HAL
open science

Diffusion de rayons X sur une membrane unique : potentiel d'interaction et effets du champ électrique

Arnaud Hemmerle

To cite this version:

Arnaud Hemmerle. Diffusion de rayons X sur une membrane unique : potentiel d'interaction et effets du champ électrique. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAE010 . tel-00993900

HAL Id: tel-00993900

https://theses.hal.science/tel-00993900v1

Submitted on 20 May 2014

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET CHIMIE-PHYSIQUE (ED182)

ICS (UPR 22)

THÈSE présentée par :

Arnaud HEMMERLE

soutenue le : **24 Septembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Physique

Diffusion de rayons X sur une membrane unique : potentiel d'interaction et effets du champ électrique

THÈSE dirigée par :

M. CHARITAT Thierry	Professeur, Université de Strasbourg
M. DAILLANT Jean	Directeur général de SOLEIL

RAPPORTEURS :

Mme SALOME Laurence	Directrice de recherches, IPBS, Toulouse
M. LACOSTE David	Chargé de recherches, ESPCI, Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. HEBRAUD Pascal	Chargé de recherches, IPCMS, Strasbourg
M. NETZ Roland	Professeur, Université libre de Berlin

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Discipline : Physique

Diffusion de rayons X sur une membrane unique : potentiel d'interaction et effets du champ électrique

Thèse de Doctorat présentée par

Arnaud Hemmerle

Le 24 Septembre 2013

Membres du Jury:

Rapporteur :	Mme. Laurence Salomé
Rapporteur :	M. David Lacoste
Examinateur interne :	M. Pascal Hébraud
Examinateur :	M. Roland Netz
Directeur de thèse :	M. Jean Daillant
Directeur de thèse :	M. Thierry Charitat

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué à l'Institut Charles Sadron entre octobre 2010 et octobre 2013. Je remercie vivement Jean-François Legrand et Jean-Michel Guenet, directeurs successifs de l'ICS, de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. J'exprime ma reconnaissance à Roland Netz de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury, à Pascal Hébraud, examinateur interne, ainsi qu'à Laurence Salomé et David Lacoste, rapporteurs, dont la lecture minutieuse de ce manuscrit a grandement contribué à en améliorer la qualité.

Durant ces trois années j'ai eu la chance d'être encadré par Thierry Charitat et Jean Daillant. Je les remercie chaleureusement pour leur travail de supervision, et pour tout ce qu'ils m'ont appris. Un grand merci à Thierry pour son encadrement au quotidien, toujours teinté de bonne humeur et de Rock & Roll (quand iTunes n'est pas en mode aléatoire). Je remercie Thierry avant tout de m'avoir transmis ses innombrables connaissances en science, pour sa rigueur dans le travail, ses conseils toujours judicieux, sa patience et sa disponibilité. Je lui suis également reconnaissant de m'avoir permis de m'impliquer dans l'encadrement des nombreux stagiaires qui sont venus nous prêter main forte, que ce soit sur la thématique des membranes ou sur des projets annexes.
Malgré son emploi du temps de ministre, Jean a toujours su se rendre disponible dès que le besoin s'en ressentait, et je l'en remercie grandement. Il m'a transmis, je l'espère, son goût du travail bien fait, son sens du détails, et sa persévérance. Je lui suis reconnaissant pour sa franchise et son analyse critique de mes résultats, nous permettant d'avancer à vitesse grand V. Je le remercie également pour sa constante sympathie, et pour nos discussions autour d'un sérieux de bière ou d'un verre de vin, parfois alsacien.
Je souhaite une bonne continuation à ce duo de choc. J'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble et faire de ce duo un trio !

Cette thèse m'a donné l'occasion de participer à différentes campagnes d'expé-

riences sur des “grands instruments”, à l’ESRF ainsi qu’à l’ILL. Je remercie Giovanna Fragneto, Jean-Sébastien Micha et François Rieutord pour leur aide précieuse lors de ces expériences. Je joins à ces remerciements Sigolène Lecuyer et Linda Malaquin, dont les (excellents) manuscrits de thèse m’ont accompagné au quotidien.

Bien sûr une thèse ne peut bien se dérouler que dans un environnement propice à la recherche, et j’exprime toute ma sympathie à l’équipe M^3 pour la gentillesse, la disponibilité et les nombreuses qualités scientifiques de ses membres. Je garderai un super souvenir de nos séances de dégustations de mets divers et variés, souvent accompagnés d’un vin nouveau ou d’une obscure boisson brésilienne. Un merci particulier à André Schröder pour l’aide en microscopie et à Patrick Kékicheff pour les conseils dans l’approche *à la* Lifshitz des interactions de van der Waals. Je remercie également Carlos Marques, toujours au fait des divers colloques et congrès, et qui m’a permis de participer à un bon nombre d’entre eux. J’en profite pour remercier tous les stagiaires de l’équipe avec qui j’ai pu travailler : Guillaume Froehlicher, Martin Lecourt, Kübra Yasaroglu, Simon Gross et Pierre Chapuis. Je leur souhaite à toutes et à tous le meilleur pour le futur, ils le méritent sincèrement.

J’ai eu la chance de pouvoir enseigner la physique pendant les trois années de ma thèse, et j’exprime mes meilleurs sentiments à toutes les personnes avec qui j’ai pu collaborer à cette occasion. Jean Farago et Fabrice Thalmann m’ont mis le pied à l’étrier en me confiant les khôlles de physique des L2 MPA. Je leur suis reconnaissant pour l’indépendance et la confiance qu’ils m’ont accordées, ce fut une expérience très formatrice. J’ai été également ravi d’enseigner aux côtés de Sébastien Harlepp, Benjamin Fuks, Guillaume Weick, et Loïc Sengele, avec qui j’ai découvert les joies et déconvenues d’enseigner à des premières années.

Un grand merci à tous mes amis de l’ICS et de l’IPCMS pour nos délires quotidiens, généralement autour d’un café au nom exotique. J’ai eu la joie de rencontrer un grand nombre de personnes en or pendant cette thèse et il serait difficile de toutes les citer ici. Mention spéciale à mes collègues du Bureau des Jeunes Chercheurs, je garderai un excellent souvenir de nos réunions et des différents évènements qu’on a organisés parfois contre vents et marée. Bien qu’il fut plus difficile de garder un lien social constant dans les derniers mois de la rédaction, aucun d’entre eux ne m’en a tenu rigueur et je les en remercie. Merci également à Andreas Weinberger et Laure Hermann, avec qui j’ai traversé au même moment les affres de la fin de thèse, et bien sûr à Martin Greenall, d’avoir partagé mon bureau pendant trois ans et de m’avoir aidé en anglais (et en français) à de nombreuses reprises. *Keep rocking dudes!*

Il y a les amis du labo, mais aussi la vieille garde, ces amis qui ont toujours été là et qui le seront sans doute pendant longtemps encore. Je les remercie pour leur

soutien sans faille et leur disponibilité inconditionnelle quand il s'agit de lever le coude. Merci à vous tous : Juju, Tutur, Cricri, Manu G., Manu S., Amina, Marsou, Anne-Cha, Max, Aurore, Pap', Marc, Cilou, Alex, Sophie, ...et bien sûr Sacha, collègue et ami depuis bien longtemps, pour tout ce qu'on a traversé de la licence à la soutenance.

Et pour finir, je remercie ma famille, qui a toujours été là et m'a apporté son soutien tout au long de mes études. Encore merci pour l'organisation au poil du pot de thèse, il reste encore plusieurs kilos de knacks au congélateur. Bien sûr, mille mercis à Camille, à mes côtés dans les moments de joies comme de doutes. Il est certain que sans elle tout ne se serait pas aussi bien passé. Merci poussin !

Table des matières

Avant-propos **1**

I Introduction **5**

1 La membrane lipidique **7**

1.1 Systèmes modèles et techniques expérimentales 7

1.1.1 La membrane cellulaire 7

1.1.2 Propriétés physiques des membranes 9

1.1.3 Vésicules 15

1.1.4 Black Lipids Membranes 18

1.1.5 Phases multilamellaires supportées 19

1.1.6 Bicouches et doubles bicouches supportées 19

2 Modélisation d'une membrane fluctuante **23**

2.1 Spectre de fluctuations et fonction de corrélation 23

2.1.1 Bicouche libre 23

2.1.2 Simple bicouche supportée 25

2.1.3 Double bicouche supportée 30

2.2 Limites du modèle de membrane d'épaisseur nulle 31

2.3 Structure d'une double bicouche supportée 33

2.3.1 Calcul de la densité électronique 33
2.3.2 Relations géométriques entre paramètres 35

II Matériels et méthodes 37

1 Diffusion de rayons X sur une membrane unique 39
1.1 Généralités sur les interactions rayons X-matière 39
1.2 Intensité diffusée par un milieu stratifié plan 40
1.2.1 Angle critique de réflexion totale 40
1.2.2 Réflectivité spéculaire 41
1.3 Effets de la rugosité : diffusion hors-spéculaire 43
1.3.1 Calcul de la section efficace de diffusion 43
1.3.2 Prise en compte de la résolution du détecteur 45
1.3.3 Intensité totale dans la direction spéculaire 47
1.4 Mesures effectuées 48
1.4.1 Dispositif expérimental 49
1.4.2 Mesure de la réflectivité spéculaire 50
1.4.3 Mesure de la diffusion hors-spéculaire 51
1.4.4 Ajustements des courbes expérimentales 55

III Etude du potentiel d'interaction entre une membrane et son environnement 56

1 Origines et expressions des potentiels d'interaction 58
1.1 Potentiels moléculaires 58
1.1.1 Forces de van der Waals 58
1.1.2 Répulsion d'hydratation 62

1.1.3 Contribution électrostatique 66
1.1.4 Pression osmotique 70
1.2 Interactions d'origine entropique 71
1.2.1 Détermination du potentiel effectif 72
1.2.2 Théorie auto-cohérente 76
1.2.3 Approche variationnelle 81

2 Mesure des potentiels d'interaction par diffusion de rayons X 83
2.1 Introduction : compressibilité des systèmes lipidiques multilamellaires 83
2.2 Propriétés intrinsèques d'une double bicouche supportée 86
2.2.1 Propriétés de la bicouche supportée 87
2.2.2 Structure des échantillons et propriétés de la bicouche flottante 88
2.3 Détermination du potentiel d'interaction 92
2.3.1 Comparaison aux théories de potentiel effectif et à la théorie auto-cohérente 92
2.3.2 Contribution électrostatique 93
2.3.3 Application d'une pression osmotique 98
2.4 Conclusion 101

IV Fluctuations d'une membrane unique sous champ électrique 102

1 Mesure des effets du champ électrique 104
1.1 Contexte et enjeux de l'étude 104
1.1.1 Principes de l'électroformation 104
1.1.2 Modélisation d'une membrane sous champ électrique 105
1.2 Diffusion de rayons X sur une membrane sous champ électrique . . . 111

1.2.1 Etat de l'art 111

1.2.2 Dispositif expérimental 113

1.2.3 Modifications structurelles 115

1.2.4 Effets sur les paramètres élastiques 121

2 Electroformation de vésicules à partir d'une bicouche supportée 133

2.1 Dispositif expérimental 133

2.2 Résultats 134

2.2.1 Conditions de déstabilisation 135

2.2.2 Cinétique de croissance 138

2.3 Conclusion et perspectives 140

V Etude préliminaire des interactions entre membranes phospholipidiques chargées 142

1 Diffusion de rayons X sur des doubles bicouches chargées 144

1.1 Contexte et enjeux de l'étude 144

1.1.1 Structures des membranes chargées 144

1.1.2 Propriétés élastiques 145

1.1.3 Interactions entre membranes chargées 146

1.2 Résultats expérimentaux 150

1.2.1 Analyse qualitative des courbes de réflectivité et de diffusion hors-spéculaire 150

1.2.2 Paramètres structuraux 153

1.2.3 Paramètres élastiques et interactions 155

2 Discussion et perspectives 157

Conclusion générale et perspectives **161**

Annexes **165**

A.1 Phospholipides utilisés 165

A.2 Méthode de préparation d'une double bicouche supportée 167

A.3 Meilleurs paramètres d'ajustements obtenus 169

A.3.1 OTS-DSPC 169

A.3.2 DSPC + NaCl 170

A.3.3 DSPC + PVP 171

A.3.4 DSPC + champ électrique 172

A.3.5 DPPS 176

A.3.6 Barres d'erreurs sur les paramètres structuraux 179

Bibliographie **180**

Liste des symboles utilisés

BLM ..... Film de lipides suspendu

DMPC ..... 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [14:0-14:0 PC]

DMPG ..... 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol [14:0-14:0 PG]

DOPC ..... 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [18:1-18:1 PC]

DPPC ..... 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [16:0-16:0 PC]

DPPS ..... 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine [16:0-16:0 PS]

DSPC ..... 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [18:0-18:0 PC]

EggPC ..... L-α-phosphatidylcholine

FRAP ..... Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment

GUV ..... Vésicule géante unilamellaire

ITO ..... Oxyde d'indium-étain

MLV ..... Vésicule multilamellaire

NBD 7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl

OTS ..... Octadecyltrichlorosilane

PE ..... Phosphoethanolamine

PVP ..... Polyvinylpyrrolidone

SDS ..... Dodécylsulfate de sodium

K_a ..... Module de compressibilité [N·m^{-1}]

T_m ..... Température de transition gel-fluide [K]

U_{AB} ..... Potentiel d'interaction exprimé par unité de surface [J·m^{-2}]

γ ..... Tension de la membrane [N·m^{-1}]

κ ..... Module de courbure [J]

κ_G ..... Module de courbure gaussien [J]

$\rho(z)$ ..... Densité électronique [$e^-/\text{Å}^3$]

σ_s ..... Rugosité du substrat [m]

σ_{th} ..... Rugosité thermique de la membrane [m]

k_B ..... Constante de Boltzmann [$J{\cdot}K^{-1}$]

n_w ..... Nombre de molécules d'eau entre les bicouches

n'_w ..... Nombre de molécules d'eau dans la région des têtes

q ..... Vecteur d'onde [m^{-1}]

θ_c ..... Angle critique de réflexion totale [rad]

$A_{L,i}$ ..... Aire par lipide de la monocouche i [m^2]

B ..... Module de compressibilité [$J{\cdot}m^{-4}$]

H ..... Constante de Hamaker "historique"[J]

Π ..... Pression osmotique [Pa]

ℓ_B ..... Longueur de Bjerrum [m]

ℓ_D ..... Longueur de Debye-Hückel [m]

ℓ_G ..... Longueur de Gouy-Chapman [m]

ϵ ..... Permittivité diélectrique relative

η ..... Paramètre de Caillé

σ ..... Rugosité totale de la membrane [m]

σ_0 ..... Densité surfacique de charge [$C{\cdot}m^{-2}$]

ε ..... Permittivité diélectrique [$F{\cdot}m^{-1}$]

$\xi_\parallel^*$ ..... Longueur de corrélation électrostatique dans le plan [m]

c_H ..... Coefficient de Helfrich

d_m ..... Epaisseur de la membrane [m]

d_w ..... Epaisseur d'eau inter-membranaire [m]

d_{head} ..... Largeur des têtes de lipides [m]

$\mathcal{H}$ ..... Constante de Hamaker effective [J]

$\mathcal{U}_{AB}$ ..... Potentiel d'interaction [J]

C_m ..... Capacité électrique de la membrane [F]

E_m ..... Champ électrique transmembranaire [V·m^{-1}]

R_m ..... Résistance électrique de la membrane [Ω]

$\Gamma_{el,DH}$, $\kappa_{el,DH}$ ..... Γ_{el} et κ_{el} dans la limite $\ell_D \to 0$

$\Gamma_{el,c}$, $\kappa_{el,c}$ .... Valeur du couple (Γ_{el}, κ_{el}) pour laquelle la membrane se déstabilise

Γ_{el} ..... Contribution du champ électrique à γ [N·m^{-1}]

η_w ..... Viscosité dynamique de l'eau [Pa·s]

κ_{el} ..... Contribution du champ électrique à κ [J]

σ_{el} ..... Contrainte électrostatique [N·m^{-2}]

τ_q ..... Temps de croissance d'un mode q, membrane déstabilisée [s]

$\tau_{q,s}$ ..... Temps de croissance d'un mode q, membrane non déstabilisée [s]

b_{fr} ..... Coefficient de friction interne entre les deux monocouches [Pa·s·m^{-1}]

q^* ..... Vecteur d'onde minimisant τ_q [m^{-1}]

q_s^* ..... Vecteur d'onde minimisant $\tau_{q,s}$ [m^{-1}]

q_c ..... Vecteur d'onde critique de déstabilisation [m^{-1}]

Ξ ..... Constante de couplage électrostatique

Avant-propos

Les bicouches lipidiques supportées sont des systèmes remarquables où une bicouche unique parfaitement localisée est accessible par d'autres molécules, par exemple des protéines, des peptides, de l'ADN ... Au-delà de leur intérêt dans le domaine des biosenseurs, l'accès qu'elles donnent à une membrane plane en font des systèmes particulièrement adaptés à des études fondamentales dans le domaine de la biophysique et de la biologie [1, 2]. En particulier, les bicouches supportées permettent de caractériser finement les interactions entre une membrane et son environnement. Ces interactions jouent non seulement un rôle dans la fusion membranaire, les échanges avec le milieu extracellulaire, l'endocytose et l'exocytose [3, 4], mais sont également fascinantes pour le physicien.

La structure et les propriétés élastiques d'une membrane unique ont beaucoup été étudiées lors de ces dernières décennies. Elles sont aujourd'hui bien connues à l'échelle micrométrique, grâce en particulier aux différents travaux menés sur des vésicules unilamellaires. L'analyse par microscopie optique des fluctuations de forme [5, 6] et les expériences de micromanipulation de vésicules [7, 8] permettent de mesurer précisément les constantes élastiques d'une bicouche. Néanmoins, ces techniques sont limitées par la résolution des microscopes et ne permettent d'accéder aux propriétés des membranes qu'à des échelles supérieures au micron.

Les expériences de diffusion de rayonnement menées sur des systèmes multilamellaires donnent accès à des informations uniques sur la structure moléculaire des membranes, ainsi que sur leurs fluctuations thermiques à des échelles submicroniques [9, 10]. Ces travaux ont permis de grandes avancées dans la compréhension des interactions entre membranes, mais les phases multilamellaires, constituées d'un grand nombre de bicouches, contiennent des défauts structuraux et ne permettent pas d'accéder aux fluctuations d'une membrane unique.

Nous nous sommes intéressés dans cette thèse à un système composé de deux bicouches supportées sur un substrat de silicium (voir la figure 1), dans la continuité des travaux de thèse de L. Malaquin et S. Lecuyer [11, 12]. La fabrication très

contrôlée de cette “double bicouche”, combinée à des expériences précises de diffusion de rayons X, nous permet d’accéder au spectre de fluctuation d’une membrane unique contenant peu de défauts, de l’échelle nanométrique à l’échelle du micron.

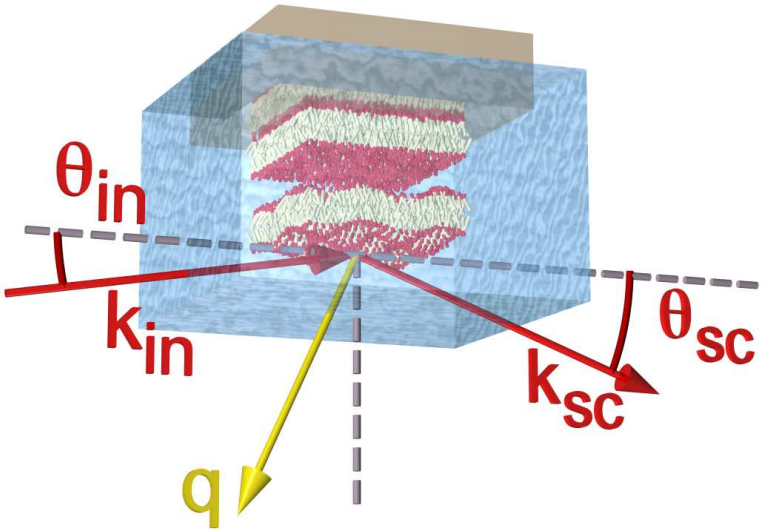


FIGURE 1 – Représentation schématique d’une expérience de diffusion de rayons X sur une double bicouche supportée.

Dans un premier temps, nous avons étudié par diffusion de rayons X les propriétés de doubles bicouches composées de lipides zwitterioniques. Nous montrons que les doubles bicouches sont plus hydratées que les phases multilamellaires et que le potentiel d’interaction inter-membranaire est plus “mou”. Nous attribuons ces différences à la répulsion électrostatique due à la faible fraction de lipides ionisés. Cette hypothèse est confirmée par des expériences réalisées à différentes longueurs de Debye-Hückel. Une analyse fine des potentiels d’interaction nous permet également de comparer nos résultats expérimentaux aux différents modèles de répulsion entropique proposés dans la littérature.

La technique de diffusion de rayons X appliquée au système modèle de double bicouche supportée permet d’étudier des situations plus complexes. Nous nous sommes intéressés aux différentes étapes de la déstabilisation d’une membrane par un champ électrique alternatif. Nous montrons notamment qu’en deçà de la limite de déstabilisation le champ induit des modifications importantes dans les paramètres élastiques de la bicouche flottante, sans modifier sa structure de façon irréversible. Nous étudions également, par microscopie de fluorescence, les étapes suivant la déstabilisation en cernant les conditions d’électroformation sur une simple bicouche supportée puis en étudiant la cinétique de croissance des vésicules obtenues.

Enfin, nous présentons les résultats de nos analyses préliminaires sur des doubles bicouches composées de lipides chargés. Des modifications de la structure échappant à nos modèles semblent apparaître à la transition gel-fluide. Nous montrons néanmoins que les bicouches chargées ont des interactions plus fortes que les bicouches neutres. Ces expériences menées sur des membranes à forte densité surfacique de charges ouvrent des perspectives intéressantes pour tester les limites de la théorie de Poisson-Boltzmann.

Première partie

Introduction

1. La membrane lipidique

1.1 Systèmes modèles et techniques expérimentales

1.1.1 La membrane cellulaire

Les cellules, unités constitutives et fonctionnelles de tout être vivant, sont délimitées par une membrane dont la structure est quasi-universelle. Cette membrane cellulaire est formée d'une bicouche phospholipidique dans laquelle évoluent diverses protéines nécessaires à son fonctionnement (voir la figure 1.1 page suivante). Sa composition hétérogène fait intervenir de nombreux types de lipides : phosphatidylcholine, sphingomyéline, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol ... ; ainsi que des molécules de cholestérols, dont la concentration a un rôle majeur dans la fluidité de la bicouche.

Les membranes sont présentes à deux niveaux dans la cellule : la membrane plasmique sépare le milieu intérieur du milieu extérieur de la cellule, tandis que les membranes intracellulaires forment les parois des organites. L'un de leurs rôles principaux est de contrôler sélectivement les échanges entre les milieux intra et extracellulaires. Citons par exemple le rôle des canaux ioniques, protéines transmembranaires régulant le potentiel électrostatique de la cellule en sélectionnant les ions pouvant franchir la membrane.

La structure adoptée par la membrane plasmique, sa composition et ses propriétés peuvent être complexes. Par exemple, les étioplastes [1] d'une plante plongée dans l'obscurité forment un réseau cubique de type diamant (voir la figure 1.2).

1. Organites liés au processus de photosynthèse.

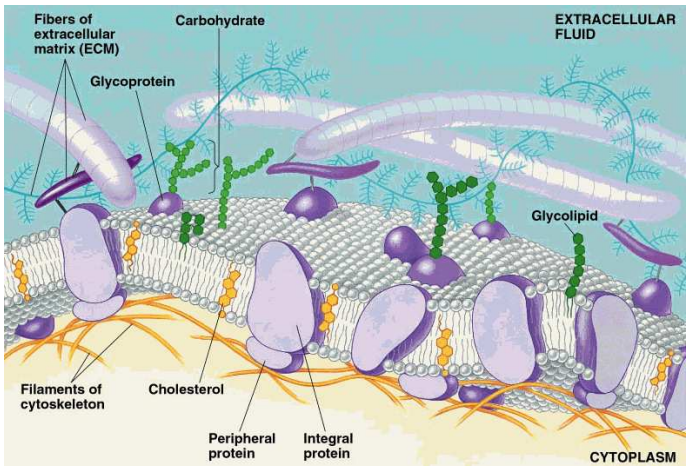


FIGURE 1.1 – Représentation schématique d'une membrane cellulaire [13].

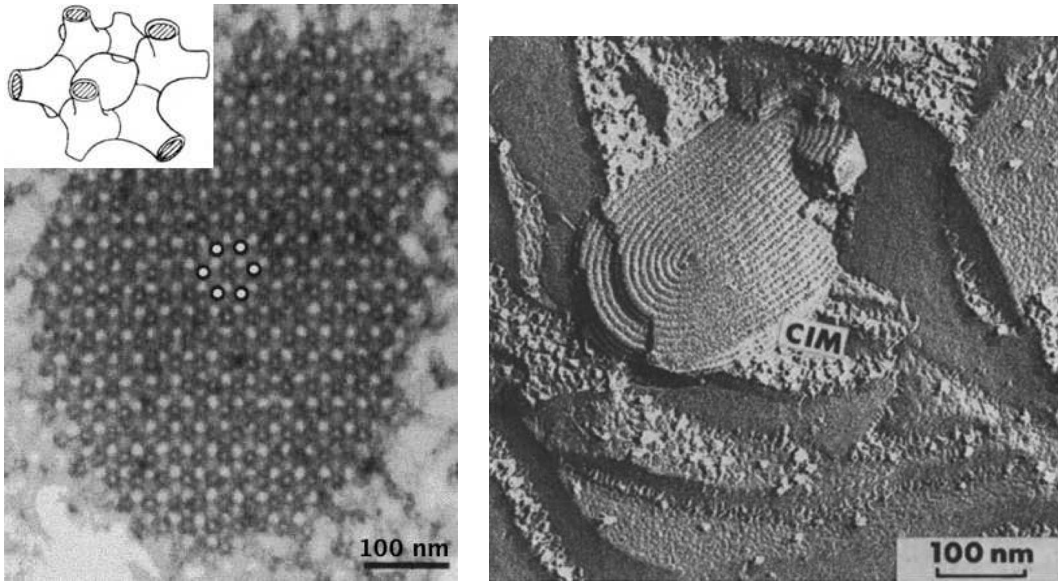


FIGURE 1.2 – A gauche : zoom sur les étioplastes d'une plantule de maïs dont une partie de la croissance s'est effectuée dans l'obscurité, observée par microscopie électronique [14]. A droite : zoom sur les chloroplastes d'une feuille de fève s'étant développée à la lumière, également observée par microscopie électronique [15].

Lorsque la plante est à nouveau éclairée ces étioplastes se différencient en chloroplastes, et forment une phase lamellaire. Le rôle éventuel de cette organisation supra-moléculaire n'est toujours pas compris.
Cette complexité des membranes cellulaires rend difficile l'étude de leurs proprié-

tés intrinsèques. L'une des approches privilégiées de la biophysique est l'utilisation de systèmes modèles permettant de caractériser indépendamment les différents constituants de la membrane et leurs interactions. Un grand nombre d'études se concentrent donc sur des systèmes simplifiés, composés de bicouches phospholipidiques de compositions très contrôlées. Intéressons nous dans un premier temps aux propriétés d'une telle bicouche, puis aux techniques expérimentales qui permettent de les étudier.

1.1.2 Propriétés physiques des membranes

La bicouche lipidique modèle est un objet intéressant du point de vue du physicien, pour qui la membrane est un "monde" en deux dimensions évoluant dans un espace à trois dimensions.

Transitions de phase La membrane lipidique est notamment un système intéressant de par la présence de transitions de phase à certaines températures caractéristiques. Les propriétés des bicouches comme leur épaisseur, fluidité, et ordre à grande distance, varient beaucoup selon la phase étudiée [16]. Décrivons les trois principales phases observées (voir la figure 1.3 page suivante) :

- à très basse température la membrane est dans une phase cristalline L_c où les lipides ont une structure périodique et une mobilité nulle,
- à plus haute température, la bicouche passe en phase gel L_β, les chaînes conservent un ordre orientationnel mais l'organisation latérale des lipides est perdue. Le coefficient de diffusion est faible mais non nul $D < 10^{-2}\,\mu\mathrm{m}^2{\cdot}\mathrm{s}^{-1}$ [17, 18], la conformation des chaînes changent et l'épaisseur de la membrane est maximale,
- au-delà de la température de transition principale T_m la bicouche est en phase fluide L_α. La mobilité des lipides augmente fortement $D \sim 1 - 10\,\mu\mathrm{m}^2{\cdot}\mathrm{s}^{-1}$ [19, 20], de même que le désordre dans les chaînes qui deviennent principalement *gauches*, diminuant l'épaisseur de la membrane. La bicouche est plus "molle", fluctue davantage et est plus facilement déformable,
- certains lipides présentent également une phase précédant la transition gel-fluide nommée phase *ripple*, caractérisée par la présence de corrugations espacées de 100 à 300 Å selon les lipides [21, 22].

La valeur des températures de transition entre les différentes phases dépend essentiellement de la nature des chaînes, comme il est possible de le constater dans le tableau A.1.1 page 166, où sont répertoriées les températures de transition gel-

fluide des lipides utilisés dans cette thèse. T_m augmente notamment avec la longueur des chaînes (il est plus difficile de désordonner des chaînes longues que des chaînes courtes) et diminue avec le nombre d'insaturation.

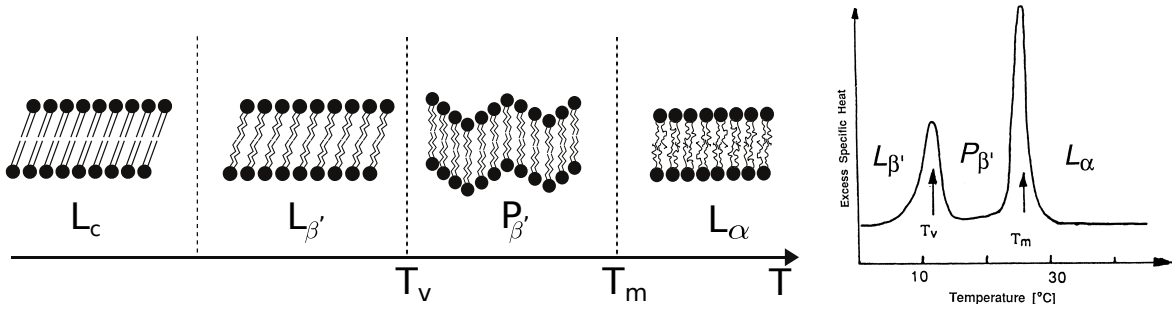


FIGURE 1.3 – A gauche : exemples de phases ordonnées d'une bicouche lipidique modèle. L_c désigne la phase cristalline, $L_{\beta'}$ la phase gel, $P_{\beta'}$ la phase *ripple* et L_α la phase fluide. A droite : mise en évidence par calorimétrie différentielle de la température de transition gel-fluide T_m et de pré-transition vers la phase *ripple* T_v pour des bicouches de DMPG [1] .

Degrés de liberté Dans une membrane, les phospholipides ont accès à un grand nombre de degrés de liberté microscopiques couplés à des mouvements collectifs impliquant un nombre de molécules plus important (voir la figure 1.4 page suivante).

Les degrés de liberté microscopiques sont variés :

- les têtes et les chaînes sont mobiles, et les changements de conformations sont rapides $\sim 10^{-12}$ s,
- les lipides peuvent aisément tourner sur eux même, en un temps caractéristique $\sim 10^{-9}$ s,
- ils ont également la possibilité de quitter le plan de la membrane sur une distance de l'ordre de l'Angström. Ce degré de liberté, nommé protrusion, est supposé fréquent dans la membrane et intervient en un temps de l'ordre de la nanoseconde [23],
- les lipides diffusent dans le plan de la membrane. Comme nous l'avons vu, en phase fluide le coefficient de diffusion est relativement élevé ($D \sim 1 - 10\,\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$), et un lipide explore la surface d'une vésicule de taille classique en environ 30 s. En phase gel le coefficient de diffusion décroît de plusieurs ordres de grandeur ($D < 10^{-2}\,\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$),
- enfin, les lipides ont la possibilité de passer d'une monocouche à l'autre lors d'un flip-flop. Ce processus étant très défavorable d'un point de vue énergétique (la tête polaire doit traverser la zone hydrophobe formée par les chaînes),

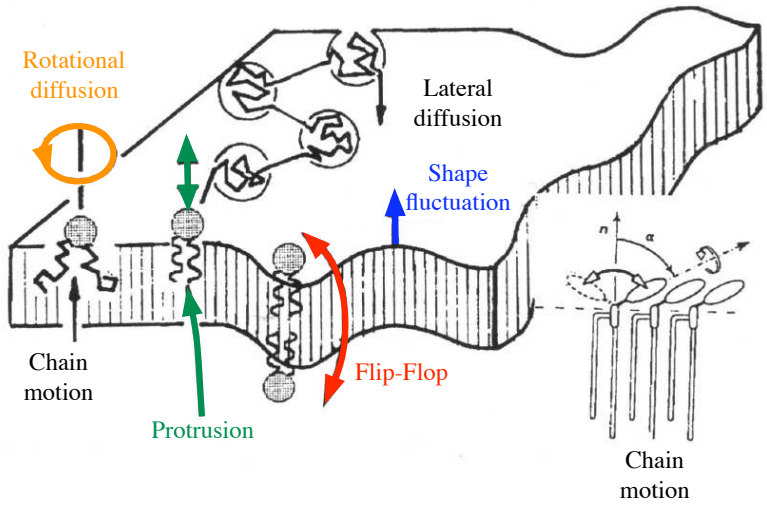


FIGURE 1.4 – Représentation schématique des différents degrés de liberté accessibles aux lipides d'une membrane. Cette dynamique moléculaire se combine aux mouvements collectifs des lipides impliqués dans les fluctuations de forme de la membrane (d'après [1]).

il serait extrêmement lent dans les membranes modèles, avec des temps caractéristiques supérieurs à l'heure [24]. La fréquence de ces flip-flop est une caractéristique essentielle de la vie d'une cellule. En présence d'une enzyme (la flippase) la probabilité pour un lipide d'effectuer un flip-flop est multipliée par $\sim 10^4$, et les deux monocouches de compositions originelles différentes s'homogénéisent rapidement. Cette perte d'asymétrie et en particulier l'apparition de phosphatidylserine (PS) sur le feuillet extérieur est notamment la première étape de l'apoptose d'une cellule [25].

Ces modes d'excitation d'ordre moléculaire sont couplés à des excitations collectives de lipides de longueurs d'onde supérieures à l'épaisseur de la bicouche. Ces fluctuations de forme se divisent en deux catégories :

- les modes d'ondulation, où les feuillets oscillent en phase (décrits dans le chapitre 2),
- les modes péristaltiques, où les feuillets fluctuent avec un décalage de phase, donnant lieu à des fluctuations d'épaisseurs de 15 à 20 % autour de la valeur moyenne, sur des longueurs de l'ordre de l'épaisseur de la membrane [4].

Elasticité des membranes Dans de nombreux systèmes étudiés l'épaisseur de la bicouche est très inférieure aux dimensions caractéristiques de l'objet qu'elle forme. Une vésicule géante a, par exemple, un diamètre pouvant atteindre plusieurs dizaines de microns, à comparer à son épaisseur d'environ 5 nanomètres. Dans ces conditions, la membrane peut être décrite par un film continu à deux dimensions [26, 27] dont les déformations élastiques se décomposent toutes en trois déformations élémentaires indépendantes : variation d'aire par élongation/compression, cisaillement pur, et courbure (voir la figure 1.5). La déformation par cisaillement n'est à prendre en compte que dans le cas de membranes cristallines. En phase fluide, la membrane n'oppose pas de résistance au cisaillement : les modes de courbures et de tension sont prédominants [28].

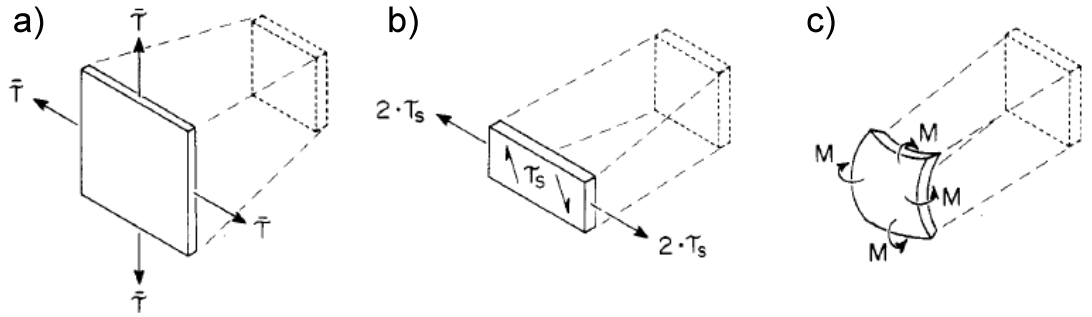


FIGURE 1.5 – Représentation schématique des trois modes de déformations élémentaires d'une membrane 2D. a) Variation d'aire par élongation/compression. b) Cisaillement pur à aire constante. c) Courbure à aire constante (adapté de [28]).

La variation d'aire par élongation[2] est limitée à de petites déformations, inférieures à $\sim 5\,\%$. Une élongation plus importante de la membrane entraine l'apparition de pores, puis sa destruction. En régime d'élasticité linéaire, l'énergie libre par unité de surface associée à une variation d'aire $\Delta A_0/A_0$ est quadratique en la déformation :

$$\mathcal{F}_{\mathrm{st}} = \frac{K_a}{2}\left(\frac{\Delta A_0}{A_0}\right)^2, \tag{1.1}$$

avec K_a le module de compressibilité dont les dimensions sont celles d'une tension de surface. Sa valeur est de l'ordre de 200 mN/m pour des vésicules géantes [8], mesurée par aspiration par micropipette. Une membrane tendue est donc généralement très peu extensible.

2. Il est expérimentalement bien plus simple d'étirer une membrane que de la comprimer.

Le terme “tendue” employé ici marque une subtilité dans la description des effets d’une variation d’aire. Nous avons considéré ci-dessus l’élongation de la surface *réelle* A_0 de la membrane, qui diffère de l’aire *apparente* A_{ap}, issue d’un “coarse-graining” de la surface observée (voir la figure 1.6).

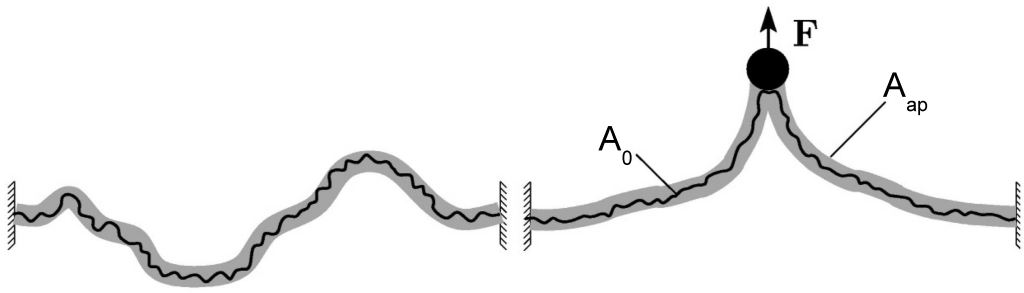


FIGURE 1.6 – Représentation schématique des différences entre l’aire réelle A_0 et l’aire apparente A_{ap}. Lorsque l’on tire sur la membrane, on accède d’abord à un régime où elle se “déplie” puis à régime de membrane tendue (adapté de [29]).

A la variation d’aire apparente est associée un nouveau paramètre élastique, la tension de surface γ, et une nouvelle expression pour l’énergie libre :

$$\mathcal{F}_{\mathrm{st}} = \frac{\gamma}{2}\left(\frac{\Delta A_{\mathrm{ap}}}{A_{\mathrm{ap}}}\right)^2 . \tag{1.2}$$

Les valeurs de γ mesurées dépendent fortement du système. Pour des vésicules géantes de SOPC étudiées par analyse de contour, γ est de l’ordre de 10^{-5}-10^{-3} mN/m [6], tandis que la tension mesurée par diffusion de rayons X sur une simple bicouche supportée peut atteindre la dizaine de mN/m, en raison des interactions avec le substrat qui “tendent” la bicouche [30]. Cette notion de tension d’une bicouche, ses origines, et les disparités qui apparaissent dans les valeurs mesurées, sont un sujet actif dans l’étude des membranes (pour une revue récente, voir la Réf. [31]).

La déformation par courbure est une autre de ces déformations élémentaires, caractérisée par ses deux courbures principales $C_1 = 1/R_1$ et $C_2 = 1/R_2$ où R_1 et R_2 sont les rayons de courbure (voir la figure 1.7 page suivante). Deux invariants émergent de l’analyse géométrique de la courbure d’une surface : la courbure moyenne $C_m = C_1 + C_2$, et la courbure de Gauss $C_G = C_1C_2$, qui permet de classer les déformations locales en trois catégories : elliptique, parabolique et hyperbolique. Le théorème de Gauss-Bonnet permet de montrer que la courbure gaussienne est directement liée à la topologie de la surface : $\int_S dSC_1C_2 = 4\pi(1-g)$, où g est le

genre topologique de la surface, par exemple $g = 0$ pour une sphère et $g = 1$ pour un tore.

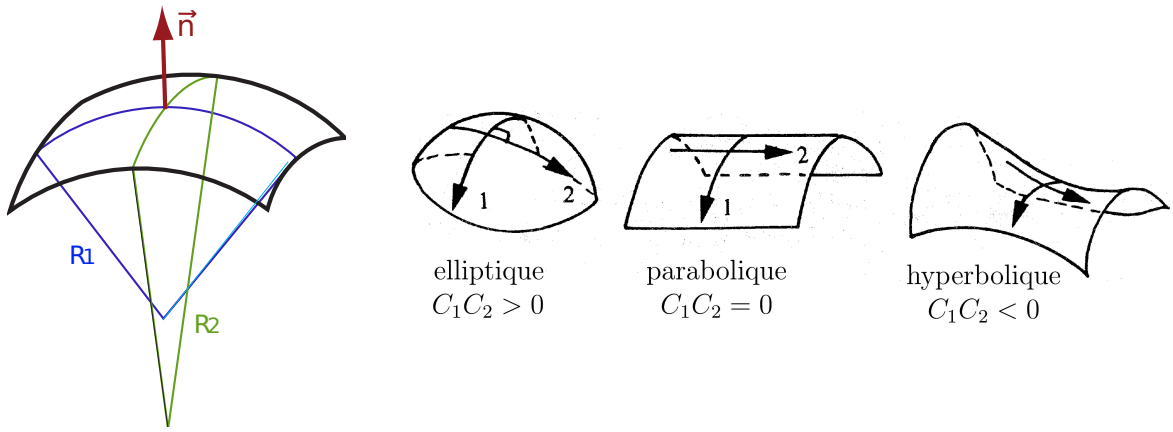


FIGURE 1.7 – A gauche : définition des rayons de courbure principaux. A droite : les trois types de topologies locales caractérisées par le signe de leur courbure gaussienne [32].

En appelant C_0 la courbure spontanée de la bicouche, l'énergie libre par unité de surface associée à la courbure d'une membrane s'écrit :

$$\frac{d\mathcal{F}_{\text{be}}}{dS} = \frac{\kappa}{2}\left(C_m - C_0\right)^2 + \kappa_G C_G, \tag{1.3}$$

et fait intervenir deux nouveaux paramètres élastiques κ et κ_G, qui ont tout deux les dimensions d'une énergie, généralement donnée en unités de $\mathrm{k_B T}$.

κ désigne le module de rigidité de courbure moyenne, et permet de quantifier l'énergie nécessaire pour courber une membrane. En phase fluide κ est de l'ordre de la dizaine de $\mathrm{k_B T}$ pour les phospholipides (voir le tableau 2.1 page 32) et supérieur à $100\,\mathrm{k_B T}$ en phase gel [33, 34].

κ_G quant à lui dicte la topologie du système. En effet, en intégrant l'expression 1.3 sur la surface totale, on obtient grâce au théorème de Gauss-Bonnet :

$$\mathcal{F}_{\text{be}} = \iint_S \frac{\kappa}{2}\left(C_m - C_0\right)^2 dS + 4\pi\kappa_G(1-g). \tag{1.4}$$

Lorsque $\kappa_G < 0$, l'énergie libre est minimisée pour $g = 0$, et des fluctuations de grandes amplitudes peuvent déstabiliser le système en formant des vésicules. Si $\kappa_G > 0$, il sera au contraire plus favorable de maximiser g en formant, par exemple,

une phase éponge (voir la figure 1.8).

Dans des systèmes de type bicouches supportées à l'équilibre, les fluctuations thermiques sont trop faibles pour induire un changement de topologie. Le terme $4\pi\kappa_G(1-g)$ reste constant, et ne sera donc pas considéré par la suite. De plus, ces systèmes symétriques ne présentent pas de courbure spontanée et $C_0 = 0$.

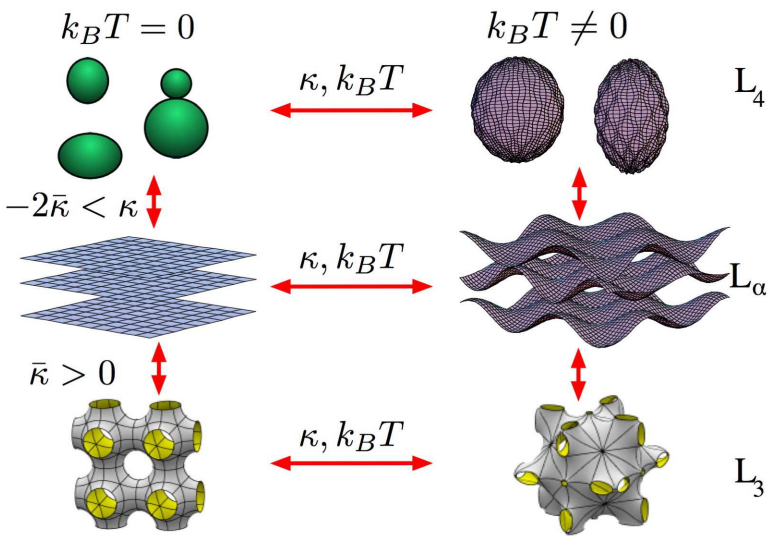


FIGURE 1.8 – Diagramme de phase schématique pour un système lamellaire. A gauche : structures à température nulle. A droite : structures équivalentes à température non nulle (d'après [35]).

L'étude fine des propriétés physiques des membranes présentées ici nécessitent des expériences précises sur des systèmes modèles, dont nous allons donner quelques exemples.

1.1.3 Vésicules

Les vésicules (ou liposomes) sont formées d'une paroi constituée soit d'une seule bicouche, auquel cas elles sont qualifiées d'unilamellaires, soit d'une multitude de bicouches et présentent alors une structure multilamellaire en "oignon", nommée MLV pour *multilamellar vesicles* (voir la figure 1.9 page suivante). Lorsqu'elles sont unilamellaires, les vésicules sont classées par tailles :

– les SUVs (*small unilamellar vesicle*) ont une taille comprise entre 40 et 100 nm,

– les LUVs (*large unilamellar vesicle*) sont de tailles plus importantes, comprises entre 100 et 500 nm,
– et les GUVs (*giant unilamellar vesicle*) dont la taille est supérieure à 500 nm et généralement inférieure à 100 μm.

