiphiles séparées par une épaisse couche d'hydratation. Vue l'épaisseur de cette couche, on ne s'attend pas à ce que toutes les molécules d'eau soient liées avec la même force aux cyclodextrines; il existe probablement différents niveaux d'organisation qui reflètent les différentes coquilles d'hydratation des cyclodextrines (primaire, secondaire). Cependant, la technique de réflectivité des rayons X ne nous permet pas d'accéder à ces différentes strates d'organisation. Les bras phospholipidiques des molécules, situés au contact de l'air, sont inclinés par rapport à la normale du film. Une telle géométrie permet d'optimiser la densité des arrangements moléculaires. Le profil des films de *ph-DIMEB* obtenus dans des conditions analogues présente une forme similaire. Cependant, les arrangements moléculaires de *ph-DIMEB* sont moins denses et les films possèdent un coeur aqueux plus développé. Ces différences de structure proviennent des différences d'hydratation entre la *ph-DIMEB* et la *ph-TRIMEB*.

d'une β -cyclodextrine: $\pi (7.7)^2 = 186 \text{ \AA}^2$. Il n'est pas surprenant que les valeurs calculées précédemment soient supérieures à cette aire minimale puisque la structure à 7 sucres de la couronne de cyclodextrines est intrinsèquement dissymétrique. Par conséquent, on ne s'attend pas à ce que les cyclodextrines puissent s'arranger de manière optimale (en terme de densité) dans le plan du film.

7.2.4 Influence du degré de méthylation des cyclodextrines sur l'hydratation des films

La structure globale des films noirs de ph-DIMEB et de ph-TRIMEB présentent des similitudes pour $c_{NaCl} = 0,07 \text{ M}$. Premièrement, tous deux sont constitués d'une couche centrale hydrophile moins dense que les couches extérieures au contact de l'air. De plus, l'épaisseur des couches extérieures vaut 13 \AA dans les deux types de films. Cependant, le coeur central des films de ph-DIMEB est plus épais de 21 \AA .

Comme nous l'avons vu précédemment, la couche centrale des films inclut les cavité des cyclodextrines ainsi qu'un certain nombre de molécules d'eau, qu'on peut calculer à l'aide de l'équation suivante :

$$\rho^{cen} = \frac{2\pi}{\lambda^2 r_e} \delta^{cen} = \frac{2n_{e^-}^{cd} + 10N_{eau}}{A e^{cen}} \quad (7.3)$$

où ρ^{cen} et e^{cen} sont respectivement la densité électronique et l'épaisseur de la couche centrale du film considéré. $n_{e^-}^{cd}$ correspond au nombre d'électrons contenus dans la partie cage des cyclodextrines amphiphiles. $n_{e^-}^{cd}$ vaut respectivement 686 et 742 pour la ph-DIMEB et la ph-TRIMEB. Quant à N_{eau} , c'est le nombre de molécules d'eau par cyclodextrine dans le film.

D'après l'équation (7.3), il vient :

$$N_{eau} = \frac{\frac{2\pi}{\lambda^2 r_e} \delta^{cen} A e^{cen} - 2n_{e^-}^{cd}}{10} \quad (7.4)$$

Les résultats de ce calcul⁵ sont présentés au tableau 1. On trouve que les films de ph-DIMEB sont plus riches en eau que ceux de ph-TRIMEB pour une concentration en électrolyte équivalente. Ce résultat n'est pas surprenant a priori, puisque tous les hydroxyles de la β -cyclodextrine ont été substitués par des méthyles dans les molécules de ph-TRIMEB. Toutefois, les molécules de ph-DIMEB possèdent encore 7 hydroxyles sur la face secondaire de la β -cyclodextrine (qui pointe vers l'intérieur des films). Intuitivement, on s'attend bien à ce que les ph-DIMEB soient plus hydratées que les ph-TRIMEB, dans la mesure où elles peuvent développer un plus grand nombre de liaisons hydrogène avec le solvant.

Il est intéressant de remarquer que ce changement d'hydratation n'a pas de conséquence notable sur la tension de surface des solutions: elle très proche de 37 mN.m^{-1} pour les solutions de ph-DIMEB et de ph-TRIMEB utilisées ci-dessus ($c_{cyclodextrine} = 0,5 \text{ mg/mL}$, $c_{NaCl} = 0,07 \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$). En revanche, le changement d'hydratation affecte significativement la structure des

5. Dans ce calcul, on a négligé la présence de contre-ions Na^+ dans le film, dont le rôle est fondamental pour écranter la charge négative du phosphate de la partie DMPE et former des films noirs. Cependant, cette approximation n'affecte pas de manière significative le calcul de N_{eau} . Grossièrement, si l'on considère qu'il y a un ion Na^+ condensé à chaque cyclodextrine amphiphile dans le film, cela diminue N_{eau} d'une unité (un ion Na^+ possède 9 électrons soit à peu près autant qu'un molécule d'eau).

films :

- d’une part, il modifie les interactions normales entre les couches de cyclodextrines adsorbées (*cf.* l’épaisseur totale des films de ph-DIMEB est différente de celle des films de ph-TRIMEB.),
- d’autre part, il influence les interactions latérales entre cyclodextrines d’une même couche. En effet, on a observé que les molécules de ph-TRIMEB formaient des arrangements moléculaires plus compacts que ceux des molécules de ph-DIMEB (*cf.* $A_{ph-TRIMEB} < A_{ph-DIMEB}$). Il est possible que les molécules de ph-TRIMEB, dont l’extérieur de la cavité ne présente que des méthyles, forment des couches plus denses sous l’effet de forces hydrophobes. A l’inverse, les couches de ph-DIMEB s’organiseraient de manière moins dense du fait de leur meilleure hydratation.

De manière générale, les interactions normales et latérales évoquées ci-dessus sont interdépendantes. Ainsi, lorsque la compacité des arrangements moléculaires change, la charge surfacique des couches adsorbées est également modifiée. Par conséquent, l’énergie d’interaction électrostatique entre les parois du film varie. Intuitivement, on aurait pu s’attendre à ce que les films noirs de ph-DIMEB soient moins épais que ceux de ph-TRIMEB (à concentration en électrolyte égale) puisque leurs parois sont moins chargées. C’est pourtant l’inverse qu’on observe. Cette remarque souligne la subtilité de l’équilibre des forces qui détermine l’épaisseur des films ; elle met également en évidence le rôle fondamental joué par les interactions cyclodextrine-solvant dans cet équilibre. Les différences de structure observées entre les films de ph-DIMEB et de ph-TRIMEB montrent l’importance des forces d’hydratation dans ces systèmes.

7.2.5 Films noirs communs ou films noirs de Newton ?

A quelle catégorie de films noirs les films de phospholipidyl-cyclodextrines appartiennent-ils ? La réponse à cette question n’est pas évidente a priori. En effet, la structure des films dépend de l’hydratation des cyclodextrines, ce qui est caractéristique des films de Newton. Pourtant, ils possèdent une couche centrale d’eau très épaisse, *i.e.* supérieure à 50 Å lorsque $0,07 \leq c_{NaCl} \leq 0,1$ M. Pour des corps aqueux d’une telle taille, on a théoriquement affaire à des films communs.⁶ Intéressons-nous de plus près aux caractéristiques de la couche centrale d’eau des films de phospholipidyl-cyclodextrines. Sa densité électronique est environ trois fois moins dense que celle de l’eau liquide (*cf.* $\delta_{eau} = 3,56 \times 10^6$).⁷ Par conséquent, l’organisation des molécules d’eau au sein des films est conditionnée par leur confinement géométrique et les interactions qu’elles développent avec les cyclodextrines adsorbées. Aree *et al* ont montré que la DIMEB cristallisait sous une forme très hydratée à 18°C [Are00] : les sept groupements hydroxyles de la DIMEB forment des liaisons hydrogène avec sept molécules d’eau. En présence de 8 molécules d’eau supplémentaires, elles constituent un réseau régulier de liaisons hydrogène qui encapsule la cage de la cyclodextrine. Ce type de structure est couramment appelé « clathrate hydrate » dans la littérature [Are00] [Sta01] ; sa formation est cruciale pour stabiliser la matrice de cyclodextrines

6. Habituellement, les couches d’hydratation associées aux têtes polaires sont inférieures à 10 Å dans les films de Newton. Au-delà de 20-30 Å, on considère que les propriétés des couches d’eau sont proches de celles de l’eau liquide [Rav04].

7. Il s’agit de la densité électronique de l’eau volumique, aussi appelée « bulk water » en anglais.

cristallisée et elle prouve que les molécules d'eau tendent à s'organiser au voisinage d'une couche de DIMEB. Des simulations moléculaires ont également montré que les molécules de DIMEB en solution étaient recouvertes d'une importante coquille d'hydratation, mettant en jeu plusieurs dizaines de molécules d'eau à $T=25^{\circ}\text{C}$ [Sta01]. Ces molécules d'eau s'organisent par strates autour des différents éléments de la couronne de sucres (groupements $-\text{OH}$ et $-\text{CH}_3$) et déterminent la solubilité globale de la cyclodextrine. A la lumière de ces résultats, il semble raisonnable de penser que l'abondante couche d'eau qui sépare les parois des films de ph-DIMEB et de ph-TRIMEB provient du haut degré d'hydratation des cyclodextrines.

Peut-on pour autant assimiler ces films à des films de Newton possédant une couche d'hydratation extrêmement développée? Rien de moins sûr, car si la structure des films dépend de l'hydratation des molécules qui le composent, elle dépend également de la concentration en électrolyte dans la solution. En effet, l'épaisseur des films diminue lorsque la concentration en NaCl passe de 0,07 à 0,1 M (*cf.* § 7.2.2). Ce type de comportement est caractéristique des films communs. A l'inverse, les films de Newton sont habituellement décrits comme deux parois de molécules amphiphiles qui adhèrent l'une sur l'autre; leur épaisseur est théoriquement minimale et ne peut pas être réduite davantage même si la concentration en électrolyte augmente. On peut se demander ici si l'hydratation des cyclodextrines ne dépendrait pas de la concentration en électrolyte, ce qui expliquerait les variations observées en présence de quantités croissantes de NaCl.

En conclusion, la structure des films noirs de phospholipidyl-cyclodextrines ne correspond pas exactement à celle d'un film commun, ni à celle d'un film de Newton. Historiquement, la distinction entre ces deux types de films a été établie pour des systèmes stabilisés par des tensioactifs de petite taille (*cf.* § 3.1). Néanmoins, la transition CBF \rightarrow NBF ne semble pas aussi bien définie pour des tensioactifs plus complexes, tels que les phospholipidyl-cyclodextrines. La spécificité de ces molécules provient de leur abondante coquille d'hydratation dont la taille pourrait dépendre de la concentration en électrolyte du système.

7.2.6 Déshydratation des films par irradiation I.R.

Benattar *et al* ont montré qu'on pouvait réduire de manière significative le coeur aqueux des films noirs en les exposant à un rayonnement infra-rouge (I.R.) de faible intensité [Ben04]. On a soumis les films noirs de ph-TRIMEB à un tel rayonnement afin d'explorer les états de faible hydratation qu'ils peuvent accepter. Les expériences ont été réalisées en présence de 0,07 M de NaCl afin de favoriser la formation de films noirs stables.

Avant toute chose, on attend que le film de ph-TRIMEB atteigne son état d'équilibre (104 Å). Puis, on commence le processus d'irradiation tout en observant la structure du film par réflectivité de rayons X (Figure 7.7).

Voici les principales étapes de l'évolution du film irradié :

- le film gonfle d'environ 5 Å dans les 15 premières minutes.

Ce phénomène surprenant, déjà observé pour les films noirs de DMPE, résulte de réarrangements de surface subtils associés à la fusion des chaînes des phospholipides. Une explication complète de ce phénomène est proposée dans la référence [Ben04].

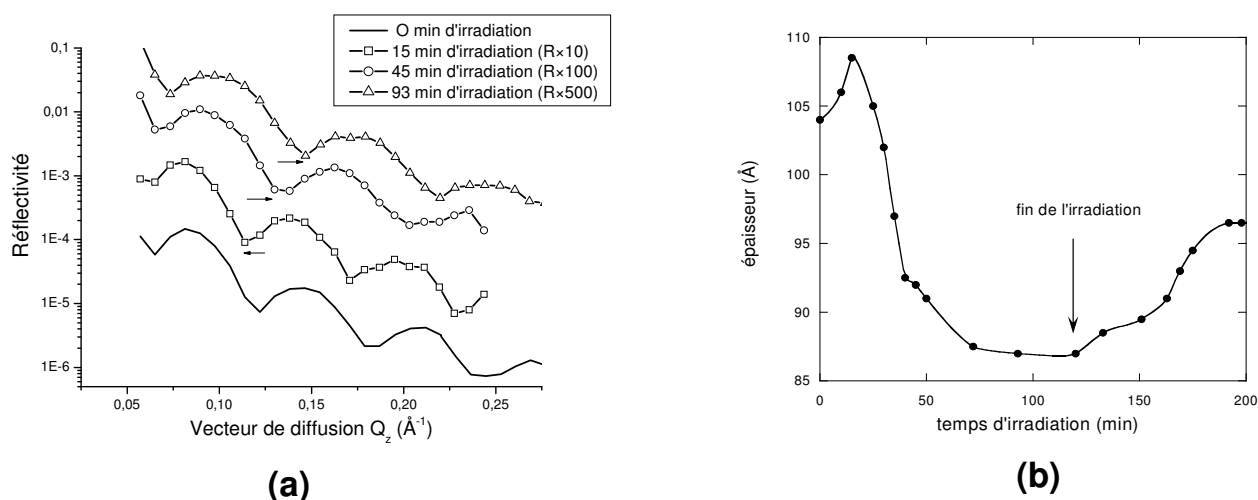


FIG. 7.7 – La figure (a) présente l'évolution du spectre de réflectivité d'un film de *ph-TRIMEB* soumis à un rayonnement I.R (solution: 0,5 mg/mL de *ph-TRIMEB*, 0,07 M de NaCl). Pour une meilleure lisibilité de la figure, les courbes à $t=15$, 45 et 93 min ont été déplacées verticalement en multipliant le coefficient de réflectivité R par un facteur 10, 100 et 500. On observe globalement un déplacement des franges d'interférences vers les grands vecteurs de diffusion (à l'exception de la courbe à $t=15$ min). Cela traduit l'amincissement du film au cours du processus d'irradiation (Figure (b)).