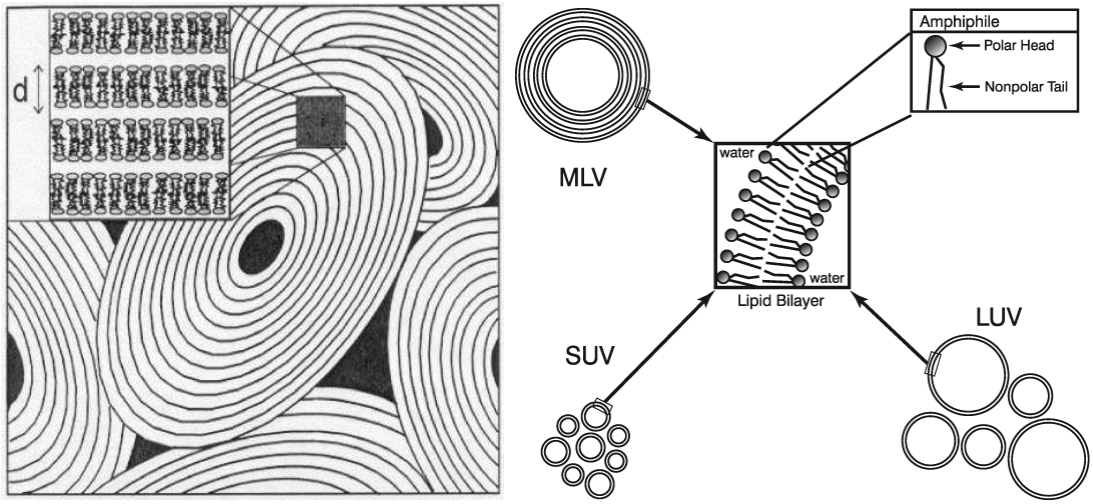


FIGURE 1.9 – A gauche : représentation schématique d'une vésicule multilamellaire en solution aqueuse (zones noires) [36]. A droite : description de différents types de vésicules [37].

Une des méthodes utilisées pour préparer des vésicules en solution consiste à hydrater un dépôt de lipides (voir la figure 1.10 page ci-contre). Des vésicules multilamellaires de différentes tailles et de différentes épaisseurs se forment alors spontanément. Diverses techniques existent ensuite pour obtenir des vésicules unilamellaires à partir de ces solutions, citons par exemple la sonication des MLVs permettant d'"éplucher" leur paroi, et qui donne essentiellement des SUVs.
Cette méthode de formation spontanée à partir d'un film de lipides est simple mais peu contrôlée : les vésicules formées ont une grande polydispersité de tailles, sont multilamellaires, et présentent souvent des défauts structuraux. D'autres techniques ont ainsi été développées pour palier à ces limitations comme l'électroformation, dont les principes sont détaillés dans la partie IV.

Les GUVs sont particulièrement adaptées à l'étude des propriétés d'une membrane unique. Leur grande taille permet leur observation directe par les différentes techniques de microscopie optique (fluorescence, RICM, confocale, contraste de phase), ainsi que leur manipulation à l'aide d'une micropipette (voir la figure 1.11 page suivante). Les progrès à la fois théoriques et expérimentaux sur les GUVs ont

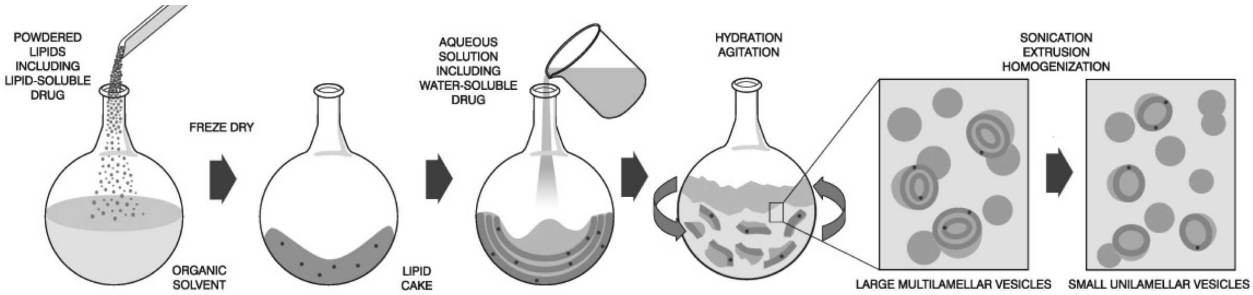


FIGURE 1.10 – Méthode classique de préparation d'une solution de vésicules multilamellaires. Diverses techniques comme la sonication, l'extrusion ou l'homogénéisation permettent ensuite d'obtenir des vésicules unilamellaires (d'après [38]).

permis de grandes avancées de la physique des membranes (pour une revue, voir la Réf. [1]). Il est possible d'utiliser des GUVs pour étudier entre autres l'élasticité des bicouches, leurs transitions de phases [39], les interactions entre différents types de lipides [40], les effets d'un champ électrique [41], etc ....

Les liposomes n'ont pas qu'un intérêt en recherche fondamentale et intéressent également les industries cosmétiques et pharmaceutiques, de part la possibilité d'y encapsuler des principes actifs. En incorporant dans leur paroi des longues chaînes de polyéthylène glycol, inertes dans le corps humain, les liposomes deviennent "furtifs" et sont protégés contre leur destruction par les cellules du système immunitaire. Ils ont ainsi une durée de vie suffisante pour délivrer le médicament qu'ils contiennent directement à l'endroit visé, par exemple une tumeur.

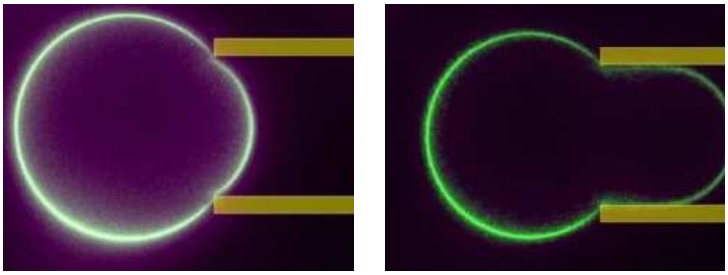


FIGURE 1.11 – Mesure d'excès d'aire par aspiration d'une vésicule unilamellaire par micropipette, observée en microscopie de fluorescence (issu de [42]).

De nombreuses études sur les propriétés des membranes, et plus particulièrement leurs interactions avec leur environnement, ont été menées sur des phases multilamellaires de phospholipides dans des solutions de MLVs. Les expériences de diffusion de rayons X sur ces phases multilamellaires ont permis des avancées majeures dans

la compréhension de la structure des bicouches phospholipidiques, et ce pour de nombreux types de lipides [43, 44]. Néanmoins, la faible orientation de ces “poudres” limite l’utilisation de la diffusion de rayons X pour étudier les fluctuations thermiques des membranes.

1.1.4 Black Lipids Membranes

Les films de lipides suspendus (BLM pour *Black Lipids Membranes*) sont des bicouches formées sur des substrats, généralement en Teflon, dans lesquels une ouverture d’un diamètre de l’ordre de la centaine de microns a été faite (voir la figure 1.12). Les BLMs ont l’avantage de permettre l’étude d’une bicouche plane, localisée, et d’extension très contrôlée, séparant deux milieux distincts.
Les propriétés électriques d’une bicouche étant très sensibles à sa structure et sa composition, les mesures de conductivités sur une BLM nous renseignent sur l’électrophysiologie des membranes, notamment sur ses capacités d’électrostriction [45], ainsi que sur les possibilités d’incorporation de protéines [46].

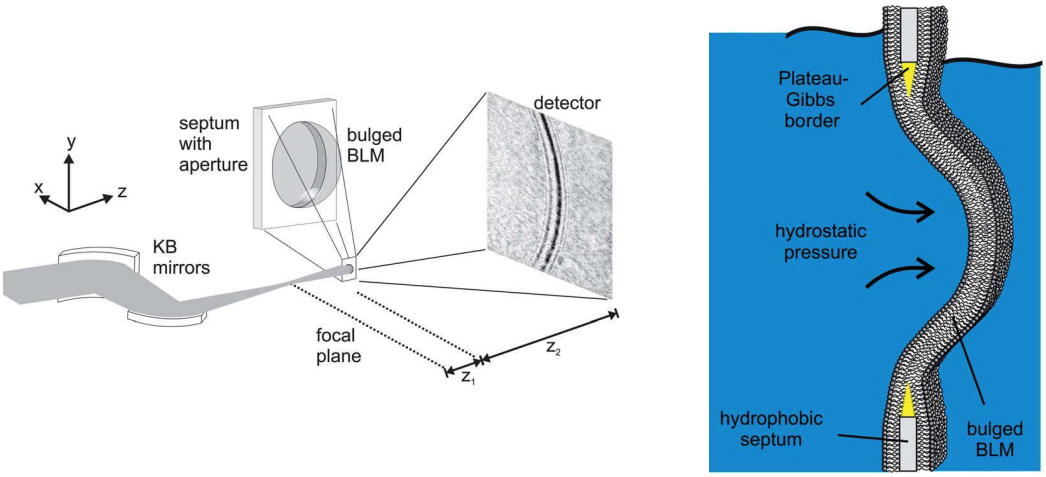


FIGURE 1.12 – Schéma d’une expérience d’imagerie par rayons X (*X-Ray propagation imaging*) sur un film de lipides suspendu (BLM) auquel est appliqué une pression hydrostatique (adapté de [47]).

De grands progrès ont été fait récemment dans le maintien de la stabilité des BLMs, et il est à présent possible d’étudier par différentes techniques d’imagerie de rayons X des films de lipides séparant des solutions différentes (en pH, en force ionique, ...) élargissant le champ des propriétés membranaires accessibles par ce système modèle [47]. Néanmoins, l’extension spatiale du film de lipide, dictée par la

taille de l'ouverture formée dans le substrat, ne permet pas l'étude des fluctuations thermiques sur une grande gamme de longueurs d'onde.

1.1.5 Phases multilamellaires supportées

Depuis le début des années 2000, la structure et les interactions entre bicouches sont essentiellement étudiées sur des membranes supportées sur un substrat solide. Ces échantillons, stables, ne présentent pas de grandes difficultés dans leur préparation. Une solution de lipides dissous dans un solvant organique est déposée sur un substrat (wafer de silicium, feuillet de mica, lame de verre, ...). Après évaporation du solvant et hydratation des lipides par saturation de l'atmosphère en vapeur d'eau, on observe un film de 50 à 1000 bicouches orientées. Plus récemment, Salditt et al. [48] ont montré qu'il était possible d'obtenir un nombre contrôlé de bicouches supportées fortement orientées par spin coating (voir la figure 1.13). Les expériences de diffusion de rayons X sur ces systèmes sont décrites dans la partie II.

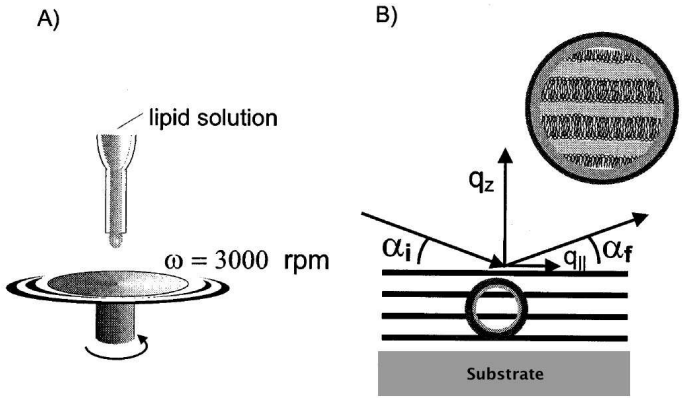


FIGURE 1.13 – a) Schéma illustrant la technique de déposition par spin coating. b) Schéma d'une expérience de diffusion de rayons X sur une phase multilamellaire supportée déposée par spin coating (adapté de [49]).

1.1.6 Bicouches et doubles bicouches supportées

Les simples bicouches supportées, déposées sur substrat solide par la méthode dite de Langmuir-Blodgett (voir la figure 1.14 page suivante), permettent d'utiliser la technique expérimentale de diffusion de rayons X pour accéder aux propriétés physiques d'une bicouche unique, plane, et totalement hydratée. La bicouche, fortement

liée au substrat par interaction de van der Waals, fluctue très peu. Cette proximité avec le substrat ($\sim 1\,\mathrm{nm}$) affecte également fortement les propriétés élastiques des membranes [34, 50].
Les simples bicouches supportées ont permis des avancées importantes dans l'étude des membranes phospholipidiques du point de vue de la physique fondamentale, mais également dans le domaine des biotechnologies en tant que biosenseur ou en permettant la fonctionnalisation de surfaces solides (pour une revue, voir la Ref. [51]).

Afin d'éloigner la bicouche étudiée du substrat et d'accéder au spectre de fluctuation d'une membrane unique, libre, pour des échelles allant du nanomètre au micron, deux types de systèmes seront utilisés dans cette thèse (voir la figure 1.15 page suivante) :

- les doubles bicouches supportées OTS/lipides [52, 53], où un film d'octadecyltrichlorosilane (OTS) hydrophobe est greffé de manière covalente au substrat, suivi de deux monocouches de lipides déposées par la technique de Langmuir-Blodgett, et une monocouche finale déposée par la technique de Langmuir-Schaefer décrite en annexe A.2,
- les "vraies" doubles bicouches supportées [54], formées de trois monocouches déposées par la technique de Langmuir-Blodgett et d'une quatrième monocouche par la technique de Langmuir-Schaefer.

Une troisième méthode que nous n'utiliserons pas ici consiste à introduire un "coussin" de polymères entre le substrat et une bicouche simple [55]. Dans ces trois cas la première bicouche ou le coussin de polymère servent essentiellement d'espaceur permettant d'éloigner la bicouche "flottante" du substrat. Les doubles bicouches OTS/lipides sont moins fragiles que les vraies doubles bicouches, mais ces dernières ont l'avantage de n'être composées que de lipides et d'être plus symétriques.

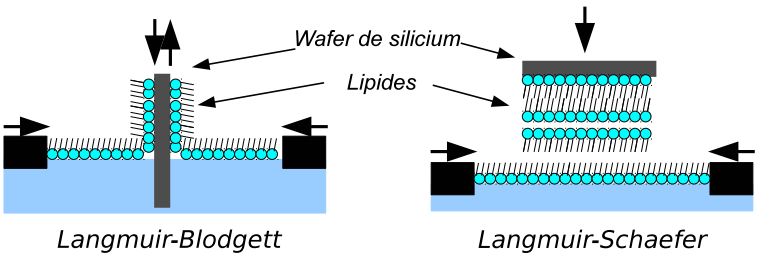


FIGURE 1.14 – Représentation schématique de la fabrication d'une double bicouche supportée par déposition de Langmuir-Blodgett et de Langmuir-Schaefer.

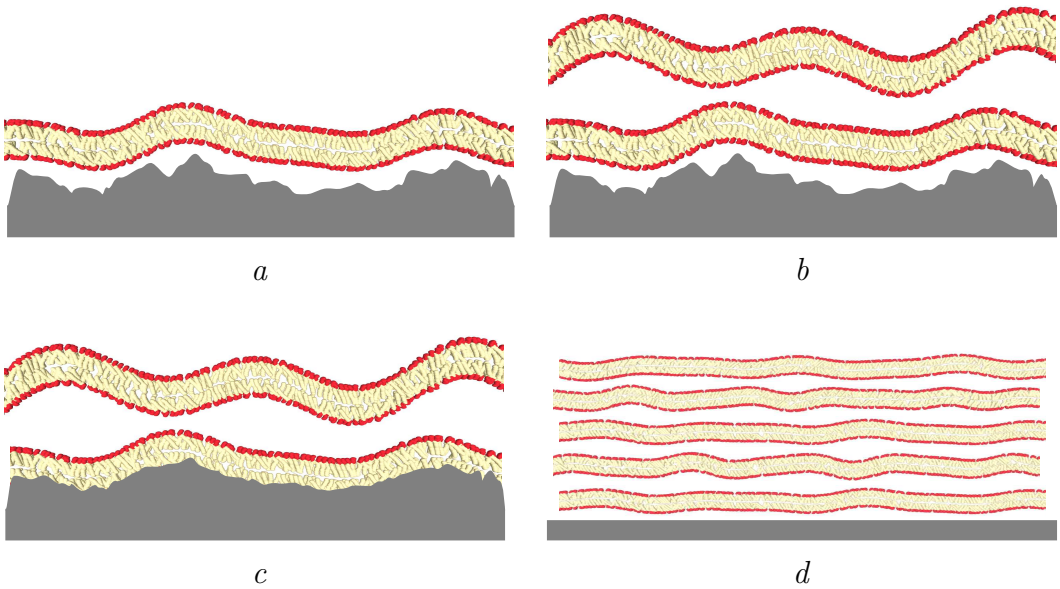


FIGURE 1.15 – a) Simple bicouche supportée déposée par la technique de Langmuir-Blodgett. b) Double bicouche supportée déposée par une combinaison des techniques de Langmuir-Blodgett et Langmuir-Schaefer détaillées dans l'annexe A.2 . c) Double bicouche supportée mixte OTS/lipides où la première monocouche d'OTS est greffée au substrat. La rugosité du substrat est volontairement exagérée sur ces figures. d) Phase multilamellaire supportée.

Comme nous le verrons par la suite, les doubles bicouches supportées sont particulièrement adaptées à l'étude des propriétés intrinsèques d'une membrane et des interactions intermembranaires par diffusion de rayons X.
Des travaux récents menés par F. Harb et al. sur des doubles bicouches supportées étudiées par FRAPP (recouvrement de fluorescence après photoblanchiment) montrent également leur potentiel en tant que système modèle d'une bicouche proche des conditions physiologiques.
Ils parviennent notamment à mesurer précisément le coefficient de diffusion de protéines insérées dans des membranes [56] ainsi qu'à étudier les effets de la force ionique sur la dynamique des bicouches [57]. Citons également leurs expériences de séparation de protéines membranaires par électrophorèse, illustrées sur la figure 1.16 [58].

Le point clé dans ces expériences est qu'elles mènent à des résultats différents lorsqu'elles sont effectuées sur de simples bicouches supportées : la proximité du substrat modifie entre autre la dynamique et la structure des protéines incluses, menant éventuellement à leur dénaturation [55]. En particulier, la mobilité électrophorétique est nulle dans une membrane supportée mais ne l'est pas dans la membrane flottante d'une double bicouche supportée.
De même, l'élasticité de la membrane et la mobilité des lipides diffèrent dans ces deux systèmes, le coefficient de diffusion ainsi que la température de transition principale sont, par exemple, affectés par la présence du substrat [17, 57]

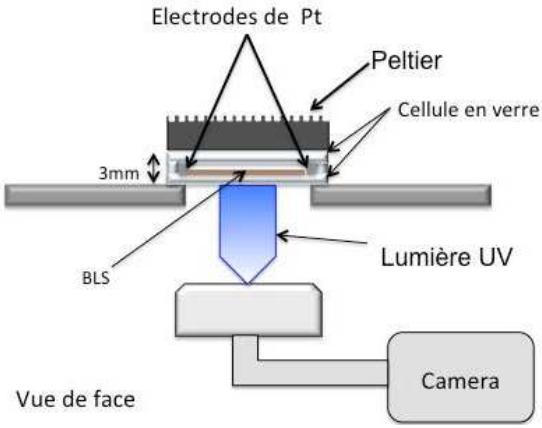


FIGURE 1.16 – Représentation schématique d'une expérience d'électrophorèse sur une double bicouche supportée, notée BLS ici (adapté de [58]).

2. Modélisation d'une membrane fluctuante

Les membranes phospholipidiques sont des objets "mous" qui fluctuent sous l'effet de l'agitation thermique. Nous nous intéresserons dans ce chapitre aux fonctions de corrélation des hauteurs directement liées à la dynamique des membranes et nécessaires pour le calcul des sections efficaces de diffusion, puis à la description de la structure des échantillons, et finalement aux relations liant les différents paramètres structuraux.

2.1 Spectre de fluctuations et fonction de corrélation

2.1.1 Bicouche libre

Considérons une membrane quasi-plane, continue, infiniment fine, dans la limite des faibles fluctuations. La représentation de Monge permet de décrire cette interface par rapport à un plan de référence auquel est associée un repère cartésien $\mathcal{R} = (O; \mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z})$. Un point de la membrane a alors pour coordonnées $\left(\mathbf{r}_\parallel = (x, y), h(\mathbf{r}_\parallel)\right)$ (voir la figure 2.1 page suivante). Par souci de simplification, nous omettrons le symbole $\parallel$ par la suite et $h(\mathbf{r}_\parallel)$ sera noté h, sauf en cas de possible ambiguïté.

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, l'énergie libre d'une membrane infiniment fine est la somme d'une énergie "de tension" et d'une énergie de "courbure". Dans l'approximation de Monge $|\nabla h|^2 \ll 1$, l'énergie libre totale de la membrane, dite de Canham-Helfrich [26, 27], s'écrit :

$$\mathcal{F}[h] = \frac{1}{2} \iint d^2\mathbf{r} \left(\gamma \left(\nabla h\right)^2 + \kappa \left(\Delta h\right)^2 \right). \tag{2.1}$$

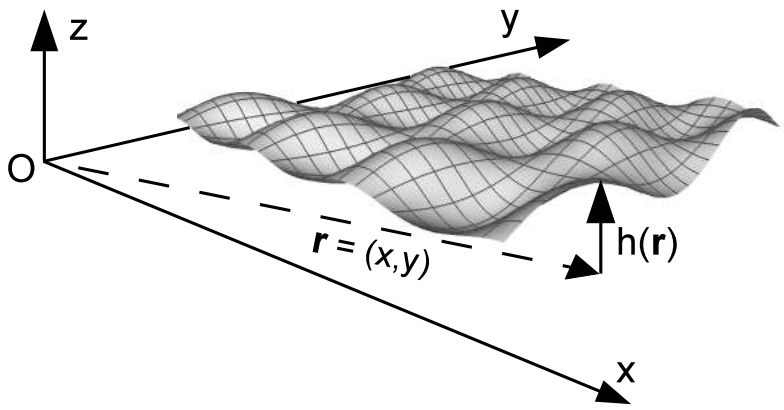


FIGURE 2.1 – Paramétrisation de la surface d'une membrane dans la représentation de Monge.

En introduisant la série de Fourier $h(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{q}} \tilde{h}(\mathbf{q}) e^{i\mathbf{q}.\mathbf{r}}$, nous obtenons l'expression des modes découplés de l'énergie de Canham-Helfrich :

$$\mathcal{F}(\mathbf{q}) = \frac{1}{2}\left(\gamma q^2 + \kappa q^4\right)\left|\tilde{h}(\mathbf{q})\right|^2. \tag{2.2}$$

D'après le théorème d'équipartition de l'énergie, chaque degré de liberté contribue pour $k_B T/2$ à l'énergie totale. Nous obtenons donc directement le spectre de fluctuation de la membrane :

$$\left\langle |h(\mathbf{q})|^2 \right\rangle = \frac{k_B T}{\gamma q^2 + \kappa q^4}. \tag{2.3}$$

Cette expression montre notamment qu'il existe deux régimes de fluctuations : les fluctuations de grandes longueurs d'onde $\left(q < \sqrt{\gamma/\kappa}\right)$ sont dominées par la tension de la membrane, tandis que les fluctuations de petites longueurs d'onde $\left(q > \sqrt{\gamma/\kappa}\right)$ sont dominées par la rigidité de courbure.

Longueur de persistance L'équation 2.3 indique également comment la membrane est froissée aux différentes échelles. La théorie du groupe de renormalisation, appliquée à ce système, permet de calculer la renormalisation du module de courbure (à tension de surface nulle) [59, 60] :

$$\kappa_{\text{eff}}(\xi) = \kappa\left(1 - \frac{3k_B T}{4\pi\kappa}\ln\frac{\xi}{a}\right), \tag{2.4}$$

où a est une longueur de coupure microscopique, typiquement de l'ordre de la longueur d'un lipide. κ_{eff} dépend de l'échelle d'observation ξ et fait apparaître naturellement la longueur de persistance de la bicouche ξ_K, également nommée longueur de "de Gennes-Taupin" :

$$\xi_K = a \exp\left[\frac{4\pi\kappa}{3k_B T}\right]. \tag{2.5}$$

Donnons quelques ordre de grandeurs de ξ_K :

- pour $\kappa \sim 10\,\mathrm{k_B T}$, caractéristique d'une bicouche en phase fluide, $\xi_K \sim 10^{10}\,\mathrm{m}$, et la membrane reste quasi-plane à toute les échelles.
- pour $\kappa \sim \mathrm{k_B T}$, $\xi_K \sim \mu\mathrm{m}$. On peut alors observer des fluctuations importantes de la membrane de l'ordre du μm. Ces fluctuations apparaissent par exemple sur des vésicules géantes dont le module de courbure a été abaissé par l'ajout d'une fraction de lipides bipolaires [61].
- les micro-émulsions présentent des valeurs de $\kappa < \mathrm{k_B T}$, les fluctuations sont alors très importantes et les gouttelettes ont une taille caractéristique de l'ordre de ξ_K.

Pour des échelles d'observation inférieures à cette longueur, la membrane apparaît comme tendue et fluctue très peu, permettant l'utilisation de l'approximation de Monge. A des échelles supérieures, $\kappa_{\text{eff}} \to 0$ et les fluctuations deviennent très importantes. La membrane exécute alors une marche aléatoire à trois dimensions et notre approximation de membrane quasi-plane n'est plus valable.

2.1.2 Simple bicouche supportée

Fluctuations thermiques Comme nous le verrons plus loin, les membranes interagissent de différentes façons avec leur environnement extérieur (substrat ou autre membrane) : interaction de van der Waals, électrostatique, répulsion d'hydratation, etc ...Considérons une membrane située à une distance h_1 d'un substrat plan, de tension γ_1 et de module de courbure κ_1. Les interactions sont prises en compte en ajoutant un potentiel d'interaction (par unité de surface) $U_{1,s}(h_1)$ à l'énergie libre :

$$\mathcal{F}[h_1] = \iint d^2\mathbf{r}\frac{1}{2}\left(\gamma_1\left(\nabla h_1\right)^2 + \kappa_1\left(\Delta h_1\right)^2\right) + U_{1,s}(h_1). \tag{2.6}$$

Afin de poursuivre le calcul analytique, nous faisons une approximation quadratique du potentiel autour de sa valeur à l'équilibre[1] : $U_{1,s}(h_1) \simeq U''_{1,s}\delta h_1^2/2$, où $\delta h_1 \equiv$

1. Cette approximation n'est valable que dans le cadre des faible fluctuations, loin de la transition de décollement.

$h_1 - h_{1,eq}$ est la position de la membrane par rapport à sa position à température nulle. Le spectre des fluctuations thermiques s'écrit alors :

$$\left\langle \left|\tilde{\delta h}_1(\mathbf{q})\right|^2 \right\rangle_{th} = \frac{k_B T}{U''_{1,s} + \gamma_1 q^2 + \kappa_1 q^4}. \tag{2.7}$$

Si $\Delta = \gamma_1^2 - 4U''_{1,s}\kappa_1 > 0$, trois régimes de fluctuations sont à distinguer : les fluctuations de grandes longueurs d'onde sont dominées par le potentiel d'interaction pour $q < \sqrt{U''_{1,s}/\gamma_1}$, à plus grands vecteurs d'onde les fluctuations sont dominées par la tension, suivi d'un régime de courbure pour $q > (\gamma_1/\kappa_1)^{1/4}$ (voir la figure 2.2). Pour $\Delta < 0$ la membrane passe directement du régime dominé par le potentiel où la membrane suit le substrat, au régime de courbure contrôlé par la rigidité.

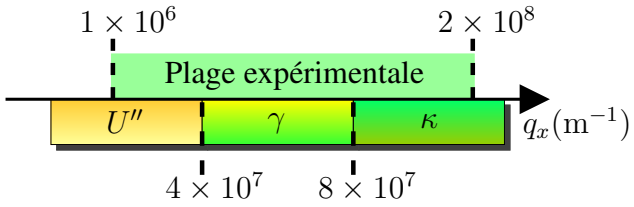


FIGURE 2.2 – Domaine de prédominance indicatif des paramètres élastiques et plage de vecteurs d'onde q_x accessibles lors de nos expériences de diffusion de rayons X, dans le cas où $\Delta > 0$.

L'amplitude *rms* des fluctuations thermiques $\sigma_{1,th}$ est obtenue en intégrant le spectre de fluctuation :

$$\sigma_{1,th}^2 = \int d\mathbf{q} \left\langle \left|\tilde{\delta h}_1(\mathbf{q})\right|^2 \right\rangle_{th} \tag{2.8}$$

$$= \frac{k_B T}{2\pi\sqrt{\Delta}} \log \frac{q_2}{q_1}, \tag{2.9}$$

avec $q_1^2 = \dfrac{-\gamma_1 - \sqrt{\Delta}}{2\kappa_1}$ et $q_2^2 = \dfrac{-\gamma_1 + \sqrt{\Delta}}{2\kappa_1}$. Un calcul d'ordre de grandeur pour une bicouche flottante, effectué à partir des données expérimentales obtenues dans la partie III, donne $\sigma_{th} < 1\,\mathrm{nm}$. La diffusion de rayons X aux petits angles permet d'étudier ces fluctuations thermiques, relativement faibles, et d'en déduire les valeurs de U'', κ et γ.

La transformée de Fourier inverse de l'équation 2.7 nous permet d'obtenir la fonction de corrélation des hauteurs issue des fluctuations thermiques [30] :

$$\langle \delta h_1(0) \delta h_1(r) \rangle_{th} = \frac{k_B T}{2\pi\sqrt{\Delta}} \left[K_0(q_1 r) - K_0(q_2 r) \right], \tag{2.10}$$

où K_0 désigne la fonction de Bessel modifiée du second ordre K_n pour $n = 0$. $\langle \delta h_1(0)\delta h_1(r)\rangle_{th}$ est tracée pour différentes valeurs des paramètres élastiques sur la figure 2.3.

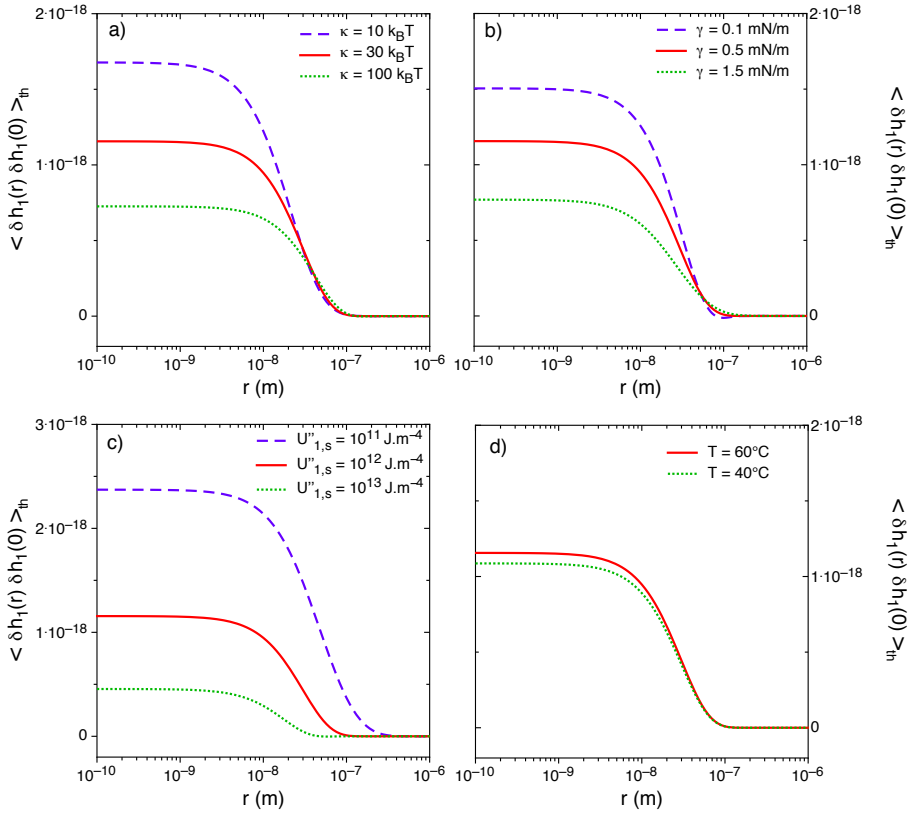


FIGURE 2.3 – Fonctions d'auto-corrélation thermiques d'une simple bicouche supportée $\langle \delta h_1(r)\delta h_1(0)\rangle_{th}$ exprimées en m^2 pour $\kappa_1 = 30\,k_BT$, $\gamma_1 = 0.5\,mN/m$, $U''_{1,s} = 10^{12}\,J{\cdot}m^{-4}$ et $T = 60\,°C$. La bicouche fluctue d'autant plus que κ_1 et γ_1 sont petits (figures *a* et *b*). Le potentiel d'interaction $U''_{1,s}$ intervient à la fois dans l'amplitude des fluctuations et dans la portée des corrélations (figure *c*). Les variations de température semblent avoir peu d'importance (figure *d*), mais rappelons que les valeurs intrinsèques des paramètres élastiques dépendent également de la température.

Prise en compte de la rugosité du substrat Le substrat de silicium utilisé n'est jamais parfaitement plan. Même après polissage (effectué par la société SESO) sa rugosité déterminée par AFM est de l'ordre de quelques Angströms. La surface du substrat est décrite par une approche statistique, et nous choisissons de modéliser la

fonction de corrélation des hauteurs par une fonction auto-affine de la forme [62] :

$$\langle \delta h_s(0)\delta h_s(r)\rangle = \sigma_s^2 \exp\left[-\left(\frac{r}{\xi_s}\right)^{2H_s}\right], \tag{2.11}$$

avec σ_s la rugosité *rms* du substrat et $0 < H_s < 1$ un exposant qui décrit la forme de la fonction de corrélation. ξ_s est une longueur de coupure : pour des distances plus petites que ξ_s la rugosité est de l'ordre de σ_s tandis qu'à plus grande échelle le substrat paraît lisse. δh_s représente ici la hauteur du substrat par rapport à sa hauteur moyenne.
Pour calculer la fonction de corrélation statique de la membrane, nous avons besoin de l'expression de la fonction 2.11 dans l'espace réciproque. Elle a pour transformée de Fourier approchée :

$$\left\langle \left|\tilde{\delta h}_s(\mathbf{q})\right|^2 \right\rangle = 2\pi \frac{\sigma_s^2 \xi_s^2}{\left(1+\frac{q^2\xi_s^2}{2H_s}\right)^{1+H_s}}. \tag{2.12}$$

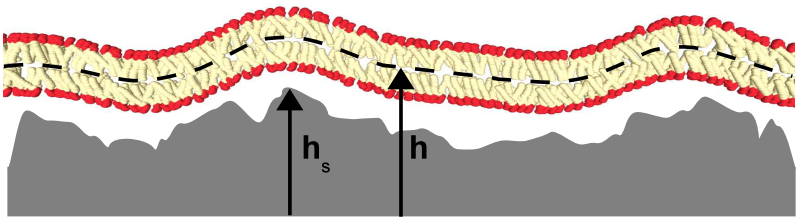


FIGURE 2.4 – A température nulle, une membrane molle suit la rugosité de grande longueur d'onde du substrat.

La membrane tente de s'adapter à cette rugosité en se déformant sous l'action du potentiel d'interaction (voir la figure 2.4). Cette déformation a un coût énergétique : plus la rigidité de la membrane est importante, moins elle suivra la rugosité du substrat. Les corrélations entre la forme statique de la membrane et la rugosité du substrat ont été traitées en détail par Swain et Andelman [63, 64].

Calculons dans un premier temps la transformée de Fourier de l'énergie libre 2.6 pour un mode $\mathbf{q}$:

$$\tilde{\mathcal{F}}(\mathbf{q}) = \frac{1}{2}\left(U''_{1,s} + \gamma_1 q^2 + \kappa_1 q^4\right)|\tilde{\delta h}_1(\mathbf{q})|^2 - U''_{1,s}\tilde{\delta h}_1(\mathbf{q})\tilde{\delta h}_s(-\mathbf{q}). \tag{2.13}$$

Cette expression est minimisée pour :

$$\tilde{\delta h}_1(\mathbf{q}) = \frac{U''_{1,s}}{U''_{1,s} + \gamma_1 q^2 + \kappa_1 q^4}\tilde{\delta h}_s(\mathbf{q}) \equiv \tilde{\delta h}_{1,\mathrm{stat}}(\mathbf{q}). \tag{2.14}$$

On observe bien que si les valeurs de γ_1 ou κ_1 sont faibles, $\tilde{\delta h}_{1,\text{stat}}(\mathbf{q}) \sim \tilde{\delta h}_s(\mathbf{q})$ et la membrane suit le substrat. A l'inverse si la membrane est rigide, $\tilde{\delta h}_{1,\text{stat}}(\mathbf{q}) \to 0$ et la membrane reste tendue.

L'équation 2.14 nous permet d'écrire les fonctions de corrélation statiques :

$$\begin{aligned}
\left\langle \left|\tilde{\delta h}_{1,\text{stat}}(\mathbf{q})\right|^2 \right\rangle =& \frac{{U''_{1,s}}^2}{\left(U''_{1,s} + \gamma_1 q^2 + \kappa_1 q^4\right)^2} \langle |\tilde{\delta h}_s(\mathbf{q})|^2 \rangle \\
\left\langle \tilde{\delta h}_{1,\text{stat}}(\mathbf{q}) \tilde{\delta h}_s(-\mathbf{q}) \right\rangle =& \frac{U''_{1,s}}{U''_{1,s} + \gamma_1 q^2 + \kappa_1 q^4} \langle |\tilde{\delta h}_s(\mathbf{q})|^2 \rangle.
\end{aligned} \tag{2.15}$$

Les fonctions de corrélation dans l'espace réel sont plus complexes que dans le cas des fluctuations thermiques. Les transformées de Fourier des expressions 2.15 peuvent être exprimées comme des produits de convolution :

$$\begin{aligned}
\langle \delta h_1(0) \delta h_1(r) \rangle_{\text{stat}} =& f(r) * \langle \delta h_s(0) \delta h_s(r) \rangle \\
\langle \delta h_1(0) \delta h_s(r) \rangle_{\text{stat}} =& g(r) * \langle \delta h_s(0) \delta h_s(r) \rangle .
\end{aligned} \tag{2.16}$$

$f(r)$ et $g(r)$ décrivent comment les fonctions d'autocorrélation et de corrélation croisée de la membrane sont liées à la fonction de corrélation des hauteurs du substrat :

$$\begin{aligned}
f(r) =& \mathrm{TF}^{-1} \left[\frac{{\mathrm{U}''_{1,\mathrm{s}}}^2}{\left(\mathrm{U}''_{1,\mathrm{s}} + \gamma_1 \mathrm{q}^2 + \kappa_1 \mathrm{q}^4\right)^2} \right] \\
g(r) =& \mathrm{TF}^{-1} \left[\frac{\mathrm{U}''_{1,\mathrm{s}}}{\mathrm{U}''_{1,\mathrm{s}} + \gamma_1 \mathrm{q}^2 + \kappa_1 \mathrm{q}^4} \right].
\end{aligned} \tag{2.17}$$

Une décomposition en éléments simples permet d'obtenir leurs expressions finales :

$$\begin{aligned}
f(r) =& \frac{1}{2\pi} \frac{{U''_{1,s}}^2}{\kappa_1^2} \left[\lambda \left(K_0 \left(q_1 r \right) - K_0 \left(q_2 r \right) \right) + \frac{\eta^2 r}{2} \left(\frac{K_1 \left(q_1 r \right)}{q_1} + \frac{K_1 \left(q_2 r \right)}{q_2} \right) \right] \\
g(r) =& \frac{1}{2\pi} \frac{U''_{1,s}}{\kappa_1} \eta \left[K_0 \left(q_1 r \right) - K_0 \left(q_2 r \right) \right],
\end{aligned} \tag{2.18}$$

avec :

$$\begin{cases}
\lambda = \dfrac{2}{\left(q_1^2 - q_2^2\right)^3} \\
\eta = -\dfrac{1}{q_1^2 - q_2^2}.
\end{cases} \tag{2.19}$$

Enfin, nous faisons l'hypothèse qu'il n'y a pas de corrélations entre les fluctuations thermiques et la rugosité statique de la membrane, de telle sorte que :

$$\begin{aligned}\langle[\delta h_{1,th}(\mathbf{r})+\delta h_{1,\text{stat}}(\mathbf{r})]\,[\delta h_{1,th}(\mathbf{0})+\delta h_{1,\text{stat}}(\mathbf{0})]\rangle &= \langle\delta h_{1,th}(\mathbf{r})\delta h_{1,th}(\mathbf{0})\rangle+\langle\delta h_{1,\text{stat}}(\mathbf{r})\delta h_{1,\text{stat}}(\mathbf{0})\rangle\\ \langle[\delta h_{1,th}(\mathbf{r})+\delta h_{1,\text{stat}}(\mathbf{r})]\,\delta h_s(\mathbf{0})\rangle &= \langle\delta h_{1,\text{stat}}(\mathbf{r})\delta h_s(\mathbf{0})\rangle\,. \end{aligned} \tag{2.20}$$

2.1.3 Double bicouche supportée

Les fonctions de corrélation statiques et thermiques des membranes d'un système de double bicouche supportée se calculent de la même manière que précédemment. Aux interactions membranes-substrat $U''_{1,s}$ et $U''_{2,s}$ s'ajoutent à présent un potentiel d'interaction inter-membranaire $U''_{1,2}$, et l'énergie libre du système s'écrit :

$$\begin{aligned}\tilde{\mathcal{F}}(\mathbf{q}) =&\frac{1}{2}\sum_{i=1}^{2}\left(a_i(\mathbf{q})+U''_{1,2}\right)|\tilde{\delta h}_i(\mathbf{q})|^2-U''_{1,2}\tilde{\delta h}_1(\mathbf{q})\tilde{\delta h}_2(-\mathbf{q})\\ &-U''_{2,s}\tilde{\delta h}_2(\mathbf{q})\tilde{\delta h}_s(-\mathbf{q})-U''_{1,s}\tilde{\delta h}_1(\mathbf{q})\tilde{\delta h}_s(-\mathbf{q}),\end{aligned} \tag{2.21}$$

où $a_i(\mathbf{q}) = U''_{i,s}+\gamma_i q^2+\kappa_i q^4$.

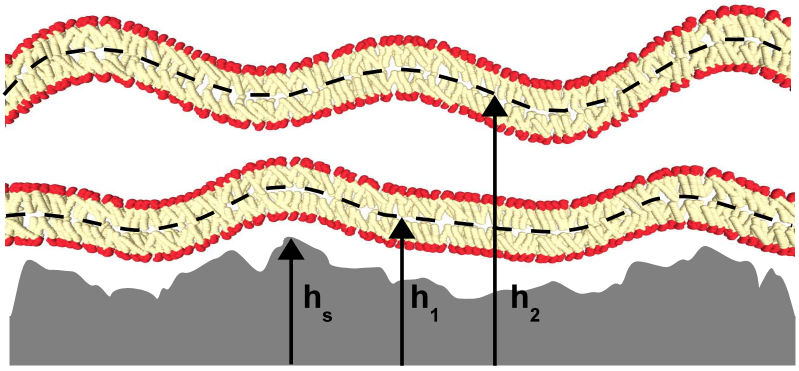


FIGURE 2.5 – Paramétrisation d'un système de double bicouche supportée sur substrat rugueux.

La partie de l'énergie libre liée aux fluctuations thermiques devient :

$$\begin{aligned}\tilde{\mathcal{F}}_{th}(\mathbf{q}) =&\frac{1}{2}\sum_{i=1}^{2}\left(a_i(\mathbf{q})+U''_{1,2}\right)|\tilde{\delta h}_{i,th}(\mathbf{q})|^2-U''_{1,2}\tilde{\delta h}_{1,th}(\mathbf{q})\tilde{\delta h}_{2,th}(-\mathbf{q})\\ =&\frac{1}{2}\begin{pmatrix}\tilde{\delta h}_{1,th}(-\mathbf{q}) & \tilde{\delta h}_{2,th}(-\mathbf{q})\end{pmatrix}\begin{pmatrix}a_1(\mathbf{q})+U''_{1,2} & -U''_{1,2}\\ -U''_{1,2} & a_2(\mathbf{q})+U''_{1,2}\end{pmatrix}\begin{pmatrix}\tilde{\delta h}_{1,th}(\mathbf{q})\\ \tilde{\delta h}_{2,th}(\mathbf{q})\end{pmatrix}\end{aligned} \tag{2.22}$$

Le potentiel d'interaction inter-membranaire couple les modes de fluctuations thermiques des deux membranes. Les fonctions de corrélation thermiques s'obtiennent après diagonalisation de la matrice et application du théorème d'équipartition de l'énergie :

$$\begin{aligned}
\left\langle |\tilde{\delta h}_{1,th}(\mathbf{q})|^2 \right\rangle =& k_B T \frac{a_2(\mathbf{q}) + U''_{1,2}}{a_1(\mathbf{q})a_2(\mathbf{q}) + U''_{1,2}\left(a_1(\mathbf{q}) + a_2(\mathbf{q})\right)} \\
\left\langle |\tilde{\delta h}_{2,th}(\mathbf{q})|^2 \right\rangle =& k_B T \frac{a_1(\mathbf{q}) + U''_{1,2}}{a_1(\mathbf{q})a_2(\mathbf{q}) + U''_{1,2}\left(a_1(\mathbf{q}) + a_2(\mathbf{q})\right)} \\
\left\langle \tilde{\delta h}_{1,th}(\mathbf{q})\tilde{\delta h}_{2,th}(-\mathbf{q}) \right\rangle =& k_B T \frac{U''_{1,2}}{a_1(\mathbf{q})a_2(\mathbf{q}) + U''_{1,2}\left(a_1(\mathbf{q}) + a_2(\mathbf{q})\right)}.
\end{aligned} \tag{2.23}$$

Leurs expressions dans l'espace réel sont également des combinaisons linéaires des fonctions de Bessel K_0 et K_1, explicitées dans les Réf. [11, 34].

A nouveau les fonctions de corrélation statiques s'obtiennent par minimisation de l'énergie libre par rapport à $\tilde{\delta h}_1(\mathbf{q})$ et $\tilde{\delta h}_2(\mathbf{q})$, et nous obtenons :

$$\begin{aligned}
\tilde{\delta h}_{1,\mathrm{stat}}(\mathbf{q}) =& \frac{U''_{1,s}a_2(\mathbf{q}) + U''_{1,2}\left(U''_{1,s} + U''_{2,s}\right)}{a_1(\mathbf{q})a_2(\mathbf{q}) + U''_{1,2}\left(a_1(\mathbf{q}) + a_2(\mathbf{q})\right)}\tilde{\delta h}_s(\mathbf{q}) \\
\tilde{\delta h}_{2,\mathrm{stat}}(\mathbf{q}) =& \frac{U''_{2,s}a_1(\mathbf{q}) + U''_{1,2}\left(U''_{1,s} + U''_{2,s}\right)}{a_1(\mathbf{q})a_2(\mathbf{q}) + U''_{1,2}\left(a_1(\mathbf{q}) + a_2(\mathbf{q})\right)}\tilde{\delta h}_s(\mathbf{q}).
\end{aligned} \tag{2.24}$$

Ce sont à présent 5 fonctions de corrélation qu'il faut calculer :
- les fonctions d'autocorrélation de chaque membrane $\langle \delta h_1(0)\delta h_1(r)\rangle_{\mathrm{stat}}$ et $\langle \delta h_2(0)\delta h_2(r)\rangle_{\mathrm{stat}}$,
- les fonctions de corrélation croisée membranes-substrat $\langle \delta h_1(0)\delta h_s(r)\rangle_{\mathrm{stat}}$ et $\langle \delta h_2(0)\delta h_s(r)\rangle_{\mathrm{stat}}$,
- et la fonction de corrélation croisée membrane-membrane $\langle \delta h_1(0)\delta h_2(r)\rangle_{\mathrm{stat}}$.

Les transformées de Fourier se résolvent également par décomposition en éléments simples, et s'expriment sous forme de combinaisons linéaires de K_0 et K_1.

2.2 Limites du modèle de membrane d'épaisseur nulle

Il existe de nombreuses techniques expérimentales permettant d'accéder aux valeurs des paramètres élastiques d'une membrane phospholipidique (voir la section 1.1.2). Le tableau 2.1 page suivante est extrait d'un recensement partiel de J.F. Nagle des différentes valeurs de κ qu'il est possible de trouver dans la littérature

[65]. On remarque que pour un même type de lipide, les valeurs mesurées peuvent varier du simple au double.
Une différence d'un facteur deux dans κ peut être d'une importance cruciale, surtout lorsque l'on considère des processus activés thermiquement dont les fréquences d'apparition dépendent exponentiellement de l'énergie d'activation. Un processus fréquent pour $\kappa = 20\,\mathrm{k_B T}$ aura une fréquence d'apparition plus faible d'une dizaine d'ordre de grandeur pour $\kappa = 40\,\mathrm{k_B T}$.