- son épaisseur diminue ensuite de 22 \AA avant de se fixer à 87 \AA .⁸

En comparant les paramètres structuraux du film avant et pendant l'irradiation (tableau 1), on se rend compte que seul le coeur aqueux est affecté par le rayonnement I.R. Il devient nettement plus mince et légèrement moins dense. A l'aide de l'équation (7.4), on a établi que le nombre de molécules d'eau par cyclodextrine diminuait d'un facteur 5 dans le film irradié. Le changement de structure observé sous irradiation I.R provient donc de la déshydratation des molécules de *ph-TRIMEB* du film,

- enfin, le film se remet immédiatement à gonfler à l'arrêt l'irradiation.

On peut remarquer qu'il ne retrouve pas son épaisseur initiale même au bout d'un temps long (80 min). Son épaisseur se stabilise à 96 \AA , sans doute à cause d'un hystérésis dans le processus d'hydratation.

Ce type de comportement a déjà été observé pour des films de tensioactifs très divers (SDS, $C_{12}E_6$, DMPC, DMPE, etc). Le principal effet des I.R est de chauffer localement le film, tandis que la température du réservoir de solution et de la phase gazeuse environnante reste quasiment constante. Dans ces conditions, les molécules d'eau contenues dans le film s'évaporent et l'épaisseur du film diminue. On peut remarquer que le film ne s'amincit pas à la même vitesse tout au long de l'irradiation. En effet, on observe une rupture de pente sur la courbe (b) de la figure 7.7, qui indique que les molécules d'eau sont plus difficiles à arracher lorsque le coeur du film est plus fin.⁹ En bref, ces expériences confirment que les films de phospholipidyl-cyclodextrines pos-

8. Cet état stationnaire dépend de la puissance du rayonnement I.R. et ne correspond pas forcément à l'état d'hydratation le plus bas que les films puissent supporter.

9. Plus le film est fin et plus les molécules d'eau restantes sont fortement liées aux cyclodextrines.

sèdent un coeur aqueux abondant, dont la taille peut être considérablement réduite sous l'effet d'un rayonnement I.R.

7.2.7 Changement d'hydratation des films en présence de complexes d'inclusion

Ce paragraphe est consacré à l'étude de films noirs de cyclodextrines amphiphiles complexées. Le but de ce travail est de déterminer l'influence des interactions faibles sur la structure des films. En effet, la présence d'une molécule invitée dans la cavité modifie les interactions de la cyclodextrine avec son environnement (solvant, autres molécules de cyclodextrine). Les forces qui contrôlent la complexation varient en fonction de la nature de la molécule invitée ; il peut s'agir de forces de Van de Waals, de forces hydrophobes et/ou de liaisons hydrogène (*cf.* [Jef91] ch.18).

Présentation des complexes

Au cours de cette étude, nous avons utilisé les 4 molécules liantes suivantes : l'acide citrique, le 4-*tert*-butylbenzoate de sodium, le chlorure de 1-adamantylammonium et le chloramphénicol (Figure 7.8). Toutes ces molécules forment des complexes d'inclusion avec la ph-DIMEB à l'exception de l'acide citrique (complexes d'association). En effet, l'acide citrique interagit fortement avec les groupements hydroxyles des cyclodextrines tout en restant à l'extérieur de la cavité.¹⁰ En terme d'interaction, le cas du 4-*tert*-butylbenzoate de sodium est aussi intéressant : la partie aromatique de la molécule rentre dans la cavité, alors que le groupement COO^- pointe vers l'extérieur. Il interagit donc lui aussi avec les groupements hydroxyles de la cyclodextrine. On peut remarquer que le 4-*tert*-butylbenzoate de sodium et le chlorure de 1-adamantylammonium portent respectivement un charge négative et positive en solution. Quant au chloramphénicol, il est neutre. On espère pouvoir déterminer à l'aide de ces trois composés si la charge de la molécule invitée a une quelconque incidence sur la structure des films. On dispose donc d'un jeu de molécules, caractérisées chacune par un schéma d'interaction différent avec la ph-DIMEB. On se propose d'analyser maintenant les conséquences sur la structure des films de complexes.

Résultats expérimentaux

Tous les complexes utilisés dans cette étude possèdent une très grande constante d'association ($K > 10^3$ M) et une stoechiométrie 1:1 [Hof96] [Wei96] [Pal90] [Auz01]. Ainsi, les solutions ont été préparées à partir d'un mélange équimolaire ($2,46 \times 10^{-3}$ M) de ph-DIMEB et de molécule liante. Dans la suite, on a supposé que la plupart des molécules de ph-DIMEB en solution étaient complexées. Toutes les expériences ont été réalisées en présence de 0,07 M de NaCl.

Expérimentalement, les films formés à partir de complexes d'inclusion sont beaucoup moins stables que les films de ph-DIMEB seule. Ainsi, la durée de vie des films de ph-DIMEB/4-*tert*-

¹⁰ Les complexes de ph-DIMEB/acide citrique ont été étudiés par des expériences de T-ROESY. Ces expériences, basées sur la détection des interactions dipolaires, permettent de recueillir des informations sur la proximité spatiale des protons du système étudié [Bot84]. On a ainsi pu mettre en évidence que l'acide citrique ne pénétrait pas dans la cavité [Per04].

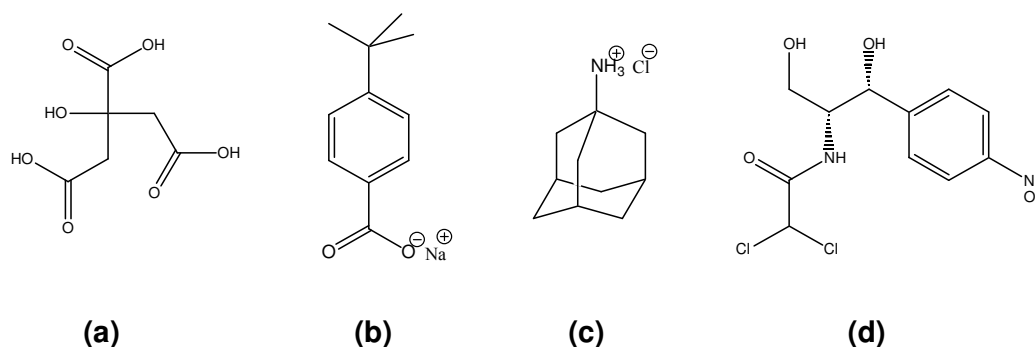


FIG. 7.8 – Formules chimiques développées des molécules liantes utilisées dans cette étude : (a) acide citrique, (b) 4-tert-butylbenzoate de sodium, (c) chlorure de 1-adamantylammonium, (d) chloramphénicol.

butylbenzoate de sodium n'excède pas 20 min. Ils cassent en fin de drainage, lorsque leur épaisseur se situe autour de 134 Å. Quant aux films de ph-DIMEB/chlorure de 1-adamantylammonium et de ph-DIMEB/chloramphénicol, ils éclatent bien plus tôt, dès l'apparition des premiers spots noirs.

Nous avons vu précédemment que les films de ph-DIMEB possédaient une couche centrale d'hydratation très épaisse. Il est possible que la présence d'une molécule invitée dans la cavité perturbe le réseau de liaisons hydrogène autour de la cyclodextrine. En effet, les groupements hydroxyles et O-CH₃ de la couronne de sucres peuvent interagir avec la molécule invitée et donc modifier les interactions entre la cyclodextrine et le solvant. De plus, le phénomène d'inclusion doit également perturber les arrangements moléculaires au niveau des parois du film. En effet, ce dernier point a déjà été soulevé au cours d'expériences de diffraction de rayons X sur des cristaux de cyclodextrines complexées [Sae85]. Dans ces cristaux, le structure de la matrice de cyclodextrines dépend étroitement de la nature et de la taille des molécules invitées. Bien que les parois des films noirs ne soient pas cristallines, on peut s'attendre à ce que leur structure dépende également la molécule invitée considérée. En bref, les résultats ci-dessus montrent que le phénomène d'inclusion bouleverse la structure des films. Le changement d'hydratation des cyclodextrines en présence d'une molécule invitée pourrait en être une des raisons.

Les films formés à partir de complexes ph-DIMEB/acide citrique se comportent de manière radicalement différente. C'est probablement lié au fait que l'acide citrique reste en-dehors de la cavité lorsqu'il est complexé. Ces films présentent une stabilité et une structure très similaires à celles des films de ph-DIMEB obtenus dans les mêmes conditions (Figure 7.9 et tableau 1). Toutefois, la couche centrale des films de ph-DIMEB/acide citrique est légèrement plus épaisse et plus dense.

Il est intéressant de remarquer que le pH d'une solution mixte de ph-DIMEB et d'acide citrique vaut environ 4, alors qu'il est plutôt de 6 pour les solutions de ph-DIMEB pures. D'après les valeurs des pK_a des trois groupements carboxyliques de l'acide citrique¹¹, l'un d'entre eux doit être principalement présent sous sa forme basique COO⁻. Par conséquent, les complexes ph-

11. pK_{a1}=3,13, pK_{a2}=4,76, pK_{a3}=6,4

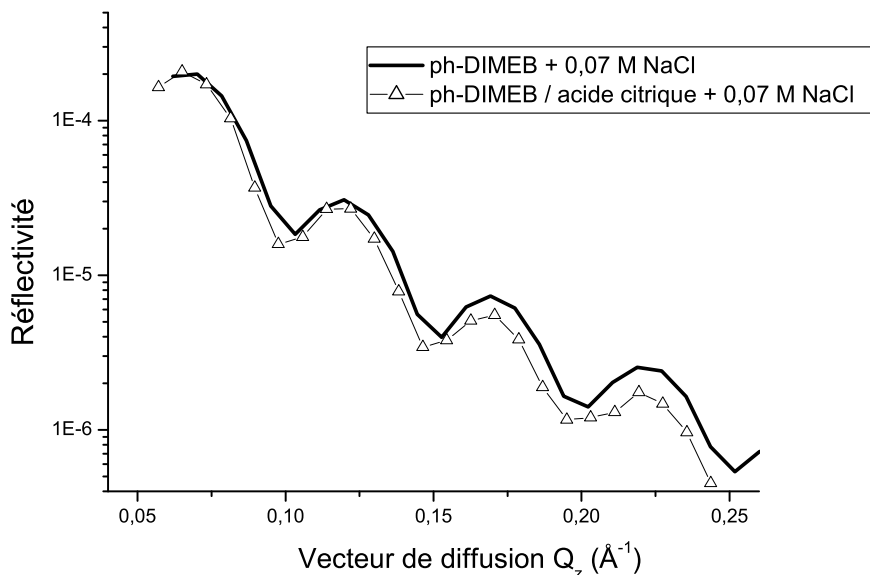


FIG. 7.9 – Comparaison des courbes de réflectivité d'un film noir de *ph-DIMEB* et d'un film noir de *ph-DIMEB/acide citrique* ($c_{\text{NaCl}}=0,07$ M). Les deux films présentent des structures assez proches. Toutefois, la couche centrale des films de *ph-DIMEB/acide citrique* est légèrement plus épaisse et plus dense que celle des films de *ph-DIMEB* seule (tableau 1).

DIMEB/acide citrique portent en moyenne deux charges négatives (contre seulement une pour les molécules de *ph-DIMEB* seules). On s'attend donc à ce que les films de complexes soient soumis à des interactions électrostatiques de plus grande intensité que celles existant dans les films de *ph-DIMEB*. On observe pourtant que l'épaisseur des films ainsi que l'aire moyenne par cyclodextrine sont quasiment identiques en présence ou en absence d'acide citrique (tableau 1). On est donc amené à envisager les deux hypothèses suivantes :

- soit la charge négative de l'acide citrique est écrantée par la présence de contre-ions dans le film,
- soit l'acide citrique est neutre lorsqu'il s'associe à la *ph-DIMEB*. Cela signifierait donc que les valeurs des pK_a des groupements carboxyliques sont modifiées au cours de la complexation.

Quoi qu'il en soit, les répulsions électrostatiques ne semblent pas être un paramètre déterminant pour discriminer la structure des films de *ph-DIMEB/acide citrique* devant celle des films de *ph-DIMEB*. Les différences observées entre ces deux films sont probablement dues à un effet d'hydratation. Germain *et al* ont d'ailleurs montré que la solubilité des β -cyclodextrines augmentait significativement en présence d'acide citrique [Ger95]. Il semble que l'acide citrique, situé à l'extérieur de la cavité, optimise l'interface entre l'eau et la β -cyclodextrine. En d'autres termes, la β -cyclodextrine est plus hydratée et donc mieux solubilisée. Nos résultats corroborent ces observations : d'après nos calculs, le nombre de molécules d'eau impliquées dans l'hydratation des complexes *ph-DIMEB/acide citrique* est 20 % supérieur à celui observé dans les films de *ph-DIMEB* seule (tableau 1).

7.2.8 Perméabilité à l'air des films noirs de phospholipidyl-cyclodextrines

Nous avons mesuré le coefficient de perméabilité à l'air (K) de divers films de phospholipidyl-cyclodextrines en utilisant la méthode décrite au chapitre 4. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à l'évolution de K en fonction de la concentration en électrolyte. La taille des films requise pour ce genre d'expériences est de l'ordre de $3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$, tandis qu'elle est d'environ 1 cm^2 pour les expériences de réflectivité de rayons X. En pratique, les films dont on mesure la perméabilité sont plus stables du fait de leur petite surface. Par conséquent, on peut explorer une gamme de conditions expérimentales plus large que celle autorisée au cours des expériences de réflectivité X où la stabilité des films macroscopiques est un facteur limitant.

Chaque valeur de K proposée ci-après est la moyenne d'au moins dix valeurs expérimentales indépendantes. Il faut noter que la déviation entre cette valeur moyenne et les valeurs expérimentales peut atteindre 10 %. Malgré de nombreuses précautions expérimentales (propreté de la verrerie...), nous ne sommes pas parvenus à obtenir des valeurs de K moins dispersées. Soit cette dispersion est le résultat d'inhomogénéités intrinsèques à la structure des films, soit elle correspond à une légère dispersion de l'épaisseur des films (métastables) bien qu'ils soient formés à partir de solutions identiques. Les résultats obtenus pour des films de ph-DIMEB et de ph-TRIMEB sont présentés au tableau 2.

TABLEAU 2 - Perméabilité à l'air des films de phospholipidyl-cyclodextrines en fonction de la concentration en électrolyte dans la solution ($T=25 \pm 1^\circ \text{ C}$)

concentration en NaCl	0,05 M	0,07 M	0,1 M
$K_{ph-DIMEB} \text{ (cm.s}^{-1}\text{)}$	0,096	0,088	0,106
$K_{ph-TRIMEB} \text{ (cm.s}^{-1}\text{)}$	0,127	0,134	0,145

Les valeurs de K présentées dans ce tableau ont été obtenues pour des études limitées à une heure.