	Rayons X phase lamellaire	Micro manipulation GUV	Analyse de formes GUV
DOPC	18.2 ± 2.7	19.1 ± 2.2	26.5 ± 2.7
	15.1 ±1.6	23 ±2.2	17-24 ± 2
SOPC	21.1 ± 1.6	20.2 ± 1.3	30.4 ± 1.7
		30 ± 1.6	29.4 ± 6.1
		36.9 ± 1.2	37.9 ± 0.8
DMPC	15.8 ± 2.4	13.4 ± 1.4	31.1 ± 1.9
diC22:1PC	30.6 ± 4.5	27.3 ± 3.4	

Table 2.1 – Exemples de valeurs du module de courbure κ disponibles dans la littérature, mesurées par différentes méthodes (extrait de [65]). Les valeurs de κ mesurées par analyse des fluctuations de forme de GUVs sont systématiquement une à deux fois plus grandes que celles obtenues par micro-manipulation de GUV ou par diffusion de rayons X.

Une hypothèse avancée par J.F. Nagle pour expliquer ces disparités dans la détermination des paramètres élastiques est l'absence de prise en compte des degrés de liberté internes dans l'énergie libre de Canham-Helfrich, utilisée dans la majorité des analyses de résultats expérimentaux [65]. En effet, les techniques expérimentales évoquées ici mesurent κ à différentes échelles. La longueur caractéristique d'une analyse de fluctuations de forme d'une GUV est de l'ordre de $10\,\mu$m (longueur d'onde du douzième mode d'une GUV de rayon $R = 20\,\mu$m), tandis qu'une expérience d'aspiration par micropipette se base sur l'étude de l'excès d'aire sur l'ensemble des modes de longueur d'onde supérieure à la distance entre lipides $d \sim 8\,$Å.

Watson et al. ont développé un modèle décrivant les fluctuations d'une membrane d'épaisseur non nulle de l'échelle moléculaire à l'échelle des fluctuations de grande longueur d'onde [66, 67]. Ce modèle, développé pour une membrane libre sans tension macroscopique, prend notamment en compte la contribution énergétique issue du *tilt* des lipides, i.e. leur orientation vis-à-vis de la normale à la surface locale. Il prédit une contribution $E_{\mathrm{tilt}} = \kappa_\theta t(r)/2$ du tilt moléculaire $t(r)$ à l'énergie libre totale, et

le spectre de fluctuation s'écrit :

$$\left\langle \left|\tilde{\delta h}(\mathbf{q})\right|^2 \right\rangle_{th} = k_B T \left(\frac{1}{\kappa_\theta q^2} + \frac{1}{\kappa q^4} \right). \tag{2.25}$$

Les modes de fluctuations de grande longueur d'onde sont dominés par la courbure, comme dans le modèle classique, tandis que pour $q \gtrsim \sqrt{\kappa_\theta/\kappa}$ le terme de tilt domine. Dans l'hypothèse où ce modèle, encore très récent, est réaliste, cette contribution à petite longueur d'onde pourrait expliquer pourquoi les valeurs de κ mesurées diffèrent selon l'échelle caractéristique d'observation des différentes méthodes.

Des simulations numériques de Watson et al. [67] prédisent une valeur de κ_θ de l'ordre de $5 \times 10^{-20}\,\mathrm{J/nm^{-2}}$, soit un changement de régime pour $q \sim 5 \times 10^8\,\mathrm{m}^{-1}$, à la limite de notre résolution expérimentale. Ce modèle ne prend cependant en compte ni la tension de la membrane ni le potentiel d'interaction, et un effort important de modélisation serait nécessaire si nous souhaitions l'adapter à nos systèmes expérimentaux.

2.3 Structure d'une double bicouche supportée

Les fonctions de corrélation calculées précédemment nous permettent de décrire la forme statique et les fluctuations thermiques des deux membranes supportées. Intéressons nous maintenant au facteur de structure de nos échantillons.

2.3.1 Calcul de la densité électronique

Une première possibilité pour modéliser la densité électronique $\rho(z)$ d'une bicouche consiste à utiliser un développement en série de Fourier [30] :

$$\delta\rho\,(z) \equiv \rho(z) - \rho_{H_2O} = \frac{F_0}{D} + \frac{2}{D}\sum_{h=1}^{h_{\max}} F_h \cos\left(\frac{2\pi h z}{D}\right), \tag{2.26}$$

où F_h est le $h^{\text{ième}}$ coefficient de Fourier, $h_{\max}$ l'ordre maximal du développement (généralement $h_{\max} = 5 - 6$), D le pas smectique dans le cas d'un empilement de bicouche [2], et $\rho_{H_20} = 0.334\,\mathrm{e}^-/\mathrm{\AA}^3$ la densité électronique de l'eau. Cette approche permet de simplifier l'analyse des courbes de diffusion hors-spéculaire (voir le chapitre 1 de la partie II).

2. Dans le cas d'un empilement d'une ou de deux bicouches uniquement, D est une pseudo-période prise comme un paramètre d'ajustement libre.

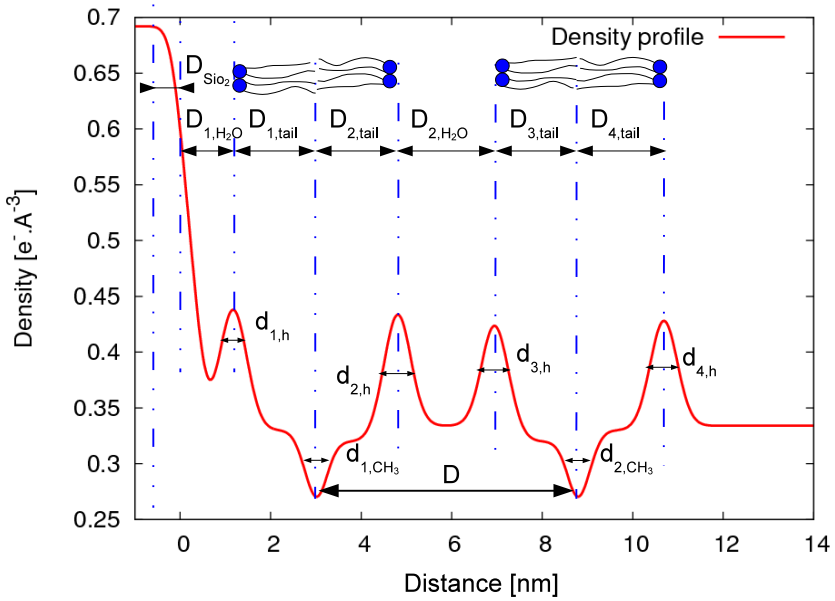


FIGURE 2.6 – Introduction des différents paramètres utilisés pour décrire la structure d'une double bicouche supportée.

Pour prendre en compte une éventuelle asymétrie dans la densité électronique des deux feuillets d'une bicouche, nous choisissons d'adapter le modèle communément nommé "1G-hybrid box model" [68, 69] au cas des doubles bicouches [11]. $\rho(z)$ est modélisée par une somme de fonctions analytiques continues par morceaux :

– les têtes sont modélisées par des fonctions gaussiennes

$$\delta\rho_{head}(z) = (\rho_{head} - \rho_{H_2O}) \exp\left(-\frac{(z - z_{head})^2}{2d_{head}^2}\right), \tag{2.27}$$

– de même pour les groupements méthyl

$$\delta\rho_{CH_3}(z) = (\rho_{CH_3} - \rho_{H_2O}) \exp\left(-\frac{(z - z_{CH_3})^2}{2d_{CH_3}^2}\right), \tag{2.28}$$

– les chaines sont de densité électronique constante et sont localisées par des différences de fonctions de Heaviside $\Theta(z)$

$$\delta\rho_{tail}(z) = (\rho_{tail} - \rho_{H_2O}) \left[\Theta(z - z_{head} - d_{head}) - \Theta(z - z_{CH_3} + d_{head})\right]. \tag{2.29}$$

Les chaines sont raccordées aux têtes ainsi qu'aux groupements méthyl par des fonctions sinus. La discontinuité que présentent la fonction de Heaviside

génère des instabilités numériques, et nous utilisons à la place de l'équation 2.29 :

$$\delta\rho_{tail}(z) = \frac{1}{2}(\rho_{tail} - \rho_{H_2O})\left[erf\left(\frac{z - z_{head} - d_{head}}{\varepsilon}\right) - erf\left(\frac{z - z_{CH_3} + d_{head}}{\varepsilon}\right)\right], \tag{2.30}$$

où ε est pris aussi petit que possible (typiquement $\varepsilon = 10^{-100}$).
La membrane est donc décrite par une fonction continue et *lisse*, dont on peut contrôler finement l'asymétrie (voir la figure 2.6 page ci-contre).

2.3.2 Relations géométriques entre paramètres

Un certain nombre de grandeurs caractéristiques des bicouches peuvent être extraites des profils de densité électronique. Nous nous concentrerons par la suite sur la structure de la bicouche flottante. En effet, la proximité de la première membrane avec le substrat rend délicat l'exploitation de son profil. De plus, nos analyses porteront essentiellement sur des expériences de diffusion hors-spéculaire de rayons X, et seront donc plus sensibles aux propriétés de la bicouche flottante.

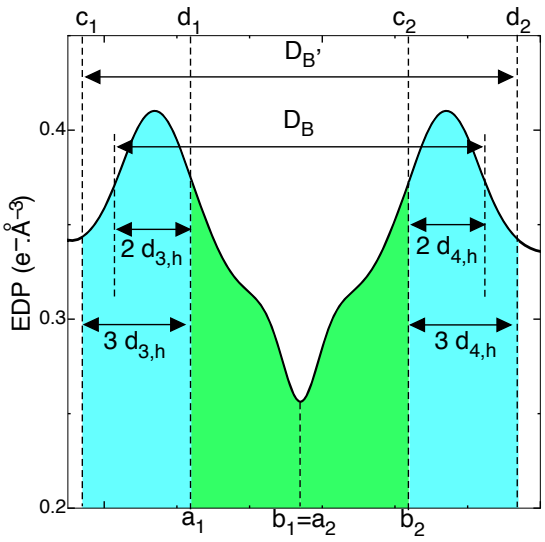


FIGURE 2.7 – Zoom sur le profil de densité de la bicouche flottante et définition des notations utilisées. En vert (resp. bleu), domaine d'intégration dans le calcul de A_L (resp. $\bar{n}'_w$) . D_B et D'_B désignent les notations utilisées dans la Réf. [44].

Nous choisissons de calculer l'aire par lipide $A_{L,i}$ pour chaque monocouche i de la bicouche flottante par intégration du profil de densité sur l'épaisseur des chaines :

$$A_{L,i}\int_{a_i}^{b_i}\rho(z)dz = n^*_{ch}, \tag{2.31}$$

avec n^*_{ch} le nombre d'électron total dans les chaînes, par exemple pour une molécule de DSPC $n^*_{ch} = 274$ (voir la figure 2.7).

Nous calculons également le nombre de molécules d'eau par lipide n_w comprises entre les deux bicouches [70] :

$$n_w V_w = \frac{A_L}{2}\left(D - D_B\right) = A_{L,bic2}d_w - A_{L,1}d_{h,1} - A_{L,2}d_{h,2}, \tag{2.32}$$

où $V_w = 30\,\text{Å}^3$ est le volume d'une molécule d'eau et $A_{L,bic2} = \left(A_{L,1} + A_{L,2}\right)/2$.

Une troisième quantité intéressante à analyser est le nombre de molécules d'eau par lipide n'_w situées dans la région des têtes, calculé d'après [44] :

$$n'_w V_w = \frac{A_L D'_B}{2} - V_L, \tag{2.33}$$

avec V_L le volume d'un lipide, défini par la relation $V_L = A_L D_B/2$.

Le calcul de n'_w nous permet d'estimer le nombre de molécules d'eau par tête de lipide, et de comparer ce résultat aux expériences menées sur des phases multilamellaires. Néanmoins, ce calcul purement géométrique ne prend pas en compte la densité électronique des têtes ρ_{head}, pouvant varier selon les échantillons. Nous introduisons donc une nouvelle quantité $\bar{n}'_w$, calculée par intégration du profil de densité sur la région des têtes :

$$n^*_w \bar{n}'_w = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{2} A_{L,i}\int_{c_i}^{d_i}\rho(z)dz - n^*_h, \tag{2.34}$$

où $n^*_w = 10$ est le nombre d'électrons dans une molécule d'eau et n^*_h le nombre d'électrons situés dans la tête du lipide ($n^*_h = 164$ pour du DSPC).
$\bar{n}'_w$ est une estimation autre que n'_w, qui elle est purement géométrique, du nombre de molécules d'eau situées dans la région des têtes. $\bar{n}'_w$ est cependant moins précise à cause du plus grand nombre de paramètres expérimentaux qu'elle fait intervenir.
Afin de préciser les ordres de grandeurs de ces quantités, prenons comme exemple un profil de densité idéal symétrique correspondant à une double bicouche de DSPC en phase fluide :

ρ_{head}	ρ_{tail}	ρ_{CH3}	d_{head}	d_{tail}	d_{CH3}	d_w
$0.42\,\text{e}^-/\text{Å}^3$	$0.31\,\text{e}^-/\text{Å}^3$	$0.28\,\text{e}^-/\text{Å}^3$	5 Å	19 Å	2.5 Å	22 Å

Nous obtenons alors $A_{L,bic2} = 57\,\text{Å}^2$, $n_w = 23$, $n'_w = 10$ et $\bar{n}'_w = 17$.

Deuxième partie

Matériels et méthodes

1. Diffusion de rayons X sur une membrane unique

1.1 Généralités sur les interactions rayons X-matière

Les rayons X interagissent avec la matière selon divers mécanismes (diffusion élastique, inélastique, absorption, ionisation, ...). Nous ne nous intéresserons ici qu'à la diffusion Thomson : les électrons du milieu diffusant sont accélérés par le champ électrique incident $\mathbf{E}_{in}$ et réémettent un champ $\mathbf{E}_{sc}$. Cette diffusion est élastique et $\mathbf{k}_{in}^2 = \mathbf{k}_{sc}^2$, où $\mathbf{k}_{in}$ (resp. $\mathbf{k}_{sc}$) est le vecteur d'onde de l'onde incidente (resp. diffusée). Les protons du noyau étant beaucoup plus lourds que les électrons du cortège électronique, ils contribuent très peu au rayonnement réémis. Le milieu diffusant est donc entièrement défini par sa densité électronique $\rho(\mathbf{r})$.

Dans un milieu diffusant décrit comme un milieu continu, l'indice de réfraction complexe est donné par la relation [71] :

$$n = 1 - \delta - i\beta, \tag{1.1}$$

avec $\delta = \lambda^2 r_e \rho / 2\pi$. λ désigne la longueur d'onde du champ électromagnétique et $r_e = 2.818 \times 10^{-15}\,\mathrm{m}$ le rayon classique de l'électron (dans notre cas $\delta \sim 10^{-6}$). $\beta \simeq 10^{-8}$ décrit l'absorption des rayons X au cours du processus de diffusion, que nous négligerons par la suite.

Dans le cas d'un milieu faiblement diffusant (n proche de 1), la diffusion peut être décrite dans le cadre de l'approximation de Born : le diffuseur perturbe peu le champ incident et nous pouvons négliger les diffusions multiples. Les ondes émises par deux électrons séparés d'une distance $\mathbf{r}$ ne diffèrent que d'un facteur de phase $e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}$, où $\mathbf{q} \equiv \mathbf{k}_{sc} - \mathbf{k}_{in}$ est le vecteur d'onde de transfert de norme $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, avec 2θ l'angle de diffusion. En sommant sur tous les électrons du milieu, la section

efficace différentielle de diffusion (définie comme étant l'intensité diffusée par unité d'angle solide Ω dans la direction $\mathbf{k}_{sc}$ par unité de flux incident dans la direction $\mathbf{k}_{in}$) s'écrit dans la limite continue :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_e^2 \left| \int d\mathbf{r} e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} \rho(\mathbf{r}) \right|^2 . \tag{1.2}$$

L'intensité $I(\mathbf{q})$ mesurée par un détecteur situé à une distance $\mathbf{r}$ et de surface élémentaire $r^2 d\Omega$ est proportionnelle à $d\sigma/d\Omega$. La diffusion de rayons X permet donc d'accéder à la structure interne du système étudié, en mesurant $I(\mathbf{q})$ pour différents angles d'incidence.

1.2 Intensité diffusée par un milieu stratifié plan

1.2.1 Angle critique de réflexion totale

Considérons deux milieux semi-infinis définis par leurs indices respectifs n_1 et n_2 avec $n_1 > n_2$, séparés par une interface parfaitement plane (voir la figure 1.1). D'après les lois de Snell-Descarte l'angle réfléchi θ_{sc} est égal à l'angle incident θ_{in}, et il existe un angle critique θ_c en deçà duquel la réflexion est totale. θ_c est défini par la relation :

$$\cos\theta_c = \frac{n_2}{n_1}. \tag{1.3}$$

Pour des rayons X sur une interface eau-silicium, l'angle critique est petit ($\theta_c \simeq 0.04°$), nous permettant d'effectuer un développement au premier ordre de l'équation 1.3 : $\theta_c \simeq \sqrt{2(\delta_2 - \delta_1)}$.

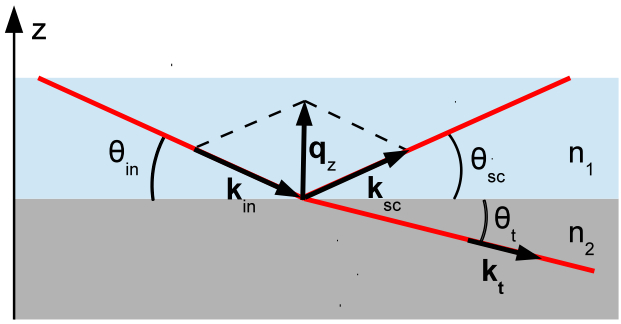


FIGURE 1.1 – Représentation schématique de la réflectivité de Fresnel.

1.2.2 Réflectivité spéculaire

Réflectivité de Fresnel Pour $\theta_i > \theta_c$, une partie de l'onde incidente pénètre dans le milieu 2. La réflectivité de Fresnel R_F, définie comme étant le rapport entre l'intensité réfléchie et l'intensité incidente pour une interface donnée, s'obtient à partir des équations de continuités des composantes tangentielles du champ électromagnétique. Elle est donnée par la relation :

$$R_F \equiv \frac{I_R}{I_0} = \left| \frac{k_{in,z} - k_{t,z}}{k_{in,z} + k_{t,z}} \right|^2 , \tag{1.4}$$

avec $k_z \equiv \mathbf{k} \cdot \mathbf{e_z}$. Lors de nos expériences de réflectivité de rayons X, nous gardons $\lambda = 0.459\,\text{Å}$ fixe et obtenons une courbe de réflectivité $R_F(q_z)$ en faisant varier θ_{in}. Les courbes ainsi obtenues présentent un plateau pour $q_z < q_c$ et une décroissance $\sim q_z^{-4}$ pour les plus grands vecteurs d'onde (voir la figure 1.2).

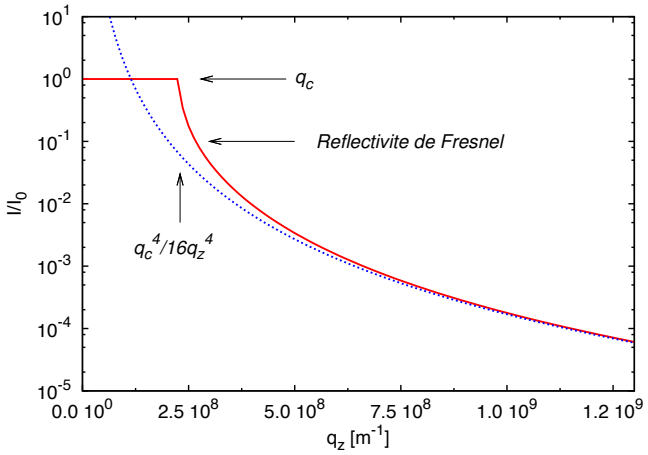


FIGURE 1.2 – Allure d'une courbe de réflectivité de Fresnel. On observe un plateau jusqu'au vecteur d'onde critique q_c correspondant à l'angle θ_c, suivi d'une décroissance qui tend rapidement vers une courbe proportionnelle à q_z^{-4} (issu de [11]).

Approximation de Born de l'onde distordue (DWBA) Au voisinage de l'angle critique, l'intensité du faisceau réfléchi est grande, il y a diffusion multiple et l'approximation de Born n'est plus valable. Nous utilisons alors l'approche perturbative DWBA (*Distorted-wave Born approximation*) où le système non perturbé est un système pour lequel les champs électriques réfléchis et transmis peuvent être calculés exactement [71]. La contribution de la perturbation est ensuite calculée dans le cadre de l'approximation de Born.

Si le système est constitué, par exemple, d'une bicouche supportée sur un substrat de silicium, on calcule de façon exacte la réflectivité d'une interface parfaitement plane entre le silicium et l'eau. La présence de la bicouche est traitée ensuite comme une perturbation de la densité électronique. Ceci est possible car sa densité électronique est proche de celle de l'eau (voir la figure 1.3).

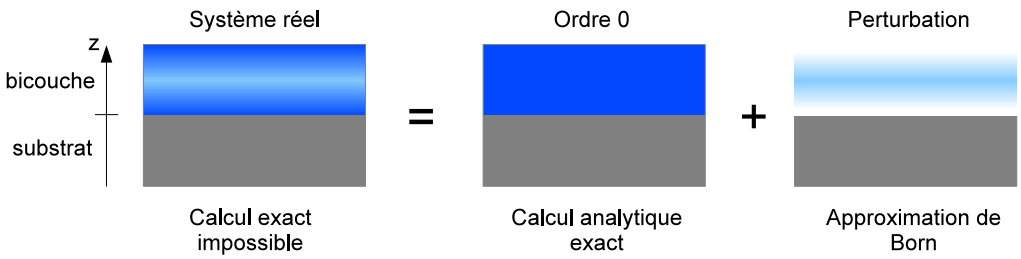


FIGURE 1.3 – Représentation schématique de l'approximation DWBA.

Réflectivité du système total Dans le cadre de l'approximation DWBA la réflectivité $R(q_z)$ du système total, décrit par sa densité électronique $\delta\rho(z)$, est donnée par la relation [72] :

$$R\left(q_z\right) = R_F\left(q_z\right)\left|1 + iq_z \int \frac{\delta\rho\left(z\right)}{\delta\rho_{Si}} e^{iq_z z} dz\right|^2 . \tag{1.5}$$

Le terme d'interférence fait apparaître des oscillations nommées franges de Kiessig dans la courbe de réflectivité. Dans le cas d'une couche de densité homogène déposée sur un substrat semi-infini, la position et l'amplitude de ces oscillations sont directement liées respectivement à l'épaisseur des couches et à leur rugosité.

L'interprétation des courbes expérimentales de systèmes constitués de plusieurs couches de densités électroniques différentes est complexe (voir la figure 1.4). On remarque dans l'équation 1.5 que les informations liées à la phase sont perdues : deux systèmes ayant des structures différentes peuvent donc avoir des réflectivités très semblables. Il est nécessaire d'estimer le plus précisément possible dans quelle gamme les paramètres des différentes couches peuvent varier afin d'obtenir un ajustement unique des données expérimentales.

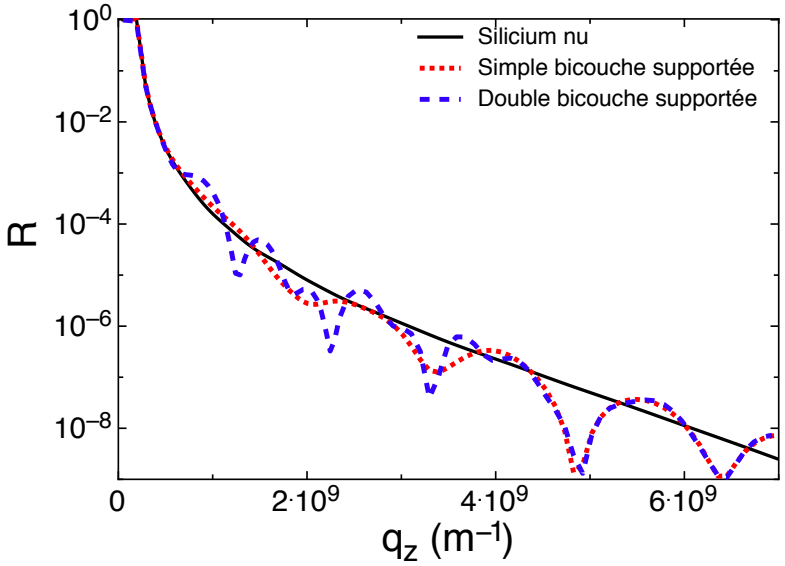


FIGURE 1.4 – Exemples de courbes de réflectivités calculées d'après l'équation 1.5.

1.3 Effets de la rugosité : diffusion hors-spéculaire

Nous n'avons considéré jusqu'ici que des surfaces parfaitement planes, invariantes par translation dans le plan $(\mathbf{x}, \mathbf{y})$. Cette invariance est rompue par la rugosité statique du substrat et des membranes, les fluctuations thermiques de ces dernières, la présence de trous, de défauts structuraux, etc ... Ces inhomogénéités latérales donnant lieu à une diffusion dans les directions hors-spéculaires, le vecteur d'onde de transfert n'est plus purement transverse : $\mathbf{q} = \mathbf{q}_z + \mathbf{q}_{\parallel}$ (voir la figure 1.5 page suivante). Comme nous allons le voir, la section efficace de diffusion se décompose en deux parties, d'un côté la réflectivité dans la direction spéculaire, et de l'autre la diffusion dite hors-spéculaire, liée aux fonctions de corrélations des hauteurs.

1.3.1 Calcul de la section efficace de diffusion

Dans le cadre de la DWBA la section efficace différentielle de diffusion totale se décompose en deux parties [30, 71] :

$$\begin{aligned}\frac{d\sigma}{d\Omega} &= \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\text{ref}} + \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\text{pert}} \\ &= \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\text{ref}} + r_e^2 |t^{in}|^2 |t^{sc}|^2 \left(\mathbf{e}_{in} \cdot \mathbf{e}_{sc}\right)^2 \left\langle \left| \int d\mathbf{r} e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} \delta\rho\left(\mathbf{r}\right) \right|^2 \right\rangle, \end{aligned} \tag{1.6}$$

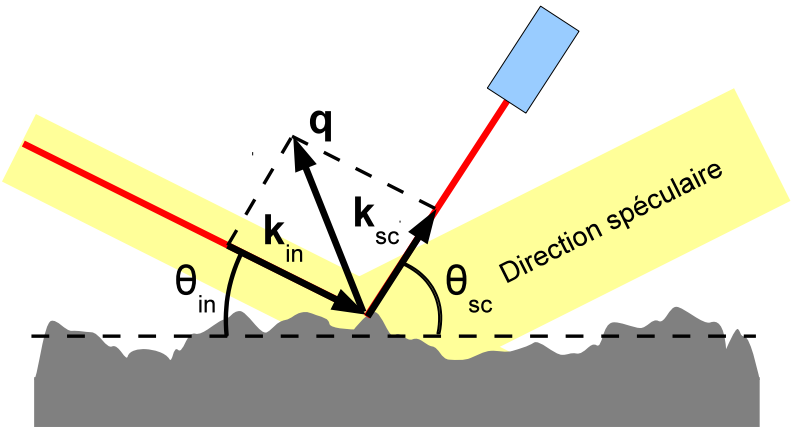


FIGURE 1.5 – La rugosité d'une interface donne lieu à une diffusion dans les directions hors-spéculaires. Les vecteurs d'onde incident et diffusé sont respectivement désignés par $\mathbf{k}_{in}$ et $\mathbf{k}_{sc}$. $\mathbf{q}$ est le vecteur d'onde de transfert.

où $(\mathbf{e}_{in} \cdot \mathbf{e}_{sc})^2 \sim 1$ décrit le changement de polarisation entre le champ incident et le champ diffusé. $|t^{in}|^2$ et $|t^{sc}|^2$ sont les coefficients de transmission de Fresnel entre l'eau et le substrat à incidence rasante. t^{in} est une bonne approximation du champ électrique incident, et t^{sc} décrit de quelle manière l'onde diffusée se propage jusqu'au détecteur. La section efficace de référence $(d\sigma/d\Omega)_{\text{ref}}$ est la réflectivité spéculaire correspondant à une interface parfaitement plane silicium/eau.

La partie perturbée du système est décrite par la somme des densités électroniques du substrat rugueux et des membranes M_1 et M_2 :

$$\delta\rho\left(z\right) = \delta\rho_{\text{sub}}\left(z - z_s\right) + \delta\rho_{\text{M}_1}\left(z - z_{1,th} - z_{1,st}\right) + \delta\rho_{\text{M}_2}\left(z - z_{2,th} - z_{2,st}\right). \tag{1.7}$$

Nous obtenons comme expression de la partie perturbée de la section efficace de diffusion [11, 34, 73]:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\text{pert}} = \mathcal{A} r_e^2 |t^{in}|^2 |t^{sc}|^2 \left(\mathbf{e}_{in} \cdot \mathbf{e}_{sc}\right)^2 \left[g\left(q_z\right)(2\pi)^2 \delta\left(\mathbf{q}_{\parallel}\right) + \int d\mathbf{r}_{\parallel} e^{i\mathbf{q}_{\parallel}\mathbf{r}_{\parallel}} f\left(\mathbf{r}_{\parallel}, q_z\right)\right], \tag{1.8}$$

avec $\mathcal{A}$ l'aire de l'échantillon illuminée par le faisceau (de l'ordre du μm^2).
La fonction $g\left(q_z\right)$ décrit la partie spéculaire de la perturbation. Nous n'utiliserons pas cette fonction par la suite, mais l'équation 1.5 qui donne accès à la réflectivité totale et non pas uniquement à la partie perturbée.

La fonction $f\left(\mathbf{r}_{\parallel}, q_z\right)$ est donnée par :

$$\begin{aligned}
f\left(\mathbf{r}_{\parallel}, q_z\right) =& \left|\tilde{\delta\rho}_{\text{sub}}\left(q_z\right)\right|^2 e^{-q_z^2\sigma_s^2}\left(e^{q_z^2\left\langle z_s\left(\mathbf{r}_{\parallel}\right)z_s(0)\right\rangle}-1\right)\\
&+\left|\tilde{\delta\rho}_{\text{M1}}\left(q_z\right)\right|^2 e^{-q_z^2\left(\sigma_{1,th}^2+\sigma_{1,st}^2\right)}\left(e^{q_z^2\left\langle z_{1,th}\left(\mathbf{r}_{\parallel}\right)z_{1,th}(0)\right\rangle}e^{q_z^2\left\langle z_{1,st}\left(\mathbf{r}_{\parallel}\right)z_{1,st}(0)\right\rangle}-1\right)\\
&+\left|\tilde{\delta\rho}_{\text{M2}}\left(q_z\right)\right|^2 e^{-q_z^2\left(\sigma_{2,th}^2+\sigma_{2,st}^2\right)}\left(e^{q_z^2\left\langle z_{2,th}\left(\mathbf{r}_{\parallel}\right)z_{2,th}(0)\right\rangle}e^{q_z^2\left\langle z_{2,st}\left(\mathbf{r}_{\parallel}\right)z_{2,st}(0)\right\rangle}-1\right)\\
&+\left(\tilde{\delta\rho}_{\text{M1}}^*\left(q_z\right)\tilde{\delta\rho}_{\text{M2}}\left(q_z\right)+\tilde{\delta\rho}_{\text{M1}}\left(q_z\right)\tilde{\delta\rho}_{\text{M2}}^*\left(q_z\right)\right)e^{-\frac{1}{2}q_z^2\left(\sigma_{1,th}^2+\sigma_{1,st}^2+\sigma_{2,th}^2+\sigma_{2,st}^2\right)}\\
&\times\left(e^{q_z^2\left\langle z_{1,th}\left(\mathbf{r}_{\parallel}\right)z_{2,th}(0)\right\rangle}e^{q_z^2\left\langle z_{1,st}\left(\mathbf{r}_{\parallel}\right)z_{2,st}(0)\right\rangle}-1\right)\\
&+\left(\tilde{\delta\rho}_{\text{M1}}^*\left(q_z\right)\tilde{\delta\rho}_{\text{sub}}\left(q_z\right)+\tilde{\delta\rho}_{\text{M1}}\left(q_z\right)\tilde{\delta\rho}_{\text{sub}}^*\left(q_z\right)\right)e^{-\frac{1}{2}q_z^2\left(\sigma_{1,th}^2+\sigma_{1,st}^2+\sigma_s^2\right)}\left(e^{q_z^2\left\langle z_{1,st}\left(\mathbf{r}_{\parallel}\right)z_s(0)\right\rangle}-1\right)\\
&+\left(\tilde{\delta\rho}_{\text{M2}}^*\left(q_z\right)\tilde{\delta\rho}_{\text{sub}}\left(q_z\right)+\tilde{\delta\rho}_{\text{M2}}\left(q_z\right)\tilde{\delta\rho}_{\text{sub}}^*\left(q_z\right)\right)e^{-\frac{1}{2}q_z^2\left(\sigma_{2,th}^2+\sigma_{2,st}^2+\sigma_s^2\right)}\left(e^{q_z^2\left\langle z_{2,st}\left(\mathbf{r}_{\parallel}\right)z_s(0)\right\rangle}-1\right).
\end{aligned} \tag{1.9}$$

f est une fonction des transformées de Fourier des densités électroniques, de la rugosité des interfaces, et des fonctions de corrélation des hauteurs $\left\langle z_i\left(\mathbf{r}_{\parallel}\right)z_j\left(0\right)\right\rangle$ décrites dans le chapitre 2 de la partie I. i et j désignent la première membrane, la seconde, ou le substrat. Le détail des calculs présentés ici est disponible dans les Réf. [11, 34].

1.3.2 Prise en compte de la résolution du détecteur

Contrairement au cas de la réflectivité spéculaire, l'intensité diffusée est liée à la résolution expérimentale : il faut prendre en compte les dimensions du faisceau ainsi que sa divergence, en intégrant sur tous les angles d'incidence et de diffusion accessibles. Le calcul de l'intensité reçue par un détecteur placé à un angle θ_{sc} est donné par la relation :

$$I = \frac{I_0}{h_i w_i}\int\left[\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\text{ref}}+\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\text{spec}}+\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\text{off-spec}}\right]\mathcal{R}es\left(\Omega\right)d\Omega, \tag{1.10}$$

où h_i et w_i sont respectivement la largeur et la hauteur des fentes collimatrices situées en aval de l'échantillon. Le terme $I_0/h_i w_i$ désigne donc le flux incident.

L'équation 1.10 fait intervenir la résolution du détecteur $\mathcal{R}es\left(\Omega\right) \equiv \mathcal{R}es\left(\theta_{sc}, \psi\right)$, décrite par une fonction créneau de largeur $\Delta\theta$ dans le plan d'incidence et $\Delta\psi$ dans le plan transverse, de sorte que $\mathcal{R}es\left(\theta_{sc}, \psi\right) = 1$ si $\left(\theta_{sc}, \psi\right)$ est en direction du

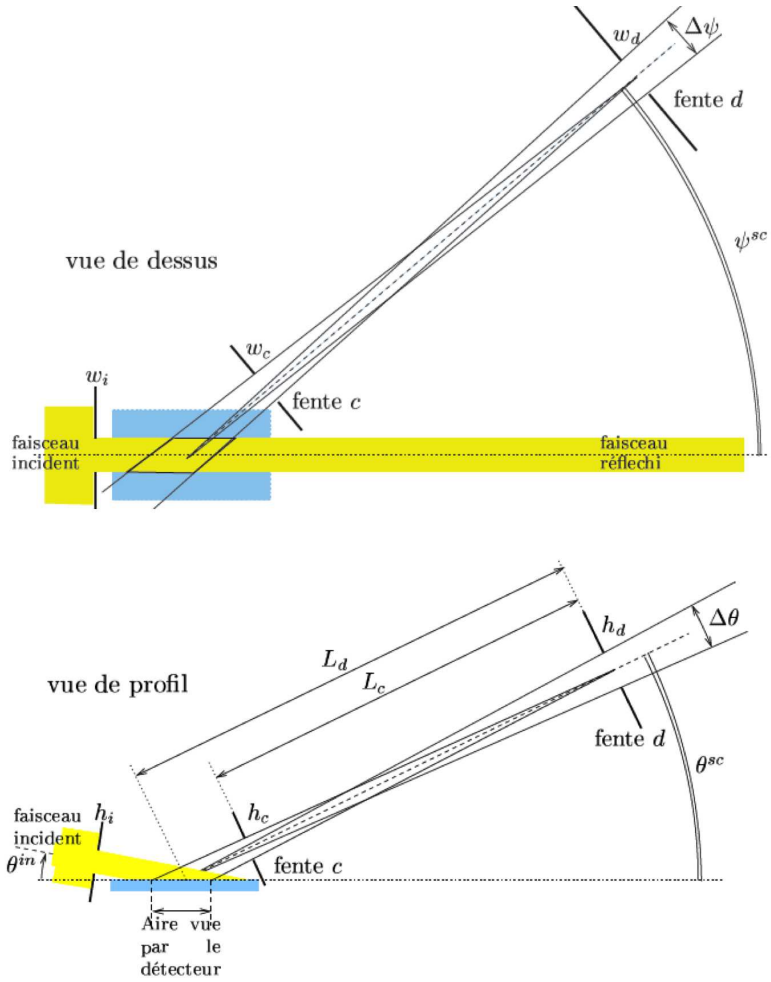


FIGURE 1.6 – Définition des paramètres utilisés dans le calcul de l'intensité diffusée (extrait de [73]).

détecteur et $\mathcal{R}es\,(\theta_{sc}, \psi) = 0$ sinon. $\Delta\theta$ et $\Delta\psi$ font intervenir la taille de la fente d placée devant le détecteur, ainsi que la divergence du faisceau $\delta\theta$ (voir la figure 1.6):

$$\begin{cases} \Delta\theta = h_d/L_d + \delta\theta \\ \Delta\psi = w_d/L_d. \end{cases} \tag{1.11}$$

Dans nos expériences, les fentes sont très ouvertes selon leur largeur (voir le tableau 1.1 page 50), par conséquence l'expression de la fonction de résolution dans l'espace réciproque ne dépend pas de q_y : $\tilde{\mathcal{R}es}\left(\mathbf{q}_{\parallel}\right) = \tilde{\mathcal{R}es}\,(q_x)$.

Lorsque $\theta_{sc} \neq \theta_{in}$, l'équation 1.10 se réduit à :

$$I_{\text{off-spec}}\left(\mathbf{q}_{\parallel}\right) = \frac{I_0}{h_i w_i k_0^2 \sin\theta_{sc}} \int \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\text{off-spec}} \tilde{\mathcal{R}es}\left(q_x\right) dq_x dq_y. \tag{1.12}$$

Après simplifications détaillées dans la Réf. [34], l'intégrale est calculée numériquement au cas par cas. Nous accédons ainsi à l'intensité diffusée dans les directions hors-spéculaires de nos systèmes de doubles bicouches supportées (voir la figure 1.7).

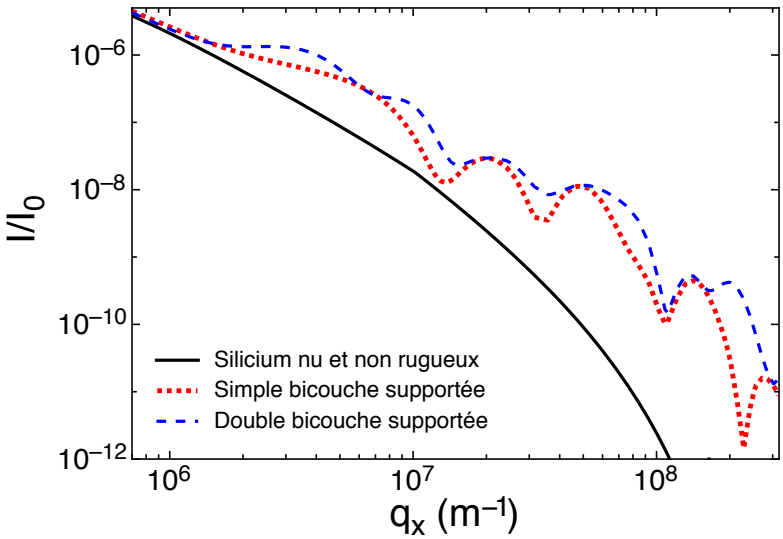


FIGURE 1.7 – Intensité hors-spéculaire normalisée par l'intensité du faisceau incident I_0, calculée en fonction de $q_x = k_{in}\left(\cos\theta_{in} - \cos\theta_{sc}\right)$ pour différents systèmes.

1.3.3 Intensité totale dans la direction spéculaire

Les fluctuations thermiques et la rugosité statique des interfaces du système ont deux effets sur les courbes de réflectivité spéculaire :

- l'expression de la réflectivité donnée par l'équation 1.5 est multipliée par une exponentielle décroissante, nommée facteur de Debye-Waller, qui traduit la diffusion dans les directions hors-spéculaires du champ incident. Par exemple, pour une interface de silicium de rugosité σ :

$$I_{\text{spec}}\left(q_z\right) = R_F\left(q_z\right) e^{-q_z^2\sigma^2}. \tag{1.13}$$

  Ce facteur réduit le contraste des oscillations de la courbe de réflectivité.

– la résolution finie de nos expériences (nos fentes ont une certaine largeur) mène à une contribution du signal hors-spéculaire dans la direction spéculaire : à grand q_z la diffusion hors-spéculaire domine le signal mesuré.

L'intensité totale détectée dans la direction spéculaire ($\theta_{sc} = \theta_{in}$) est donc donnée par l'expression :

$$I_{\text{spec,mes}}(\theta_{sc}) = I_{\text{spec}}(q_z) + I_{\text{off-spec}}(q_z, q_x = 0)\,. \tag{1.14}$$

Une simulation de courbes de réflectivité mettant en évidence ces deux effets est présentée sur la figure 1.8.

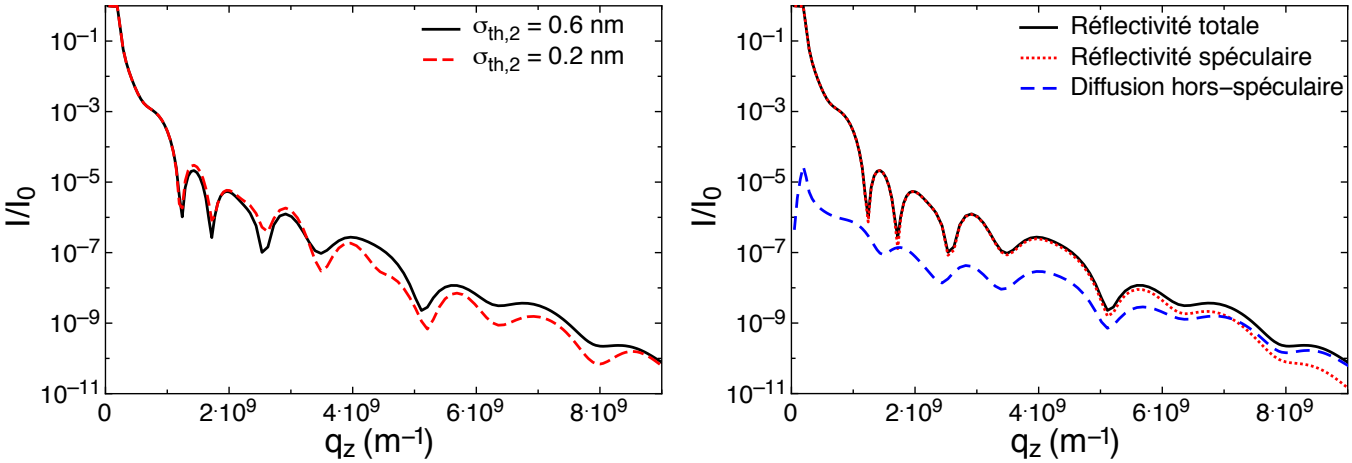


FIGURE 1.8 – A gauche : réflectivité d'une double bicouche supportée calculée pour deux rugosités thermiques moyennes de la membrane libre $\sigma_{th,2}$. A droite : détail des différentes contributions à la réflectivité dans la direction spéculaire.

1.4 Mesures effectuées

Le formalisme présenté précédemment, associé à la modélisation de la structure des bicouches et au calcul des fonctions de corrélations des hauteurs nous permet de calculer l'intensité diffusée par une double bicouche supportée dans les différentes directions. L'intensité détectée dans la direction spéculaire nous renseigne essentiellement sur la structure de l'échantillon, tandis que la diffusion dans les directions hors-spéculaires est également sensible aux inhomogénéités latérales. Nous allons à présent décrire les méthodes expérimentales nous permettant de mesurer ces intensités.

1.4.1 Dispositif expérimental

Les expériences de diffusion de rayons X ont été menées sur la ligne BM32 de l'*European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF). Le rayonnement synchrotron présente un flux important d'environ 10^{11} photons/s nous permettant d'obtenir une courbe de réflectivité en une heure environ. Nous ne détectons qu'un photon sur 10^{12} à grands q_x en diffusion hors-spéculaire (voir la figure 1.7 page 47), et un flux conséquent tel que celui disponible à l'ESRF est nécessaire pour obtenir une bonne statistique en un temps raisonnable sans dégrader l'échantillon.

La ligne BM32, décrite sur la figure 1.9, possède un goniomètre nous permettant de contrôler très précisément la hauteur et l'orientation de l'échantillon (angles θ et ψ). Nous nous plaçons toujours dans le plan formé par le faisceau incident/ faisceau spéculaire lors de nos expériences ($\psi = 0$), et translatons régulièrement l'échantillon afin de limiter l'exposition de la zone étudiée. Un moniteur placé juste avant le goniomètre nous permet de mesurer le flux incident pour chaque mesure effectuée.

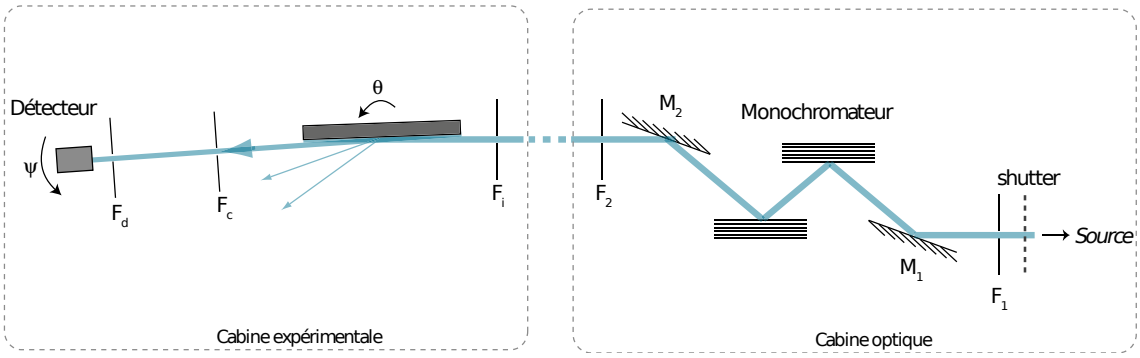


FIGURE 1.9 – Schéma du dispositif expérimental sur la ligne BM32 de l'ESRF (adapté de [12]). L'angle θ désigne une rotation dans le plan formé par le faisceau incident/faisceau spéculaire, ψ une rotation hors de ce plan.

La longueur d'onde du faisceau est fixée à 27 keV (0.459 Å) grâce à deux cristaux monochromateurs de Si(111). Nous contrôlons l'aire éclairée et la résolution de l'expérience à l'aide de fentes en tantale caractérisées par leurs ouvertures $w \times h$. Pour toutes nos expériences l'ouverture de la fente F_i située en amont du goniomètre est fixée à $500\,\mu\text{m} \times 20\,\mu\text{m}$. Les fentes situées entre l'échantillon et le détecteur sont modifiées selon le type de mesure réalisée. Lors d'une mesure du signal hors-spéculaire, le choix de leurs ouvertures résulte d'un compromis entre une résolution expérimen-

tale suffisamment fine et une quantité de photons détectés suffisamment importante. En réflectivité spéculaire la taille des fentes n'influe pas sur la résolution, l'ouverture doit être assez grande pour détecter le signal réfléchi mais rester fine pour limiter la contribution de la diffusion hors-spéculaire dans la direction spéculaire.