On remarque les deux points suivants :

- à concentration en NaCl équivalente, les films de ph-TRIMEB sont systématiquement plus perméables à l'air que ceux de ph-DIMEB,
- de plus, la perméabilité des films de ph-TRIMEB augmente en fonction de la concentration en électrolyte. Cet effet est moins net pour les films de ph-DIMEB à cause de la dispersion des valeurs expérimentales de K , qui limite la précision des mesures.

Nous allons discuter de chacune de ces tendances en supposant que la structure des films microscopiques horizontaux, dont on mesure la perméabilité, est identique à celles des films macroscopiques verticaux étudiés par réflectivité de rayons X (pour des solutions identiques).

Nous avons vu par réflectivité de rayons X que les couches d'adsorption de ph-TRIMEB étaient plus compactes que celles de ph-DIMEB dans les films noirs. Pourtant, les films de ph-TRIMEB sont systématiquement plus perméables à l'air que ceux de ph-DIMEB (tableau 2). Par conséquent, la densité des couches de cyclodextrines adsorbées n'est pas un paramètre pertinent pour comprendre la perméabilité des films. Le passage du gaz dépend plutôt de l'épaisseur du coeur d'hydratation : plus ce dernier est fin, plus les films sont perméables. Cette évolution met en évidence la singularité des films de phospholipidyl-cyclodextrines. En effet, d'après la litté-

rature, la perméabilité des films noirs dépend essentiellement de l'organisation des couches de tensioactifs adsorbées [Kru93] [Kru97]. Ainsi, les films de Newton, dont la structure est dense et ordonnée, sont nettement moins perméables que les films communs, pourtant plus épais. Krustev *et al* ont montré que le coeur aqueux des films communs n'était pas une barrière efficace au passage de l'air : expérimentalement, leur perméabilité baisse lorsque leur épaisseur diminue [Kru97].

Comment expliquer alors que les films noirs de phospholipidyl-cyclodextrines obéissent au comportement inverse? Deux éléments de réponse se profilent :

- il peut y avoir un effet de taille. On a vu que les films noirs de ph-DIMEB et de ph-TRIMEB possédaient un coeur d'hydratation très développé par rapport aux films noirs de tensioactifs « classiques ». Au-delà d'une épaisseur critique, l'effet du coeur d'hydratation des films pourrait supplanter celui des couches adsorbées au niveau de la perméabilité.
- l'organisation des molécules d'eau dans le coeur central des films peut aussi intervenir. Dans le cas des films de phospholipidyl-cyclodextrines, on pense que ces molécules sont impliquées dans l'hydratation des cyclodextrines, tandis que la structure de l'eau dans les films communs se rapproche davantage de celle de l'eau liquide. Quel impact cela peut-il avoir en terme de perméabilité?

La dépendance de la perméabilité des films de ph-DIMEB et de ph-TRIMEB en fonction de la concentration en électrolyte est cohérente avec la discussion précédente. Lorsque la concentration en électrolyte augmente, les films sont plus fins et plus perméables. Les mesures de tension de surface des solutions correspondantes réalisées entre 0,05 et 0,1 M donnent des résultats quasiment identiques (37 ± 1 mN.m⁻¹ à T=25°C). Par conséquent, on ne s'attend pas à ce que les couches adsorbées présentent des structures très différentes d'une solution à une autre. Là encore, la couche centrale d'eau des films est l'élément déterminant pour interpréter la cinétique de transfert de l'air à travers les films.

7.2.9 Conclusion

Nous avons déterminé l'architecture moléculaire d'un nouveau type de films noirs par réflectivité des rayons X. Les films de phospholipidyl-cyclodextrines ne correspondent pas aux standards des films noirs de tensioactifs de petite taille (SDS) ; la complexité de leur structure, liée à leur abondante hydratation, ne permet pas de déterminer si on a affaire à des films de Newton ou des films communs. Néanmoins, les films noirs de phospholipidyl-cyclodextrines constituent des systèmes modèles pour étudier l'hydratation des cyclodextrines. Nous avons mis en évidence qu'elle dépendait du degré de méthylation des cyclodextrines, de leur état de complexation et de la température du film (irradiation I.R.). Ces informations physico-chimiques pourront être utiles pour mieux contrôler la vectorisation de principes actifs vers des cellules cibles.

Bibliographie

- [Are00] T. AREE, H. HOIER, B. SCHULZ, G. RECK, W. SAENGER, *Novel Type of Thermostable Channel Clathrate Hydrate Formed by Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin 15 H₂O. A paradigm of the Hydrophobic Effect.*, *Angewandte Chemie. International Edition* **39**(5), 897-899 (2000).
- [Auz99] R. AUZÉLY-VELTY, B. PERLY, O. TACHÉ, T. ZEMB, P. JÉHAN, P. GUENOT, J.P. DALBIEZ, F. DJEDAÏNI-PILARD, *Cholesteryl-Cyclodextrins: Synthesis and Insertion into Phospholipid Membranes*, *Carbohydrate Research* **318**, 82-90 (1999).
- [Auz00] R. AUZÉLY-VELTY, F. DJEDAÏNI-PILARD, S. DÉSSERT, B. PERLY, T. ZEMB, *Micellization of Hydrophobically Modified Cyclodextrins. 1. Micellar Structure.*, *Langmuir* **16**, 3727-3734 (2000).
- [Auz01] R. AUZÉLY-VELTY, C. PÉAN, F. DJEDAÏNI-PILARD, T. ZEMB, B. PERLY, *Micellization of Hydrophobically Modified Cyclodextrins. 2. Inclusion of Guest Molecules.*, *Langmuir* **17**, 504-510 (2001), et les références indiquées à l'intérieur.
- [Bel91] O. BÉLORGEY, J.J. BENATTAR, *Structural Properties of Soap Black Films Investigated by X-Ray Reflectivity*, *Physical Review Letters* **66**(3), 313-316 (1991).
- [Bel92] N. BELLANGER, B. PERLY, *NMR Investigations of the Conformation of New Cyclodextrin-Based Amphiphilic Transporters for Hydrophobic Drugs: Molecular Lollipops*, *Journal of Molecular Structure* **273**, 215-226 (1992).
- [Ben04] J.J. BENATTAR, Q. SHEN, S. BRATSKAYA, V. PETKOVA, M.P. KRAFT, B. PUCCI, *Modification of Black Film Hydration by Infrared Irradiation*, *Langmuir* **20**, 1047-1050 (2004).
- [Bot84] A.A. BOTHNER-BY, R.L. STEPHENS, J. LEE, C.D. WARREN, R.W. JEANLOZ, , *Journal of the American Chemical Society* **106**, 811- (1984).
- [Exe81] D. EXEROWA, A. NIKOLOV, M. ZACHARIEVA, *Common Black and Newton Film Formation*, *Journal of Colloid and Interface Science* **81**(2), 419-429 (1981).
- [Ger95] P. GERMAIN, M. BILAL, C. DE BRAUER, *β -Cyclodextrin/Citric Acid Complexation Equilibrium: Thermodynamic Study. Apparent Solubility of β -CD in Aqueous Solutions of Citric Acid*, *Thermochimica Acta* **259**, 187-198 (1995).
- [Hof96] T. HÖFLER, G. WENZ, *Determination of Binding Energies between Cyclodextrins and Aromatic Guest Molecules by Microcalorimetry*, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* **25**, 81-84 (1996).
- [Jav02] I. JAVIERRE, M. NEDYALKOV, V. PETKOVA, J.J. BENATTAR, S. WEISSE, R. AUZÉLY-VELTY, F. DJEDAÏNI-PILARD, B. PERLY, *Direct Investigation of the Vectorization Proper-*

- ties of Amphiphilic Cyclodextrins in Phospholipid Films*, Journal of Colloid and Interface Science **254**, 120-128 (2002).
- [Jef91] G.A. JEFFREY, W. SAENGER, *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Heidelberg: Springer-Verlag, Berlin, 1991.
- [Kru93] R. KRUSTEV, D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV, *Permeability of Common Black Foam Films to Gas, Part 1*, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **79**, 129-136 (1993).
- [Kru97] R. KRUSTEV, D. PLATIKANOV, M. NEDYALKOV, *Permeability of Common Black Foam Films to Gas, Part 2*, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **123-124**, 383-390 (1997).
- [Lin98] J. LIN, C. CRÉMINON, B. PERLY, F. DJEDAÏNI-PILARD, *New Amphiphilic Derivatives of Cyclodextrins for the Purpose of Insertion in Biological Membranes: The "Cup and Ball" Molecules*, Journal of Chemical Society-Perkin Transactions **2**(12), 2639-2646 (1998).
- [Mar94] S.J. MARRINK, J.C. BERENDSEN, *Simulation of Water Transport through a Lipid Membrane*, Journal of Physical Chemistry **98**(15), 4155-4168 (1994).
- [Mou02] S. MOUTARD, B. PERLY, P. GODÉ, G. DEMAILLY, F. DJEDAÏNI-PILARD, *Novel Glycolipids Based on Cyclodextrins*, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry **44**, 317-322 (2002).
- [Mou03] S. MOUTARD, *Relation entre la Structure et les Propriétés d'Organisation de Nouvelles Cyclodextrines Amphiphiles*, Thèse de L'Université de Picardie Jules Verne (2003).
- [Mys59] K.J. MYSELS, K. SHINODA, S. FRANKEL, *Soap Films: Studies of their Thinning*, Pergamon: London, 1959.
- [Pal90] R. PALEPU, V.C. REINSBOROUGH, *β -Cyclodextrin Inclusion of Adamantan Derivatives in Solution*, Australian Journal of Chemistry **43**, 2119-2123 (1990).
- [Pal04] S.K. PAL, A.H. ZEWAİL, *Dynamics of Water in Biological Recognition*, Chemical Reviews **104**(4), 2099-2123 (2004).
- [Per04] Conversation personnelle avec B. Perly (SCM/DRECAM/CEA-Saclay).
- [Rav04] U. RAVIV, S. PERKIN, P. LAURAT, J. KLEIN, *Fluidity of Water Confined Down to Subnanometer Films*, Langmuir **20**(13), 5322-5332 (2004), et les références indiquées à l'intérieur.
- [Red90] T.E. REDELMEIER, M.J. HOPE, P.R. CULLIS, *On the Mechanism of Transbilayer Transport of Phosphatidylglycerol in Response to Transmembrane pH Gradients*, Biochemistry **29**, 3046-3053 (1990).
- [Sae85] W. SAENGER, *Nature and Size of Included Guest Molecule Determines Architecture of Crystalline Cyclodextrin Host Matrix*, Israel Journal of Chemistry **25**, 43-50 (1985).
- [Sta01] E.B. STARIKOV, K. BRÄSICKE, E.W. KNAPP, W. SAENGER, *Negative Solubility Coefficient of Methylated Cyclodextrins in Water: a Theoretical Study*, Chemical Physics Letters **336**(15), 504-510 (2001).
- [Str95] L. STRYER, *Biochemistry, Fourth Edition*, New York: W.H. Freeman and Company, 1995, p277.

- [Sul04] C. SULTANEM, S. MOUTARD, J.J. BENATTAR, F. DJEDAÏNI-PILARD, B. PERLY, *Hydration of Black Foam Films Made of Amphiphilic Cyclodextrins*, *Langmuir* **20**, 3311-3318 (2004).
- [Uek87] K. UEKAMA, T. IRIE, in *Cyclodextrin and their Industrial Uses*, D. Duchêne (ed.), Paris: Edition de Santé, 1987, p 395.
- [Wei96] M. WEICKENMEIER, G. WENZ, *Cyclodextrin Sidechain Polyesters-Synthesis and Inclusion of Adamantan Derivatives*, *Macromolecular Rapid Communications* **17**, 731-736 (1996).

Chapitre 8

Conclusion

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux films minces de protéines sous divers aspects. Nous avons cherché à mettre en évidence la spécificité de ces systèmes en les comparant systématiquement à des films minces de tensioactifs de petite taille (tels que le SDS).

- Tout d’abord, nous nous sommes posés la question de la stabilité et de la structure de ces films de protéines. Nous avons déterminé les paramètres de la solution qui permettent d’optimiser l’activité de surface des protéines et d’obtenir des films noirs stables. Nous avons également observé qu’en présence de solutions de protéines très concentrées ou d’interfaces air/solution vieilles, on obtenait des films épais et inhomogènes de type gel.
- Nous avons ensuite étudié le mûrissement d’Ostwald à l’échelle d’une bulle individuelle de protéines. Nous avons alors montré que la bulle s’entourait d’une carapace insoluble de protéines au fur et à mesure de sa décroissance. Nous avons ainsi interprété la cinétique de disparition de la bulle en fonction de la structure (dynamique) et de la rhéologie des couches de protéines adsorbées.
- Puis, nous avons voulu mesurer les interactions qui prennent part dans les films de protéines. Pour cela, nous avons proposé un nouveau dispositif expérimental, auquel il faut encore apporter des améliorations techniques pour qu’il puisse donner des résultats fiables.
- Enfin, nous avons étudié la stabilité de diverses mousses de protéines. Nous avons alors constaté qu’il était difficile d’extrapoler les propriétés des films individuels de protéines au comportement global des mousses.

A travers ces études, nous avons souligné à diverses occasions l’importance de la rhéologie des systèmes interfaciaux constitués de protéines. En effet, les protéines s’illustrent par l’intensité et la variété des interactions qu’elles développent dans les couches adsorbées. Elles forment ainsi un réseau viscoélastique insoluble dont la structure dynamique garde la mémoire des événements qu’il a subis. A l’inverse, les couches adsorbées de SDS conservent une structure plus standard et reproductible tout au long de leur existence. A un instant donné, il est donc difficile de dissocier les propriétés des systèmes interfaciaux de protéines des événements mécaniques auxquels ils ont été soumis précédemment.

En perspective, il serait intéressant d’étudier à un niveau moléculaire les réponses de la structure des films de protéines face à diverses déformations. On pourrait pour cela utiliser la technique de microscopie à force atomique. L’objectif serait de simuler la vie d’un film dans une

mousse et de suivre progressivement les changements qu'il endure.