		U'' vs température Champ électrique	Pression osmotique Membrane chargée	Pression osmotique Electrostatique GP
Spéculaire	h_c	500 μm	200 μm	200 μm
	w_c	1 mm	2 mm	2 mm
	h_d	100 μm	200 μm	200 μm
	w_d	1 mm	2 mm	2 mm
Hors-spéculaire	h_c	200 μm	200 μm	200 μm
	w_c	2 cm	2 cm	5 cm
	h_d	200 μm	200 μm	200 μm
	w_d	2 cm	2 cm	2 cm

TABLE 1.1 – Dimensions des fentes utilisées sur la ligne BM32, classées par type d'expériences.

Les dimensions des fentes utilisées dans cette thèse sont données à titre indicatif dans le tableau 1.1. Nous les caractérisons précisément avant chaque série d'expérience, une différence d'une vingtaine de microns pouvant être parfois constatée entre la consigne et les dimensions effectives. La divergence du faisceau est également mesurée au cas par cas, et est comprise entre 10 et 70 μrad.

1.4.2 Mesure de la réflectivité spéculaire

La réflectivité dans la direction spéculaire est mesurée en utilisant la géométrie décrite sur la figure 1.10. En faisant varier l'angle θ entre 0 à 4° nous couvrons une gamme de q_z comprise entre 0 et 1 Å^{-1}.

Pour chaque valeur de θ, le détecteur mesure l'intensité à l'angle 2θ. Le bruit de fond est mesuré en réalisant un "offset scan" [74], i.e. en décalant le détecteur de $\delta\theta = 0.08°$ par rapport à 2θ pour chaque point. Nous obtenons ainsi une courbe de réflectivité (voir la figure 1.11 page ci-contre) en environ 1h45.

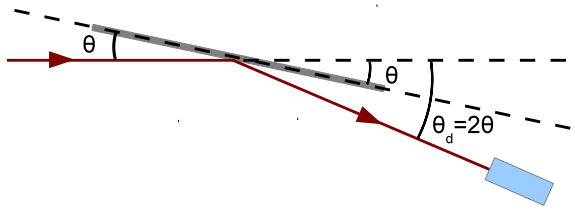


FIGURE 1.10 – Géométrie adoptée lors d'une mesure de réflectivité spéculaire.

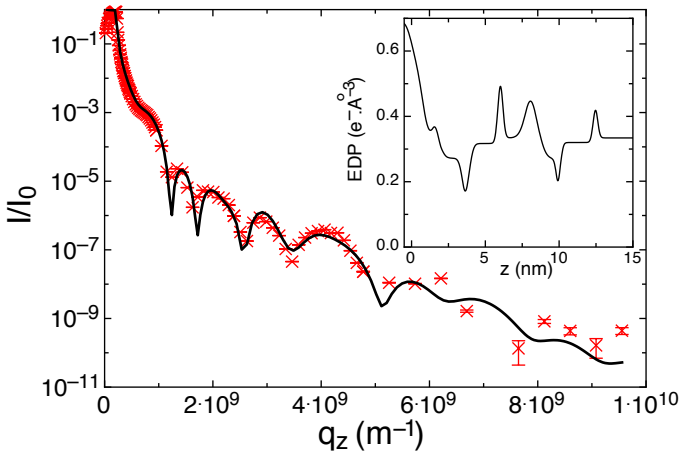


FIGURE 1.11 – Points expérimentaux obtenus par réflectivité spéculaire pour une double bicouche supportée de DSPC en phase gel. La courbe représente le meilleur ajustement obtenu par l'équation 1.14. En insert, le profil de densité électronique correspondant.

1.4.3 Mesure de la diffusion hors-spéculaire

Lors d'une expérience de diffusion hors-spéculaire, l'angle d'incidence est fixé à 0.04°, soit légèrement en deçà de l'angle de réflexion critique de l'interface Si-eau (0.048° à 27 keV). Nous mesurons le signal hors-spéculaire en écartant le détecteur de la direction spéculaire d'un angle pouvant varier de 0 à 4° (voir la figure 1.12 page suivante).
Le signal est diffusé par chaque milieu qu'il rencontre. En travaillant à cet angle d'incidence, seule une onde évanescente se propage dans le silicium avec une longueur de pénétration de quelques nanomètres. La contribution principale au bruit de fond est donc due à la diffusion par la couche d'eau traversée.

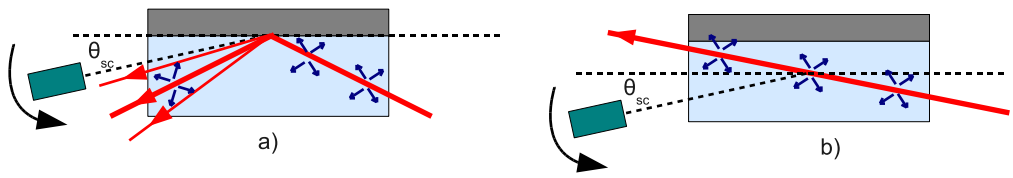


FIGURE 1.12 – a) Géométrie adoptée lors d'une mesure de la diffusion hors-spéculaire. b) Mesure de la diffusion du faisceau incident due à la traversée du volume d'eau (issu de [11]).

Le bruit de fond est mesuré en translatant le substrat de silicium de telle sorte qu'il n'intercepte plus le faisceau incident. En répétant l'opération pour chaque angle du détecteur utilisé pour la mesure du signal, nous obtenons une courbe du bruit fond définie par la relation :

$$I_{bg}\left(\theta_{sc}\right) = \frac{1}{2}\left[I_{mes}\left(\theta_{sc}\right) + R\left(\theta_{in}\right) \times I_{mes}\left(\theta_{sc} - 2\theta_{in}\right)\right], \tag{1.15}$$

où $R\left(\theta_{in}\right)$ est la réflectivité mesurée à l'angle θ_{in}. Le premier terme correspond à la diffusion par l'eau du faisceau incident, tandis que le deuxième terme décrit la diffusion du faisceau réfléchi dans la direction spéculaire. La soustraction du signal brut et du bruit de fond nous donne le signal hors-spéculaire, auquel nous pouvons ajuster les courbes obtenues par l'équation 1.12, dont un exemple est donné sur les figures 1.13 et 1.14.

La figure 1.14 montre le meilleur ajustement d'une courbe expérimentale prise en exemple, auquel nous comparons les courbes obtenues par variations indépendantes de différents paramètres de la bicouche libre. On observe bien que chaque paramètre élastique a une zone de prédominance décrite sur la figure 2.2 page 26, et que la courbe de diffusion est également sensible aux paramètres structuraux comme d_w.

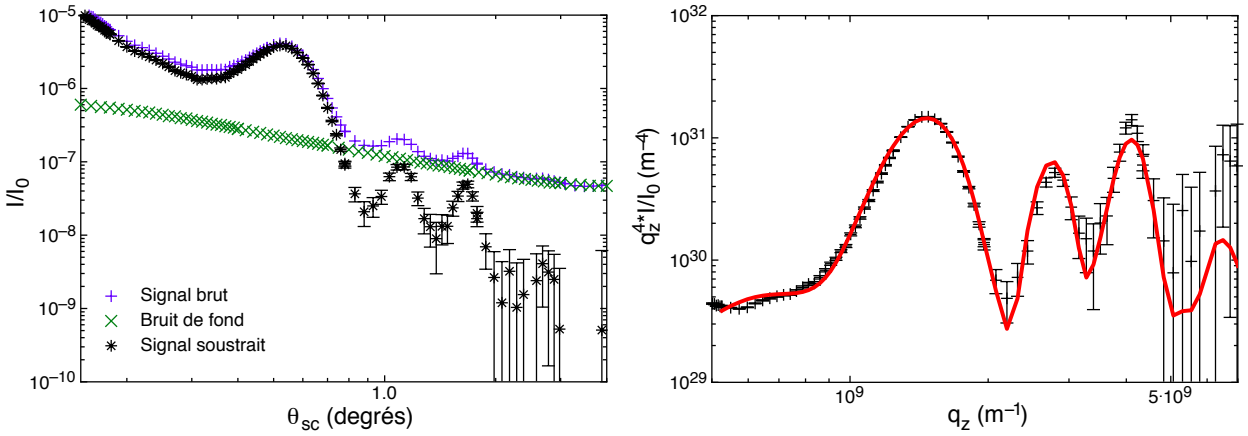


FIGURE 1.13 – A gauche : courbe de diffusion hors-spéculaire obtenue par soustraction du bruit de fond, pour une double bicouche de DPPS. A droite : contribution du substrat atténuée en représentant $q_z^4 I/I_0$ en fonction de q_z. La courbe rouge représente le meilleur ajustement obtenu.

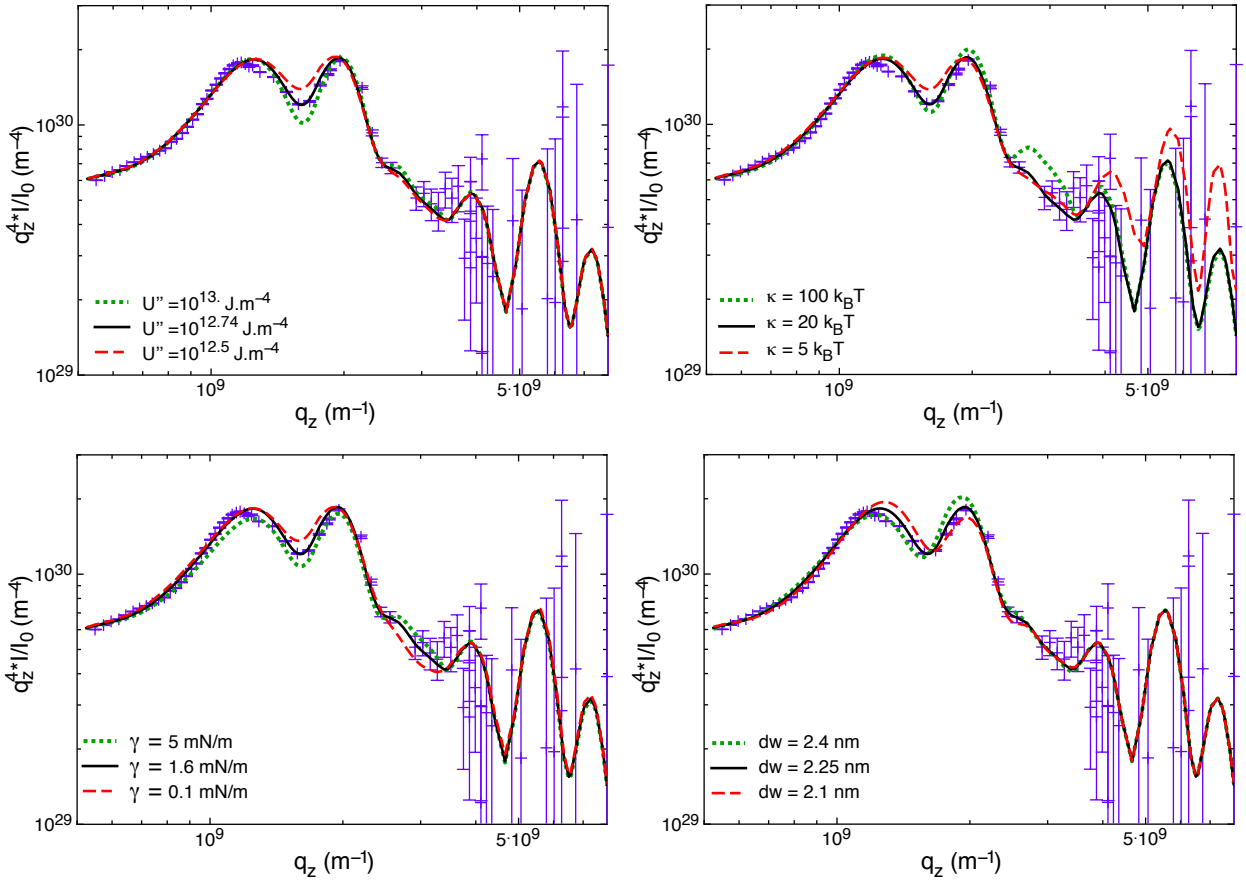


FIGURE 1.14 – Mesure de diffusion hors-spéculaire et meilleur ajustement associé (ligne noire) pour une double bicouche de DSPC en phase gel. Les courbes obtenues par variations indépendantes de différents paramètres de la bicouche libre sont également représentées.

1.4.4 Ajustements des courbes expérimentales

Au total, 27 paramètres structuraux et 7 paramètres élastiques sont nécessaires pour décrire une double bicouche supportée. Il nous est donc impossible de minimiser le χ^2 de nos ajustements par une méthode simple en explorant l'espace des phases dans son intégralité.

Les meilleurs ajustements sont obtenus par minimisation du χ^2 par un algorithme de recuit simulé, particulièrement adapté aux problèmes de minimisation de fonctions à plusieurs variables continues [75]. La stratégie de cet algorithme est comparable au mécanisme de recuit des métaux qui consiste à porter le métal à haute température puis à le refroidir lentement. A chaque étape du refroidissement les atomes du métal se réorganisent en une structure proche de celle de plus basse énergie. Si le refroidissement est suffisamment lent, le métal forme un cristal quasi-parfait à la fin du processus.
Ici, la "température" détermine la probabilité $P = \exp\left[-(\chi^2 - \chi^2_{\text{best}})/T\right]$ qu'un ajustement de moins bon χ^2 que le meilleur ajustement actuel soit temporairement accepté, nous évitant ainsi d'être "piégé" dans un minimum local.

Afin d'optimiser cet algorithme, une bonne connaissance préalable du système est nécessaire pour déterminer une gamme de variations autorisées des différents paramètres la plus étroite possible. Le temps nécessaire pour obtenir un ajustement reste cependant long, de deux semaines à un mois par courbe.

Troisième partie

Etude du potentiel d'interaction entre une membrane et son environnement

Une membrane lipidique interagit avec son milieu extérieur par le biais de différentes forces dites *microscopiques* : les interactions attractives de van der Waals, omniprésentes dans le domaine de la matière molle, la répulsion d'hydratation, les interactions électrostatiques, attractives ou répulsives, ...
A ces interactions "directes" s'ajoutent une contribution entropique répulsive, propre aux systèmes fluctuant sous l'effet de l'agitation thermique. Cette force, d'origine purement thermodynamique, entre en compétition avec les interactions microscopiques et joue un rôle prépondérant dans l'organisation des systèmes étudiés.

Cette partie sera dans un premier temps consacrée aux différents potentiels d'interaction entre une membrane et son environnement, puis à leur étude par diffusion de rayons X sur une membrane unique.

1. Origines et expressions des potentiels d'interaction

1.1 Potentiels moléculaires

1.1.1 Forces de van der Waals

La force dite de van der Waals résulte des interactions dipôle-dipôle et se décompose en trois interactions électrodynamiques :

- les forces de Keesom, issues des interactions entre dipôles permanents,
- les forces de Debye, issues des interactions entre un dipôle induit et un dipôle permanent,
- et les forces de dispersions de London, issues des interactions entre dipôles induits.

Sommation par paire Un calcul rigoureux de l'expression des forces de van der Waals entre deux objets nécessitent des calculs lourds d'électrodynamique quantique [76]. Une approche semi-classique simple permet néanmoins d'établir la dépendance en r^{-6} du potentiel d'interaction de van der Waals entre deux atomes A et B [32] :

$$\mathcal{U}_{AB}(r) = -\frac{C_{AB}}{r^6}, \tag{1.1}$$

avec C_{AB} une constante exprimée en J·m^6, proportionnelle au produit des polarisabilités des atomes α_A et α_B.

Cette expression de l'énergie d'interaction de van der Waals entre deux dipôles ponctuels va nous permettre de déterminer l'expression des interactions entre des objets macroscopiques. Une première approche, qui fut historiquement celle de Hamaker, consiste à considérer uniquement les interactions entre paires de volumes

élémentaires. Comme nous le verrons plus loin, cette approche a ses limites, mais reste une bonne approximation de l'interaction de van der Waals à faible distance [1].

Considérons comme exemple le cas d'un atome ponctuel A situé à une distance d d'un film d'extension infinie, d'épaisseur e et de densité ρ exprimée en nombre d'atomes par unité de volume. En suivant la paramétrisation de la figure 1.1, le potentiel d'interaction entre l'atome et un volume infinitésimal du film situé en B s'écrit :

$$d\mathcal{U}_{AB} = -\frac{C_{AB}\rho dV}{\mathrm{dist}(\mathrm{A},\mathrm{B})^6} = -\frac{C_{AB}\rho r dr d\theta dz}{(z^2+r^2)^3}. \tag{1.2}$$

Il vient alors :

$$\begin{aligned}\mathcal{U}_{AB} &= -C_{AB}\rho \int_d^{d+e} dz \int_0^\infty \frac{2\pi r dr}{(z^2+r^2)^3} \\ &= -C_{AB}\rho\frac{\pi}{6}\left(\frac{1}{d^3} - \frac{1}{(d+e)^3}\right).\end{aligned} \tag{1.3}$$

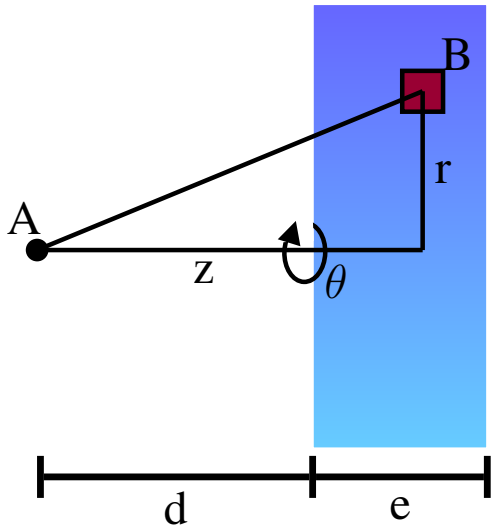


FIGURE 1.1 – Paramétrisation du calcul des interactions de van der Waals entre un atome et un plan.

Intéressons-nous au cas particulier de deux films d'épaisseurs finies e_1 et e_2 séparés d'une distance d. Le calcul, qui ne nécessite qu'une intégration de l'expression

1. A très faible distance, cette approche de sommation par paires fait apparaître des divergences corrigées par l'approche de Lifshitz discutée plus loin.

1.3 sur le deuxième film, donne un potentiel attractif (par unité de surface) [2] :

$$U_{1,2} = -\frac{\pi\rho_1\rho_2 C_{12}}{12}\left(\frac{1}{d^2} - \frac{1}{(d+b_1)^2} - \frac{1}{(d+b_2)^2} + \frac{1}{(d+b_1+b_2)^2}\right). \tag{1.4}$$

Cette équation fait apparaître la constante dite de Hamaker : $H_{12} \equiv \pi^2\rho_1\rho_2 C_{12}$, caractéristique de l'interaction entre les deux objets considérés. Elle a les dimensions d'une énergie et dépend notamment des polarisabilités des matériaux. Sa valeur est de l'ordre de $10^{-21} - 10^{-20}$J pour des membranes phospholipidiques dans de l'eau. Nous reviendrons sur cette "constante" dans la section suivante.

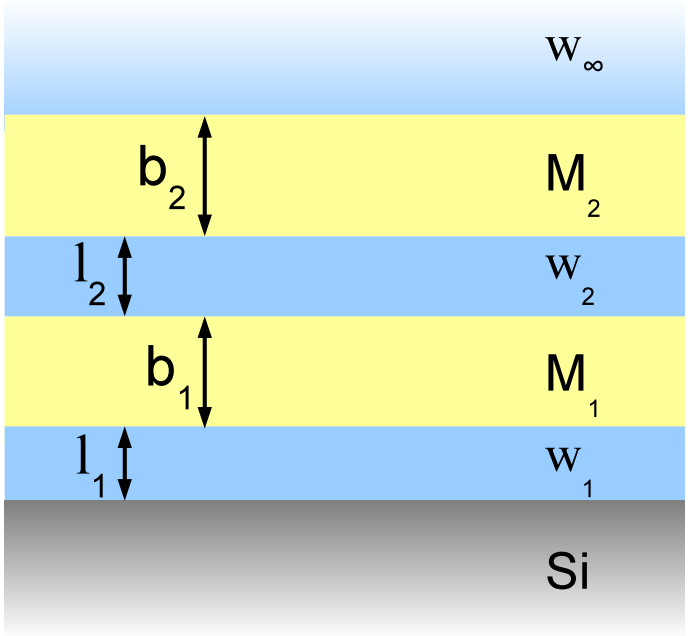


FIGURE 1.2 – Représentation schématique d'une double bicouche supportée pour le calcul du potentiel d'interaction de van der Waals.

Enfin, donnons l'expression des potentiels de van der Waals pour le cas particulier qui nous intéresse (voir la figure 1.2) :

- deux milieux semi-infinis (silicium et eau),
- deux couches M_1 et M_2 représentant les bicouches lipidiques, d'épaisseurs b_1 et b_2,
- et deux couches d'eau, d'épaisseurs l_1 et l_2.

Les têtes des lipides, fortement hydratées, sont incluses dans la couche d'eau.

2. L'ensemble des potentiels d'interactions suivants seront exprimés par unité de surface.

$$
\begin{aligned}
U_{M_1,M_2} &= -\frac{H_{M_1M_2}}{12\pi}\left(\frac{1}{l_2^2}-\frac{1}{(l_2+b_1)^2}-\frac{1}{(l_2+b_2)^2}+\frac{1}{(l_2+b_1+b_2)^2}\right),\\
U_{M_1,Si} &= -\frac{H_{M_1S}}{12\pi}\left(\frac{1}{l_1^2}-\frac{1}{(l_1+b_1)^2}\right),\\
U_{M_2,Si} &= -\frac{H_{M_2S}}{12\pi}\left(\frac{1}{(l_1+b_1+l_2)^2}-\frac{1}{(l_1+b_1+l_2+b_2)^2}\right).
\end{aligned}
\tag{1.5}
$$

Approche de Lifshitz Bien qu'elle donne de bons ordres de grandeur des interactions de van der Waals entre objets macroscopiques, cette approche de sommation par paire présentent néanmoins certaines limitations [76]. Dans les milieux condensés par exemple, les interactions à trois corps et des corrections d'ordres supérieurs doivent être prises en compte. De plus, le calcul de la constante de Hamaker ne traite pas rigoureusement des effets de la fréquence du champ électromagnétique sur la polarisabilité des molécules.
En traitant des interactions électromagnétiques entre des milieux continus, définis par leurs propriétés volumiques plutôt que leurs structures moléculaires, la théorie de Lifshitz est plus générale que la sommation par paire. Elle décrit notamment plus précisément les effets de la fréquence du champ électromagnétique sur le comportement des molécules des différents milieux. Pour une description complète des calculs voir les Réf. [11, 76, 77].

En utilisant la même description de notre système que précédemment (voir la figure 1.2 page ci-contre), la théorie de Lifshitz donne comme potentiel d'interaction inter-bicouche[3] :

$$
\begin{aligned}
U_{M_1,M_2}(l_2,T) = \frac{k_BT}{8\pi l_2^2}\sum_{n=0}^{\infty}{}' \int_{r_n}^{\infty} x\ln\Big[\Big(1-\overline{\Delta}_{Si,w_1}(l_1,b_1)\,\overline{\Delta}_{w_2,w_\infty}(b_2)\,e^{-x}\Big)\\
\times\Big(1-\Delta_{Si,w_1}(l_1,b_1)\,\Delta_{w_2,w_\infty}(b_2)\,e^{-x}\Big)\Big]\,dx.
\end{aligned}
\tag{1.6}
$$

$\overline{\Delta}$ et Δ ont des expressions complexes, qui dépendent des paramètres géométriques (b_i, l_i) et des permittivités diélectriques relatives ϵ_i de chaque milieu (les calculs complets peuvent être trouvés dans la Réf. [76]). r_n est un rapport sans dimension défini par :

$$
r_n = \frac{4\pi l_2 \epsilon_w^{1/2} n k_B T}{c\hbar}. \tag{1.7}
$$

3. Le $'$ sur la somme signifie que le terme en $n = 0$ doit être compté pour moitié.

Pour l_2 de l'ordre de quelques nanomètres $r_n \ll 1$, et les effets de retard dus à la vitesse finie de propagation des ondes électromagnétiques peuvent être négligés.

Pour poursuivre ce calcul il est crucial de décrire correctement les dépendances en fréquences des permittivités diélectriques. L'expression de $\epsilon_i(\omega)$ est donnée par [78]:

$$\epsilon_i(\omega) = 1 + \sum_r \frac{C_r}{1 + j\omega/\omega_r} + \sum_p \frac{C_p}{1 - \omega^2/\omega_p^2 + j\gamma_p\omega/\omega_p^2}. \tag{1.8}$$

Les termes $\omega_{r,p}$ et $C_{r,p}$ désignent respectivement les fréquences et les intensités des pics d'absorption et γ_p les facteurs d'amortissement. La première somme décrit la relaxation dans le domaine des micro-ondes et la seconde les pics d'absorption dans les domaines des ultra-violets et des infrarouges (voir le tableau 1.1). Pour des systèmes composés de lipides dans de l'eau, Ninham et Parsegian [77] ont montré la nécessité d'évaluer correctement toutes les composantes des constantes diélectriques pour analyser les fluctuations du champ électromagnétique. Des expériences d'appareil à force de surface (SFA) ont notamment démontré l'importance des contributions dans les domaines infrarouge et micro-onde [78].

On définit ici une "constante" de Hamaker effective : $\mathcal{H}(l_2, T) = -12\pi l_2^2 U_{M_1,M_2}(l_2, T)$. Pour des épaisseurs d'eau $d_w = l_2 - 2d_{\text{head}}$ plus grandes qu'un nanomètre, les valeurs de la constante de Hamaker effective prédites par la méthode de sommation par paire et celles prédites par la théorie de Lifshitz diffèrent grandement (voir la figure 1.3 page suivante).

Pour les épaisseurs d'eau caractéristiques de nos systèmes ($d_w < 3\,\text{nm}$), les interactions de van der Waals inter-membranaires sont correctement décrites par le potentiel d'interaction de deux demi-espaces semi-infinis [4] :

$$U_{M_1,M_2}(l_2, T) = -\frac{\mathcal{H}(l_2 = 0, T)}{12\pi\,(d_w + 2d_{\text{head}})^2}, \tag{1.9}$$

avec $\mathcal{H}(l_2 = 0, T) = 5.3 \times 10^{-21}\,\text{J}$.

1.1.2 Répulsion d'hydratation

A cette attraction due aux forces de van de Waals s'oppose une force à courte distance nommée répulsion d'hydratation. L'origine exacte de cette force est encore

4. Pour des épaisseurs de membranes classiques $b_1 = b_2 \simeq 5\,\text{nm}$, les termes d'ordre supérieur à $1/(d + b_i)^2$ sont négligeables.

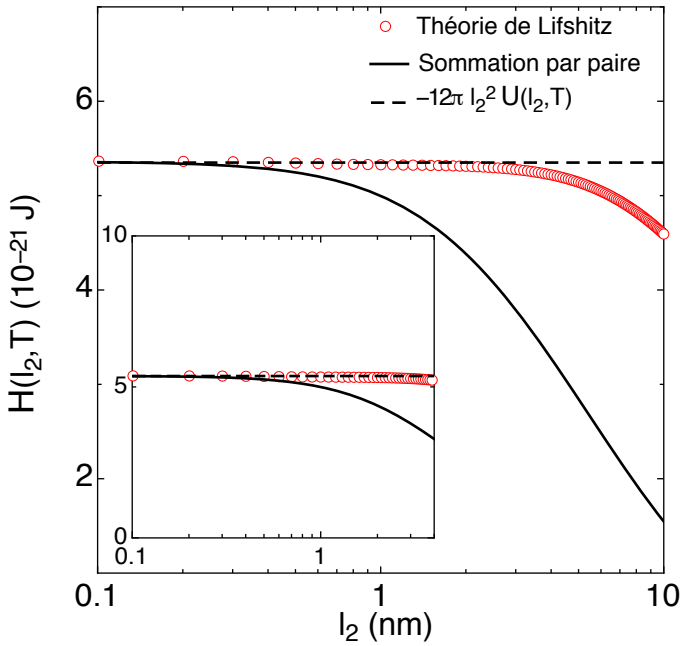


FIGURE 1.3 – Constante de Hamaker effective $\mathcal{H}(l_2, T)$ en fonction de l_2 pour une double bicouche supportée. La sommation par paire tend à sous-estimer l'intensité des interactions de van der Waals pour $l_2 > 1\,\text{nm}$. En pointillés, constante de Hamaker effective pour un potentiel de la forme $U(l_2, T) = -\mathcal{H}(l_2 = 0, T)/12\pi l_2^2$. En insert, zoom sur la zone intéressante pour nos expériences.

		Micro-onde		Infrarouge			Ultraviolet		
	$\epsilon(0)$	ω_{MW} [10^{11} rad·s^{-1}]	C_{MW}	ω_{IR} [10^{14} rad·s^{-1}]	C_{IR}	γ_{IR} [10^{13} rad·s^{-1}]	ω_{UV} [10^{16} rad·s^{-1}]	C_{UV}	γ_{UV} [10^{15} rad·s^{-1}]
Silicium	11.6			0.345	0.043	0	0.503	10.448	0
				0.535	0.050	0			
				0.884	0.059	0			
Eau	80.1	1.083	75.3	0.314	1.4635	2.29	1.2593	0.0392	0.774
				1.047	0.7368	5.78	1.5172	0.0570	1.335
				1.396	0.1526	4.22	1.7296	0.0923	2.336
				3.065	0.0136	3.81	1.9724	0.1556	3.110
				6.450	0.0751	8.54	2.2606	0.1522	4.491
							2.8068	0.2711	9.498
Alcanes	2.014			5.54	0.025	0	1.848	1.026	0

TABLE 1.1 – Valeurs des constantes utilisées pour le calcul de la constante diélectrique $\epsilon(\omega)$ du silicium [79], de l'eau [78] et des alcanes [80].

sujette à débat, malgré une activité récente intense sur les plans théoriques [81, 82] et numériques [83, 84, 85]. Des expériences menées sur des empilements de membranes auxquels une pression osmotique est appliquée (voir le paragraphe 1.1.4 page 70)

[9], ainsi que des mesures par SFA [86], ont permis de déterminer l'intensité de cette répulsion en fonction de l'épaisseur d'eau entre les membranes. Il est aujourd'hui établi que le potentiel d'hydratation peut être décrit par une exponentielle décroissante avec une longueur caractéristique z_h de quelques Angströms :

$$U_{\mathrm{hyd}}(z) = P_h z_h \exp\left(-\frac{z}{z_h}\right). \tag{1.10}$$

Typiquement, pour des bicouches phospholipidiques : $P_h \sim 10^7\,\mathrm{Pa}$ et $z_h \sim 0.2\,\mathrm{nm}$.

La répulsion d'hydratation est d'une importance cruciale dans les systèmes biologiques, assurant la lubrification nécessaire à leur fonctionnement. Attardons nous quelques instants sur les récentes avancées dans l'étude des caractéristiques de cette force. Comme son nom l'indique, la répulsion d'hydratation a pour origine l'hydratation des têtes des lipides de la bicouche. Le caractère hydrophile des têtes les lie à un nombre important de molécules d'eau, les ordonnant même sur une distance de plusieurs Angströms. Ce qu'on appelle toujours répulsion d'hydratation semble être la combinaison d'interactions directes attractives et indirectes répulsives dues à cette orientation locale des molécules d'eau. Chacune de ces interactions se décomposant elle-mêmes en une contribution enthalpique et une autre entropique.

Cette complexité explique les résultats parfois contradictoires des nombreuses études théoriques et numériques des origines de la répulsion d'hydratation. Il faut en effet traiter de la manière la plus précise possible des interactions complexes entre les molécules d'eau. Pour palier à cette difficulté, la plupart des études théoriques se concentrent sur des parties limitées et supposées indépendantes de ce problème, comme les interactions entre molécules d'eau et têtes de lipides ou les corrélations entre molécules d'eau elles-mêmes [81, 82]. De même, les simulations numériques sont limitées par le traitement coûteux en temps de calcul des molécules d'eau.

Récemment, Schneck et Netz [87] ont proposé une interprétation de la répulsion d'hydratation, basée sur des simulations numériques avec un modèle réaliste d'eau et de lipides. A grande séparation, les bicouches sont totalement hydratées et la répulsion est due aux interactions entre les couches de molécules d'eau polarisées par la surface. Cet effet serait universel et indépendant de la nature des surfaces étudiées, à condition qu'elles soient suffisamment hydratées.

A faible séparation ($\sim 5\,\text{Å}$), les couches d'hydratation des têtes commencent à se recouvrir et interagissent directement. Les molécules d'eau sont fortement liées aux têtes, et le coût énergétique nécessaire pour les retirer contribue grandement à la répulsion à courte distance.

Il a été considéré pendant longtemps que la répulsion stérique due aux modes de

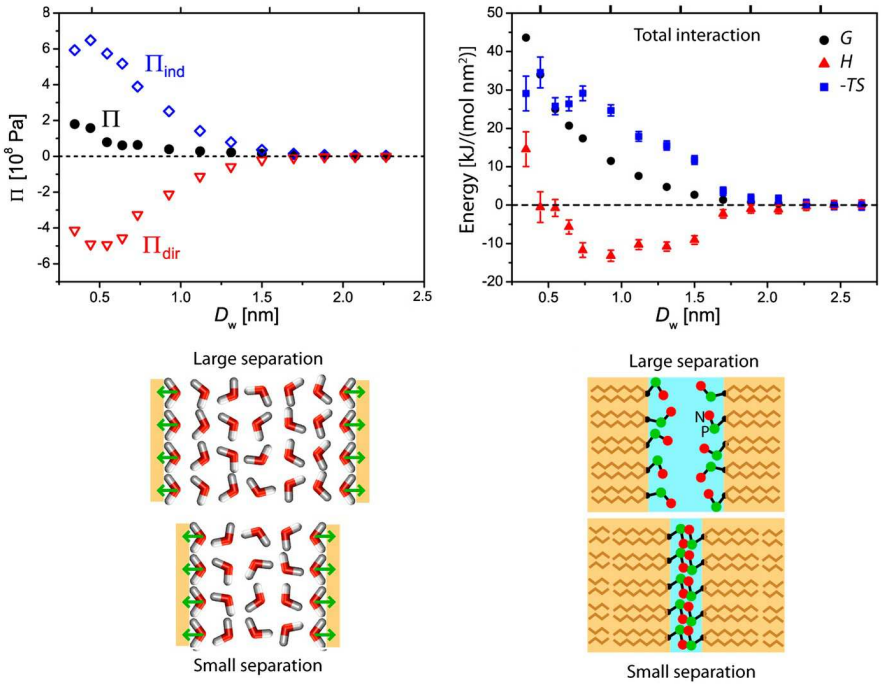


FIGURE 1.4 – En haut, à gauche : contribution directe attractive Π_{dir} et contribution indirecte répulsive Π_{ind} de la pression totale Π. En haut, à droite : énergie libre totale d'interaction G décomposée en une partie enthalpique H et une partie entropique $-TS$. En bas, à gauche : représentation schématique de l'ordre induit par la couche de molécules d'eau liées aux têtes. En bas, à droite : représentation schématique de la réorganisation des têtes à faible épaisseur d'eau. D'après [85].

protrusion jouait un rôle prépondérant en augmentant la répulsion à courte portée [88]. Les travaux récents de Schneck et Netz [87] montrent que la contribution des têtes des lipides n'est pas liée aux collisions dues au modes de protrusion. Il faut considérer les interactions complexes entre les dipôles électrostatiques formés par les groupements azote et phosphate des têtes en regard (voir la figure 1.4). Ces interactions induisent une réorganisation des têtes dans les bicouches et réduit de fait leur entropie configurationnelle à courte distance. A cette répulsion d'origine entropique s'ajoute une attraction d'origine enthalpique, due à l'attraction coulombienne entre les dipôles orientés favorablement au fur et à mesure de la déshydratation des têtes.

La répulsion à courte distance serait donc le résultat d'une balance entre une forte contribution attractive et une forte contribution répulsive, qui, dans le cas des membranes de phospholipides, aboutit à une répulsion exponentielle. Ces contribu-

tions étant chacune spécifique à la nature des lipides, le caractère universel de la répulsion d'hydratation est aujourd'hui sujet à débat.

1.1.3 Contribution électrostatique

Intéressons nous à présent aux interactions électrostatiques dans nos systèmes. Comme nous le verrons plus loin, les interactions électrostatiques entre membranes peuvent apporter une contribution non négligeable au potentiel d'interaction. Avant de donner les expressions des potentiels d'interactions électrostatiques, nous devons tout d'abord introduire trois longueurs caractéristiques des interactions électrostatiques en solution aqueuse.

Longueur de Bjerrum Calculons l'énergie potentielle électrostatique entre deux ions monovalents identiques et isolés, séparés d'une distance r, en solution dans l'eau :

$$U_{\mathrm{p,elec}}(r) \equiv eV(r) = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_w r},$$

où $V(r)$ désigne le potentiel électrostatique.

$$U_{\mathrm{p,elec}}(\ell_B) = k_B T \Rightarrow \ell_B = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_w k_B T}. \tag{1.11}$$

ℓ_B est nommée longueur de Bjerrum, vaut 7 Å dans l'eau à 20 °C, et correspond à la distance à laquelle l'énergie électrostatique égale celle d'agitation thermique.

Longueur de Debye-Hückel On considère à présent le cas d'un soluté chargé dissous dans de l'eau. Ce soluté est composé d'ions d'espèces i ($i = 1...A$, A étant le nombre d'espèce ionique), portant la charge q_i (q_i pouvant être positif ou négatif) en nombre $n_{i,0}$ par unité de volume.

Nous faisons l'hypothèse que l'énergie électrostatique entre deux charges $q^2/(4\pi\varepsilon_w d)$ est très petite devant $k_B T$. La distance moyenne entre deux charges étant donnée par $1/n_{i,0}^{1/3}$, on a donc la condition suivante sur la densité :

$$n_{i,0} \ll \left(\frac{4\pi\varepsilon_w k_B T}{q^2}\right)^3. \tag{1.12}$$

Si la solution était homogène à toutes les échelles, et les concentrations en électrolytes uniformes, l'énergie électrostatique totale serait nulle et le système se comporterait comme un gaz parfait. Or, un ion donné modifie la distribution de charge

autour de lui en attirant préférentiellement les charges de signe opposé.

Pour décrire ce nuage créé autour d'un ion donné, déterminons le potentiel électrostatique $\Phi(\mathbf{r})$ autour de lui. On suppose que celui ci ne dépend que de la distance à l'ion (symétrie sphérique), avec $\Phi(r \to +\infty) = 0$. La distribution des ions d'espèce i suit alors la distribution de Boltzmann :

$$n_i(r) = n_{i,0} e^{-\frac{q_i \Phi(r)}{k_B T}}, \tag{1.13}$$

et la densité volumique de charge dans le milieu s'écrit :

$$\rho(r) = \sum_i n_{i,0} q_i e^{-\frac{q_i \Phi(r)}{k_B T}}. \tag{1.14}$$

D'autre part, le potentiel dans la solution satisfait l'équation de Maxwell-Gauss :

$$\Delta\Phi(r) = -\frac{\rho(r)}{\varepsilon_w} = -\sum_i \frac{n_{i,0} q_i}{\varepsilon_w} e^{-\frac{q_i \Phi(r)}{k_B T}}. \tag{1.15}$$

Dans l'approximation de faible densité 1.12, il est possible de linéariser cette équation, on obtient alors en utilisant la condition d'électroneutralité $\sum q_i n_{i,0} = 0$:

$$\Delta\Phi(r) + \frac{1}{\varepsilon_w k_B T} \left(\sum_i n_{i,0} q_i^2 \right) \Phi(r) = 0 \tag{1.16}$$

Il apparaît une longueur caractéristique nommée longueur de Debye-Hückel et notée ℓ_D par la suite, qui s'exprime comme :

$$\ell_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_w k_B T}{\sum_i n_{i,0} q_i^2}}. \tag{1.17}$$

Dans le cas où seuls deux types d'ions de valence z sont présents, on retrouve l'expression classique :

$$\ell_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_w k_B T}{2 n_0 z^2 e^2}}. \tag{1.18}$$

On peut alors résoudre l'équation de Maxwell-Boltzmann pour obtenir le potentiel au voisinage d'un ion j. On obtient :

$$\Phi(r) = \frac{q_j}{4\pi\varepsilon_w r} e^{-r/\ell_D}. \tag{1.19}$$

Le potentiel électrostatique se comporte comme celui d'une charge isolée quand $r \to 0 : \Phi(r) \sim q_j / (4\pi\varepsilon_w r)$. Lorsque l'on s'éloigne de la charge centrale, le potentiel est écranté par le nuage d'ions de charges de signe opposé et décroit exponentiellement sur une distance caractéristique ℓ_D.

La longueur de Debye-Hückel peut donc s'interpréter grâce à cet exemple comme étant la distance entre deux ions dans une solution chargée à partir de laquelle les effets de l'agitation thermique deviennent comparables à ceux de l'interaction électrostatique. Elle vaut $\ell_D = 960\,\text{nm}$ dans l'eau pure (pH=7 à 20 °C).

Cette hypothèse d'eau pure au pH neutre et constant n'est pas valide pour nos systèmes. En effet, au contact de l'air la dissolution du CO_2 dans l'eau mène rapidement à un pH $\simeq 5.5 - 6$, et une longueur de Debye-Hückel $\ell_D \simeq 200\,\text{nm}$ est plus réaliste [89]. Enfin il est intéressant, et pratique, de noter que $\ell_D \approx 0.3\,\text{nm}/\sqrt{c_0(\text{mol/L})}$ pour un sel monovalent dans de l'eau à température ambiante.

Longueur de Gouy-Chapman La définition exacte de la longueur de Gouy-Chapman apparait naturellement dans la résolution analytique de l'équation de Poisson-Boltzmann, à laquelle nous préférons un exemple physique simple.

Une membrane plongée dans l'eau va acquérir une charge de surface plus ou moins forte, due à la dissociation des têtes des phospholipides. Considérons une surface dans de l'eau, portant une densité surfacique de charge uniforme σ_0. Par application directe du théorème de Gauss, le champ local s'écrit $E_S = \sigma_0/2\varepsilon_w$ et :

$$U_{\text{p,elec}}(\ell_G) \sim k_B T \Rightarrow \ell_G = \frac{2\varepsilon_w k_B T}{\sigma_0 e}. \tag{1.20}$$

La longueur de Gouy-Chapman ℓ_G représente la distance limite pour laquelle les effets du champ local de la surface sont comparables aux effets de l'agitation thermique. La majorité des contres-ions sera donc située dans une zone d'épaisseur $\simeq \ell_G$. Pour de la silice de densité surfacique $\sigma_0 = 2.5\,\text{mC}\cdot\text{m}^{-2}$, plongée dans de l'eau à pH = 7 à 20 °C, on obtient $\ell_G = 14.2\,\text{nm}$.

Potentiel d'interaction électrostatique Intéressons nous à présent aux interactions électrostatiques dans le cas particulier de notre système de double bicouche supportée. Dans la limite des potentiels électrostatiques suffisamment faibles où les corrélations entre ions peuvent être négligés, le potentiel d'interaction entre deux membranes planes et rigides s'obtient par résolution de l'équation de Poisson-Boltzman [90]. Cette équation de champ moyen se résout différemment selon le régime dans lequel le système considéré se trouve, dont les longueurs caractéristiques

ℓ_D et ℓ_G introduites précédemment permettent de définir les limites (voir la figure 1.5). Nous verrons dans la partie V que cette théorie n'est plus adaptée pour décrire des membranes fortement chargées.

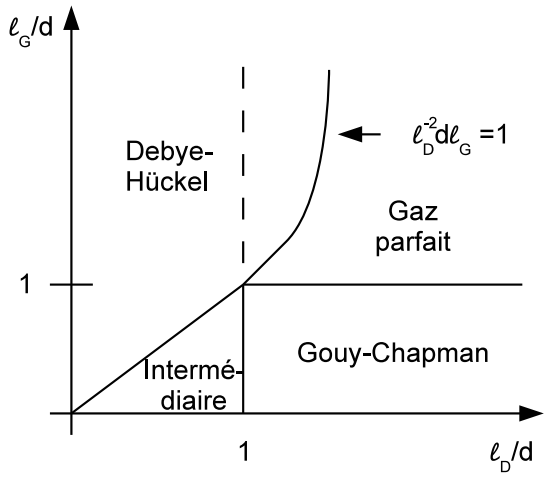


FIGURE 1.5 – Délimitations des différentes zones pour la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann (d'après [90]).

Considérons dans un premier temps le cas de bicouches composées uniquement de phospholipides zwitterioniques (DSPC), dont la faible charge de surface n'est due qu'à la dissociation des têtes dans l'eau. Avec $\sigma_0 = 0.001\,\mathrm{e{\cdot}nm^{-2}}$ (voir la section 2.3.2 page 93) et $d_w = 2.5\,\mathrm{nm}$, nous obtenons $\ell_G/d_w \simeq 90$ et $\ell_D/d_w \simeq 80$. Nous sommes donc, d'après la figure 1.5, dans le régime du gaz parfait. Dans ce régime, le potentiel électrostatique est dominé par l'entropie des contre-ions, plutôt que par leur charge. La résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann nous donne comme potentiel intermembranaire [90] :

$$U_{\mathrm{el,GP}}(z) = \frac{k_B T}{\pi \ell_G \ell_B} \ln(z). \tag{1.21}$$

Ce potentiel, négligeable devant les autres contributions au potentiel total à faible épaisseur d'eau, devient prédominant pour des distances $z \gtrsim 2.5\,\mathrm{nm}$.

Pour finir, étudions le même cas mais dans une solution saline d'ions monovalents de concentration c_0, exprimée en $\mathrm{mol{\cdot}L^{-1}}$. L'adjonction de sel diminue la valeur de la longueur de Debye-Hückel, sans changer celle de Gouy-Chapman. La limite en deçà de laquelle l'équation de Poisson-Boltzmann se résout dans le régime de Debye-Hückel est donnée par l'équation $l_{D,\mathrm{lim}}^2 = d_w \ell_G$, ce qui se traduit par la concentration

limite :

$$c_{0,\mathrm{lim}} = \frac{1}{8 \cdot 10^3 \pi d_w \mathcal{N}_A \ell_G \ell_B}. \tag{1.22}$$

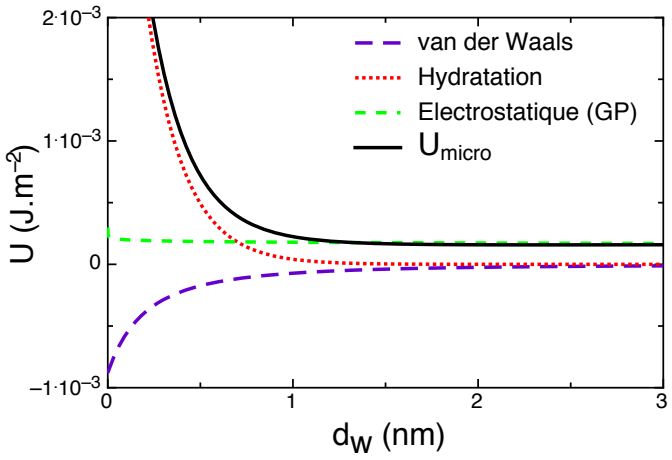


FIGURE 1.6 – Différentes contributions au potentiel d'interaction microscopique $U_{\mathrm{micro}} = U_{\mathrm{vdW}} + U_{\mathrm{hyd}} + U_{\mathrm{elec,GP}}$, prises pour $\mathcal{H}(l_2 = 0, T) = 5.3 \times 10^{-21}$ J, $\sigma_0 = 0.001\,\mathrm{e{\cdot}nm^{-2}}$, $P_h = 3 \times 10^7$ Pa et $z_h = 0.2$ nm.