Annexe A

Aire d'une calotte sphérique

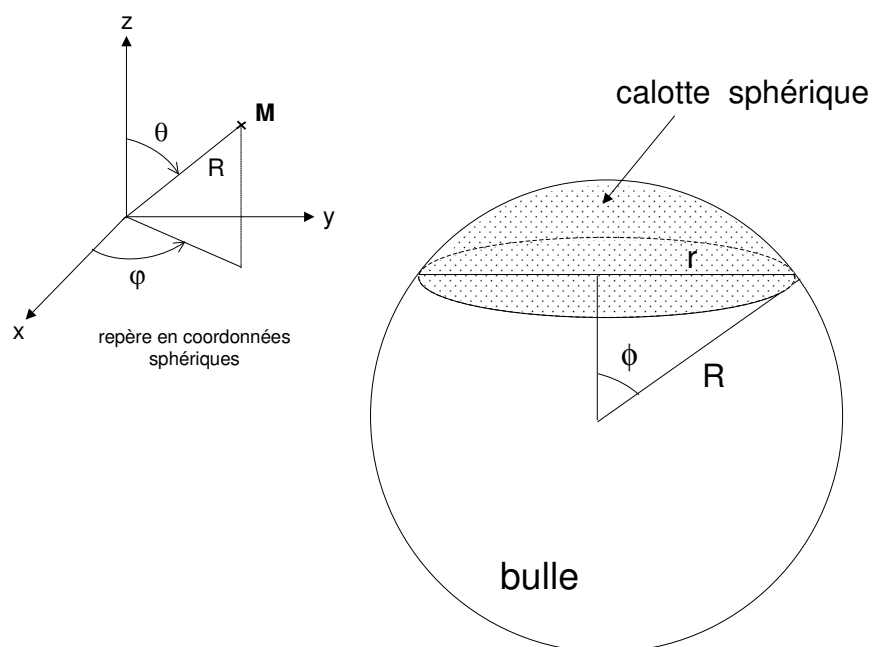


FIG. A.1 – Calotte sphérique

L'expression d'une surface élémentaire à rayon constant en coordonnées sphériques est :

$$dA = R^2 d\theta \sin \theta d\varphi \quad (\text{A.1})$$

L'aire de la calotte sphérique tronquée par la présence du film vaut donc :

$$A_{\text{calotte}} = \int_{\varphi=0}^{2\pi} \int_{\theta=0}^{\phi} R^2 d\theta \sin \theta d\varphi \quad (\text{A.2})$$

$$A_{\text{calotte}} = 2\pi R^2 [-\cos \theta]_0^{\phi} \quad (\text{A.3})$$

Soit :

$$A_{calotte} = 2\pi R^2(1 - \cos\phi) \quad \text{avec} \quad \phi = \arcsin \frac{r}{R} \quad (\text{A.4})$$

L'aire de la bulle tronquée vaut donc :

$$A_{tronq} = 4\pi R^2 - A_{calotte} \quad (\text{A.5})$$

$$A_{tronq} = 2\pi R^2(1 + \cos\phi) \quad (\text{A.6})$$

Annexe B

Description thermodynamique d'un film mince : relation entre énergie libre d'interaction du film et tension superficielle

La relation de Gibbs-Duhem est une équation fondamentale de la thermodynamique, couramment utilisée pour caractériser l'activité de chacune des espèces présentes dans le système étudié.

- Pour une phase volumique, elle s'écrit :

$$SdT - Vdp + \sum_{i=1}^n N_i d\mu_i = 0 \quad (\text{B.1})$$

où V est le volume du système et S son entropie ; μ_i et N_i représentent respectivement le potentiel chimique et le nombre de moles de l'espèce i contenue dans le système.

- Pour une phase interfaciale d'épaisseur négligeable, cette relation devient :

$$S^\sigma dT + Ad\sigma + \sum_{i=1}^n N_i^\sigma d\mu_i = 0 \quad (\text{B.2})$$

où A représente l'aire de l'interface considérée, S^σ son entropie et σ la tension de surface. C'est à partir de cette relation qu'on peut retrouver l'isotherme d'adsorption de Gibbs qui permet de relier les excès interfaciaux à l'énergie interfaciale.

- De manière analogue, pour un film mince de volume V^f , on a [DeF78] :

$$S^f dT - V^f dp^\beta + A^f d\gamma^f + \sum_{i=1}^n N_i^f d\mu_i = 0 \quad (\text{B.3})$$

où S^f , A^f et γ^f sont respectivement l'entropie, l'aire et la tension du film ; p^β est la pression de la phase atmosphérique qui entoure le film.

Dans cette relation, l'épaisseur réelle des deux parois de tensioactifs qui stabilisent le film est négligée. La quantité de molécules contenues dans la zone interfaciale air/solution est projetée sur une surface de séparation virtuelle, strictement bidimensionnelle (modèle de l'interface de Gibbs). Le corps aqueux du film, de volume V^f , est lui en équilibre avec un réservoir de solution (via des ménisques).

En supposant que le corps du film possède la même composition que la solution, on peut exprimer l'entropie surfacique du film (s^f) de la manière suivante :

$$s^f = \frac{S^f}{A^f} = hs^\epsilon + 2s^\delta = hs^\alpha + 2s^\delta \quad (\text{B.4})$$

où les exposants ϵ , δ et α se réfèrent respectivement au corps du film, à ses deux parois et au réservoir de solution.

De même, le nombre de moles de l'espèce i par unité de surface du film (n_i^f) s'écrit :

$$n_i^f = \frac{N_i^f}{A^f} = hn_i^\epsilon + 2\Gamma_i^\delta = hn_i^\alpha + 2\Gamma_i^\delta \quad (\text{B.5})$$

où Γ_i^δ est l'excès de surface du composant i au niveau des parois du film.

En divisant (B.3) par A^f , puis en remplaçant n_i^f et s^f par leur expression, l'équation de Gibbs-Duheim du film devient :

$$(hs^\alpha + 2s^\delta)dT - hdp^\beta + d\gamma^f + \sum_{i=1}^n (hn_i^\alpha + 2\Gamma_i^\delta)d\mu_i = 0 \quad (\text{B.6})$$

D'autre part, l'équation de Gibbs-Duheim de la solution, qui s'applique également au corps du film, s'écrit :

$$s^\alpha dT - dp^\alpha + \sum_{i=1}^n n_i^\alpha d\mu_i = 0 \quad (\text{B.7})$$

En soustrayant le produit $h \times$ (B.7) à l'équation (B.6), il vient :

$$d\gamma = -2s^\delta dT + hd(p^\beta - p^\alpha) - \sum_{i=1}^n 2\Gamma_i^\delta d\mu_i \quad (\text{B.8})$$

Par définition, $(p^\beta - p^\alpha)$ correspond à Π , la pression de disjonction du film [Der78].

D'autre part, la tension globale du film γ peut s'exprimer en fonction de la tension de chacune des deux parois du film (σ^f) de la manière suivante :

$$\gamma = 2\sigma^f + \Pi h \quad (\text{B.9})$$

L'équation (B.8) devient alors :

$$2d\sigma^f = -2s^\delta dT - \Pi dh - \sum_{i=1}^n 2\Gamma_i^\delta d\mu_i \quad (\text{B.10})$$

Par conséquent,

$$2\left(\frac{\partial\sigma^f}{\partial h}\right)_{T,\mu_i} = -\Pi \quad (\text{B.11})$$

C'est la définition thermodynamique de la pression de disjonction.

En intégrant (B.11) sur l'intervalle $[h;\infty]$ à T et μ_i constants, on a :

$$2(\sigma^f - \sigma) = - \int_{\infty}^h \Pi dh \quad (\text{B.12})$$

où σ est la tension de surface de la solution (*cf.* $\Pi=0$ quand $h=\infty$). Or, l'énergie libre d'interaction du film $\Delta F(h)$ ¹ est définie ainsi :

$$\Delta F(h) \equiv - \int_{\infty}^h \Pi dh \quad (\text{B.13})$$

Soit :

$$\Delta F(h) = 2(\sigma^f - \sigma) \quad (\text{B.14})$$

Ou encore, d'après (B.9) :

$$\gamma = 2\sigma + \Delta F(h) + \Pi h \quad (\text{B.15})$$

$\Delta F(h)$ est donc la contribution des forces d'interaction (qui agissent entre les parois du film) à la tension du film.

1. par unité de surface

Bibliographie

- [DeF78] J. A. DE FEIJTER, J. B. RIJNBOUT, A. VRIJ, *Contact Angles in Thin Liquid Films, I. Thermodynamic Description*, Journal of Colloid and Interface Science **64**(2), 258-268 (1978).
- [Der78] B.V. DERJAGUIN, N. V. CHURAEV, *On the Question of Determining the Concept of Disjoining Pressure and its Role in the Equilibrium and Flow of Thin Films*, Journal of Colloid and Interface Science **66**(3), 389-398 (1978).

Annexe C

Angle de contact d'une bulle légèrement déformée par la gravité

Dimitrov a proposé une expression de l'angle de contact d'un film formé en haut d'une bulle à la surface de la solution [Dim77]. Il est parti pour cela de l'équation de Laplace :

$$\Delta p = \sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (\text{C.1})$$

σ représente la tension de surface de la bulle et Δp la pression capillaire. R_1 et R_2 sont les deux rayons qui caractérisent la courbure de la surface en un point M. Ils correspondent aux rayons de courbure du profil de la bulle dans deux plans orthogonaux qui se coupent selon \vec{N} , le vecteur normal à la surface en M (Figure C.1).

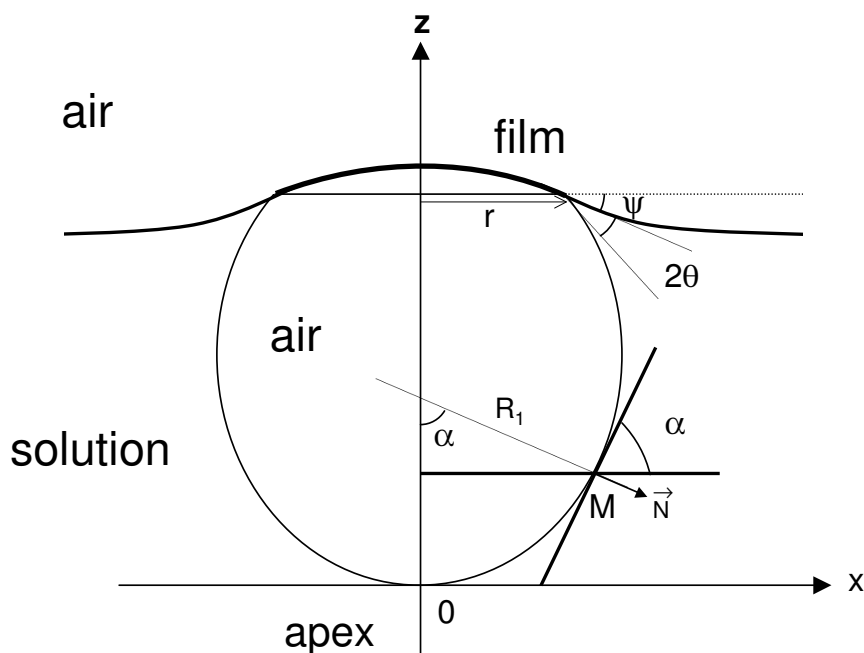


FIG. C.1 – Schéma d'une bulle déformée par la gravité à la surface de la solution

Si s est la coordonnée curviligne qui suit le profil de la bulle dans le plan méridien, i.e., le plan de la feuille, on peut écrire :

$$R_1 = \frac{ds}{d\alpha} \quad \text{et} \quad R_2 = \frac{x}{\sin \alpha} \quad (\text{C.2})$$

D'autre part :

$$\Delta p = p_{int} - (p_0 + \rho g(2R - z)) \quad (\text{C.3})$$

où p_{int} est la pression dans la bulle, p_0 la pression atmosphérique et ρ la masse volumique de la solution. Dans cette expression, on fait l'approximation que la bulle est quasiment sphérique et de rayon R . On suppose alors que la distance qui sépare la surface de la solution de l'apex de la bulle est égale à $2R$. On écrit également que la différence $p_{int} - p_0$, qui correspond à l'excès de pression dans la bulle près de la surface de la solution, vaut :

$$p_{int} - p_0 = \frac{2\sigma}{R} \quad (\text{C.4})$$

En remplaçant R_1 , R_2 et Δp par leur expression dans (C.1), il vient :

$$\frac{2\sigma}{R} - \rho g 2R + \rho g z = \sigma \left(\frac{d\alpha}{ds} + \frac{\sin \alpha}{x} \right) \quad (\text{C.5})$$

En posant :

$$\kappa = \frac{g\rho}{\sigma} \quad (\text{C.6})$$

Il vient :

$$\frac{2}{R} - \kappa 2R + \kappa z = \frac{d\alpha}{ds} + \frac{\sin \alpha}{x} \quad (\text{C.7})$$

Or :

$$\frac{d\alpha}{ds} = \frac{d\alpha}{dx} \frac{dx}{ds} = \frac{d\alpha}{dx} \cos \alpha \quad (\text{C.8})$$

Soit, en reprenant (C.7) :

$$\frac{2}{R} - \kappa 2R + \kappa z = \frac{1}{x} \frac{d}{dx} (x \sin \alpha) \quad (\text{C.9})$$

En intégrant l'expression sur l'intervalle $[0; r]$, on obtient :

$$\frac{r^2}{R} - \kappa R r^2 + \kappa \int_0^r z x \, dx = r \sin(2\theta + \psi) \quad (\text{C.10})$$

Par changement de variable, on a l'égalité suivante :

$$\int_0^r z x \, dx = \int_0^{2R} z x \, dz \quad (\text{C.11})$$

Puis, en intégrant par parties, il vient :

$$2 \int_0^{2R} z x \, dz = r^2 2R - \int_0^{2R} x^2 \, dz = r^2 2R - \frac{V}{\pi} \quad (\text{C.12})$$

où V est le volume de la portion de la bulle comprise entre l'apex et le plan de la ligne de contact (Figure C.1). On supposera ici que ce volume est égal à $\frac{4}{3}\pi R^3$, ce qui revient à négliger la partie de la bulle tronquée par la présence du film à la surface de la solution.

L'équation (C.10) devient alors :

$$r \sin(2\theta + \psi) = \frac{r^2}{R} - \kappa R r^2 + \frac{\kappa}{2}(r^2 2R - \frac{4}{3}R^3) \quad (\text{C.13})$$

Soit :

$$2\theta = \arcsin\left(\frac{r}{R} - \frac{2\kappa R^3}{3r}\right) - \psi \quad (\text{C.14})$$

Nous avons montré dans le chapitre que :

$$\psi = \arcsin\left(\frac{2\rho g R^3}{3\sigma r}\right) \quad (\text{C.15})$$

On trouve donc :

$$2\theta = \arcsin\left(\frac{r}{R} - \frac{2\rho g R^3}{3\sigma r}\right) - \arcsin\left(\frac{2\rho g R^3}{3\sigma r}\right) \quad (\text{C.16})$$

Bibliographie

[Dim77] D. DIMITROV, *Compte Rendus de L'Académie Bulgare des Sciences* **30**, 269 (1977).