Des valeurs caractéristiques de nos systèmes donnent $c_{0,\mathrm{lim}} \simeq 0.2\,\mathrm{mmol{\cdot}L^{-1}}$. Pour $c_0 > c_{0,\mathrm{lim}}$, le potentiel s'écrit [90] :

$$U_{\mathrm{el,DH}}(z) = \frac{k_B T \ell_D}{\pi \ell_G^2 \ell_B} \left(\coth\left(\frac{z}{2\ell_D}\right) - 1 \right). \tag{1.23}$$

A noter que dans les régimes où l'équation de Poisson-Boltzmann est valide les interactions entre surfaces chargées de même signe sont toujours répulsives. Nous verrons que cela n'est plus le cas lorsque les corrélations entre ions ne sont plus négligeables.

1.1.4 Pression osmotique

Il est possible d'appliquer une pression osmotique aux membranes en ajoutant un polymère hydrosoluble au solvant. Cette technique, très employée sur des systèmes multilamellaires pour mesurer leur compressibilité, n'avait à notre connaissance jamais été utilisée sur des doubles bicouches supportées. La relation entre la

concentration en polymère et la pression osmotique exercée Π est déduite de calculs de Vink [91], reportés dans la Réf. [92]. Le potentiel a comme expression :

$$U_{\text{osmo}}(z) = \Pi z. \tag{1.24}$$

Pour atteindre une distance inter-membranaire $\sim 1.5\,\text{nm}$, des pressions de l'ordre de $\Pi \simeq 500\,\text{kPa}$, soit environ 5 atmosphères, seront nécessaires.

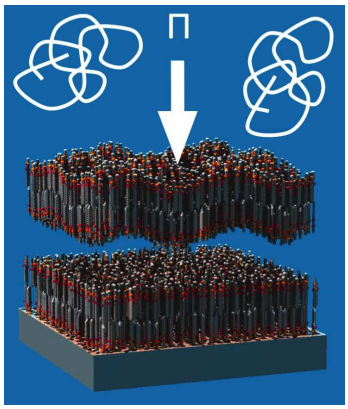


FIGURE 1.7 – Représentation schématique de l'application d'une pression osmotique par un polymère hydrosoluble.

D'autres méthodes sont possibles pour appliquer une pression plus importante sur un empilement de bicouches [93]. Il est par exemple possible d'appliquer directement une pression hydraulique au système dans une cellule où l'eau peut s'évacuer par une membrane semi-perméable ($6 \lesssim \Pi \lesssim 500\,\text{atm}$), ou de placer une solution saline dans la même cellule isolée que l'empilement, la pression partielle de la vapeur résultante étant plus basse que la pression de vapeur de l'eau pure, l'épaisseur d'eau inter-membranaire va diminuer pour atteindre l'équilibre des potentiels chimiques ($225 \lesssim \Pi \lesssim 1500\,\text{atm}$).

1.2 Interactions d'origine entropique

Que ce soient dans l'étude de systèmes biologiques ou de systèmes modèles, les membranes fluctuent et sont généralement à proximité de membranes voisines. Le confinement imposé par le substrat et/ou par les bicouches avoisinantes limite l'extension spatiale des fluctuations thermiques, et modifie de ce fait les interactions

entre une membrane et son environnement. Dans une description simplifiée ne prenant en compte que des interactions de volume exclu, une membrane "touche" ses voisines en fluctuant, et de ces "chocs" résultent une répulsion. Aux interactions moléculaires "directes"[5] s'ajoute donc une contribution due au confinement. Une description de cette contribution entropique adaptée aux empilements de membranes phospholipidiques nécessitent la prise en compte des interactions microscopiques, ce dont nous discutons par la suite. La répulsion d'origine entropique peut empêcher l'adhésion d'une vésicule sur un substrat [94], et pourrait avoir un rôle dans les interactions entre les cellules et leur environnement [95].

Savoir quelle méthode est la plus adaptée pour décrire les interactions issues des fluctuations est un problème complexe de physique statistique étudié depuis plus de 40 ans. De nombreuses approches ont été développées pour décrire les fluctuations d'une membrane confinée [96] : simulations Monte-Carlo [97], théorie de Flory [98], utilisation du groupe de renormalisation [99], calcul numérique auto-cohérent [100], etc ... Nous discuterons ici de plusieurs potentiels effectifs utilisés pour décrire les interactions d'origine entropique, puis de la théorie auto-cohérente développée par Mecke et al. [101], et nous évoquerons pour finir l'approche variationnelle développée par Manghi et Destainville [102].

1.2.1 Détermination du potentiel effectif

Interactions de type murs durs C'est W. Helfrich qui, le premier [103], décrivit les effets de cette force en considérant une membrane fluctuante entre deux murs. Pour obtenir une expression analytique du potentiel effectif par une approche semblable à celle d'Helfrich, nous émettons certaines hypothèses que nous discuterons par la suite :

1. les interactions entre la membrane et les murs sont de type "murs durs", i.e. la membrane ne "sent" le mur que lorsqu'elle le touche,
2. la tension de surface de la membrane est négligeable, si bien que son spectre de fluctuation s'écrit : $\left\langle |h_{\mathbf{q}}|^2 \right\rangle = k_B T/\kappa q^4$,
3. la membrane est décrite comme une mosaïque de domaines, séparés d'une distance $\xi_{\|}$ définie comme étant la distance caractéristique entre deux chocs (voir la figure 1.8 page suivante),
4. chaque choc entre la membrane et la paroi décorrèle les domaines,
5. l'amplitude des fluctuations σ fixe la distance entre les parois d.

5. Comme nous l'avons vu, des contributions entropiques interviennent dans l'expression des potentiels d'interactions microscopiques.

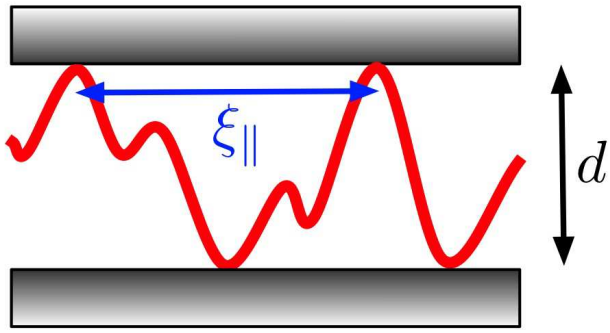


FIGURE 1.8 – Schéma du système considéré par Helfrich dans son calcul du potentiel entropique : une membrane fluctuante entre deux murs durs séparés d'une distance d. La distance caractéristique entre deux chocs $\xi_{\|}$ définit la longueur de coupure des corrélations de la membrane.

La membrane est donc décrite comme une collection de domaines indépendants [6] d'aire moyenne $\xi_{\|}^2$.

L'amplitude des fluctuations σ est liée au spectre par la relation :

$$\sigma^2 = \int d\mathbf{q} \left\langle |h_{\mathbf{q}}|^2 \right\rangle, \tag{1.25}$$

soit :

$$\sigma^2 = \frac{2\pi k_B T}{\kappa} \int_{q_{min}}^{+\infty} \frac{dq}{q^3}. \tag{1.26}$$

Le plus petit vecteur d'onde à prendre en compte dans cet exemple est celui correspondant à la longueur de corrélation : $q_{min} = 2\pi/\xi_{\|}$. On obtient donc :

$$d^2 \sim \sigma^2 \sim \frac{k_B T}{\kappa} \xi_{\|}^2. \tag{1.27}$$

Exprimons cette longueur $\xi_{\|}$ en fonction des paramètres du système. La courbure moyenne de la membrane est de $1/R \sim d/\xi_{\|}^2$, et l'énergie élastique (partie enthalpique du potentiel) s'écrit par unité de surface :

$$\Delta\mathcal{E} \sim \frac{\kappa}{R^2} \sim \frac{(k_B T)^2}{\kappa d^2}. \tag{1.28}$$

6. On remarquera la correspondance entre ce modèle et celui du gaz parfait.

Chaque morceau apporte une contribution (toujours par unité de surface) $-T\Delta S = k_B T/\xi_\parallel^2$ à la partie entropique du potentiel. Pour conclure :

$$\begin{aligned} U_{\text{Helfrich}}(z) =& \Delta\mathcal{E} - T\Delta S \\ =& c_H \frac{(k_B T)^2}{\kappa z^2}, \end{aligned} \tag{1.29}$$

où c_H est un facteur sans dimension dont la valeur est encore aujourd'hui sujette à discussion. Dans son calcul initial Helfrich estimait le coefficient c_H à $3\pi^2/128 \simeq 0.231$. Un certain nombre de simulations Monte-Carlo ont depuis donné des valeurs plus petites de c_H : $c_H = 0.116 \pm 0.002$ [97], $c_H = 0.106$ [104], $c_H = 0.101 \pm 0.002$ [105] ... Mecke et al. [101] donne une valeur $c_H = 0.08$ encore plus petite par calcul auto-cohérent (voir la section 1.2.2 page 76). De la même manière, l'influence sur la valeur de c_H du nombre de membranes [97], ainsi que de la perte de symétrie dans le cas d'une bicouche supportée [106], n'est pas parfaitement établie.

Des expériences de diffusion de rayons X sur des systèmes multilamellaires de faible rigidité de courbure $\kappa \sim k_B T$, donc aux fluctuations très importantes, ont permis de mettre en évidence la répulsion stérique entre membranes [107]. L'étude des pics de diffraction de ces systèmes quaternaires de tensioactifs (SDS/pentanol), d'alcanes (dodécane) et d'eau pour différentes valeurs du pas smectique a permis de vérifier la validité du potentiel de répulsion entropique de type murs durs, et, fait surprenant, pour une valeur de c_H proche de celle prédite initialement par Helfrich.

On comprend bien la nécessité d'expériences supplémentaires sur des systèmes modèles pour décrire les effets du confinements. Comme nous le verrons plus loin, le potentiel effectif de Helfrich n'est pas adapté à nos systèmes, et nous devons intégrer d'autres effets pour établir un potentiel réaliste.

Prise en compte de la tension de surface Dans l'établissement du potentiel de Helfrich nous avons supposé que les effets de la tension γ de la membrane étaient négligeables devant ceux de la courbure κ. L'introduction d'un terme de type γq^2 dans le spectre de fluctuation ne permet plus le calcul analytique du potentiel entropique. Néanmoins, une approche phénoménologique menée par Seifert [108] permet d'obtenir un potentiel tenant compte de γ :

$$U_{\text{Seifert}}(z) = \frac{6c_S^2 (k_B T)^2}{\kappa z^2} \frac{y^2}{\sinh^2(y)} \text{ avec } y = \frac{z}{2}\sqrt{\frac{\gamma}{c_S k_B T}}, \tag{1.30}$$

où $c_S = \sqrt{c_H/6}$. On remarque que pour $\gamma \to 0$:

$$U_{\text{Seifert}}(z) \underset{\gamma\to 0}{\sim} U_{\text{Helfrich}}(z). \tag{1.31}$$

Avec $z = 2.2\,\mathrm{nm}$ et $\gamma = 0.1\,\mathrm{mN{\cdot}m^{-1}}$, valeurs typiques pour notre bicouche flottante, on obtient $y^2/\sinh^2(y) \simeq 0.93$ et $U_{\mathrm{Seifert}}(z) \sim U_{\mathrm{Helfrich}}(z)$. Nous ne considérerons donc pas les effets de tension de surface sur le potentiel entropique dans l'interprétation de nos résultats.

Potentiel "soft" Lors de l'étude des interactions microscopiques nous avons vu que deux membranes proches l'une de l'autre subissent une répulsion d'une portée de l'ordre de plusieurs Angströms. La présence de cette force contredit l'hypothèse selon laquelle les interactions sont de type murs durs : la membrane "sent" le mur par l'intermédiaire de la répulsion d'hydratation, avant de le toucher.

Une description réaliste des interactions d'origine entropique doit donc intégrer les effets, eux même d'origines enthalpiques et entropiques, de la répulsion d'hydratation. Des calculs auto-cohérents [28, 100, 109] donnent comme renormalisation du potentiel, pour $\gamma \sim 0$ uniquement :

$$U_{\mathrm{soft}}(z) = \frac{\pi k_B T}{16}\sqrt{\frac{P_h}{\kappa z_h}}\exp\left(-\frac{z}{n z_h}\right), \tag{1.32}$$

où z_h et P_h sont définis dans l'équation 1.10 page 64.
n est un nombre sans dimension qui définit la longueur caractéristique de l'exponentielle. Les calculs auto-cohérents originaux prédisent une valeur $n = 2$, tandis que les expériences sur des empilements multilamellaires de Petrache et al. [9], de même que la théorie auto-cohérente développée par Mecke et al. [101] (voir la section 1.2.2 page suivante), montrent qu'une valeur plus élevée $n \simeq 2.4$ est plus réaliste.

Le potentiel ainsi obtenu est plus "mou" que le potentiel de Helfrich (voir la figure 1.9 page suivante).

Discussion sur la renormalisation du potentiel Il est donc possible, et comme nous le verrons plus loin nécessaire, de prendre en considération les effets de la répulsion d'hydratation dans l'expression du potentiel entropique. Qu'en est-il des autres contributions enthalpiques ?

Les interactions de van der Waals ont été prises en compte par Podgornik et Parsegian [100] mais donnent un potentiel complexe, dont certains paramètres doivent être calculés numériquement au cas par cas. Petrache et al. [9] ont montré expérimentalement qu'un potentiel effectif de type "soft", sans renormalisation des interactions de van der Waals, est suffisant pour décrire correctement les interactions entropiques dans les systèmes multilamellaires. A notre connaissance, aucune étude théorique récente sur le sujet n'a été menée.

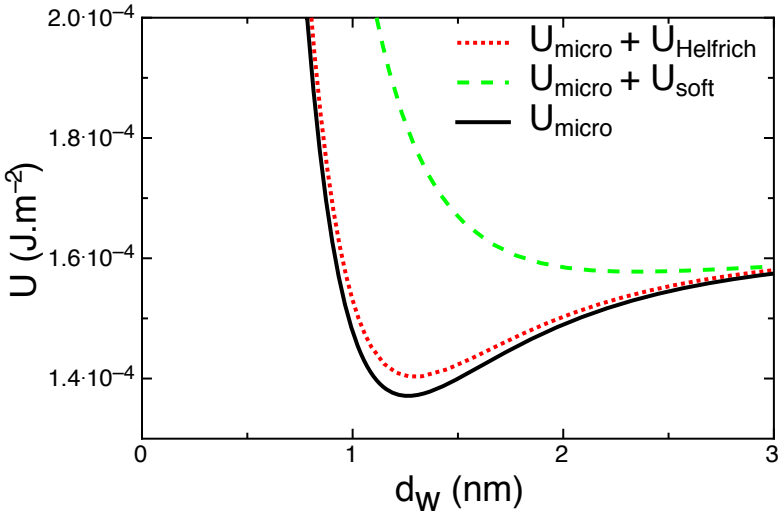


FIGURE 1.9 – Effets du potentiel "soft" et de Helfrich sur le potentiel d'interaction total avec les valeurs des paramètres de la figure 1.6 page 70, $\kappa = 70\,\mathrm{k_B T}$ et $c_H = 0.08$.

Les mêmes questions se posent pour les interactions d'origine électrostatique. Faut-il nécessairement les inclure dans la renormalisation du potentiel entropique ? Bien qu'à nouveau cette question n'ait pas été étudiée en détail, ces interactions de très longue portée ne devrait être renormalisées que marginalement.
En effet, D. Andelman montre dans la Réf. [90] que si la longueur de corrélation électrostatique dans le plan $\xi_{\parallel}^*$ est grande devant la séparation entre les membranes, les interactions électrostatiques peuvent être négligées devant les interactions d'origine entropique[7]. L'expression de cette longueur est, dans le régime du gaz idéal :

$$\xi_{\parallel}^* = \left(\frac{\pi \ell_B \ell_D \kappa}{k_B T}\right)^{1/4} d_w^{1/2}. \tag{1.33}$$

Dans nos systèmes $\xi_{\parallel}^*$ est comprise entre 50 nm et 100 nm, nous supposons donc qu'il n'est pas nécessaire de tenir compte des interactions électrostatiques dans la renormalisation du potentiel.

1.2.2 Théorie auto-cohérente

Nous venons de voir qu'un certain nombre de méthodes permettent d'obtenir des potentiels effectifs U_{fluc} adaptés à diverses configurations : le potentiel U_{Helfrich} pour

7. En l'absence de forces de van der Waals et d'hydratation.

décrire les interactions de type “murs durs”, celui de Seifert U_{Seifert} lorsque les effets de la tension de surface ne sont plus négligeables, et enfin U_{soft} pour prendre en compte les effets de la répulsion d"hydratation. On obtient le potentiel d'interaction total entre une membrane et son environnement simplement en sommant le potentiel microscopique U_{micro} et le potentiel effectif U_{fluc} : $U_{\text{tot}} = U_{\text{micro}} + U_{\text{fluc}}$. La position d'équilibre du système d_w est donnée par le minimum de U_{tot}, et sa dérivée seconde prise à la position d'équilibre donne sa courbure $U''_{\text{tot}}(d_w)$.

La théorie auto-cohérente développée par Mecke et al. [101] est une alternative aux théories de potentiel effectif. En considérant les fluctuations de position d'une membrane près d'un substrat dans le régime des faibles fluctuations, i.e. loin de la transition de décollement (*unbinding transition*), elle permet de calculer différentes quantités comme :

- une fonction de partition $\mathcal{Z}$ de la membrane,
- la distance moyenne membrane-substrat d_w,
- l'amplitude des fluctuations thermiques *rms* σ_{th},
- et la valeur moyenne de la dérivée seconde du potentiel extérieur $\langle U'' \rangle$.

$$\begin{aligned}
\mathcal{Z}_{\mathcal{SC}} &= \int dz \exp\left(-\frac{16\kappa\sigma_{th}^2}{(k_BT)^2}U(z) - \frac{3\,(z-d_w)^2}{8\sigma_{th}^2}\right), \\
d_w &= \langle z \rangle = \frac{1}{\mathcal{Z}}\int dz z \exp\left(-\frac{16\kappa\sigma_{th}^2}{(k_BT)^2}U(z) - \frac{3\,(z-d_w)^2}{8\sigma_{th}^2}\right), \\
\sigma_{th}^2 &= \langle (z-d_w)^2 \rangle = \frac{1}{\mathcal{Z}}\int dz\,(z-d_w)^2 \exp\left(-\frac{16\kappa\sigma_{th}^2}{(k_BT)^2}U(z) - \frac{3\,(z-d_w)^2}{8\sigma_{th}^2}\right), \\
\langle U'' \rangle &= \frac{1}{\mathcal{Z}}\int dz U''(z) \exp\left(-\frac{16\kappa\sigma_{th}^2}{(k_BT)^2}U(z) - \frac{3\,(z-d_w)^2}{8\sigma_{th}^2}\right). \qquad (1.34)
\end{aligned}$$

$U(z)$ désigne ici le potentiel microscopique, pouvant être symétrique ou non. L'hypothèse majeure sous-jacente à l'obtention de la fonction de partition est qu'il est possible de traiter indépendamment les fluctuations de courtes longueurs d'onde dans l'espace réciproque, et les fluctuations de grandes longueurs d'onde dans l'espace réel.

Ces équations peuvent être résolues de façon analytique pour quelques potentiels simples, permettant ainsi une comparaison directe avec les théories de potentiel effectif.

Membrane entre deux murs durs En utilisant un potentiel d'expression :

$$\begin{cases} U(z) = 0, & \text{pour } -d < z < +d, \\ U(z) = cste, & \text{sinon}, \end{cases} \tag{1.35}$$

il est possible de résoudre analytiquement les équations 1.34. Imposer la contrainte $\sigma^2 = \mu d^2$ permet une détermination auto-cohérente de c_H et donne la valeur $c_H = 0.08$, en accord avec certaines simulations Monte-Carlo [110].

Potentiel linéaire L'exemple d'un potentiel linéaire de la forme $U(z) = Pz$ où P a les dimensions d'une pression est intéressant, car il s'agit là d'un premier potentiel asymétrique simple déjà traité par d'autres méthodes [4]. La résolution analytique des équations auto-cohérentes donne :

$$\sigma_{th} \sim P^{-1/3}, \tag{1.36}$$

résultat en excellent accord avec ceux obtenus par simulations numériques [97].

Transition entre un potentiel "soft" et un potentiel de type murs durs Nous avons vu que le potentiel de Seifert (équation 1.30 page 74) redonne l'expression du potentiel de Helfrich lorsque la tension de surface γ tend vers 0. L'expression analytique du potentiel "soft" (équation 1.32 page 75), elle, ne permet pas de retrouver le potentiel de Helfrich, quelles que soient les valeurs prises pour P_h et z_h. La théorie auto-cohérente permet-elle de passer continument d'un système de type "soft" à un système de type murs durs ?

Nous avons résolu les équations auto-cohérentes pour un potentiel extérieur asymétrique $U(z)$ composé d'un terme de pression d'hydratation $U_{\text{hyd}}(z) = P_h z_h \exp(-z/nz_h)$ et d'une pression osmotique $U_{\text{osmo}}(z) = Pz$. En faisant varier P_h et z_h de $\{P_h = 5 \times 10^6\,\text{Pa},\ z_h = 0.18\,\text{nm}\}$ à $\{P_h = 5 \times 10^8\,\text{Pa},\ z_h = 0.005\,\text{nm}\}$ nous mimons une transition d'une répulsion de type "soft" à une répulsion de type murs durs (voir la figure 1.10 page 80).

Comparons les résultats ainsi obtenus aux théories de potentiel effectif. Dans le cas du potentiel "soft" :

- la théorie auto-cohérente (□) et la théorie du potentiel effectif (ligne discontinue bleue) sont en très bon accord, notamment pour les faibles épaisseurs d'eau (régime des petites fluctuations);
- il est impossible d'ajuster les résultats prédits par la théorie auto-cohérente avec un potentiel effectif de Helfrich, et ce quelque soit le module de courbure utilisé;

- le seul paramètre libre dans l'ajustement du potentiel "soft" sur les résultats auto-cohérents est le coefficient n (voir l'équation 1.32 page 75). La valeur obtenue pour n est $n = 2.4$, en bon accord avec les résultats expérimentaux sur des empilements multilamellaires [9];
- nous retrouvons cet accord pour toute valeur de κ comprise entre 5 et $200\,\mathrm{k_B T}$;
- l'approche auto-cohérente prédit une épaisseur d'eau inter-membranaire d_w à pression nulle plus faible (■) que la théorie du potentiel effectif, et sur-estime $\langle U'' \rangle$. Ce problème, majeur (voir la section 2.3.1 page 92), est certainement du à un mauvais échantillonnage des micro-états les plus confinés.

Concernant le potentiel de type murs durs :

- il est impossible d'ajuster les résultats prédits par la théorie auto-cohérente (○) avec un potentiel "soft" (ligne noire pointillée), et ce quelques soient les paramètres pris;
- il est possible d'ajuster ces résultats par un potentiel effectif de Helfrich (voir équation 1.29 page 74), avec $c_H \sim 0.5$. Il est intéressant de noter que cette valeur de c_H diffère grandement de celle obtenue pour le cas symétrique.

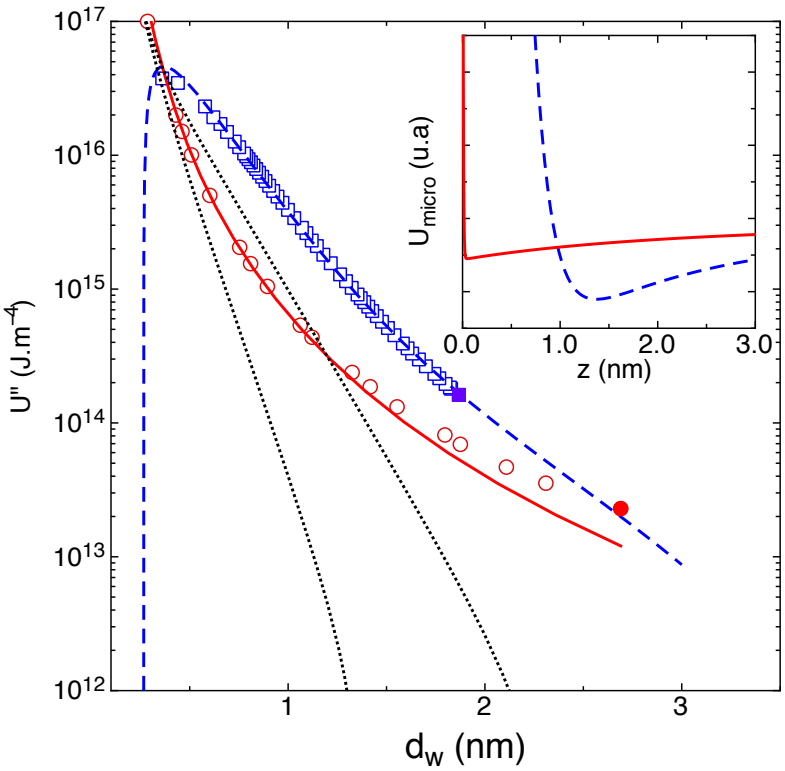


FIGURE 1.10 – Valeurs moyennes de la dérivée seconde du potentiel extérieur calculée par résolution des équations auto-cohérentes 1.34 (points) et par utilisation de la théorie du potentiel effectif (lignes), pour une répulsion de type "soft" (□ et ligne bleue discontinue $\{P_h = 5 \times 10^6\,\mathrm{Pa},\ z_h = 0.18\,\mathrm{nm}\}$) et pour une répulsion de type murs durs (○ et ligne rouge continue $\{P_h = 5 \times 10^8\,\mathrm{Pa},\ z_h = 0.005\,\mathrm{nm}\}$). Les points pleins (●, ■) et l'extrémité des lignes désignent les points à pression nulle (en insert, les potentiels microscopiques correspondants). En pointillé, meilleur ajustement possible de la répulsion de type murs durs (○) par un potentiel effectif "soft".

Ces résultats montrent que la théorie auto-cohérente, contrairement aux théories de potentiel effectif, peut décrire une transition continue entre une répulsion "soft" et une répulsion de type murs durs.

Toutes les théories présentées ici sont basées sur une approximation quadratique du potentiel d'interaction, que ce soit dans le cas symétrique [100, 103] ou non [101, 102]. Dans tous les cas, une situation non-symétrique, comme la notre, peut être symétrisée en identifiant la dérivée seconde du potentiel avec l'intensité A d'un potentiel quadratique $U(z) \simeq A(z - z_0)^2$, approximation valable dans la limite des faibles fluctuations [101].

1.2.3 Approche variationnelle

Manghi et Destainville [102] ont développé un modèle de la transition de décollement d'une double bicouche supportée prenant en compte γ et κ, basé sur une approche variationnelle où les potentiels d'interaction inter-membranaire et membrane-substrat sont modélisés par un potentiel de Morse asymétrique (voir la figure 1.11 page suivante) :

$$U_{\text{Morse}}(z) = D\left[e^{-2\alpha(z-d)} - 2e^{-\alpha(z-d)}\right], \tag{1.37}$$

décrit par sa profondeur D, sa largeur α et la position de son minimum d, ajustés pour décrire un potentiel réaliste $U_{vdW}+U_{hyd}$. Cette approche leur permet de calculer dans quelles conditions l'empilement est stable, en fonction des différents paramètres élastiques (potentiel d'interaction, module de courbure, et tension de surface) et de la température. La physique du problème est alors dictée par deux paramètres (adimensionnés) :

$$\Xi = \frac{8\alpha^2\kappa D}{\gamma^2}, \text{ et } \frac{T}{\Theta} \text{ avec } \Theta = \frac{2\pi\gamma}{k_B\alpha^2}. \tag{1.38}$$

Ξ correspond à la dérivée seconde du potentiel de Morse prise à son minimum, et Θ est une température caractéristique du système. La stabilité de l'empilement dépend de la valeur de ces paramètres : plus T/Θ est grand et Ξ petit, plus on sera proche de la transition de décollement. Le diagramme de phase est divisé en quatre régions : système stable (1), décollement de la membrane libre (2), décollement des deux membranes (3), et décollement des deux membranes liées (4).

Les calculs des auteurs pour des paramètres de doubles bicouches supportées issus des résultats de Daillant et al. [30] mènent à $\Xi \simeq 200$. D'après la figure 1.11,

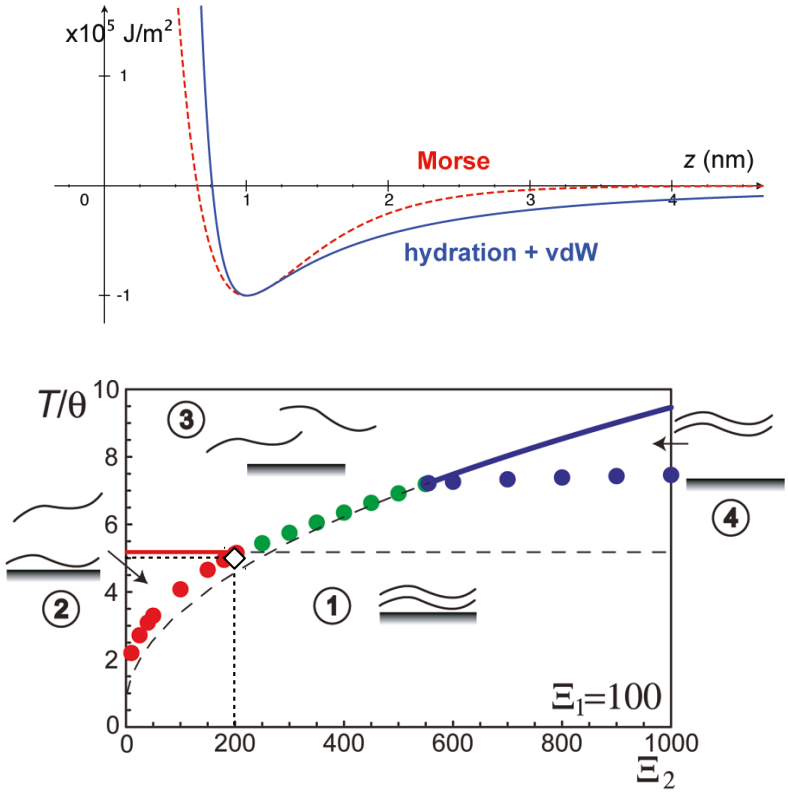


FIGURE 1.11 – En haut : potentiel de Morse utilisé dans le modèle de Manghi et Destainville pour décrire ici les interactions entre une membrane et un substrat, comparé à un potentiel $U_{hyd} + U_{vdW}$ classique. En bas : température normalisée de la transition de décollement, calculée en fonction du paramètre de couplage Ξ_2 correspondant au potentiel d'interaction inter-membranaire. Les points colorés et les lignes désignent les calculs des frontières entre les différentes zones discutées dans le texte. Le point ($\diamond$) correspond à notre situation expérimentale (adapté de [102]).

la transition de décollement de la bicouche libre se situe à des températures proches de $T \simeq 5\Theta \simeq 30\,°\mathrm{C}$, c'est-à-dire proches de la température à laquelle nos expériences sont menées.
En montrant que la bicouche flottante est proche du décollement, ces travaux confirment que les interactions de la bicouche flottante avec le substrat sont suffisamment faibles pour lui permettre de fluctuer quasi-librement.

Nous allons à présent nous intéresser aux expériences que nous avons menées sur des doubles bicouches supportées, puis nous comparerons nos résultats aux différents aspects des théories présentées ici.

2. Mesure des potentiels d'interaction par diffusion de rayons X

2.1 Introduction : compressibilité des systèmes lipidiques multilamellaires

Avant de décrire les résultats que nous avons obtenus sur les systèmes de doubles bicouches supportées, intéressons nous aux expériences menées sur des phases multilamellaires de phospholipides. Détaillons pour cela les travaux de Petrache et al. [9, 111] sur des solutions de MLVs de DMPC, EggPC et DPPC en phase L_α, observées par diffusion de rayons X.

L'amplitude de fluctuations *rms* des membranes est obtenue par ajustement des courbes de diffusion de rayons X par une loi de Caillé [111, 112]. Le module de compressibilité B, défini ici par la relation $B = d\partial^2\mathcal{F}/\partial d^2$, est également déduit de la loi de Caillé, mais nécessite une valeur de κ déduite des meilleurs ajustements des potentiels entropiques (voir la figure 2.1 page suivante). L'application d'une pression osmotique variant de 0 à 58 atm permet d'obtenir la valeur des différents paramètres structuraux et élastiques des membranes pour différentes épaisseurs d'eau d_w (ces résultats sont résumés dans le tableau 2.1 page suivante).

Les données expérimentales sont comparées à une théorie de potentiel effectif, avec un potentiel microscopique de la forme $U_{\text{micro}} = U_{\text{vdW}} + U_{\text{hyd}} + U_{\text{osm}}$, et un potentiel entropique soit de Helfrich, soit de type "soft". La charge de surface due à la dissociation des têtes des lipides n'est pas prise en compte dans l'interprétation de leurs résultats.

Lipide	T [°C]	d_w [Å]	d_m [Å]	κ [k_BT]	B [10^{13} J/m^4]	P_h [10^8 Pa]	z_h [Å]	n	H [10^{-21} J]
DPPC^a	50	18.0	47.2	12		0.99	1.97	3.05	4.78
DMPC^a	30	18.8	44.0	19		1.13	1.97	2.59	4.91
EggPC^a	30	20.9	45.4	13	2.11	1.07	1.94	3.04	4.73
DMPC^b	40	17.9	44.0	23		1.06	1.88	2.22	4.91

TABLE 2.1 – Valeurs des différents paramètres structuraux et élastiques extraites des analyses de diffusion de rayons X pour différents types de lipides en phase multilamellaire (d'après [9]^a et [113]^b).

Comme on peut le voir sur la figure 2.1, seul un ajustement des données expérimentales avec un potentiel "soft" est possible. Le paramètre d'écrantage n du potentiel "soft" issu des meilleurs ajustements est cependant plus grand que la valeur $n = 2$ prédite par la théorie, et varie de $n = 2.4$ à $n = 2.9$ selon l'échantillon.

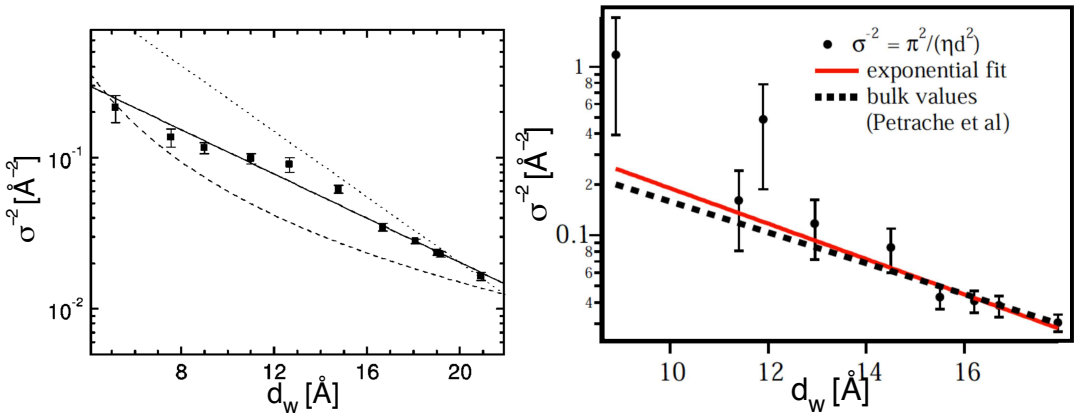


FIGURE 2.1 – σ^{-2} en fonction de d_w et comparaison à différents potentiels. A gauche : phase lamellaire de EggPC. En tirets : potentiel de Helfrich, en pointillés : potentiel "soft" avec $n = 2$, en trait plein : potentiel "soft" avec $n = 2.9$ (issu de [9]). A droite : phase lamellaire supportée de DMPC. En trait plein : potentiel "soft" avec $n = 2.2$, en tirets : comparaison aux résultats de Petrache et al. [9] (issu de [113]).

L'épaisseur d'eau inter-membranaire d_w à pression nulle semble relativement indépendante des échantillons et vaut ~ 20 Å. Le module de compressibilité B n'est calculé que pour du EggPC, et a une valeur à pression nulle de 2.11×10^{13} J/m^4.

Notons que Salditt et al. obtiennent des résultats équivalents sur des bicouches de DMPC supportées obtenues par spin coating (N$\sim$ 16) [113] (voir le tableau 2.1). Ils montrent également que seul un potentiel “soft” permet d'ajuster leurs données expérimentales, et ce pour une valeur de $n \simeq 2.2$.

Ces résultats caractéristiques des phases multilamellaires serviront de base de comparaison à nos expériences sur des doubles bicouches supportées.

Rôle des défauts dans les phases multilamellaires Les expériences de diffusion de rayons X sur des phases multilamellaires ont ainsi été à l'origine de grandes avancées dans la compréhension des interactions entre bicouches. Cependant, le rôle des défauts structuraux (voir la figure 2.2) dans ces systèmes est aujourd'hui mis en avant pour expliquer des différences entre les prédictions théoriques et certains résultats expérimentaux.
Prenons l'exemple de la transition de décollement. Comme nous l'avons vu à la section 1.2.1 page 72, la répulsion entropique entre membranes est directement liée à leur amplitude de fluctuation σ. Une augmentation de la température devrait donc théoriquement résulter en une augmentation de l'épaisseur d'eau d_w. Au delà d'une température critique T_u, la répulsion entropique domine la partie attractive du potentiel et les membranes se “détachent” une à une du substrat : c'est la transition de décollement.

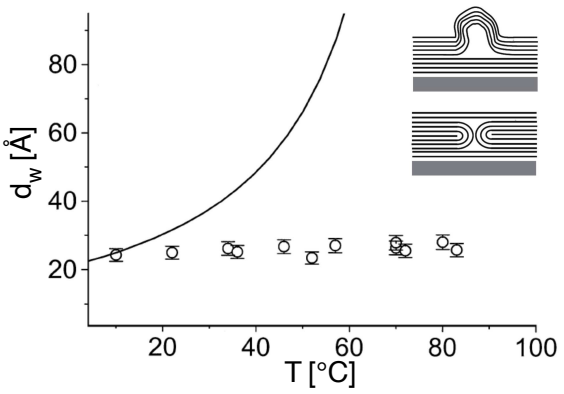


FIGURE 2.2 – Epaisseur d'eau inter-membranaire en fonction de la température pour une phase multilamellaire supportée de DMPC (issu de [114]). La ligne continue correspond à la prédiction théorique d'une transition de décollement, calculée pour deux membranes supportées. En insert, exemple de défauts présents dans les phases multilamellaires : bourgeonnement et dislocation (issu de [115]).

Vogel et al. [114] ont montré qu'une transition de décollement est bien présente dans des échantillons multilamellaires supportés de POPC et de DMPC (à des températures respectives de 80 °C et 95 °C), mais que ni l'épaisseur d'eau ni l'amplitude des fluctuations n'augmentent à l'approche de T_u (voir la figure 2.2 page précédente). L'hypothèse faite est que les défauts structuraux des membranes limitent l'augmentation de d_w avec la température, et que la transition de décollement observée est liée à une réorganisation de ces défauts à T_u.

2.2 Propriétés intrinsèques d'une double bicouche supportée

Les phases multilamellaires permettent d'étudier les fluctuations des membranes dans un empilement de bicouches phospholipidiques ainsi que leurs interactions pour différentes températures, pressions osmotiques, forces ioniques, etc ... Néanmoins, ces systèmes possèdent probablement des défauts structuraux, et ne permettent pas d'accéder aux fluctuations d'une membrane unique.

De part leur conception très contrôlée, les doubles bicouches supportées ne comportent que peu de défauts, et sont un candidat idéal à l'étude des fluctuations d'une membrane unique. Nous avons mené plusieurs séries d'expériences de diffusion de rayons X sur des doubles bicouches supportées de deux sortes :

- les "vraies" doubles bicouches constituées de deux bicouches de DSPC,
- et les doubles bicouches OTS-DSPC, où la première monocouche est remplacée par une couche greffée d'octadecyl-trichlorosilane (OTS) (voir l'annexe A.2).

Dans les deux cas la première bicouche, greffée ou quasiment adsorbée sur le substrat, sert "d'espaceur" en éloignant la bicouche flottante sur laquelle notre étude portera majoritairement.

A partir des ajustements réalisés conjointement sur des courbes de réflectivité spéculaire et hors-spéculaire, nous déterminons les paramètres structuraux des doubles bicouches (en particulier l'épaisseur d'eau entre les membranes d_w) pour des températures variant entre 42.9 °C et 52.9 °C. Nous avons aussi accès aux paramètres dits "élastiques" tels que la tension des bicouches γ, leurs rigidités de courbure κ et la dérivée seconde du potentiel d'interaction inter-membranaire U''_{M_1,M_2}. L'amplitude des fluctuations σ est également mesurée et décomposée en sa partie statique σ_{st} et sa partie thermique σ_{th}. L'essentiel des résultats est résumé dans le tableau 2.2 page 90.

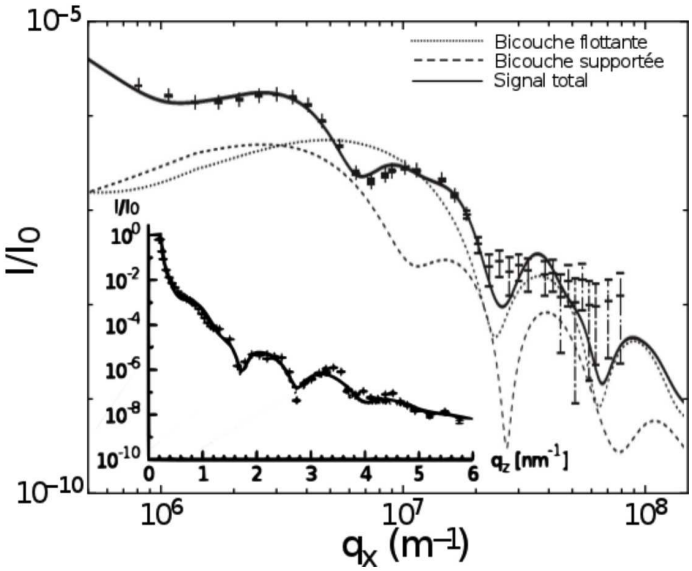


FIGURE 2.3 – Courbe de réflectivité hors-spéculaire d'une vraie double bicouche de DSPC. La bicouche flottante domine le signal total à grand q_x (adapté de [34]). En insert, courbe de réflectivité spéculaire de la double bicouche. La ligne continue représente le meilleur ajustement, avec le même jeu de paramètre pour les réflectivités spéculaire et hors-spéculaire (ajustements couplés).

2.2.1 Propriétés de la bicouche supportée

Les propriétés de la bicouche la plus proche du substrat seront peu discutées dans cette thèse essentiellement portée sur l'étude de la bicouche flottante. La bicouche supportée étant très proche du substrat (de 0 nm pour les bicouches OTS-DSPC à ~ 1 nm pour les vraies doubles bicouches), ses fluctuations sont moins importantes que celles de la bicouche flottante ($\sigma_{th,1} < 5$ Å) et contribuent donc moins au signal de diffusion hors-spéculaire (voir la figure 2.3). De ce fait, les incertitudes associées aux mesures des paramètres élastiques et structuraux de la première bicouche sont nettement supérieures à celles de la membrane quasi-libre.
Cette proximité avec le substrat a une influence majeure sur la tension de la bicouche supportée, comprise entre 10 et 30 mN/m, soit de deux à trois ordres de grandeurs plus grande que celle de la bicouche flottante. Les interactions de van der Waals "tendent" la bicouche sur le substrat, et suppriment les fluctuations de grandes longueurs d'onde. Il est possible que la tension que nous mesurons corresponde à la tension "microscopique" de la bicouche issue des modes de protrusions, dont la tension de surface associée, i.e. le coût énergétique d'une protrusion, est prédit par simulation numérique de l'ordre de 50 mN/m [23].

2.2.2 Structure des échantillons et propriétés de la bicouche flottante

Dans le cas des doubles bicouches sans ajout de polyvinylpyrrolidone (PVP) ni de sel, la tension de la bicouche flottante déterminée par les ajustements est de $0.3 \pm 0.2\,\mathrm{mN/m}$. Comme reporté dans des travaux précédents de Daillant et al. [30] sur des doubles bicouches supportées, on observe une transition gel-fluide nette à une température d'environ 52 °C pour laquelle le module de courbure chute de presque un ordre de grandeur. Cette température de transition est légèrement inférieure à celle observée sur des vésicules multilamellaires ($T_m = 55.5\,°\mathrm{C}$ d'après la Réf. [116]). Ce décalage, attribué aux interactions avec le substrat, est cohérent avec certaines études menées sur des bicouches supportées [17, 117]. D'autres études menées par AFM sur de simples bicouches de DMPC supportées sur des substrats de mica [118, 119, 120] ont néanmoins mis en évidence un décalage de la température de transition vers des températures plus élevées que sur des vésicules multilamellaires. L'origine des disparités entre ces résultats n'est à ce jour pas connue.

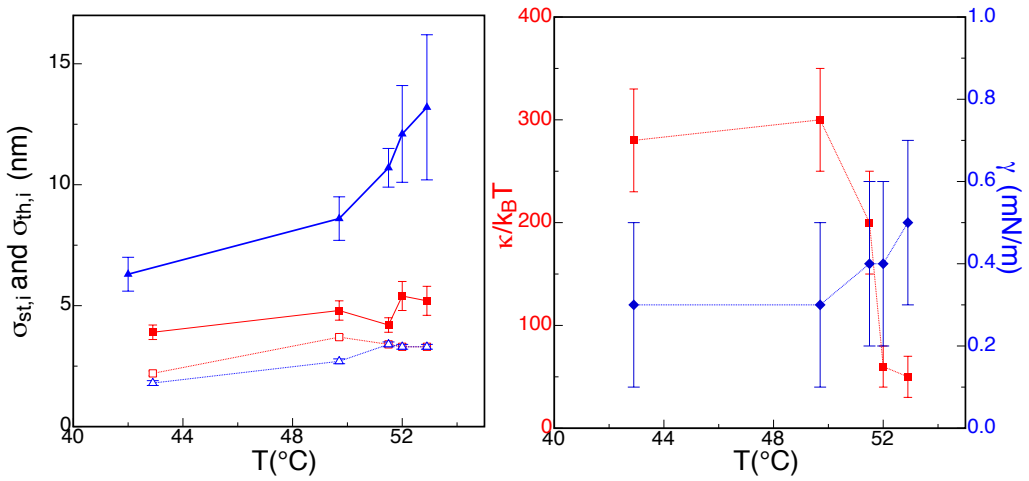


FIGURE 2.4 – A gauche : rugosité statique $\sigma_{st,i}$ (points ouverts) et rugosité thermique $\sigma_{th,i}$ (points pleins) pour la bicouche en contact avec le substrat ($i = 1$, carrés rouges), et la bicouche flottante ($i = 2$, triangles bleus). A droite : module de courbure κ (■) et tension de surface γ (♦) de la bicouche flottante. Les lignes sont de simples guides pour les yeux.

Dans les échantillons de doubles bicouches supportées, la transition principale gel-fluide observée ne semble pas précédée d'une pré-transition de la phase gel à la phase *ripple*.

La composante statique $\sigma_{st,2}$ de la rugosité totale de la bicouche flottante reste constante et comprise entre 0.5 et 3.5 Å. Sa rugosité thermique $\sigma_{th,2}$ est beaucoup plus importante que celle de la bicouche supportée, allant de 6 à 13 Å, et augmente de façon conséquente avec la température (voir la figure 2.4 page précédente). Ce résultat, en opposition aux observations faites sur des systèmes multilamellaires [114], justifie la dénomination de membrane flottante, et est en parfait accord avec les expériences précédentes menées sur des doubles bicouches supportées [34].

Un zoom de la réflectivité hors-spéculaire sur la région où elle est le plus sensible au potentiel d'interaction U''_{M_1,M_2} est montré sur la figure 2.5 pour différentes températures. Il est important de noter ici que la dérivée seconde du potentiel d'interaction est directement liée à la profondeur du minimum de la courbe de réflectivité hors-spéculaire autour de $q_z \approx 1.0 - 1.5\,\mathrm{nm}^{-1}$, sans être fortement couplée aux autres paramètres. De la même manière, l'épaisseur d'eau d_w est fortement corrélée à la position en q_z de ce minimum. Comme on peut le voir directement sur la figure 2.5, d_w augmente (le minimum se décale vers les petits q_z) et le potentiel devient plus faible (le minimum est moins prononcé) lorsque la température augmente.

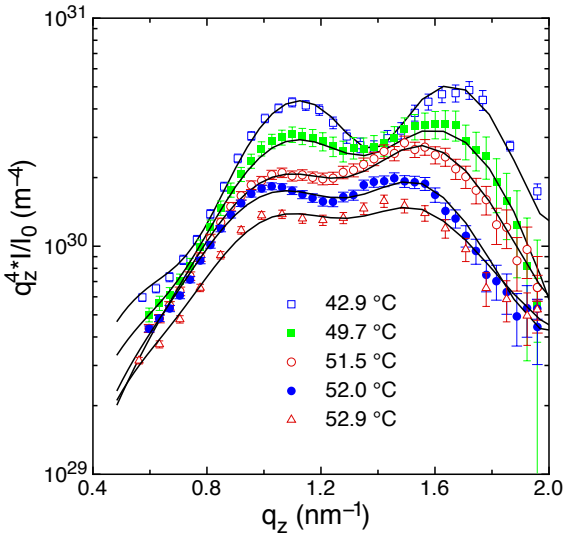


FIGURE 2.5 – Courbes de réflectivité hors-spéculaire et ajustements associés, multipliés par un facteur q_z^4 pour faire ressortir la contribution des bicouches. Le zoom est fait sur la partie la plus sensible au potentiel U''_{M_1,M_2}.

	Influence de la température				
	42.9°C	49.7°C	51.5°C	52.0°C	52.9°C
d_w [Å]	25.0±1	26.5±1	26.9±1	28.1±1	29.7±1
$A_{L,bic2}$ [Å^2]	47 ±6	48 ±6	47 ±6	47 ±6	42 ±5
n_w	29 ±4	32 ±4	24 ±3	30 ±4	33 ±4
n'_w	5 ±1	5 ±1	6 ±1	6 ±1	5 ±1
$\bar{n}'_w$	3 ±1	1 ±1	4 ±1	4 ±1	1 ±1
κ_2 [k_BT]	280±50	300±50	200±50	60±20	50±20
γ_2 [mN/m]	0.3±0.2	0.3±0.2	0.4±0.2	0.4±0.2	0.5±0.2
$\sigma_{2,st}$ [Å]	2.0±0.5	2.5±0.5	3.5±0.5	3.0±0.5	3.0±0.5
$\sigma_{2,th}$ [Å]	6.3±0.7	8.6±0.9	10.7±0.8	12±2	13±3
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	12.1±0.3	11.8±0.3	11.6±0.3	11.7±0.3	11.5±0.3

TABLE 2.2 – Effets de la température sur les paramètres structuraux et élastiques de doubles bicouches OTS-DSPC.

Comparons ces résultats à ceux obtenus par Petrache et al. [9] pour des phases multilamellaires (voir la figure 2.6 page suivante). La distance inter-membranaire d_w des doubles bicouches est plus grande de 0.1 à 0.5 nm que la distance inter-membranaire moyenne des échantillons de EggPC, et le potentiel d'interaction U''_{12} est plus faible d'un ordre de grandeur. Ces disparités significatives ne peuvent être attribuées à la seule différence dans la nature des lipides utilisés, et nécessitent une modélisation plus poussée des interactions pour être interprétées.

L'aire par lipide $A_{L,bic2}$ ainsi que le nombre de molécule d'eau par tête de lipide n'_w (et $\bar{n}'_w$) sont calculés selon la méthode développée dans la partie I (voir le tableau 2.2 pour les expériences à différentes températures, 2.4 pour les expériences avec ajout de sel, et 2.5 pour celles où une pression osmotique est appliquée). Nous obtenons une aire par tête de lipide $A_{L,bic2} = 48 \pm 6\,\text{Å}^2$, de l'ordre de la valeur $A_{L,bic2} \simeq 54\,\text{Å}^2$ mesurée par Daillant et al. par diffusion de rayons X sur des doubles bicouches de DSPC [30].
Le nombre de molécule d'eau par tête de lipide est inférieur à la valeur $n'_w \simeq 11$ obtenue par Tristram-Nagle et al. sur des phases multilamellaires de DOPC [44]. Cet écart est probablement dû aux différences de nature entre les deux lipides utilisés.
Bien que $A_{L,bic2}$ et n'_w restent du même ordre de grandeur après ajout de sel ou de PVP, notre résolution expérimentale ne nous permet pas de conclure sur une variation fine de ces deux quantités.

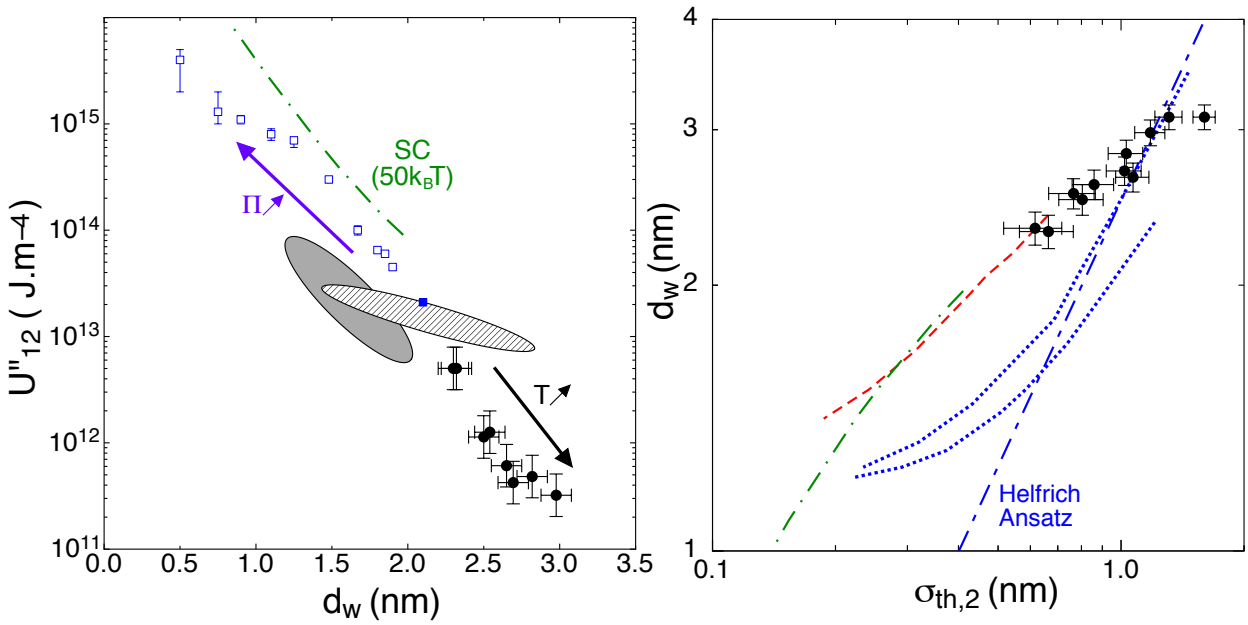


FIGURE 2.6 – A gauche : dérivée seconde du potentiel d'interaction U''_{12} en fonction de l'épaisseur d'eau inter-membranaire d_w. (□) : data de Petrache et al. [9] sur du EggPC en phase fluide, pour différentes pressions osmotiques, (■) : $\Pi = 0$. (•) : doubles bicouches de DSPC en phases gel et fluide pour différentes températures. Ligne verte discontinue : modèle auto-cohérent (SC) en phase fluide ($\kappa = 50k_BT$). Les ellipses désignent les prédictions de théories de potentiel effectif, sans pression appliquée, pour des interactions de van der Waals, d'hydratation et de Helfrich (ellipse grise); van der Waals, hydratation et potentiel "soft" (ellipse rayée). Ces ellipses sont obtenues par variation des différents paramètres dans les limites de la littérature (voir texte). A droite : d_w en fonction de la rugosité thermique de la bicouche flottante $\sigma_{th,2}$. Ligne bleue discontinue : "Helfrich Ansatz" $d_w^2 = 1/6\sigma_{th,2}^2$. Ligne bleue pointillée : modèle de Helfrich, avec un décalage du minimum de 0.3 nm pour la courbe supérieure. Tirets rouges : modèle du potentiel "soft".

2.3 Détermination du potentiel d'interaction

2.3.1 Comparaison aux théories de potentiel effectif et à la théorie auto-cohérente

Deux modes de représentation s'avèrent particulièrement efficaces pour comparer les résultats expérimentaux aux prédictions théoriques : d_w est représentée en fonction de la rugosité thermique de la bicouche flottante $\sigma_{th,2}$ et U''_{12} est tracé en fonction de l'épaisseur d'eau sur la figure 2.6 page précédente.

La précision de nos mesures, et en particulier pour les larges séparations, nous permet de tester les différents potentiels microscopiques et entropiques proposés dans la littérature. Sur la figure 2.6, nous calculons chaque contribution au potentiel total en faisant varier les paramètres dans des intervalles de valeurs provenant de la littérature. Nous obtenons alors l'ellipse grise et l'ellipse rayée, correspondant aux prédictions théoriques pour respectivement le modèle de Helfrich et le modèle "soft". Dans les deux cas le potentiel microscopique est décrit de la même manière (voir le tableau 2.3 page suivante) :

- les forces attractives de van der Waals sont calculées en utilisant l'approche de Lifschitz, $U_{\mathrm{vdW}} = -H/12\pi(z + 2d_{\mathrm{head}})^2$ avec $H = 5.3 \times 10^{-21}$ J et $d_{\mathrm{head}} = 0.4 - 0.8$ nm [121, 122],
- la répulsion d'hydratation est décrite par une exponentielle décroissante classique $U_{\mathrm{hyd}} = P_h z_h \exp(-z/z_h)$ avec $P_h = 1 - 5 \times 10^7$ Pa et $z_h = 0.16 - 0.2$ nm [9].

Nous ajoutons un potentiel de type murs durs $U_{\mathrm{Hel}} = c_H/\kappa(k_B T/z)^2$ [103] pour obtenir l'ellipse grise, avec c_H variant de 0.08 à 0.2. Les valeurs de d_w prédites sont loin des résultats expérimentaux, aussi bien dans le cas des doubles bicouches (•) que pour les échantillons multilamellaires (■). Ce potentiel ne parvient pas non plus à décrire l'évolution de d_w en fonction de $\sigma_{th,2}$, de même pour toute relation de la forme [1] : $d_w \propto \sigma_{th}$. Nous vérifions également que décaler le zéro du potentiel pour rendre le potentiel plus "mou" n'améliore pas la comparaison.

L'utilisation d'un potentiel "soft" $U_{\mathrm{soft}} = \pi k_B T/16\sqrt{P_h/\kappa/z_h}\exp(-z/nz_h)$ permet d'améliorer l'accord avec les résultats expérimentaux mais prédit toujours des valeurs de la courbure du potentiel U''_{12} un à deux ordres de grandeurs plus grands que ceux observés, et sous-estime les valeurs de d_w et $\sigma_{th,2}$ pour les doubles bicouches de DSPC. Le potentiel "soft" couplé à ce potentiel microscopique est par contre à même de décrire les résultats sur les phases multilamellaires de EggPC.

1. Cette relation de proportionnalité entre d et σ_{th} est parfois nommée "Helfrich Ansatz".

Interaction	Potentiel	Valeurs des paramètres
van der Waals	$U_{\mathrm{vdW}} = -H/12\pi(z + 2d_{\mathrm{head}})^2$	$H = 5.3 \times 10^{-21}\,\mathrm{J}$ $d_{\mathrm{head}} = 0.4 - 0.8\,\mathrm{nm}$
Hydratation	$U_{\mathrm{hyd}} = P_h z_h \exp(-z/z_h)$	$P_h = 1 - 5 \times 10^7\,\mathrm{Pa}$ $z_h = 0.16 - 0.2\,\mathrm{nm}$
Helfrich	$U_{\mathrm{Hel}} = c_H/\kappa(k_B T/z)^2$	$c_H = 0.08 - 0.2$ $\kappa = 20 - 300\,\mathrm{k_B T}$ $T = 40 - 60\,°\mathrm{C}$
"Soft"	$U_{\mathrm{soft}} = \pi k_B T/16\sqrt{P_h/\kappa/z_h}\exp(-z/nz_h)$	$n = 2.4$
Electrostatique GP	$U_{\mathrm{el,GP}} = k_B T \ln(z)/\pi/\ell_G/\ell_B$	$\ell_G = 225\,\mathrm{nm}$ $\ell_B = 7\,\mathrm{Å}$

TABLE 2.3 – Liste des potentiels et des valeurs des paramètres utilisés pour tracer les ellipses des figures 2.6 et 2.9.

La théorie auto-cohérente, supposée permettre le calcul de d_w, U''_{12} et $\sigma_{th,2}$ de manière plus satisfaisante que le potentiel effectif, sur-estime fortement leurs valeurs, probablement à cause d'un mauvais échantillonnage des micro-états les plus confinés.

2.3.2 Contribution électrostatique

La théorie du potentiel effectif avec un potentiel total $U_{\mathrm{tot}} = U_{\mathrm{vdW}} + U_{\mathrm{hyd}} + U_{\mathrm{soft}}$ permet donc de décrire les résultats obtenus expérimentalement pour des phases multilamellaires, mais ne permet pas de rendre compte de l'épaisseur d'eau à l'équilibre et du potentiel d'interaction des doubles bicouches de DSPC. Comme la bicouche flottante interagit faiblement avec le substrat et peut être très proche du décollement [2], une contribution répulsive faible mais de très longue portée au potentiel total suffirait à décaler sa position d'équilibre vers des valeurs de d_w plus grandes et de U''_{12} plus faibles. La contribution électrostatique, issue de la dissociation des têtes PC, répond à ces conditions.

En effet, les têtes zwitterioniques de phosphocholines sont amphotères : leur taux de dissociation dépend du pH de la solution (voir la figure 2.7 page suivante). Au contact de l'air, du CO_2 se dissout dans l'eau milli-Q et l'acidifie rapidement jusqu'à un pH$\sim 5.5-6$. A ce pH, l'espèce zwitterionique est prédominante, mais une fraction

2. Décollement parfois observé pour des températures $\gtrsim 60\,°\mathrm{C}$.

non négligeable de lipides sont chargés positivement [123] :

$$\frac{[\text{ lipides chargés } +]}{[\text{lipides zwitterioniques}]} = 10^{\text{pH}-\text{pKa}_1} \simeq 1/1000. \tag{2.1}$$

Cette fraction de lipides chargés mène à une charge surfacique de l'ordre de $\sigma_0 \simeq 0.001\,\text{e}\cdot\text{nm}^{-2}$. Il a été montré récemment que cette densité de charges, a priori faible, était suffisante pour empêcher l'adhésion de vésicules [124].

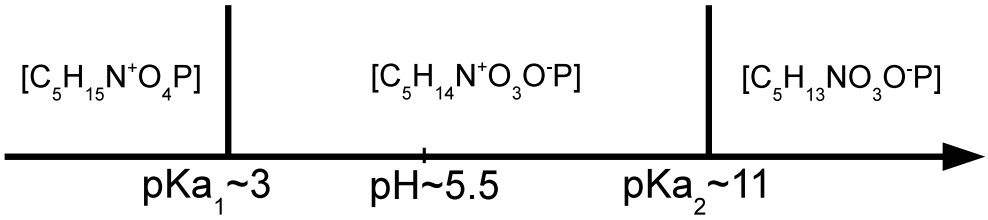


FIGURE 2.7 – Diagramme de prédominance de la phosphocholine en fonction du pH de la solution.

La faible densité surfacique de charge de nos systèmes permet l'utilisation de la théorie de champ moyen de Poisson-Boltzmann pour décrire les interactions électrostatiques. La longueur de Gouy-Chapman vaut $\ell_G \sim 10^2 - 10^3\,\text{nm}$, celle de Debye-Hückel $\ell_D \sim 200 - 500\,\text{nm}$, et l'épaisseur d'eau d_w reste comprise entre 2 et 3 nm. Nous sommes donc dans la limite du Gaz Parfait (GP) de la théorie de Poisson-Boltzmann, où le potentiel dominé par l'entropie des contre-ions s'écrit $U_{\text{el,GP}} = k_B T \ln(z)/\pi/\ell_G/\ell_B$ (voir section 1.1.3 page 66).

L'ajout de ce potentiel à $U_{\text{tot}} = U_{\text{vdW}} + U_{\text{hyd}} + U_{\text{soft}}$ donne une prédiction en très bon accord avec nos résultats expérimentaux (ellipse noire et lignes rouges sur la figure 2.9 page 97). Cette contribution étant dominante à grand d_w, la densité de charge prise en compte dans les ajustements est très robuste et indépendante des autres paramètres. A courte distance, elle est négligeable, et de ce fait n'améliore pas l'accord avec les autres formes de potentiels.

Ecrantage des interactions électrostatiques Pour vérifier l'hypothèse d'une répulsion électrostatique, nous avons ajouté du NaCl à nos échantillons de manière à écranter les interactions électrostatiques. Cette méthode est plus simple à analyser qu'un changement de pH par le biais d'une solution tampon, dont les effets sur les bicouches peuvent être complexes [125]. Deux concentrations de sel ont été testées,

$c_1 = 0.5\,\mathrm{mol{\cdot}L^{-1}}$ et $c_2 = 1\,\mathrm{mol{\cdot}L^{-1}} \gg c_{0,\mathrm{lim}}$, équivalentes à des longueurs de Debye-Hückel respectivement égales à 0.45 et 0.3 nm. Les résultats sont reportés sur la figure 2.9 et dans le tableau 2.4.

	Phase fluide			Phase gel	
	Sans sel	ℓ_D=0.45 nm	ℓ_D=0.3 nm	Sans sel	ℓ_D=0.3 nm
d_w [Å]	28.0 ±1	24.6 ± 1	20.3 ± 1	24.3 ±1	22.2 ± 1
$A_{L,bic2}$ [Å^2]	64 ±8	65 ±8	53 ±8	47 ±8	60 ±8
n_w	40 ±5	32 ±3	24 ±3	24 ±3	26 ±3
n'_w	8 ±2	11 ±2	6 ±1	7 ±1	9 ±2
$\bar{n}'_w$	8 ±3	17 ±6	4 ±1	7 ±3	11 ±4
κ_2 [k_BT]	80 ±50	470 ±50	230 ±50	80 ±10	180 ± 10
γ_2 [mN/m]	0.8 ± 0.2	0.2±0.2	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.5±0.2
$\sigma_{2,st}$ [Å]	0.5±0.5	1.0 ±0.5	2.5 ±0.5	1.0 ±0.5	1.0 ± 0.5
$\sigma_{2,th}$ [Å]	7.5 ±1	4.9 ±1	4.1 ± 1	8.0 ±1	5.8 ±1
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	12.1 ±0.1	12.9 ±0.1	13.3 ± 0.1	12.2 ±0.3	13.0 ±0.1

TABLE 2.4 – Effets du sel sur les paramètres structuraux et élastiques de doubles bicouches de DSPC en phase gel et en phase fluide.

On observe une diminution nette de d_w et de la rugosité thermique $\sigma_{th,2}$, ainsi qu'une augmentation de la courbure du potentiel U''_{12} d'un ordre de grandeur environ, en accord avec l'hypothèse d'un écrantage de la répulsion électrostatique. Ces résultats sont correctement décrits par une théorie du potentiel effectif avec comme potentiel total : $U_{\mathrm{tot}} = U_{\mathrm{vdW}} + U_{\mathrm{hyd}} + U_{\mathrm{soft}} + U_{\mathrm{el,DH}}$, tracée en bleu sur la figure 2.9, ce qui confirme donc le rôle de l'électrostatique.

Cette interaction électrostatique est ignorée dans les études de diffusion de rayons X sur des lipides zwitterioniques en phase multilamellaire. Elle n'est, en effet, pas nécessaire pour interpréter les résultats expérimentaux. Il se peut que dans ces expériences le pH ou la concentration en charges de l'eau ne soient pas bien contrôlés, mais il est plus probable que les défauts structuraux entre bicouches empêchent l'empilement d'atteindre l'épaisseur d'eau maximale, que nous atteignons avec des doubles bicouches supportées.

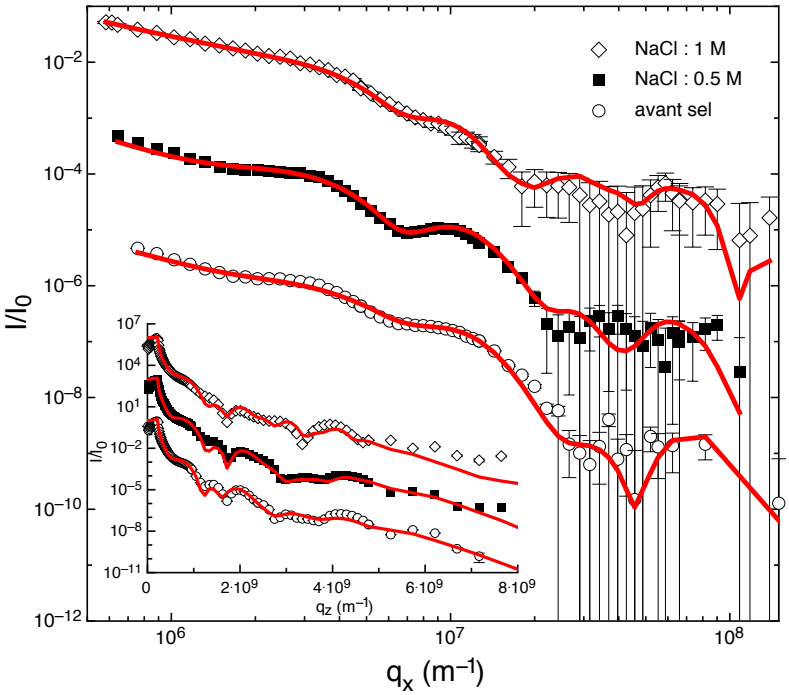


FIGURE 2.8 – Courbes de réflectivités hors-spéculaire et spéculaire (en insert), avant sel (○), avec 0.5 mol·L^{-1} de NaCl (■), puis 1 mol·L^{-1} de NaCl (◊). Les lignes représentent les meilleurs ajustements, avec le même jeu de paramètres pour les réflectivités spéculaire et hors-spéculaire.

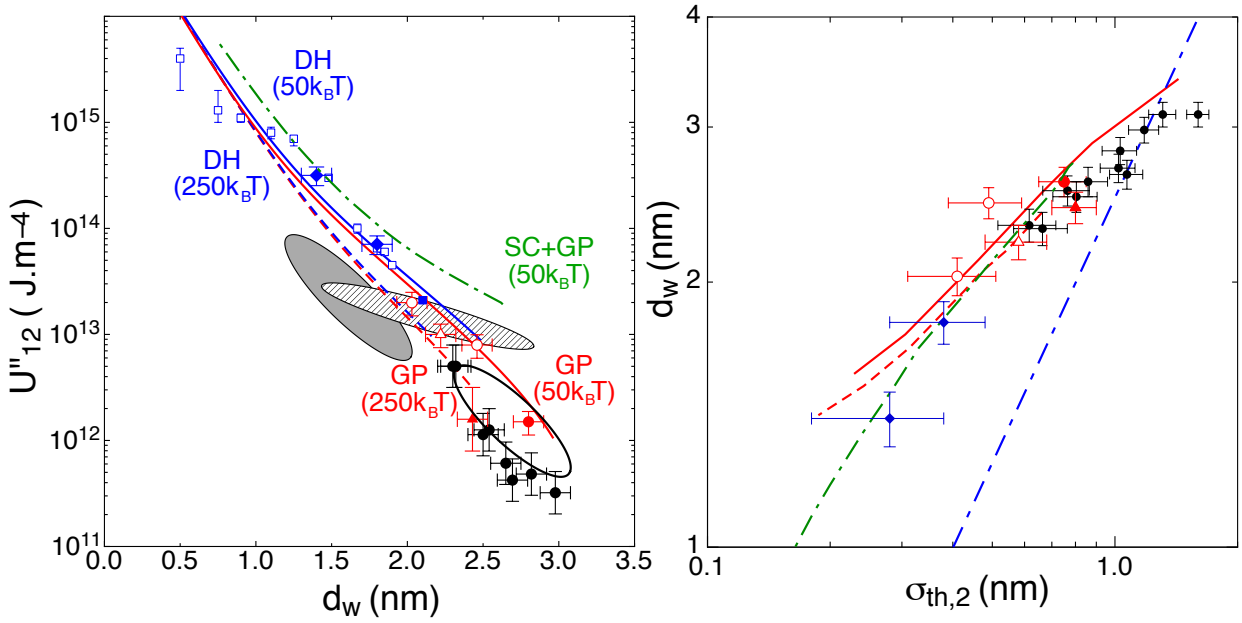


FIGURE 2.9 – Ajout des effets des charges à la figure 2.6. Doubles bicouches de DSPC en phase fluide avant (●) et après (○) un ajout de sel (T=58 °C; $\ell_D = 0.45$ nm puis 0.3 nm); et en phase gel avant (▲) et après (△) un ajout de sel (T=40 °C; $\ell_D = 0.3$ nm). Lignes rouges continues (resp. discontinues) : $U_{\mathrm{vdW}} + U_{\mathrm{hyd}} + U_{\mathrm{soft}} + U_{\mathrm{el,GP}}$ en phase fluide (resp. gel). Lignes bleues continues (resp. discontinues) : $U_{\mathrm{vdW}}+U_{\mathrm{hyd}}+U_{\mathrm{soft}}+U_{\mathrm{el,DH}}$ avec $\ell_D = 0.3$ nm, en phase fluide (resp. gel). Lignes vertes discontinues : modèle auto-cohérent en phase fluide ($\kappa = 50k_BT$) avec une contribution électrostatique de type gaz parfait. L'ellipse noire représente les prédictions de la théorie du potentiel effectif, sans pression appliquée, pour $U_{\mathrm{vdW}}+U_{\mathrm{hyd}}+U_{\mathrm{soft}}+U_{\mathrm{el,GP}}$. (♦) : effets de la pression osmotique sur des doubles bicouches de DSPC en phase gel pour deux pressions $\Pi = 14 \pm 2$ et 450 ± 250 kPa.

2.3.3 Application d'une pression osmotique

Afin de pouvoir accéder aux valeurs du potentiel d'interaction pour des distances inter-membranaires plus faibles, nous avons appliqué une pression osmotique sur des doubles bicouches supportées. Cette méthode, couramment utilisée dans les systèmes multilamellaires, n'avait à notre connaissance jamais été employée sur une double bicouche.
La pression osmotique a été appliquée en ajoutant du polyvinylpyrrolidone (PVP) de masse moléculaire moyenne de $40\,000\,\mathrm{g{\cdot}mol^{-1}}$ à de l'eau milli-Q. Des solutions de $c_1 = 4$ et $c_2 = 30\%$ en masse de PVP ont été préparées et homogénéisées à l'aide d'un agitateur magnétique pendant plusieurs heures. Les pressions osmotiques correspondantes à c_1 et c_2 sont obtenues dans la littérature et valent respectivement $\Pi = 14 \pm 2\,\mathrm{kPa}$ et $\Pi = 450 \pm 250\,\mathrm{kPa}$ [91, 92].

L'eau de la cellule contenant la double bicouche doit être soigneusement remplacée par la solution visqueuse de PVP, afin d'éviter un décollement de la bicouche flottante. Lors de l'échange des solvants, la solution dense de PVP se place au fond de la cellule et nous contrôlons visuellement son niveau (voir la figure 2.10). A environ 1 mm du substrat nous stoppons l'échange de solvant, et laissons diffuser pendant plusieurs dizaines de minutes. Cette méthode permet d'appliquer la pression osmotique sans abîmer l'échantillon, mais mène probablement à une légère sur-estimation des concentrations de PVP en contact avec la bicouche flottante.

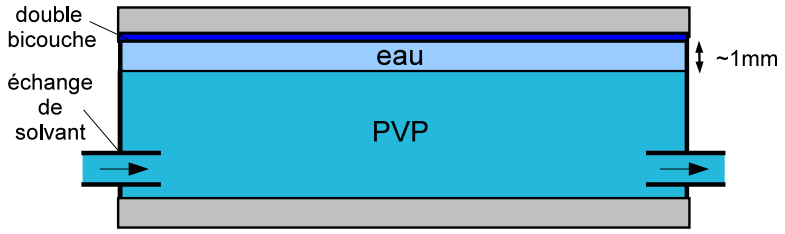


FIGURE 2.10 – Représentation schématique d'un échange de solvant. Lorsque la solution dense et visqueuse de PVP est à environ 1 mm de la bicouche, nous stoppons l'échange et laissons le mélange s'homogénéiser pendant plusieurs dizaines de minutes.

Les effets de la pression osmotique sont résumés dans le tableau 2.5 page suivante et sur les figures 2.11 et 2.12. Nous obtenons à nouveau une bonne correspondance avec les prédictions du modèle théorique précédent (voir la figure 2.9 page 97), ainsi qu'avec les expériences sur des systèmes multilamellaires (voir la figure 2.12). Nous ne disposons que de peu de points de pressions osmotiques différentes, mais la relation expérimentale observée entre $\sigma_{th,2}$ et Π n'est pas incompatible avec la prédiction théorique $\sigma_{th,2} \sim \Pi^{-1/3}$. Il s'agit, à notre connaissance, de la première démonstration que le potentiel inter-membranaire de deux bicouches supportées peut être contrôlé par l'application d'une pression osmotique.

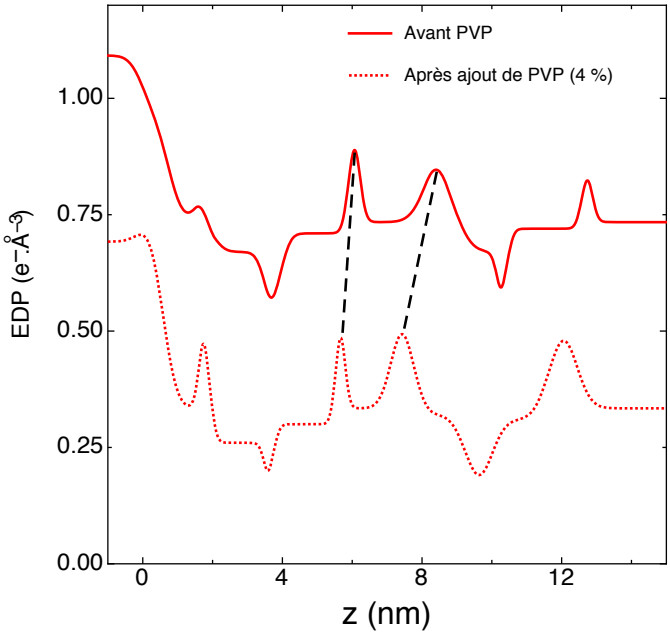


FIGURE 2.11 – Profil de densité électronique d'une double bicouche supportée avant et après ajout de PVP (4%). Les lignes discontinues mettent en évidence la diminution de d_w.

	Pression osmotique		
	Avant PVP	PVP 4%	PVP 30%
d_w [Å]	22.0±1	18.0 ± 1	14.0 ± 1
$A_{L,bic2}$ [Å^2]	51 ±8	47 ±8	47 ±8
n_w	31 ±4	17 ±2	15 ±2
n'_w	6 ±1	6 ±1	3 ±1
$\bar{n}'_w$	7 ±3	7 ±3	≤ 2
κ_2 [k_BT]	100±20	200±50	500±50
γ_2 [mN/m]	0.2±0.2	1.1± 0.3	0.3±0.1
$\sigma_{2,st}$ [Å]	2±1	4±1	3±1
$\sigma_{2,th}$ [Å]	9±1	4±1	3±1
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	12.0±0.1	13.85±0.1	14.5±0.1

TABLE 2.5 – Effets de la pression osmotique sur les paramètres structuraux et élastiques de doubles bicouches de DSPC.

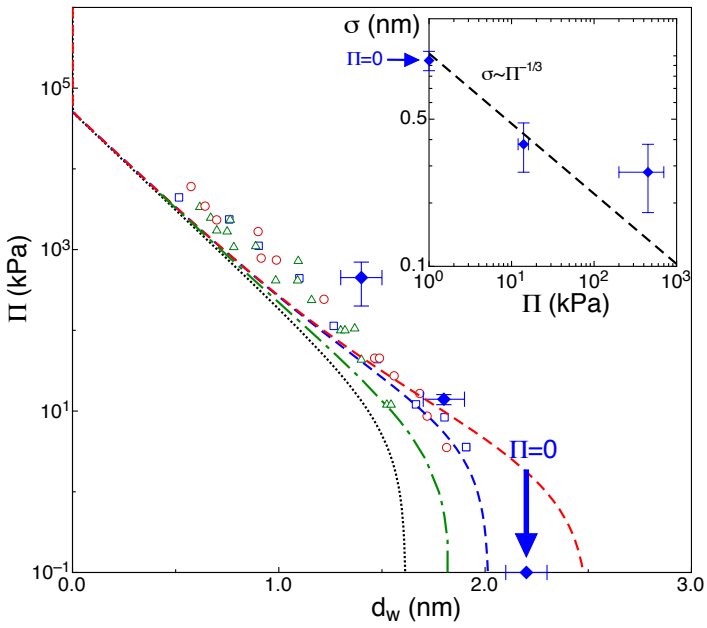


FIGURE 2.12 – Pression osmotique appliquée en fonction de d_w. Points ouverts : data de Petrache et al. [9] sur du EggPC (□), du DMPC (◊) et du DPPC (△) en phase fluide. Le code couleur des lignes est le même que pour la figure 2.9. En pointillés noirs : potentiel microscopique $U_{\mathrm{vdW}} + U_{\mathrm{hyd}} + U_{\mathrm{el,GP}}$ sans contribution entropique. En insert : $\sigma_{th,2}$ en fonction de la pression appliquée. La ligne discontinue représente une loi en $\sigma_{th,2} \sim \Pi^{-1/3}$.

2.4 Conclusion

Décrire de manière réaliste les interactions entre membranes est un problème complexe de physique statistique. Nous avons vu et comparé dans cette partie deux théories traitant des effets du confinement sur le potentiel d'interaction total. Les théories dites de potentiel effectif autorisent la description des effets entropiques par le simple ajout d'un nouveau potentiel au potentiel microscopique. Ce potentiel, effectif donc, peut être déterminé de différentes manières selon les situations considérées. Diverses expériences sur des systèmes multilamellaires ont montré que seul un potentiel de type "soft" était en accord avec les résultats expérimentaux.
La théorie développée par Mecke et al. [101] permet d'obtenir de façon auto-cohérente les valeurs moyennes de l'épaisseur d'eau inter-membranaire d_w, de la rugosité thermique σ_{th} et de la dérivée seconde du potentiel inter-membranaire $U''_{1,2}$. Bien qu'elle décrive de manière satisfaisante la transition continue entre une répulsion de type "soft" et une répulsion de type murs durs, elle ne permet pas, pour le moment, de rendre compte des résultats expérimentaux probablement à cause d'un mauvais échantillonnage des micro-états les plus confinés.

Les expériences de diffusion de rayons X sur des doubles bicouches supportées, assorties d'une modélisation minutieuse des interactions microscopiques, ont mis en évidence la nécessité de prendre en compte la faible répulsion électrostatique entre bicouches composées de lipides zwitterioniques, et permet de tester les différents potentiels, effectifs et électrostatiques, proposés dans la littérature. L'analyse couplée de courbes de réflectivité spéculaire et hors-spéculaire montre également que les bicouches supportées sont plus hydratées que les phases multilamellaires, possiblement à cause des défauts structuraux de ces dernières. Enfin, nous avons montré qu'il est possible d'accéder au régime d'interaction à courte portée par application d'une pression osmotique sur une double bicouche.

Ces expériences ouvrent un vaste champ de possibilités abordables grâce au contrôle des interactions dans les doubles bicouches supportées, telles que la transition de décollement, les effets de différentes molécules à vocation biologique, les conditions d'adhésion d'une membrane à une paroi, etc ...

Quatrième partie

Fluctuations d'une membrane unique sous champ électrique

De par leur faible perméabilité aux électrolytes, les membranes phospholipidiques voient leurs propriétés sensiblement modifiées par l'application d'un champ électrique. Une vésicule géante peut, par exemple, se déformer sous l'action d'un champ électrique continu ou alternatif [126]. Pour des tensions transmembranaires importantes, des pores peuvent se former dans la vésicule [127, 128]. Ce phénomène nommé électroporation est non seulement intéressant du point de vue de la physique fondamentale, car lié aux paramètres élastiques et structuraux des bicouches, mais également dans le domaine des biotechnologies. Il est en effet possible d'utiliser l'électroporation pour introduire des macromolécules (fragments d'ADN, protéines, principes actifs, etc...) à l'intérieur d'une cellule [129].
Les techniques expérimentales basées sur l'application d'un champ électrique sur une membrane lipidique, comme l'électroporation, l'électrofusion et l'électroformation, ont été développées de façon empirique et restent mal comprises du point de vue fondamental. Dans cette partie nous nous intéresserons plus particulièrement au phénomène d'électroformation, en étudiant les effets d'un champ électrique alternatif sur une membrane phospholipidique. Nous caractériserons dans un premier temps les propriétés de doubles bicouches de DSPC sous champ électrique par diffusion de rayons X, puis nous étudierons les conditions de déstabilisation de simples bicouches supportées de différentes natures.

1. Mesure des effets du champ électrique

1.1 Contexte et enjeux de l'étude

1.1.1 Principes de l'électroformation

L'électroformation est l'une des méthodes les plus utilisées en laboratoire pour former des vésicules géantes unilamellaires (GUVs). Elle permet d'obtenir rapidement des vésicules de plus grandes tailles et avec moins de défauts que les GUVs obtenues par formation spontanée de vésicules [130, 131].

Décrivons succinctement le protocole expérimental classique d'électroformation de GUVs tel que développé par Angelova et al. [132, 133, 134]. Les lipides, généralement dissous dans du chloroforme à une concentration de 1 à 2 $\mathrm{mg{\cdot}mL^{-1}}$, sont déposés sur une lame de verre couverte d'une fine couche d'oxyde d'indium-étain (ITO) conductrice. Le film de lipide est ensuite hydraté et placé dans une cellule fermée (voir la figure 1.1 page suivante). On applique un champ électrique alternatif (AC) d'une fréquence de 10 Hz au système, d'abord à une amplitude faible (~ 0.5 V pour une distance inter-électrode d'environ 2 mm), augmentée graduellement par pas de 0.5 V toutes les 20 minutes jusqu'à une valeur de 2 V. La fréquence est finalement réduite à 5 Hz pendant quelques minutes pour détacher les vésicules des électrodes.

Les vésicules ainsi obtenues sont sphériques, unilamellaires, et ont un diamètre compris entre 5 μm et 50 μm. Cette technique impose certaines contraintes : les vésicules sont initialement tendues, d'une distribution de tailles large, et doivent nécessairement être formées en phase fluide. La force ionique de la solution doit également être inférieure à 50 mM, loin des conditions physiologiques (100 - 200 mM KCl ou NaCl).

Un certain nombre de variations complexes, et toujours empiriques, de ce protocole expérimental ont permis d'améliorer les caractéristiques des vésicules obtenues par électroformation [135, 136, 137]. Néanmoins, la nature exacte de la déstabilisation du film multilamellaire plan de lipides vers une géométrie sphérique close de vésicules n'est pas encore bien comprise. Une modélisation précise des effets d'un champ électrique sur une membrane phospholipidique, accompagnée d'expériences sur des systèmes modèles et très contrôlés, permettrait de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu lors de l'électroformation, et éventuellement d'améliorer les protocoles expérimentaux existants.

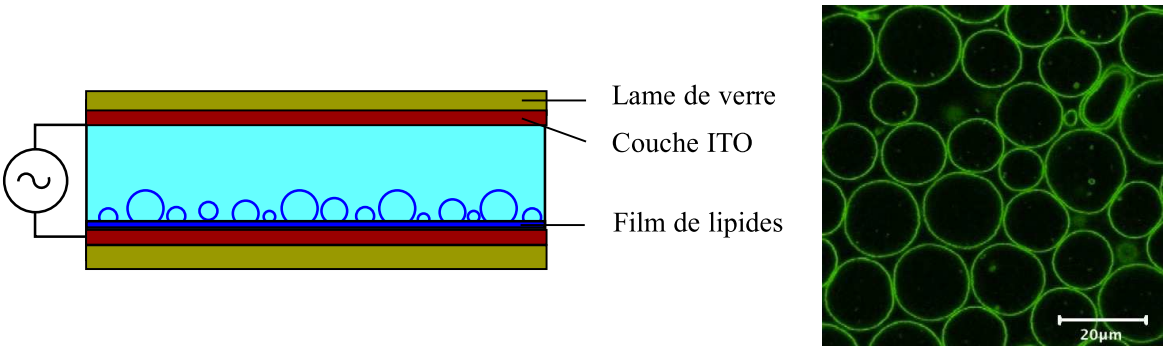


FIGURE 1.1 – A gauche : représentation schématique de la technique d'électroformation de vésicules. A droite : GUVs formées par électroformation (extrait de [138]).

1.1.2 Modélisation d'une membrane sous champ électrique

Déstabilisation d'une membrane par un champ électrique Suivons dans un premier temps le modèle développé par Sens et Isambert d'une membrane peu perméable aux électrolytes, libre[1] ($U'' = 0$), soumise à un champ électrique continu (DC) transverse, dans la limite des hautes concentrations en sel ($\ell_D \to 0$) [139].

Sous l'action du courant électrique imposé, les charges en solution vont s'accumuler de part et d'autre de la bicouche induisant un champ électrique transmembranaire $E_m \sim E\chi_m/\chi_s$, où χ_m et χ_s sont respectivement les résistivités de la membrane et du solvant, et E désigne le champ imposé à la cellule.
Dans le cas d'une membrane parfaitement plane, les éléments d'aire des interfaces inférieures et supérieures sont égales : $d\Sigma = d\Sigma_- = d\Sigma_+$, et le champ transmembranaire E_m induit une densité de charge $\sigma_0 = \varepsilon_m E_m$ sur chacune des interfaces,

1. Il n'existe, à notre connaissance, pas de modèle de membrane en interaction avec son environnement sous champ électrique.

où ε_m est la permittivité diélectrique de la membrane ($\simeq 2\varepsilon_0$). Les forces exercées à chaque interface sont opposées, ne résultant qu'en une compression de la bicouche.

Comme nous l'avons vu, une bicouche supportée n'est jamais parfaitement plane et la symétrie est rompue par ses fluctuations thermiques et sa rugosité statique : la distribution des charges de surface n'est pas uniforme. Prenons pour exemple une membrane d'épaisseur d_m déformée comme $h(x) = h_q \cos qx$ (voir la figure 1.2 page ci-contre). L'élément d'aire de la face supérieure $d\Sigma_+$ diffère de celui de la face inférieure $d\Sigma_-$:

$$\begin{aligned} d\Sigma_+ =& \left[1 + \frac{d_m}{2}(C_1 + C_2) + \left(\frac{d_m}{2}\right)^2 C_1 C_2\right] d\Sigma, \\ d\Sigma_- =& \left[1 - \frac{d_m}{2}(C_1 + C_2) + \left(\frac{d_m}{2}\right)^2 C_1 C_2\right] d\Sigma. \end{aligned} \tag{1.1}$$

C_1 et C_2 sont les courbures principales de la membrane telles que définies à la section 1.1.2 page 11. Dans notre exemple $C_1 \sim q^2 h_q$ et $C_2 = 0$:

$$\begin{aligned} d\Sigma_+ =& \left[1 + \frac{d_m}{2} q^2 h_q\right] d\Sigma, \\ d\Sigma_- =& \left[1 - \frac{d_m}{2} q^2 h_q\right] d\Sigma. \end{aligned} \tag{1.2}$$

On peut alors calculer la densité de charge induite sur chaque interface :

$$\begin{aligned} \sigma_+ \simeq& \frac{\partial Q}{\partial \Sigma_+} \sim \sigma_0 \left[1 - \frac{d_m}{2} q^2 h_q\right], \\ \sigma_- \simeq& \frac{\partial Q}{\partial \Sigma_-} \sim \sigma_0 \left[1 + \frac{d_m}{2} q^2 h_q\right]. \end{aligned} \tag{1.3}$$

La force δF_q qui agit sur un élément de surface $d\Sigma$ s'écrit :

$$\begin{aligned} \delta F_q &\sim (\sigma_+ - \sigma_-) E_m d\Sigma \\ &\sim -\sigma_0 E_m d_m q^2 h_q d\Sigma \sim -\varepsilon_m E_m^2 d_m q^2 h_q d\Sigma. \end{aligned} \tag{1.4}$$

La contribution des charges de surface à l'énergie libre totale par unité de surface est donc égale à :

$$\frac{\delta \mathcal{F}_{q,el}}{d\Sigma} = -\frac{\Gamma_{el}}{2} (q h_q)^2 , \tag{1.5}$$

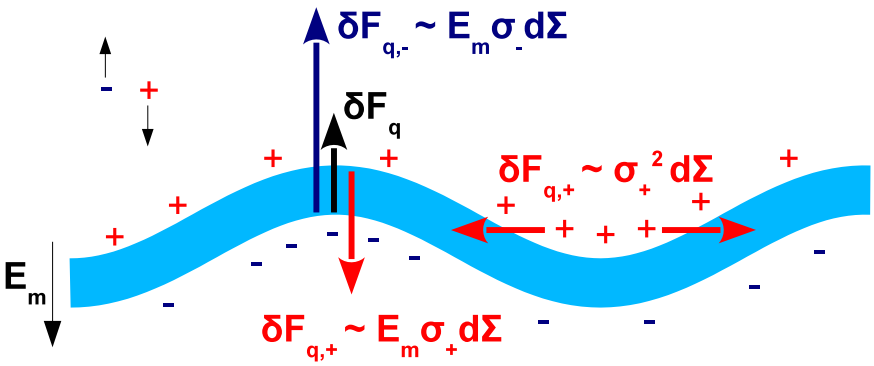


FIGURE 1.2 – Schéma représentant la distribution non uniforme des charges électriques sur une membrane courbe sous champ électrique.

avec $\Gamma_{el} = \varepsilon_m d_m E_m^2 > 0$. Γ_{el} a les dimensions d'une tension de surface, et vient se soustraire à γ dans l'expression de l'énergie libre totale de la membrane. Cet approche simplifiée nous permet de montrer comment la distribution non uniforme des charges de surface induit une diminution de la tension de la membrane. Un calcul plus rigoureux à partir du tenseur des contraintes de Maxwell permet d'obtenir cette contribution dans le cas général :

$$\mathcal{F}_{el} = \sum_q \mathcal{F}_{q,el} = -\frac{\Gamma_{el}}{2} \int dS \, (\nabla h)^2 \, . \tag{1.6}$$

Ce terme s'ajoute à l'expression de l'énergie libre de la membrane en diminuant sa tension à l'équilibre γ :

$$\mathcal{F}[h] = \iint d^2\mathbf{r} \left[\frac{1}{2} \left((\gamma - \Gamma_{el}) \, (\nabla h)^2 + \kappa \, (\Delta h)^2 \right) \right] , \tag{1.7}$$

et le spectre de fluctuation s'écrit à présent :

$$\left\langle |h_{\mathbf{q}}|^2 \right\rangle = \frac{k_B T}{(\gamma - \Gamma_{el}) q^2 + \kappa q^4} . \tag{1.8}$$

Si $(\gamma - \Gamma_{el}) \leq 0$, le spectre de fluctuation diverge, et la membrane se déstabilise pour tous vecteurs d'onde q tels que :

$$q \leq \frac{-(\gamma - \Gamma_{el})}{\kappa} \equiv q_c . \tag{1.9}$$

Tous les modes compris entre 0 et q_c devraient donc être déstabilisés. En considérant les interactions hydrodynamiques entre la membrane et le solvant, ainsi que

la dissipation visqueuse interne à la membrane, Sens et Isambert ont montré qu'une sélection étroite de modes se déstabilisant plus rapidement s'opère. Leur modèle prédit que l'évolution aux temps courts des modes de Fourier h_q est donnée par l'équation linéarisée :

$$(\eta_w q + b_{fr} d_m^2 q^2)\dot{h}_q = -((\gamma - \Gamma_{el})q^2 + \kappa q^4)h_q \tag{1.10}$$

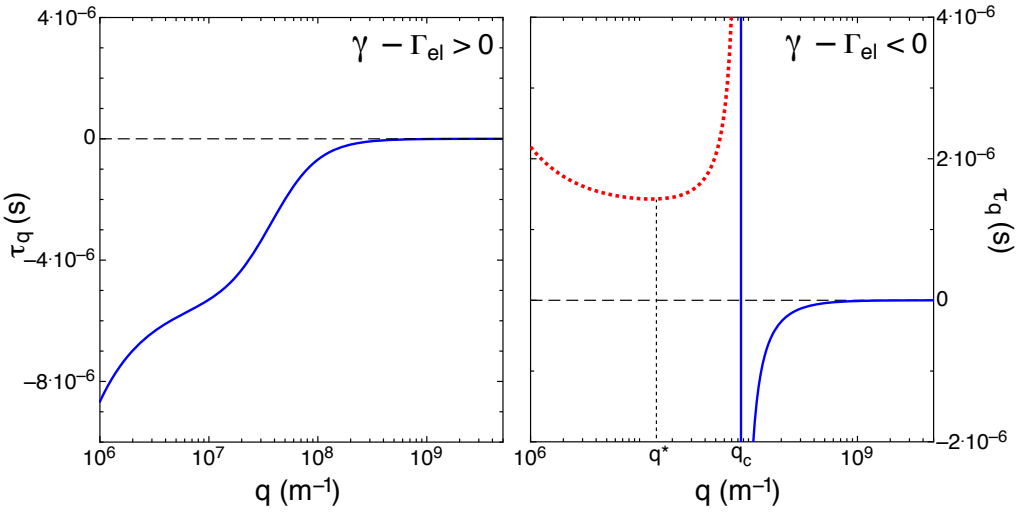


FIGURE 1.3 – Temps caractéristique τ_q en fonction du mode q. A gauche, $\gamma - \Gamma_{el} > 0$ et le critère de déstabilisation n'est pas atteint, la membrane est donc stable pour tous modes q. A droite, $\gamma - \Gamma_{el} < 0$ et les modes $q < q_c$ sont instables (ligne pointillée rouge, τ_q positif). Le minimum de la courbe dans la région instable donne le vecteur d'onde q^* se déstabilisant le plus rapidement.

En associant une évolution temporelle de la forme $h_q(t) \sim e^{t/\tau_q}$ à chaque mode de Fourier, on obtient comme temps caractéristique pour un mode donné (voir la figure 1.3) :

$$\tau_q = \frac{\eta_w}{\Gamma_{el} q}\left(\frac{1 + q/q_{\mathrm{dyn}}}{1 - (q/q_{\mathrm{c}})^2}\right) \tag{1.11}$$

avec :

$$q_{\mathrm{c}} = \sqrt{\frac{-(\gamma - \Gamma_{el})}{\kappa}} \simeq 10^8\,\mathrm{m}^{-1}, \tag{1.12}$$

$$q_{\mathrm{dyn}} = \frac{\eta_w}{b_{fr} d_m^2} \simeq 5 \times 10^5\,\mathrm{m}^{-1}. \tag{1.13}$$

Le terme q_{dyn} décrit la dissipation visqueuse dans et autour de la membrane : $\eta_w = 10^{-3}\,\mathrm{Pa{\cdot}s}$ désigne la viscosité dynamique du solvant, et $b_{fr} \simeq 10^8\,\mathrm{Pa{\cdot}s{\cdot}m^{-1}}$

le coefficient de friction entre les deux monocouches.

Si $\tau_q < 0$, alors $e^{t/\tau_q} \to 0$ et le mode q est stable. Comme nous le voyons dans l'expression 1.11, si $\Gamma_{el} < \gamma$, tous les modes sont stables. Si $\Gamma_{el} > \gamma$, l'ensemble des modes $q < q_c$ ont un temps d'évolution τ_q positif et sont donc déstabilisés.

La minimisation de τ_q par rapport à q donne le vecteur d'onde pour lequel la déstabilisation est la plus rapide. Pour $q_\mathrm{c} \gg q_\mathrm{dyn}$, τ_q présente un minimum pour $q^* = (q_\mathrm{dyn} q_\mathrm{c}^2)^{1/3}$. Les auteurs estiment la valeur de q^* de l'ordre de $2 \times 10^7\,\mathrm{m}^{-1}$, et prédisent donc une déstabilisation plus rapide des modes d'ondulations d'une longueur d'onde $\lambda^* = 2\pi/q^*$ de l'ordre du μm, représentant la taille des plus petites vésicules créées. Ces vésicules croissent ensuite par divers processus (fusion, échange de lipide avec la membrane, ...) pour atteindre la taille maximale observée expérimentalement comprise entre 5 et 50 μm.

Contribution positive au module de courbure Lacoste et al. ont développé un modèle plus général des effets d'un champ électrique continu sur les paramètres élastiques d'une membrane libre, basé sur la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann linéarisée [140] ou non[141]. Avant de décrire ces travaux plus en détail, reprenons l'approche décrite au paragraphe précédent d'une déformation de la membrane de la forme $h(x) = h_q \cos qx$, et calculons à présent la pression électrostatique agissant sur un élément de surface $d\Sigma$:

$$\begin{aligned} P_{elec} =& \frac{\left(\sigma_+^2 + \sigma_-^2\right)}{\varepsilon_m} \\ \sim& \frac{\sigma_0^2}{\varepsilon_m} d_m^2 q^4 h_q^2 \sim \varepsilon_m E_m^2 d_m^2 q^4 h_q^2. \end{aligned} \tag{1.14}$$

L'énergie libre par unité de surface se calcule directement :

$$\begin{aligned} \mathcal{F}_{el,q} =& P_{elec} dV = P_{elec} d_m d\Sigma \\ \sim& \varepsilon_m d_m^3 q^4 h_q^2 E_m^2 d\Sigma. \end{aligned} \tag{1.15}$$

En plus de la contribution négative du champ à la tension de la membrane calculée précédemment, le champ induit donc une contribution positive au module de courbure, qui tend à stabiliser la membrane en limitant ses déformations. En effet, ce terme positif en q^4 s'ajoute à κ dans les expressions de l'énergie libre totale

et du spectre de fluctuation :

$$\mathcal{F}[h] = \iint d^2\mathbf{r} \left[\frac{1}{2}\left((\gamma - \Gamma_{el})\,(\nabla h)^2 + (\kappa + \kappa_{el})\,(\Delta h)^2\right)\right],$$
$$\left\langle |h_{\mathbf{q}}|^2 \right\rangle = \frac{k_B T}{(\gamma - \Gamma_{el})q^2 + (\kappa + \kappa_{el})q^4}. \tag{1.16}$$

A nouveau, cette approche nous permet d'interpréter de façon simple les effets du champ électrique sur les fluctuations d'une membrane, mais ne permet pas de saisir l'intégralité des phénomènes mis en jeu.

Le modèle développé par Lacoste et al. montre que Γ_{el} et κ_{el} dépendent chacun des caractéristiques de la couche de Debye et du champ électrique transmembranaire. Leurs expressions, complexes, se simplifient dans la limite du régime de Debye-Hückel ($\ell_D \to 0$) :

$$\Gamma_{el,DH} = \varepsilon_m d_m E_m^2, \tag{1.17}$$

$$\kappa_{el,DH} = \frac{5}{24}\varepsilon_m d_m^3 E_m^2. \tag{1.18}$$

On retrouve bien la forme des expressions obtenues avec notre approche simplifiée. Notons que le facteur numérique 5/24 dans l'expression de $\kappa_{el,DH}$, calculé dans le modèle de membrane d'épaisseur finie de la Réf. [140], est obtenu égal à 1/12 dans les approches de Ziebert et al. [142] ainsi que d'Ambjörnsson et al. [143]; dans le premier cas avec un modèle de membrane d'épaisseur nulle (mais de conductivité et de résistivité finies), et dans le second par un modèle de membrane d'épaisseur finie décrite par une énergie libre effective.

Lacoste et al. ont calculé les valeurs de κ_{el} et γ_{el} pour une large gamme de longueurs de Debye variant du nanomètre à la dizaine de microns, présentés sous la forme de rapports $\alpha_\kappa = \kappa_{el}/\kappa_{el,DH}$ et $\alpha_\Gamma = \Gamma_{el}/\Gamma_{el,DH}$ (voir la figure 1.4 page ci-contre).

Pour finir le modèle de Lacoste et al. introduit également une contribution Γ_κ préfacteur d'un terme en q^3 dans le spectre de fluctuation. Cette correction, interdite à l'équilibre pour des raisons de symétrie, est cependant très petite ($\sim 10^{-24}$ J/m) pour des valeurs réalistes des paramètres du système [140], et ne sera pas prise en compte dans la suite.

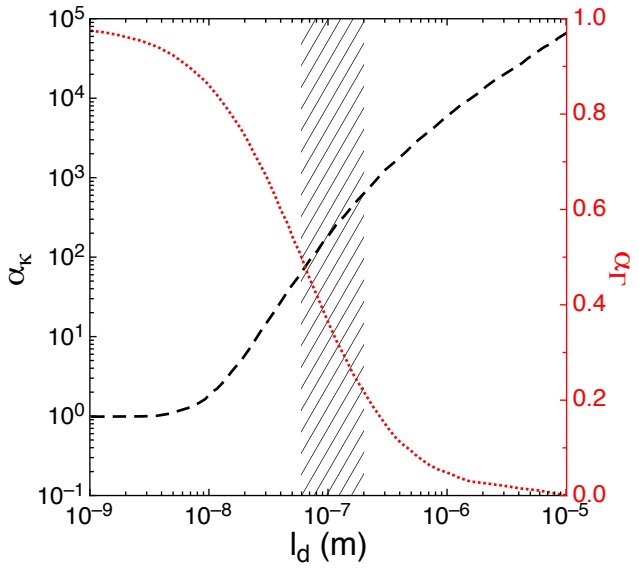


FIGURE 1.4 – En pointillés rouges (resp. tirets noirs) : valeurs prédites des rapports $\alpha_\Gamma = \Gamma_{el}/\Gamma_{el,DH}$ (resp. $\alpha_\kappa = \kappa_{el}/\kappa_{el,DH}$) par le modèle de Lacoste et al. [140] pour différentes valeurs de la longueur de Debye ℓ_D. Notons que α_κ varie de plusieurs ordres de grandeur tandis que α_Γ reste compris entre 0 et 1. Zone hachurée : valeurs de ℓ_D caractéristiques de nos systèmes.

1.2 Diffusion de rayons X sur une membrane sous champ électrique

1.2.1 Etat de l'art

Mesurer les effets d'un champ électrique faible (sous le seuil d'électroporation) sur les paramètres élastiques d'une membrane nécessite des expériences précises sur des systèmes modèles très contrôlés. Citons dans un premier temps les travaux de Constantin et al. sur la transition de décollement induite par un champ électrique, étudiée par réflectivité de rayons X sur des multicouches de lipides supportées [144]. Les auteurs mesurent dans un premier temps la cinétique de détachement des bicouches de l'empilement, en fonction de l'intensité et de la fréquence du champ. Leurs résultats montrent que les bicouches se détachent plus rapidement lorsqu'un champ de basse fréquence ($< 100\,\mathrm{Hz}$) est appliqué (voir la figure 1.5 page suivante). La cinétique de ce détachement ressemble fortement à celle d'une transition de décollement induite par une augmentation de température, mais à des échelles de temps très différentes.

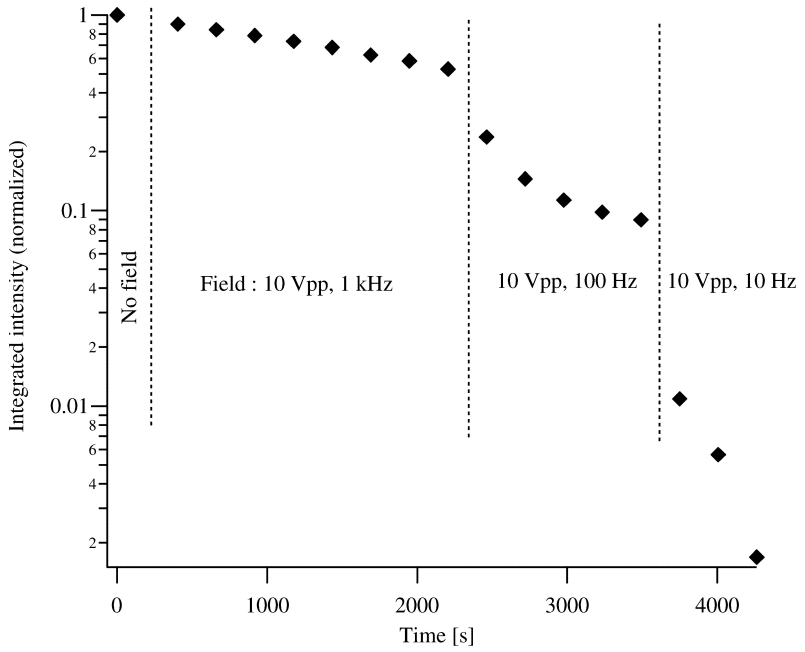


FIGURE 1.5 – Cinétique de décollement d'un empilement de bicouche sous champ électrique pour différentes fréquences du champ. L'intensité intégrée mesurée lors de ces expériences de réflectivité est directement liée au nombre de bicouches de l'empilement (issu de [144]).

Afin de comparer directement ces résultats aux théories de l'électroformation, les auteurs mesurent également l'amplitude moyenne des fluctuations, mais n'en détecte aucune modification lorsque le champ électrique est appliqué. La conclusion tirée est que les effets du champ n'affectent que les bicouches du sommet de l'empilement : leur contribution au signal de diffusion total étant minime, l'augmentation des fluctuations attendues ne peut être détectée. Cette hypothèse est cohérente avec la nature unilamellaire des vésicules obtenues par électroformation, signe qu'il s'agit très certainement d'un processus de décollement bicouche par bicouche. Il est également possible que l'empilement de membranes soit court-circuité par les défauts structuraux à travers lesquels le courant circule préférentiellement.

La diffusion de rayonnement sur des bicouches et doubles bicouches supportées permet de s'affranchir des contraintes des échantillons multilamellaires, de par leur absence de défauts structuraux, et de par la possibilité de caractériser les fluctuations d'une membrane unique faiblement liée au substrat.
Les travaux de Lecuyer et al. ont permis de montrer qu'une double bicouche supportée peut être déstabilisée par un champ électrique de basse fréquence $f < 10\,\mathrm{Hz}$

[12, 35, 145], en accord avec les résultats obtenus sur des phases multilamellaires [144]. Des expériences de réflectivité de neutrons ont permis aux auteurs d'obtenir des résultats compatibles avec l'existence d'une contribution négative à la tension de surface, induite par le champ électrique.

Grâce à des analyses couplées de réflectivité spéculaire et hors-spéculaire de rayons X, Malaquin et al. ont pu mesurer indépendamment Γ_{el} et κ_{el} pour des fréquences de 50 Hz et de 10 Hz à une tension fixe de 5 V [11]. Ces analyses préliminaires montrent qu'il est possible d'accéder directement aux corrections apportées aux modules élastiques d'une bicouche flottante. Pour une fréquence de 50 Hz, Γ_{el} est évalué à $0.52 \pm 0.15\,\mathrm{mN/m}$ et κ_{el} à $65 \pm 15\,\mathrm{k_B T}$, et pour une fréquence de 10 Hz $\Gamma_{el} = 1.05 \pm 0.15\,\mathrm{mN/m}$ et $\kappa_{el} = 185 \pm 15\,\mathrm{k_B T}$. Les travaux suivants s'inscrivent dans la continuité de ceux de Malaquin et al., et visent à caractériser les effets de la fréquence et de l'amplitude du champ électrique appliqué.

1.2.2 Dispositif expérimental

Le procédé de fabrication des échantillons est le même que celui décrit dans la partie III. Le champ électrique est appliqué entre une lame ITO placée dans le fond de la cellule et le substrat de silicium, rendu conducteur par déposition sous vide d'une couche d'environ 200 nm de cuivre (voir la figure 1.6 page suivante). Les caractéristiques du champ appliqué sont contrôlées grâce à un Générateur de Basses Fréquences (GBF) [2]. Il est délicat d'appliquer un champ électrique continu sans provoquer une l'électrolyse de l'eau, observée même pour des tensions faibles de l'ordre du Volt. Nous nous limiterons donc à l'utilisation d'une tension alternative.

Les travaux de Lecuyer et al. [12, 145] et ceux de Malaquin et al. [11] ont permis de déterminer les fréquences et amplitudes optimales pour observer les effets du champ électrique sur les membranes, sans les dégrader ni oxyder le substrat :

- une couche d'oxyde de silicium croît rapidement lorsque la fréquence du champ est inférieure à ~ 5 Hz, et ce même pour des tensions faibles,
- les effets du champ ne sont mesurables que pour une fréquence inférieure à 100 Hz, et sont d'autant plus forts que la fréquence est basse,
- dans cette gamme de fréquences la tension peut monter jusqu'à ~ 10 V sans abimer le substrat ni les bicouches,
- une conductivité plus élevée de l'eau par ajout de sel accroît certes les effets du champ local, mais mène également à un décollement de la bicouche flottante

2. Les tensions indiquées ici sont définies comme étant l'amplitude A d'un signal sinusoïdal $U(t) = A\sin(\omega t)$.

soudain et bien sûr indésirable ici.

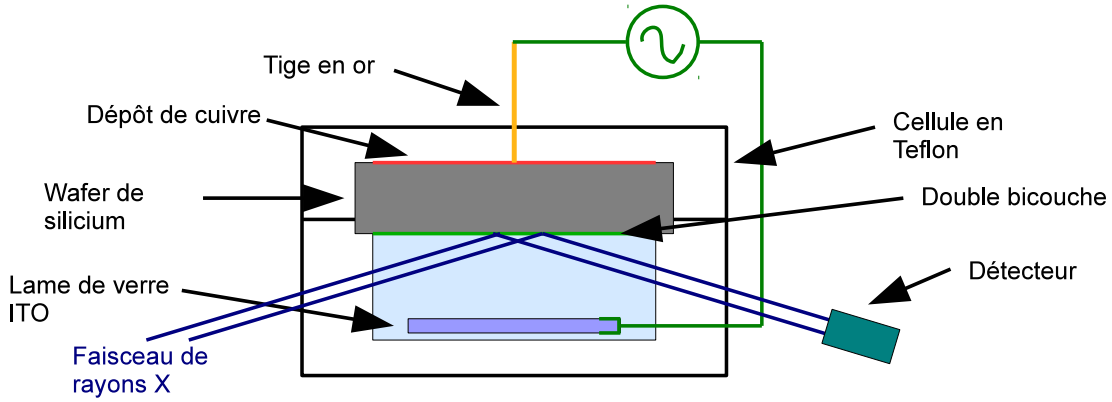


FIGURE 1.6 – Dispositif expérimental utilisé pour appliquer un champ électrique à une double bicouche supportée.

Fort des résultats de ces analyses préliminaires, nous avons mené plusieurs séries d'expériences sur des doubles bicouches de DSPC en phase fluide dans de l'eau milli-Q, sans ajouter de sel, pour des fréquences variant de 50 Hz à 10 Hz et des tensions toujours inférieures ou égales à 10 V.

1.2.3 Modifications structurelles

L'analyse des courbes de diffusion hors-spéculaire de rayons X nous permet à la fois de caractériser la structure des doubles bicouches (voir la figure 1.7), et d'accéder à leurs paramètres élastiques. Les résultats essentiels des mesures effectuées pour chaque série d'expérience sont répertoriés dans le tableau 1.1 page 120.

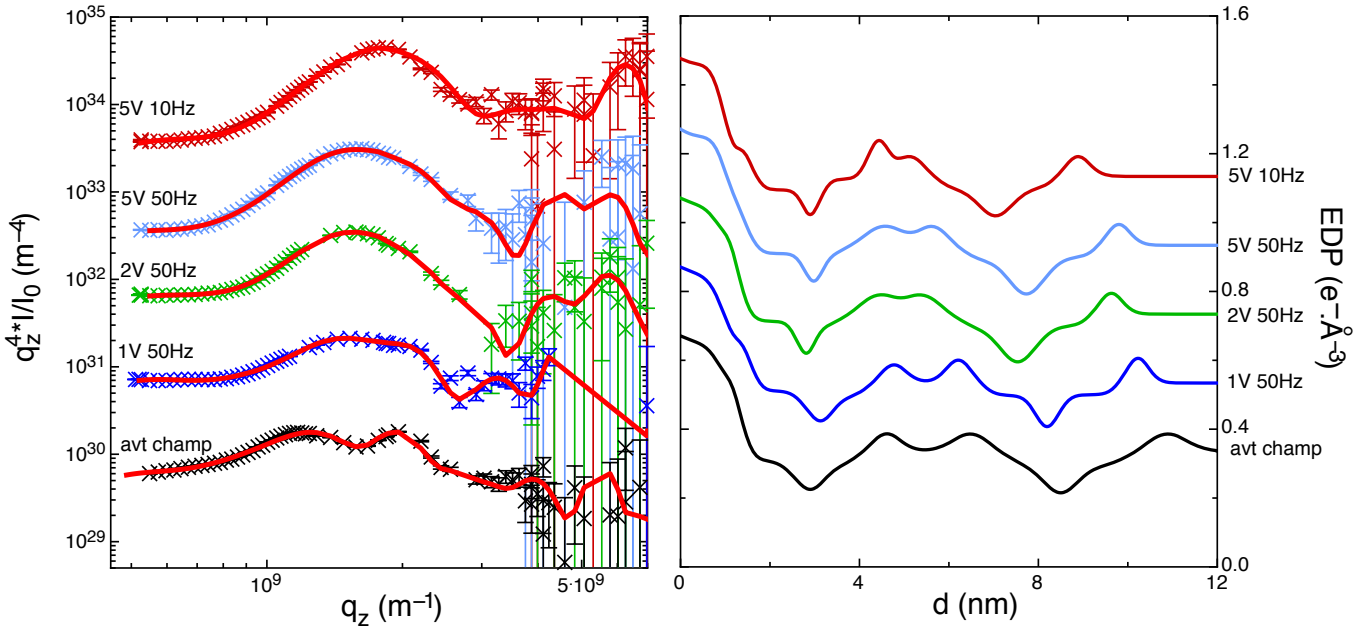


FIGURE 1.7 – A gauche : courbes de diffusion hors-spéculaire en fonction de q_z pour différentes fréquences et amplitudes du champ appliqué et ajustements associés. Les courbes sont chacune décalées d'une décade par soucis de lisibilité. A noter la croissance d'une "bosse" vers $1.5\,\mathrm{nm}^{-1}$ significative d'une augmentation de l'amplitude des fluctuations thermiques, et son déplacement vers les plus grands q_z traduisant le rapprochement des membranes. A droite : profils de densité électronique associés, décalés de $0.2\,\mathrm{e}^-\cdot\mathrm{Å}^{-3}$.

Le premier résultat intéressant qui se dégage de ces analyses est la diminution de l'épaisseur d'eau entre les bicouches lorsqu'un champ électrique est appliqué (voir la figure 1.8). La diminution d'épaisseur d'eau est d'autant plus importante que la tension est élevée et la fréquence basse, d_w pouvant atteindre une valeur de 5 ± 1 Å pour un champ de 5 V 10 Hz. Nous observons dans le cas de la série 4 que même un champ de faible tension (1 V) peut mener à une diminution importante de l'épaisseur d'eau ($\sim$ 68 %). Cet effet peut s'expliquer par la présence d'une pression électrostatique sur la bicouche flottante qui tend à la rapprocher du substrat. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, une variation minime du potentiel d'interaction suffit à modifier de façon conséquente d_w.

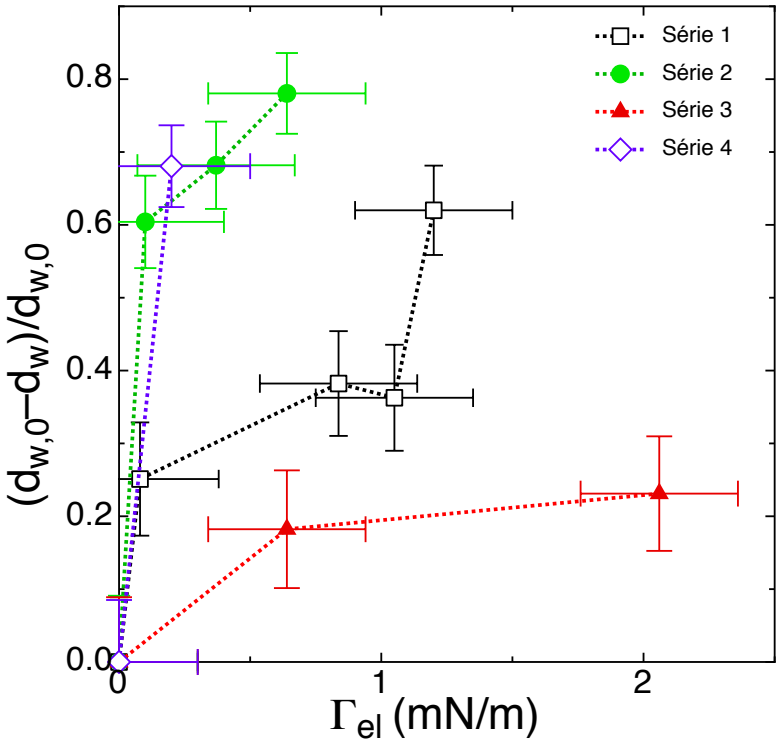


FIGURE 1.8 – Variation relative de l'épaisseur d'eau inter-membranaire, tracée en fonction de la tension induite par le champ Γ_{el}, qui est une mesure indirecte du champ local.

Nous observons également une compression des bicouches sous champ (voir la figure 1.9), de l'ordre de 5 % en moyenne et atteignant $\sim$ 30 % pour la série 3, à laquelle nous avons appliqué un champ fort à basse fréquence sans étapes intermédiaires. Ce phénomène d'électrostriction peut être modélisé de façon simple. Considérons la membrane comme un condensateur plan d'épaisseur variable d_m. La pression

électrostatique s'écrit $P_{elec} = \varepsilon_m E_m^2$. A l'équilibre mécanique, cette contrainte est compensée par la réponse élastique de la membrane $Y_\perp \Delta d_m / d_{m,0}$, i.e. :

$$\frac{\Delta d_m}{d_{m,0}} = \frac{\varepsilon_m E_m^2}{Y_\perp} \tag{1.19}$$

où $Y_\perp$ est le module de Young transverse de la bicouche, et $d_{m,0}$ son épaisseur à champ nul. Une bicouche sera donc d'autant plus comprimée que le champ local est important. La littérature donne des valeurs de $Y_\perp$ comprises entre 10^7 et 10^8 Pa, mesurées par électrostriction sur des membranes lipidiques supportées [146].
Estimons le champ électrique transmembranaire E_m grâce à nos mesures de Γ_{el}. Nous savons que $\Gamma_{el} = \alpha_\Gamma \varepsilon_m d_m E_m^2$, en prenant $\Gamma_{el} = 1 - 2\,\mathrm{mN/m}$ nous obtenons $E_m \simeq 1.8 - 2.5 \times 10^8\,\mathrm{V/m}$. La variation relative d'épaisseur $\Delta d_m / d_{m,0}$ résultante est comprise entre 1 et 10 %, en accord avec nos mesures expérimentales.

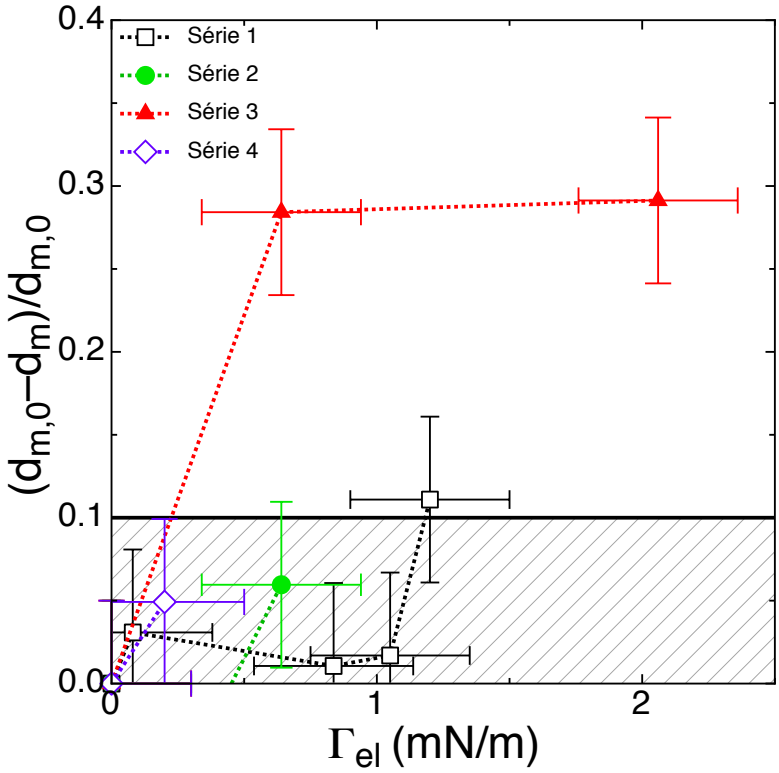


FIGURE 1.9 – Variation relative de l'épaisseur de la membrane flottante en fonction de la tension induite par le champ Γ_{el}. La zone hachurée est issue de l'équation 1.19.

Sur la figure 1.10 page suivante nous comparons les courbes de diffusion hors-spéculaire avant et après une série d'expériences sous champ électrique. La similitude entre les deux courbes contraste avec les différences dues au champ de la figure 1.7,

et montre clairement que le champ électrique n'endommage pas la bicouche de façon irréversible.
L'aire par lipide mesurée est comparable à la valeur de 54 Å^2 obtenue par Daillant et al. sur des doubles bicouches supportées [30], et ne varie pas significativement lorsque le champ est appliqué (voir la figure 1.11 page suivante). Seule la série 3 fait figure d'exception avec une variation de l'ordre de 30 %, que nous associons à nouveau au champ électrique intense auquel elle est soumise.
Le nombre de molécules d'eau par tête de lipide n'_w est cohérent avec les résultats précédents de la partie III, et ne varie pas avec l'application du champ dans la limite de notre résolution expérimentale, et ce même pour des épaisseurs d'eau inter-membranaire inférieures au nanomètre.

Ces résultats nous confortent sur l'intégrité de nos échantillons lorsqu'un champ électrique d'amplitude inférieure à 10 V et de fréquence supérieure à 10 Hz leur est appliqué. Nous pouvons donc mesurer les paramètres élastiques des bicouches flottantes sans craindre d'artefacts liés à la formation de pores ou d'autres défauts structuraux.

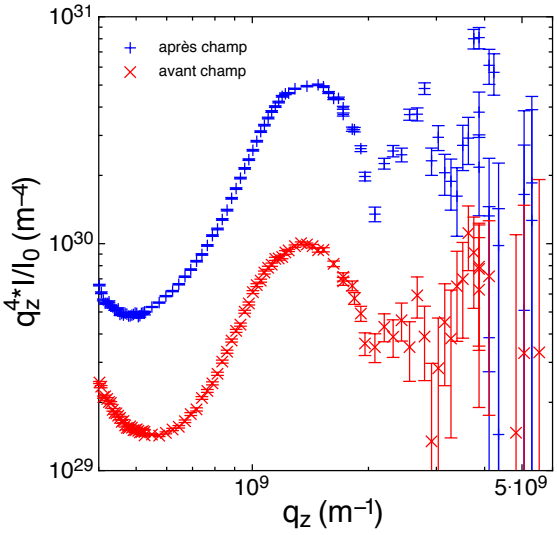


FIGURE 1.10 – Comparaison de courbes de diffusion hors-spéculaire avant et après l'application d'un champ électrique sur un même échantillon. Les courbes sont décalées d'une demi-décade par soucis de lisibilité. La différence entre les courbes est minime devant les différences induites par le champ électrique (voir la figure 1.7 page 115).

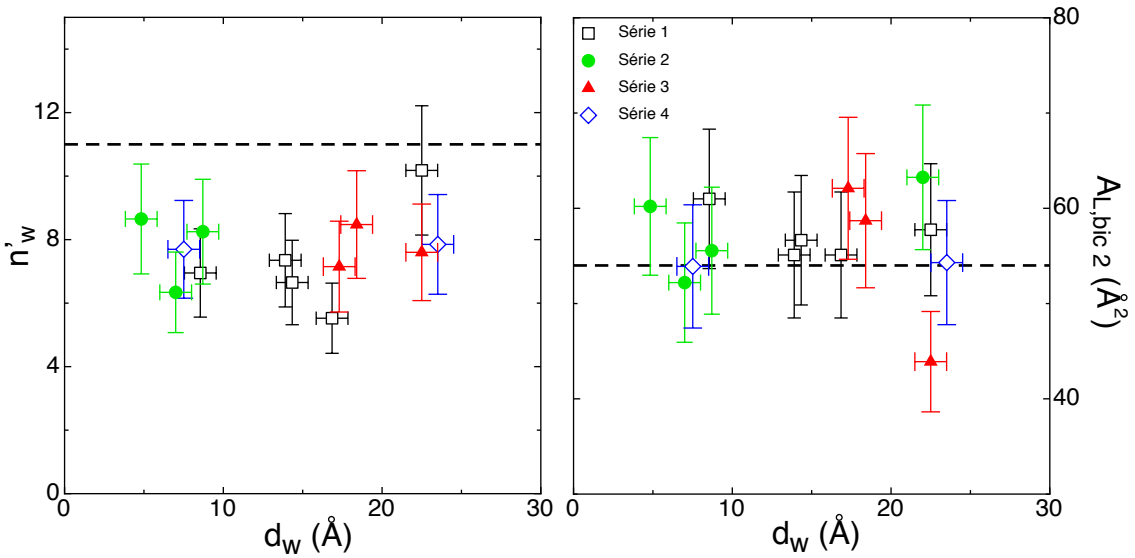


FIGURE 1.11 – A gauche : nombre de molécules d'eau par tête de lipide. Les tirets représentent la valeur de $n'_w = 11$ mesurée par Tristram-Nagle et al. sur du DOPC [44]. A droite : aire par lipide moyennée sur les deux monocouches de la bicouche flottante en fonction de l'épaisseur d'eau inter-membranaire. Les tirets représentent la valeur de $54\,\text{Å}^2$ mesurée par Daillant et al. [30].

Série 1 (□)	Avant Champ	1 V 50 Hz	2 V 50 Hz	5 V 50 Hz	5 V 10 Hz
d_w[Å]	22.5 ± 1	16.9 ± 1	13.9 ± 1	14.3 ± 1	8.6 ± 1
κ_2 [k_BT]	20 (10-35)	15 (10-30)	60 (45-80)	70 (50-90)	180 (150-220)
γ_2 [mN/m]	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2
$\sigma_{2,th}$ [Å]	8 ± 1.8	9 ± 2.6	10 ± 1.5	10 ± 1.5	11 ± 1.4
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	12.7 ± 0.2	12.3 ± 0.2	11.9 ± 0.2	11.9 ± 0.2	11.2 ± 0.2
κ_{el} [k_BT]	0	-4 (-16-17)	40 (22-65)	50 (27-74)	160 (128-202)
Γ_{el} [mN/m]	0	0.1 ± 0.3	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.3
q_s^* [10^7 m^{-1}]	9.1 ± 1	7.3 ± 1	4.3 ± 1	4.1 ± 1	2.2 ± 1

Série 2 (●)	Avant Champ	5 V 50 Hz	5 V 30 Hz	5 V 10 Hz
d_w[Å]	22.0 ± 1	8.7 ± 1	7.0 ± 1	4.8 ± 1
κ_2 [k_BT]	20 (15-30)	160 (130-210)	180 (150-220)	230 (200-280)
γ_2 [mN/m]	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.2
$\sigma_{2,th}$ [Å]	9 ± 1.8	8 ± 1	8 ± 1	12 ± 1.7
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	12.9 ± 0.2	12.7 ± 0.2	11.8 ± 0.2	11.0 ± 0.2
κ_{el} [k_BT]	0	140 (110-191)	160 (130-201)	210 (180-261)
Γ_{el} [mN/m]	0	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.7 ± 0.3
q_s^* [10^7 m^{-1}]	9.9 ± 1	5.1 ± 1	2.9 ± 1	1.8 ± 1

Série 3 (▲)	Avant Champ	5 V 10 Hz	10 V 10 Hz
d_w[Å]	22.5 ± 1	18.4 ± 1	17.3 ± 1
κ_2 [k_BT]	20 (15-40)	450 (200-600)	700 (500-1000)
γ_2 [mN/m]	0.50 ± 0.2	-0.1 ± 0.2	-1.6 ± 0.2
$\sigma_{2,th}$ [Å]	9 ± 2	5 ± 1	6 ± 1.5
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	12.7 ± 0.2	12.9 ± 0.2	12.7 ± 0.2
κ_{el} [k_BT]	0	430 (180-581)	680 (480-981)
Γ_{el} [mN/m]	0	0.6 ± 0.3	2.1 ± 0.3
q_s^* [10^7 m^{-1}]	9.1 ± 1	4.5 ± 1	3.7 ± 1

Série 4 (◊)	Avant Champ	1 V 50 Hz
d_w[Å]	23.5 ± 1	7.5 ± 1
κ_2 [k_BT]	30 (20-35)	40 (35-50)
γ_2[mN/m]	0.1 ± 0.2	-0.1 ± 0.2
$\sigma_{2,th}$ [Å]	15 ± 3.9	10 ±1
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	11.5 ± 0.2	12.5 ± 0.2
κ_{el}[k_BT]	0	10 (2-24)
Γ_{el} [mN/m]	0	0.2 ± 0.3
q_s^* [10^7 m^{-1}]	4.2 ± 1	6.7 ± 1

TABLE 1.1 – Effets du champ électrique sur les paramètres structuraux et élastiques de doubles bicouches de DSPC, classées par séries d'expériences.

1.2.4 Effets sur les paramètres élastiques

Comme attendu, le champ électrique a un effet significatif sur les paramètres élastiques de la membrane flottante (voir tableau 1.1). Nous observons systématiquement une augmentation du module de courbure et une diminution de la tension de la membrane lorsque l'amplitude du champ augmente ou lorsque la fréquence baisse, confirmant les analyses préliminaires de Malaquin et al. [11].
Pour des membranes sous champ loin de la limite de déstabilisation, les variations de l'amplitude de fluctuation $\sigma_{2,th}$ sont supposées faibles, car elles intègrent deux effets antagonistes : la contribution au module de courbure stabilisante, et la contribution à la tension de surface qui tend au contraire à amplifier les fluctuations. Les incertitudes expérimentales nous permettent difficilement de conclure quant à ces variations fines de l'amplitude de fluctuation $\sigma_{2,th}$.

Détermination du champ local L'une des difficultés rencontrée dans l'interprétation des résultats expérimentaux est la détermination de la relation liant le champ "local" transmembranaire E_m au champ électrique appliqué à la cellule. Lecuyer et al. ont proposé d'estimer ce champ local grâce à un modèle électrocinétique classique de double bicouche supportée, décrit en détail dans les Réf. [12, 145] (voir la figure 1.12 page suivante). Une membrane lipidique peu perméable aux électrolytes est classiquement modélisée par une résistance R_m et une capacité C_m en parallèle. La littérature donne une valeur de $R_m \cdot S$ de l'ordre de $\sim 1\,\mathrm{M\Omega{\cdot}cm^2}$ [147, 148] et de $C_m/S \sim 0.3 - 0.7\,\mu\mathrm{F{\cdot}cm^{-2}}$ [148, 149] où $S = 16\ - 20\,\mathrm{cm^2}$ est la surface couverte par la bicouche.
La cellule est décrite uniquement par la résistance du solvant $R \simeq 90\,\mathrm{k\Omega}$ et une capacité associée à la couche d'oxyde $C_{\mathrm{SiO_2}} \simeq 30\,\mu\mathrm{F}$, la résistance du silicium étant négligeable devant celle du solvant.

La tension aux bornes de la membrane U_m est alors donnée par :

$$U_m = \left|\frac{Z_m}{Z_{tot}}\right| U, \tag{1.20}$$

où $Z_m = R_m/(1+jR_mC_m\omega)$ est l'impédance de la bicouche et $Z_{tot} = R_s+(jC_{\mathrm{SiO_2}}\omega)^{-1}+2Z_m$ l'impédance totale de la cellule à laquelle on applique une tension sinusoïdale $U(t)$ de pulsation ω.

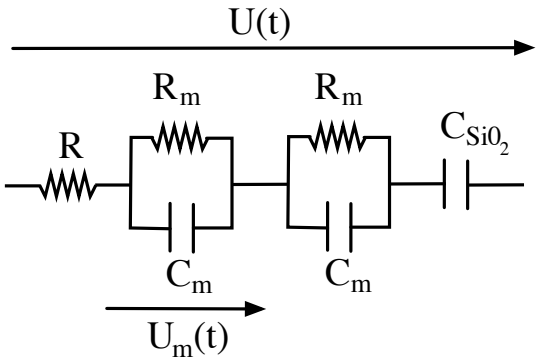


FIGURE 1.12 – Modèle électrocinétique d'une double bicouche supportée sur un substrat de silicium oxydé. $U(t)$ désigne la tension électrique appliquée à la cellule, et U_m la tension au borne d'une membrane.

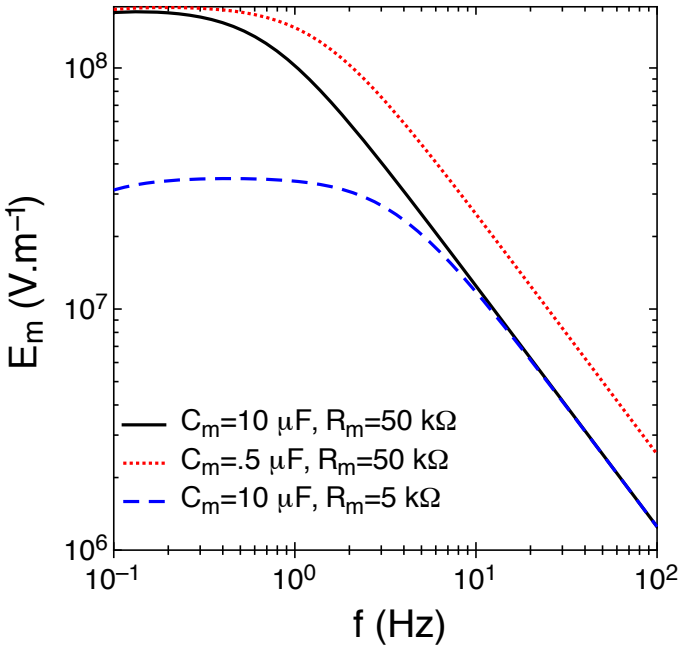


FIGURE 1.13 – Estimation du champ transmembranaire par un modèle classique d'électrocinétique. Les courbes sont calculées pour une tension de 5 V appliquée à la cellule, $R = 90\,\mathrm{k\Omega}$, $C_{\mathrm{SiO_2}} \simeq 30\,\mu\mathrm{F}$, une surface de $20\,\mathrm{cm}^2$ couverte par la bicouche, et différentes valeurs de C_m et R_m. Noter le comportement de type "passe-bas" du circuit.

Bien qu'il permette d'obtenir une expression analytique du champ transmembranaire, ce modèle fait intervenir de nouveaux paramètres dont il est difficile d'obtenir une estimation fiable. Nous savons par exemple que la résistivité de l'eau décroit en quelques dizaines de minutes, ce qui peut être source d'erreurs dans l'estimation de la résistance totale dont dépend fortement E_m.

Néanmoins, le comportement qualitatif de nos mesures est cohérent avec ce modèle : la tension de surface décroît lorsque l'amplitude du champ augmente ou lorsque sa fréquence baisse. Il est difficile de comparer les séries entre elles, car les conditions changent nécessairement entre chaque expérience (état de l'échantillon, longueur de Debye, etc ...).
Pour une série donnée, une loi du type $\Gamma_{el} \propto U^2$ issue des équations 1.17 et 1.18 page 110, est compatible avec nos résultats, mais il est difficile de conclure avec le nombre de points dont nous disposons (voir la figure 1.14 page suivante).
De même si l'on compare chaque série indépendamment, le comportement en fréquence est cohérent avec le modèle électrocinétique pour des valeurs de $R_m \cdot S = 1\,\mathrm{M\Omega{\cdot}cm^2}$ et $C_m/S = 0.5\,\mu\mathrm{F{\cdot}cm^{-2}}$, en accord avec les résultats de la littérature [148, 149].

Lecuyer et al. ne parviennent à ajuster leurs données expérimentales que pour une valeur de C_m inférieure de deux ordres de grandeur aux plus petites estimations de la littérature (voir la figure 1.14), mais leurs valeurs de Γ_{el} obtenues par des mesures indirectes sont surestimées, car elles ne prennent pas en compte les variations de κ et U'' avec le champ.

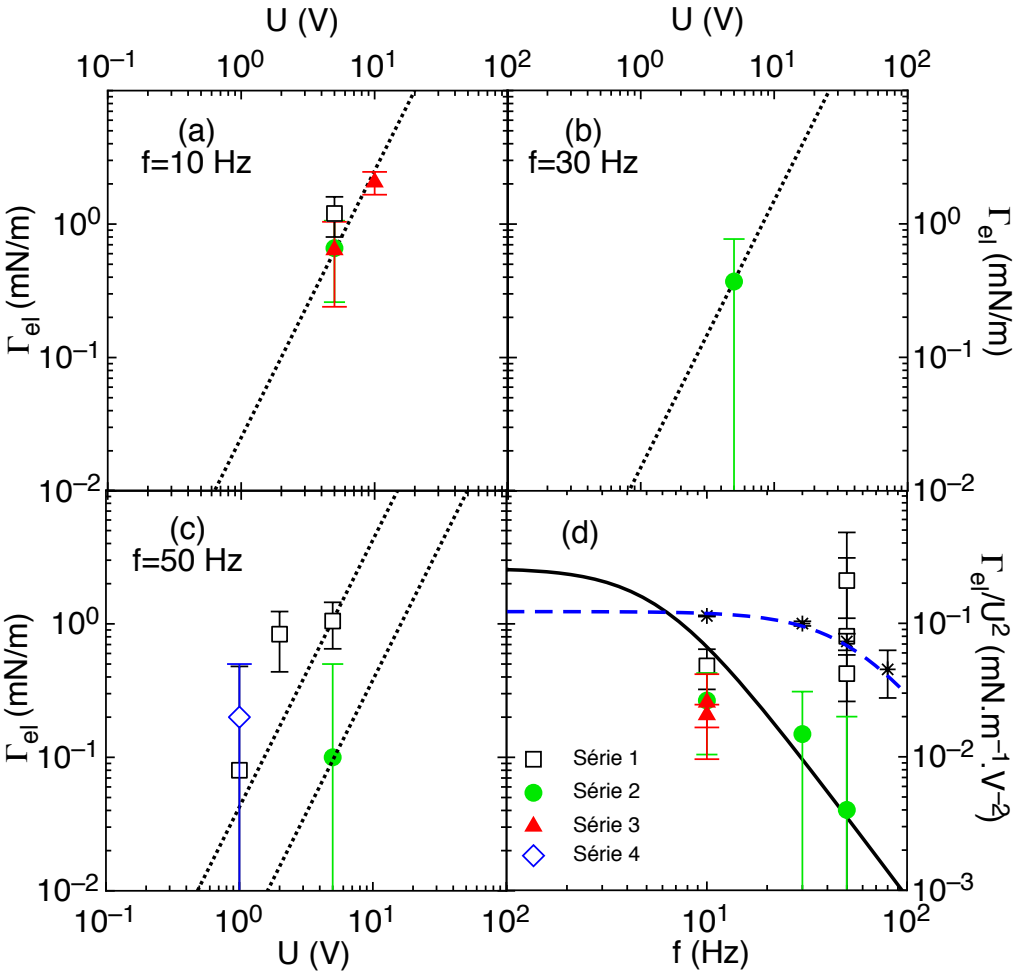


FIGURE 1.14 – (a), (b) et (c) : contribution du champ électrique à la tension Γ_{el} en fonction de l'amplitude du champ, pour trois fréquences différentes. Les pointillés représentent une loi de puissance $\Gamma_{el} \propto U^2$. (d) : comparaison des résultats expérimentaux au modèle électrocinétique discuté dans le texte, avec des valeurs classiques $R_m \cdot S = 1\,\mathrm{M\Omega{\cdot}cm^2}$ et $C_m/S = 0.5\,\mu\mathrm{F{\cdot}cm^{-2}}$ (ligne continue). $(*)$: résultats obtenus par Lecuyer et al. de manière indirecte par diffusion de neutrons et meilleur ajustement associé avec $R_m \cdot S = 0.82\,\mathrm{M\Omega{\cdot}cm^2}$ et $C_m/S = 8.1 \times 10^{-3}\,\mu\mathrm{F{\cdot}cm^{-2}}$ (ligne bleue discontinue) [145].

Devant ces difficultés à estimer la valeur du champ transmembranaire, nécessairement différent pour chaque échantillon, nous cherchons une relation directe entre Γ_{el} et κ_{el} ne faisant pas intervenir E_m. En reprenant les expressions 1.17 et 1.18 page 110 on obtient :

$$\begin{aligned} \kappa_{el,DH} =& \Gamma_{el,DH}\frac{5}{24}d_m^2 \\ \Rightarrow \kappa_{el} =& \frac{\alpha_\kappa}{\alpha_\Gamma}\frac{5}{24}d_m^2\Gamma_{el}, \end{aligned} \tag{1.21}$$

où les valeurs de α_κ et α_Γ se lisent directement sur la figure 1.4 page 111. Nous obtenons ainsi une relation entre les contributions du champ électrique à la tension et au module de courbure indépendante du champ transmembranaire, à laquelle nous pouvons directement comparer nos résultats expérimentaux.

Les valeurs de $\Gamma_{el} = \gamma(E=0) - \gamma(E)$ et $\kappa_{el} = \kappa(E) - \kappa(E=0)$, sont calculées pour chaque expérience et présentées sur la figure 1.15. Le champ induit une contribution négative à la tension de surface pouvant atteindre 2 mN/m, et une contribution positive au module de courbure comprise entre une dizaine de k_BT et environ 700 k_BT. L'augmentation de Γ_{el} est fortement corrélée à l'augmentation de κ_{el}, et est d'autant plus forte que la tension du champ est élevée ou sa fréquence faible. Ces résultats sont en bon accord avec la théorie développée par Lacoste et al. présentée ci-dessus, valable dans l'approximation de Debye-Hückel où l'équation de Poisson-Boltzmann peut être linéarisée [140].
Les longueurs de Debye-Hückel obtenues en ajustant nos données à ce modèle diffèrent selon les échantillons mais restent comprises entre 50 et 100 nm. Ces valeurs sont inférieures à la longueur de Debye-Hückel de l'eau pure (960 nm), ce qui s'explique par la dissolution du CO_2 dans l'eau au contact de l'air [89].

L'équation de Poisson-Boltzmann ne peut être linéarisée que si $eV_m/k_BT \ll 1$, où V_m est le potentiel transmembranaire. Un calcul d'ordre de grandeur issu du modèle électrocinétique donne $eV_m/k_BT \sim 1$ (voir la figure 1.13 page 122). Il serait intéressant de comparer nos résultats au modèle théorique plus récent développé par Ziebert et al. [141] qui traite des effets du champ électrique sans linéariser l'équation de Poisson-Boltzmann, ce qui n'a pu être fait dans le cadre de cette thèse faute de temps.

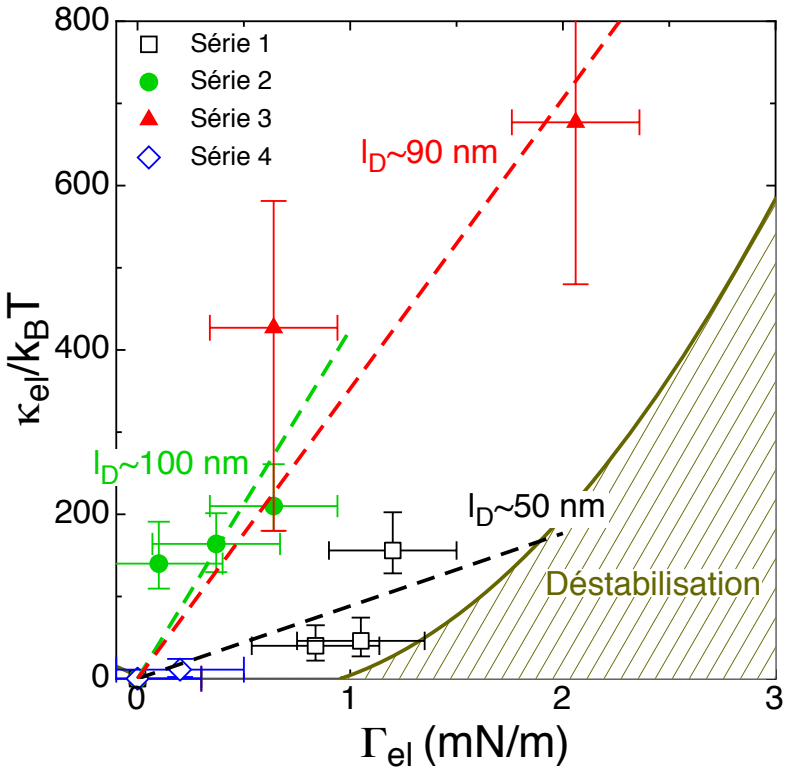


FIGURE 1.15 – Contribution au module de courbure κ_{el} induit par le champ électrique, en fonction de la contribution à la tension Γ_{el}. Ce mode de représentation permet d'éliminer la contribution du champ transmembranaire E_m (voir texte). Chaque type de point représente une série d'expériences différentes sur un même échantillon (voir le tableau 1.1). Les lignes discontinues désignent les prédictions du modèle de Lacoste et al. pour différentes valeurs de ℓ_D. La zone hachurée désigne la région où la membrane est déstabilisée par le champ, calculée pour $U'' = 10^{11.8}\,\mathrm{J{\cdot}m^{-4}}$, $\kappa = 20\,\mathrm{k_B T}$ et $\gamma = 0.5\,\mathrm{mN/m}$.

Prise en compte du potentiel d'interaction Pour pouvoir interpréter nos résultats expérimentaux, nous devons prendre en compte les interactions entre la membrane flottante et son environnement. Il nous faut donc adapter les théories présentées à la section 1.1.2 au cas $U'' \neq 0$. Un certain nombre de notations introduites dans ce paragraphe sont résumées dans le tableau 1.2.

γ, κ, U''	Paramètres élastiques avant l'application du champ
Γ_{el}, κ_{el}	Contributions du champ aux paramètres élastiques
$\Gamma_{el,c}$, $\kappa_{el,c}$	Valeur critique du couple (Γ_{el},κ_{el}) pour laquelle la membrane se déstabilise
q_c	Vecteur d'onde critique définit par l'équation 1.23 ci-dessous
τ_q	Temps caractéristique de croissance d'un mode q, pour une membrane déstabilisée
q^*	Vecteur d'onde minimisant τ_q, pour une membrane déstabilisée
$\tau_{q,s}$	Temps caractéristique de croissance d'un mode q, pour une membrane non déstabilisée
q_s^*	Vecteur d'onde minimisant $\tau_{q,s}$, pour une membrane non déstabilisée

TABLE 1.2 – Notations introduites dans ce paragraphe.

Nous supposons que le spectre de fluctuation d'une membrane sous champ électrique peut s'écrire :

$$\left\langle |h_{\mathbf{q}}|^2 \right\rangle = \frac{k_B T}{U'' + (\gamma - \Gamma_{el})q^2 + (\kappa + \kappa_{el})q^4}. \tag{1.22}$$

La membrane se déstabilise lorsque le spectre de fluctuation diverge, i.e. $\gamma - \Gamma_{el,c} = -2\sqrt{(\kappa + \kappa_{el,c})U''}$, faisant apparaitre deux vecteurs d'onde critiques :

$$q_{c,\pm} = \sqrt{\frac{-(\gamma - \Gamma_{el,c})}{2(\kappa + \kappa_{el,c})}\left(1 \pm \sqrt{1 - \frac{4(\kappa + \kappa_{el,c})U''}{(\gamma - \Gamma_{el,c})^2}}\right)}. \tag{1.23}$$

On retrouve bien les solutions de l'équation 1.9 page 107 pour $U'' = 0$: $q_{c,-} = 0$ et $q_{c,+} = \sqrt{-(\gamma - \Gamma_{el})/(\kappa + \kappa_{el,c})}$.
L'introduction d'un potentiel d'interaction implique donc de fait une sélection de modes lorsque la membrane est déstabilisée (voir la figure 1.16 page suivante). La membrane est stabilisée aux petites valeurs de q par ses interactions avec le substrat, et par l'énergie de courbure pour les grandes valeurs de q. Au final, lorsque le seuil de déstabilisation est atteint, seuls les modes compris entre $q_{c,-}$ et $q_{c,+}$ sont instables.

L'équation d'évolution temporelle des modes de fluctuation s'écrit ici :

$$(\eta_w q + b_{fr} d_m^2 q^2)\dot{h}_q = -\left(U'' + (\gamma - \Gamma_{el})q^2 + (\kappa + \kappa_{el})q^4\right) h_q, \tag{1.24}$$

et le temps caractéristique de croissance d'un mode q devient :

$$\tau_q = -\frac{\eta_w q + b_{fr} d_m^2 q^2}{U'' + (\gamma - \Gamma_{el})q^2 + (\kappa + \kappa_{el})q^4}. \tag{1.25}$$

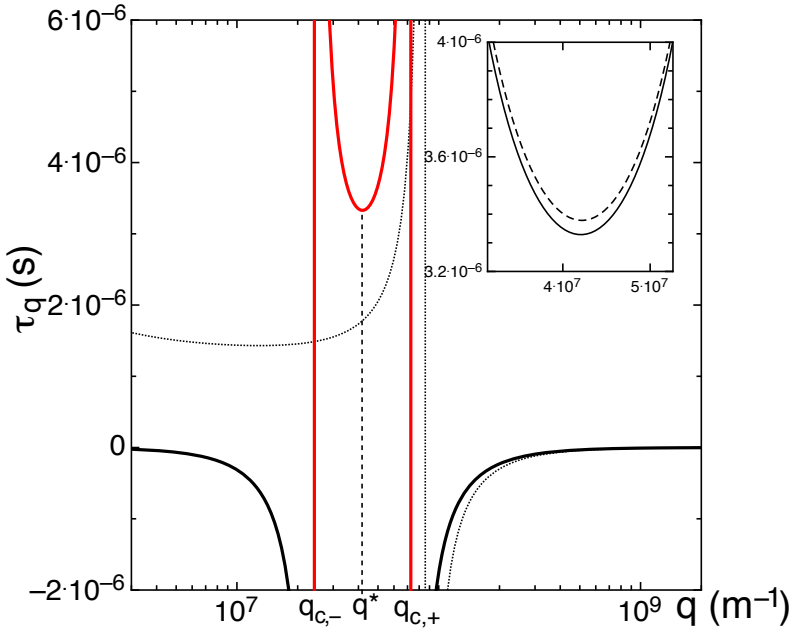


FIGURE 1.16 – Temps caractéristique τ_q en fonction du mode q calculé pour un potentiel non nul (ligne continue, en rouge la zone instable), et comparé au τ_q obtenu par Sens et Isambert [139] de la figure 1.3 (en pointillés). En insert : zoom sur le minimum de τ_q pour $\eta = 1 \times 10^{-3}$ Pa·s (tirets) et $\eta = 0$ (ligne continue).

q^* s'obtient comme précédemment par la minimisation de τ_q par rapport à q. A ce stade, nous effectuons également l'hypothèse $q_c \gg q_{\text{dyn}}$ pour pouvoir poursuivre le calcul analytique. Cette hypothèse traduit simplement le fait que dans le régime des faibles fluctuations, loin de la déstabilisation, les effets dus aux interactions hydrodynamiques avec le solvant sont négligeables devant la dissipation issue de la friction entre monocouches (voir la figure 1.16). Le terme $\eta_w q$ devient alors négligeable devant $b_{fr} d_m^2 q^2$:

$$\tau_q \simeq -\frac{b_{fr} d_m^2 q^2}{U'' + (\gamma - \Gamma_{el})q^2 + (\kappa + \kappa_{el})q^4}. \tag{1.26}$$

La position du minimum q^* et la valeur de ce minimum τ_{q^*} ont alors des expres-

sions simples :

$$q^* = \left(\frac{U''}{\kappa + \kappa_{el}}\right)^{1/4},$$
$$\tau_{q^*} = -\frac{b_{fr} d_m^2}{(\gamma - \Gamma_{el}) + 2\sqrt{(\kappa + \kappa_{el})U''}}. \tag{1.27}$$

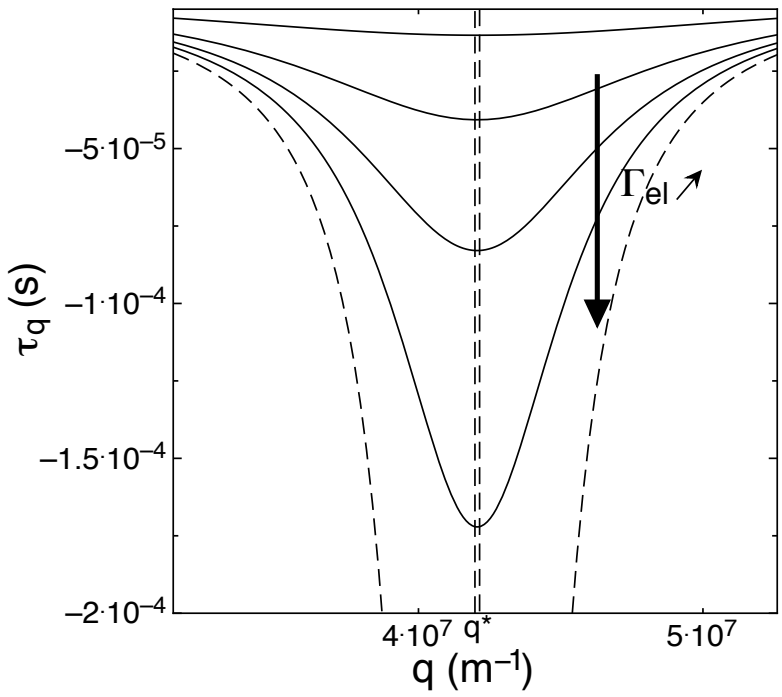


FIGURE 1.17 – Croissance de l'instabilité pour différentes valeurs de Γ_{el} en gardant κ_{el} constant. Les lignes continues représentent des systèmes non déstabilisés ($\tau_q < 0$). La ligne discontinue est obtenue pour Γ_{el} égal à $\Gamma_{el,c}$, sa valeur critique pour laquelle le système se déstabilise. Notons que la transition stable→instable ($\tau_q < 0 \rightarrow \tau_q > 0$) s'effectue par le biais d'une divergence de τ_q.

Dans les expériences décrites ici, les systèmes restent stables ($\tau_q^* < 0$). Nous pouvons néanmoins supposer que les q^* calculés à partir des mesures expérimentales vont converger vers les valeurs qu'ils auraient si nous avions atteint la déstabilisation (voir la figure 1.17). Nous notons q_s^* les vecteurs d'ondes calculés grâce à l'expression 1.27 sur des systèmes non déstabilisés.

Les valeurs de q_s^* mesurées sont données dans le tableau 1.1 page 120 et en figure 1.18 page suivante. q_s^* décroit comme attendu lorsque la fréquence du champ

diminue ou lorsque la tension du champ augmente, c'est-à-dire lorsque les effets du champ sont les plus forts. Elle est comprise entre 2 et $4 \times 10^7\,\mathrm{m}^{-1}$, soit de l'ordre de grandeur des résultats prévus par la théorie.

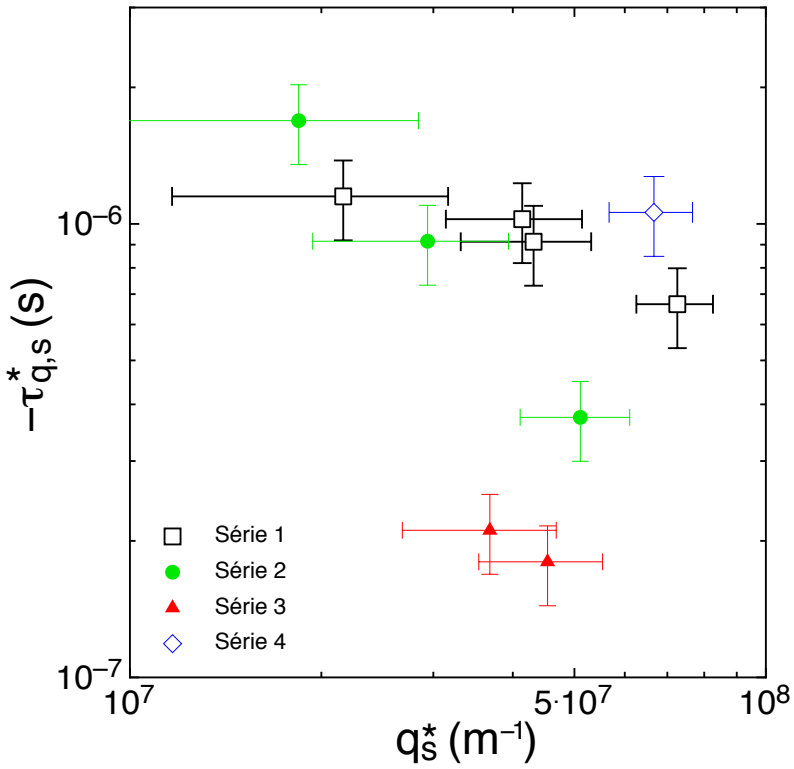


FIGURE 1.18 – Minimum du temps de croissance de l'instabilité en fonction du vecteur d'onde q_s^*, calculés d'après l'équation 1.27 à partir des mesures expérimentales.

Une extrapolation de ces résultats pour déterminer la valeur de q^* à la déstabilisation est possible si nous supposons comme le font Lacoste et al. [140] qu'il existe une relation de proportionnalité entre Γ_{el} et κ_{el}. Comme le montre la figure 1.19 page 132, les valeurs de $\Gamma_{el,c}$ et de $\kappa_{el,c}$ sont données par le point d'intersection entre la zone d'instabilité et une droite affine, dont le coefficient directeur dépend fortement de la longueur de Debye. Le point d'intersection est solution du système :

$$\begin{cases} \kappa_{el,c} = \frac{\alpha_\kappa}{\alpha_\Gamma}\frac{5}{24}d_m^2\Gamma_{el,c} \\ \gamma - \Gamma_{el,c} = -2\sqrt{(\kappa + \kappa_{el,c})U''}, \end{cases} \tag{1.28}$$

dont la solution est :

$$\Gamma_{el,c} = \gamma + 2\frac{\alpha_\kappa}{\alpha_\Gamma}\frac{5}{24}d_m^2 U'' + 2\sqrt{\Delta}, \tag{1.29}$$

$$\kappa_{el,c} = \frac{\alpha_\kappa}{\alpha_\Gamma}\frac{5}{24}d_m^2 \Gamma_{el,c}, \tag{1.30}$$

avec $\Delta = U''\left(\kappa + \frac{\alpha_\kappa}{\alpha_\Gamma}\frac{5}{24}d_m^2\gamma + \left(\frac{\alpha_\kappa}{\alpha_\Gamma}\frac{5}{24}d_m^2\right)^2 U''\right)$.

En prenant pour exemple $\gamma = 0.5\,\mathrm{mN/m}$, $\ell_D = 80\,\mathrm{nm}$, $\kappa = 20\,\mathrm{k_B T}$ et $U'' = 10^{11.8}\,\mathrm{J{\cdot}m^{-4}}$, le calcul donne :

$$\begin{cases} \Gamma_{el,c} = 3.3\,\mathrm{mN/m} \\ \kappa_{el,c} = 730\,\mathrm{k_B T} \\ q^* = 2.1 \times 10^7\,\mathrm{m^{-1}} \end{cases} \tag{1.31}$$

La longueur de Debye de chaque série [3] est obtenue par un ajustement des points expérimentaux de la figure 1.15 page 126 par une fonction linéaire, et nous permet d'estimer q^* :

	q^* ($\pm 1 \times 10^7\,\mathrm{m^{-1}}$)
Série 1 (□)	$2.1 \times 10^7\,\mathrm{m^{-1}}$
Série 2 (●)	$1.7 \times 10^7\,\mathrm{m^{-1}}$
Série 3 (▲)	$1.9 \times 10^7\,\mathrm{m^{-1}}$

Ces résultats permettent donc d'estimer la taille des plus petites vésicules obtenues par électroformation à environ 1 μm, en accord avec les prédictions théoriques du modèle de Sens et Isambert [139].

3. La série 4 n'étant composée que de deux points à champ faible, nous ne l'utiliserons pas pour extrapoler les résultats à la déstabilisation.

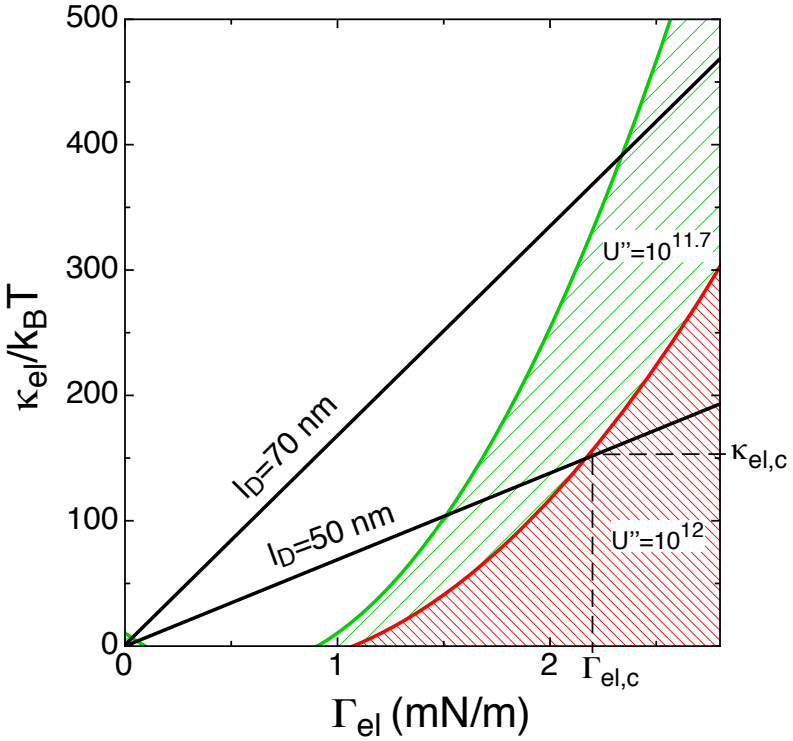


FIGURE 1.19 – Prédictions théoriques de la contribution au module de courbure induite par le champ électrique, en fonction de la contribution à la tension pour deux longueurs de Debye, d'après le modèle de Lacoste et al. [140]. Les zones hachurées désignent les régions où la membrane est déstabilisée par le champ, calculée pour $\kappa = 20\,\mathrm{k_B T}$, $\gamma = 0.5\,\mathrm{mN/m}$ et deux valeurs de U'' données en $\mathrm{J{\cdot}m^{-4}}$. Le point d'intersection entre une droite et une zone de déstabilisation donne les valeurs de $\Gamma_{el,c}$ et $\kappa_{el,c}$.

2. Electroformation de vésicules à partir d'une bicouche supportée

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié les effets d'un champ électrique sur une double bicouche supportée. En nous plaçant en deçà de la limite de déstabilisation nous avons en particulier caractérisé son influence sur les paramètres élastiques de la membrane libre. L'extrapolation de nos résultats met en évidence l'existence d'une limite de déstabilisation, et donne une taille caractéristique des objets formés de l'ordre du micron.
Nous essayons à présent de comprendre par microscopie de fluorescence les étapes qui suivent la déstabilisation et de déterminer, le cas échéant, les conditions requises pour former des vésicules à partir d'une bicouche supportée.

2.1 Dispositif expérimental

L'étude des membranes supportées par microscopie de fluorescence nécessite l'utilisation d'un substrat transparent. Nous ne pouvons donc pas nous placer exactement dans les mêmes conditions expérimentales que lors de notre étude par diffusion de rayons X. Le substrat est une lame de verre de dimensions $28 \times 55 \times 1.2$ mm recouverte d'une couche conductrice d'ITO (Indium Tin Oxyde) d'épaisseur comprise entre 60 et 100 nm.

Les lames de verre ITO sont classiquement utilisées dans la technique d'électroformation de vésicules sur des films de lipides. Ces lames sont différentes des substrats de silicium de par leur composition et leur rugosité plus importante. Elles ne permettent pas de préparer une double bicouche. En effet, une première monocouche peut être déposée par la technique de Langmuir-Blodgett, mais lors du deuxième dépôt, la première monocouche quitte systématiquement le substrat.
Nous parvenons néanmoins à déposer une simple bicouche marquée en fluorescence

par ajout d'un faible pourcentage ($\sim 0.5\%$) de NBD-PE (décrit dans l'annexe A.1) en suivant la méthode utilisée par Lecuyer et al. [12]:

- la première monocouche est déposée par transfert de Langmuir-Blodgett, de manière homogène et avec un taux de transfert $> 95\%$ (voir la figure 2.1),
- puis la seconde monocouche est déposée par la technique de Langmuir-Schaefer.

Nous plaçons un espaceur en Teflon d'une épaisseur d'environ 5 mm sur la face ITO, et nous refermons la cellule dans l'eau avec une deuxième lame ITO (voir la figure 2.2). L'échantillon est placé dans une cellule de thermalisation, dont nous avons calibré la température. La bicouche supportée est ensuite observée par microscopie optique (objectif $\times 40$).

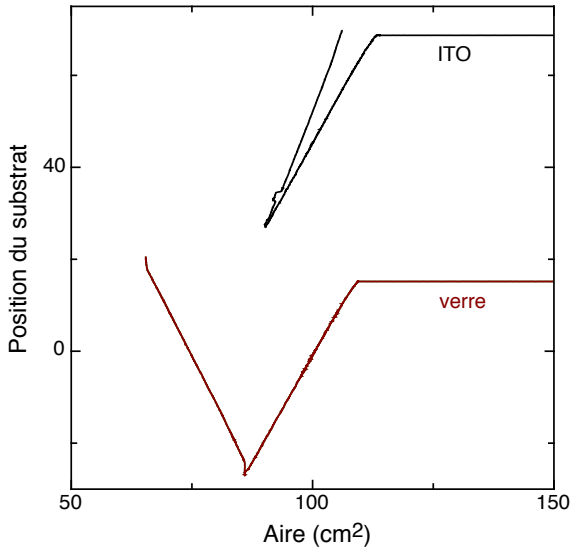


FIGURE 2.1 – Taux de déposition des deux premières monocouches de DPPC à température ambiante pour une pression de 40 mN/m, sur une lame de verre classique et une lame ITO. Les courbes ont été décalées par soucis de lisibilité (extrait de [12]).

2.2 Résultats

S. Lecuyer a étudié dans son travail de thèse la déstabilisation par un champ électrique d'une membrane supportée de DPPC à une température de 43 °C (soit deux degrés de plus que $T_m = 41$ °C) [12, 35]. Cette étude montre notamment qu'il est

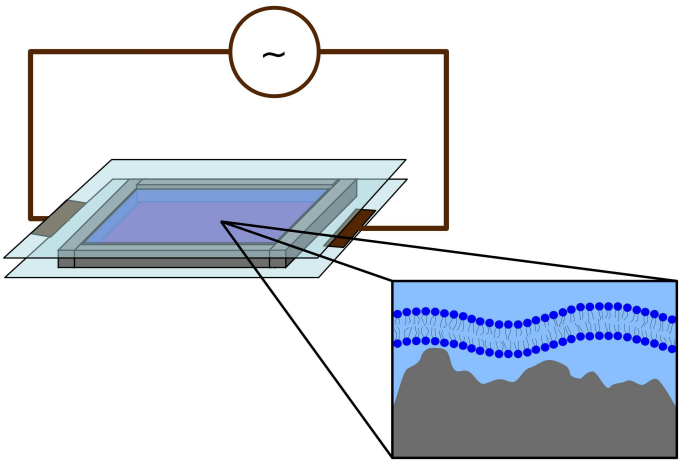


FIGURE 2.2 – Représentation schématique d'une expérience d'électroformation sur une bicouche supportée.

possible de former des vésicules de grande taille ($> 10\,\mu$m) à partir d'une simple bicouche supportée, par application d'un champ électrique alternatif identique à celui utilisé lors de nos expériences de diffusion de rayons X décrites au chapitre précédent (5 V crête-à-crête [1], 5 Hz). Les vésicules se forment quelques minutes après l'application du champ et leur taille moyenne évolue lentement jusqu'à atteindre $\sim 10\,\mu$m. Après quelques dizaines de minutes on peut observer des amas de plusieurs dizaines de vésicules se déplaçant dans la solution.

Dans la continuité de ces expériences préliminaires, nous nous sommes intéressés aux conditions de déstabilisation de la bicouche supportée, puis à la cinétique de croissance des vésicules obtenues. Ces travaux ont été effectué en collaboration avec P. Chapuis (étudiant en M1 à l'Université de Strasbourg).

2.2.1 Conditions de déstabilisation

La déstabilisation de la membrane est sensible à un grand nombre de paramètres comme la température (phase gel, phase fluide, écart à la température de transition), la longueur des chaînes, la rugosité du substrat ... Les expériences de déstabilisation par un champ électrique demandant beaucoup de temps, nous n'avons pas pu mener une étude exhaustive de ces paramètres lors de cette thèse.

1. Les amplitudes données dans ce chapitre sont toutes *crête-à-crête*.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux effets des paramètres du champ électrique. Nous parvenons à former des vésicules sur une simple bicouche de DPPC par application d'un champ électrique alternatif. Néanmoins, la gamme de fréquences et d'amplitudes du champ permettant de former des vésicules sont restreintes :

- pour des fréquences $> 10\,\mathrm{Hz}$ nous n'observons pas de formation de vésicules (après trois heures d'observation),
- la fréquence optimale permettant de former rapidement ($\sim 40\,\mathrm{min}$) des vésicules est proche de $5\,\mathrm{Hz}$,
- pour une fréquence plus basse les vésicules semblent se détacher rapidement du substrat,
- nous ne parvenons pas à déstabiliser la membrane pour une amplitude inférieure à $5\,\mathrm{V}$.

Ces résultats, en accords avec ceux de Lecuyer et al., sont cohérents avec ceux du chapitre précédent où nous avons vu que les effets du champ sont d'autant plus forts que la fréquence est basse et l'amplitude élevée.

La température de l'échantillon joue également un rôle important dans les conditions de déstabilisation. En effet, les vésicules n'apparaissent que pour des températures légèrement supérieures à la température de transition gel-fluide T_m (voir le tableau 2.1). Nous vérifions que cet effet ne résulte pas d'une "thermoformation" de vésicule, observée pour des bicouches supportées sur lame de verre [12, 35], en répétant l'expérience sans champ électrique.

Lipide	T_m (°C)	T	Formation de vésicules ?
DPPC	41	20 °C à 45 °C	Oui, pour $T > T_m$
DSPC	55	25 °C à 60 °C	Non
DOPC	-20	20 °C	Non
13:0-13:0 PC	14	20 °C	Non

Table 2.1 – Résumé des expériences de déstabilisation par un champ électrique menées sur des bicouches supportées de différentes natures et à différentes températures, chacune répétée sur plusieurs échantillons.

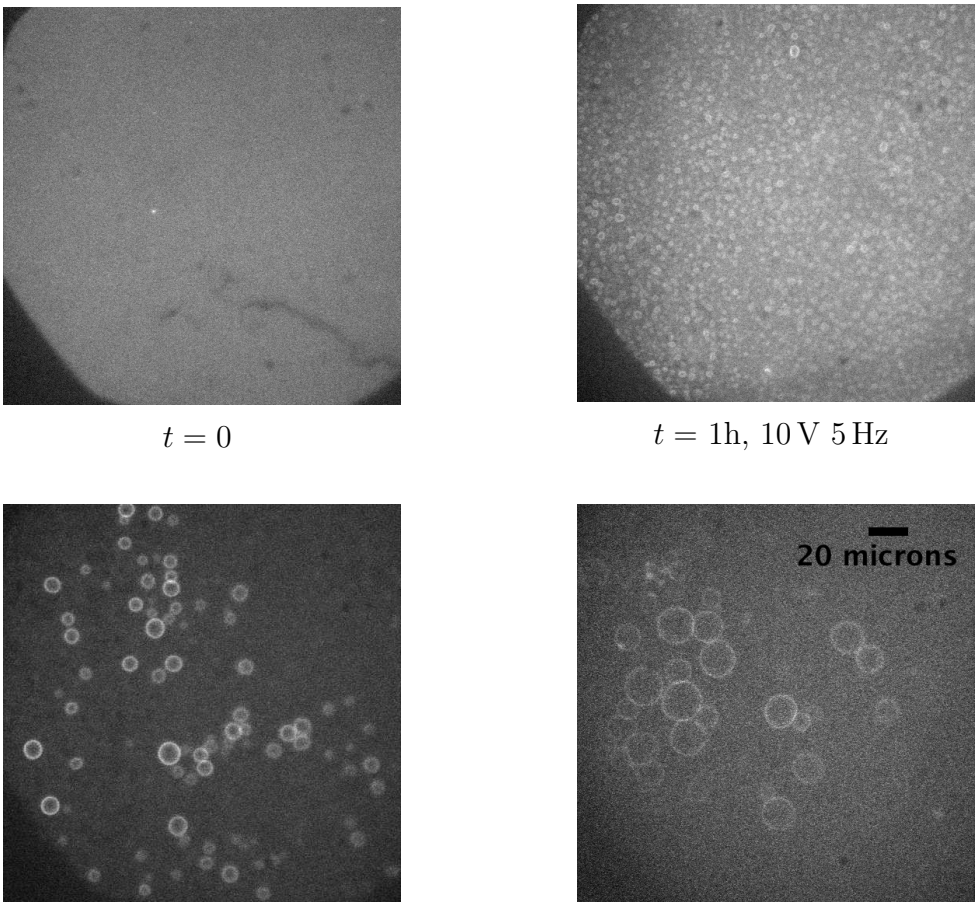
Nous ne parvenons pas à déstabiliser une bicouche de DOPC ainsi qu'une membrane de 13:0-13:0 PC à température ambiante (loin de T_m), quels que soient les paramètres du champ appliqué. Faute de temps, il n'a pas encore été possible de réaliser ces expériences en s'approchant de la température de transition. Ces expériences pourraient permettre de savoir s'il est nécessaire d'être proche de la température de transition pour former des vésicules.

En répétant l'expérience avec une bicouche de DSPC, nous n'observons pas de vésicules quelles que soient la température, la fréquence, ou l'amplitude du champ électrique appliqué, après trois heures d'application du champ. Il est possible que la bicouche de DSPC interagisse plus fortement avec le substrat qu'une bicouche de DPPC, ce que semble indiquer la comparaison des taux de transfert lors des dépositions de Langmuir-Blodgett. Ces interactions sont peut-être suffisamment fortes pour empêcher la déstabilisation.

Finalement, nous n'observons pas de vésicules avant une durée comprise entre 30 et 60 min, contrairement à Lecuyer et al. qui forment des vésicules après ~ 5 min d'application du champ. Le temps nécessaire pour déstabiliser la membrane est probablement fortement dépendant de la nature de l'échantillon et du substrat (épaisseur d'oxyde, usure de la couche ITO).

2.2.2 Cinétique de croissance

Les résultats obtenus sur une bicouche de DPPC à laquelle est appliqué un champ de 10 V 5 Hz à 45 °C sont présentés sur la figure 2.3. Après 60 min, de petites vésicules d'une taille $< 5\,\mu$m apparaissent sur certaines zones de l'échantillon [2]. Les vésicules grossissent avec le temps, et il semble que simultanément de petites vésicules continuent à apparaître.



$t = 0$ — $t = 1$h, 10 V 5 Hz — $t = 1$h20, 10 V 5 Hz — $t = 1$h50, 10 V 5 Hz

FIGURE 2.3 – Electroformation de vésicules sur une bicouche de DPPC supportée sur une lame de verre ITO, à une température de 45 °C.

2. Les plus petites vésicules observées ont un diamètre de l'ordre de la limite de résolution de l'objectif utilisé ($\sim 1\,\mu$m).

Ces observations sont confirmées par les analyses statistiques des vésicules formées en fonction du temps, qui mettent en évidence deux populations de tailles (voir la figure 2.4) :

- sur la gamme de nos mesures la taille des vésicules augmente de manière linéaire, et les vésicules formées sont plus grosses que dans les expériences de Lecuyer et al. ($\sim 20\,\mu$m),
- des vésicules de petites tailles ($< 5\,\mu$m) sont formées continûment.

Ces résultats sont en très bon accord avec ceux du chapitre précédent, où nous avons vu que la longueur d'onde du mode déstabilisé le plus rapidement ($q^* \simeq 2 \times 10^7\,\mathrm{m}^{-1}$) est de l'ordre du micron.

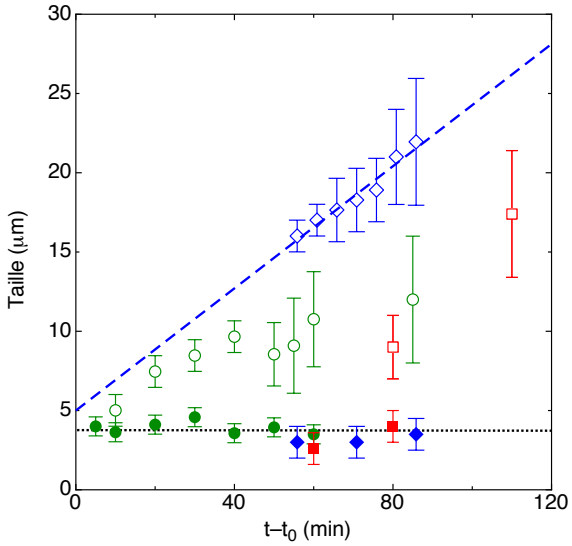


FIGURE 2.4 – Evolution de la taille des vésicules formées sur des simples bicouches supportées de DPPC. Les points pleins représentent la population de vésicules de petites tailles, et les points ouverts les vésicules dont la taille augmente. (●) et (○) : résultats de Lecuyer et al. à 43 °C et 5 V 5 Hz. (♦) et (◊) : résultats obtenus lors de nos expériences à 43 °C et 5 V 5 Hz. (■) et (□) : 45 °C et 5 V 10 Hz. La droite discontinue représente un ajustement par une fonction linéaire.

Les mécanismes de croissance des vésicules formées à la déstabilisation peuvent être complexes. Il est possible que les vésicules restent connectées au réservoir de lipides que forme la membrane supportée, et qu'elles croissent par le biais de cette connexion. Nous observons aussi des évènements de fusion qui contribuent à la croissance des vésicules (voir la figure 2.5). D'une manière générale la compréhension profonde des mécanismes de croissance des vésicules supposent des expériences com-

plémentaires qui n'ont pu être effectuées lors de cette thèse faute de temps.

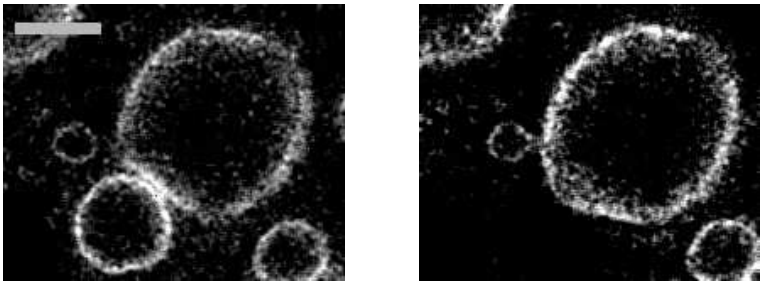


FIGURE 2.5 – Fusion entre deux vésicules au cours de l'électroformation (le contraste a été augmenté). La barre représente 20 μm.

2.3 Conclusion et perspectives

Dans cette partie nous nous sommes intéressés aux effets d'un champ électrique alternatif sur les propriétés des membranes phospholipidiques. En utilisant la diffusion de rayons X aux petits angles sur des doubles bicouches de DPSC auxquelles un champ électrique est appliqué, nous parvenons à mettre en évidence différents effets. Les propriétés structurales des doubles bicouches sont légèrement modifiées :

- l'épaisseur d'eau entre les membranes diminue d'autant plus que la fréquence est basse ou l'amplitude élevée,
- nous observons également un phénomène d'électrostriction de la bicouche flottante,
- finalement l'hydratation des têtes reste comparable à celle des bicouches sans champ.

Il apparait donc que l'intégrité de la membrane reste conservée au cours de ces expériences. Nous avons également étudié les effets du champ sur les paramètres élastiques de la bicouche flottante :

- κ augmente et γ diminue d'autant plus que le champ électrique local est important, en bon accord avec la théorie de Lacoste et al. [140],
- l'extrapolation de ces résultats nous permet de prédire la longueur d'onde des modes déstabilisés.

Ces expériences nous permettent d'avoir une compréhension détaillée des effets du champ électrique sur les membranes, et en particulier sur les premières étapes de la déstabilisation.

Nous avons ensuite étudié les étapes suivant la déstabilisation par des expériences de microscopie sur des bicouches supportées sous champ électrique. Nous montrons alors qu'il est possible de former des vésicules à partir d'une simple bicouche, et que les conditions pour observer l'électroformation sont restreintes : il est nécessaire d'appliquer un champ électrique d'une fréquence comprise entre 5 et 10 Hz à une amplitude $> 5\,\mathrm{V}$, et l'échantillon doit être en phase fluide pour être déstabilisé. Il semble également que le lipide utilisé a une importance cruciale, la déstabilisation n'ayant pas pu être observée sur une bicouche de DSPC quelque soit la température de l'échantillon et les paramètres du champ.

La taille des plus petites vésicules observées ($\sim 2\,\mu$m) est cohérente avec nos analyses du chapitre précédent. Ces petites vésicules sont générées de façon continue, en accord avec les mécanismes prédits par les théories de l'électroformation discutées précédemment. Elle croissent ensuite linéairement jusqu'à une taille maximale d'environ $30\,\mu$m par différents procédés qui doivent encore être étudiés en détails.

De nombreuses perspectives sont envisageables pour améliorer notre compréhension de la déstabilisation et de la croissance des vésicules, en variant la température et les lipides utilisés par exemple. Une étude exhaustive des conditions de déstabilisation et de l'influence de chaque paramètre sur la croissance des vésicules doit également être menée.

La microscopie confocale, donnant accès à des mesures sur différents plans de l'échantillon, devrait nous permettre de savoir si les vésicules restent connectées à la membrane afin de mieux comprendre le mécanisme de croissance des vésicules.

Finalement, il serait intéressant de parvenir à mener cette étude sur une double bicouche déposée sur un substrat de silicium, pour être au plus près des expériences de diffusion de rayons X.

Cinquième partie

Etude préliminaire des interactions entre membranes phospholipidiques chargées

Nous n'avons considéré jusqu'ici que des membranes composées de lipides zwitterioniques, dont le taux de dissociation au pH de nos expériences nous permet d'étudier les interactions électrostatiques dans la limite des gaz parfaits de l'équation de Poisson-Boltzmann ($\ell_D \sim 200\,\mathrm{nm}$). En ajoutant du sel au volume d'eau, nous accédons à la limite de Debye-Hückel où les interactions électrostatiques sont très écrantées ($\ell_D \sim 0.3\,\mathrm{nm}$).
Nous allons étudier dans ce chapitre les interactions entre membranes fortement chargées ($\ell_G/d_w \ll 1$). Ces interactions sont intéressantes du point de vue de la physique fondamentale, car ces systèmes sont proches de la limite de validité de la théorie de Poisson-Boltzmann (voir la figure 2.6). Des théories récentes prenant en compte les corrélations entre ions prédisent des comportements sensiblement différents de ceux attendus avec la théorie de Poisson-Boltzmann [150, 151].
Les interactions entre membranes chargées sont aussi importantes dans la vie d'une cellule, en intervenant par exemple dans l'adhésion cellulaire, les interactions protéines-membrane, la fusion cellulaire ...[1, 152, 153].
Nous allons présenter dans un premier temps l'état de l'art sur les membranes chargées et leurs interactions, puis nous rapporterons nos travaux préliminaires obtenus par diffusion de rayons X sur des doubles bicouches de DPPS.

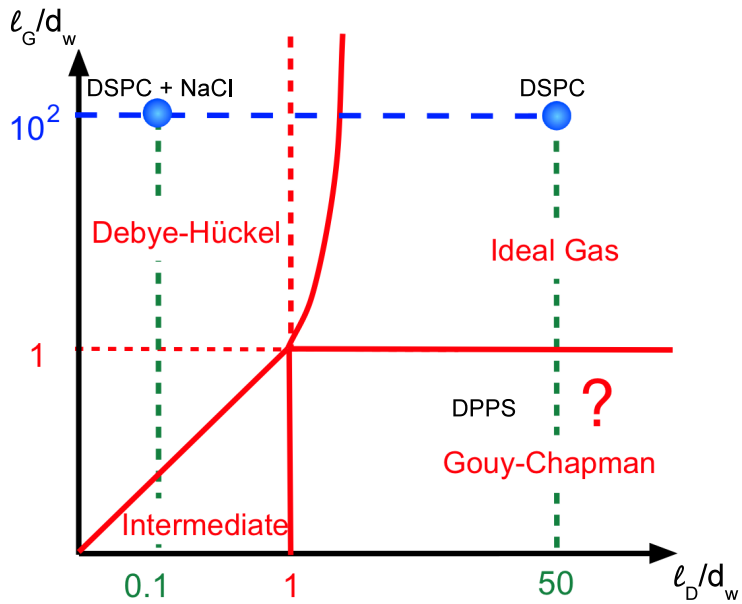


FIGURE 2.6 – Délimitations des différentes zones pour la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann (d'après [90]).

1. Diffusion de rayons X sur des doubles bicouches chargées

1.1 Contexte et enjeux de l'étude

1.1.1 Structures des membranes chargées

La 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DPPS) est un lipide privilégié dans l'étude des membranes chargées. Contrairement à la DSPC zwitterionique, la tête de la DPPS possède un groupe carboxylate qui lui confère une charge négative à pH neutre, dont le contre-ion est un ion Na^+ monovalent (voir l'annexe A.1). Comme nous le verrons, cette charge nette a des effets sur la structure et l'élasticité des membranes de DPPS.

	DOPS[a]	DOPC[a]	DPPS[b]	DPPC[b]	DPPE[c]
A_L	65.3 Å^2	72.5 Å^2	54 Å^2	62 Å^2	55.4 Å^2

Table 1.1 – Aires par lipide pour différents types de lipides, obtenues par : (a) diffraction de rayons X [154], (b) simulation de dynamique moléculaire [155], et (c) spectroscopie NMR [156].

A longueur de chaînes égales, l'aire par lipide d'une membrane chargée est plus faible que pour une membrane composée de lipides zwitterioniques. Diverses expériences et simulations numériques montrent une différence de l'ordre de 10% entre l'aire par lipide chargé et l'aire par lipide neutre (voir le tableau 1.1). On pourrait s'attendre à ce qu'au contraire la répulsion électrostatique entre les têtes mène à une aire plus grande des lipides chargés. L'étude des lipides pourvus de têtes de phosphoethanolamine (PE) permet de mieux comprendre ces interactions entre têtes.

Les têtes PE sont semblables chimiquement aux têtes PS mais sont dépourvues de charge nette. Or on constate que l'aire par tête PE est semblable à l'aire par tête PS ($A_L = 55\,\text{Å}^2$) [156]. La répulsion électrostatique ne semble donc pas jouer un rôle important dans les interactions entre têtes.

La littérature donne des résultats contradictoires concernant la comparaison des densités électroniques des têtes PS et PC (voir la figure 1.1). Les mesures de diffraction de rayons X menées par Petrache et al. sur des phases multilamellaires de DOPS et de DOPC montrent que la densité électronique des têtes PS est plus grande d'environ 12% que celle des têtes PC [154]. A l'inverse, Jing et al. mesurent par réflectivité de rayons X sur des phases multilamellaires de DPPS et de DPPC une densité électronique des têtes PS $\sim$ 17% plus faible que celle des têtes PC [157]. Ces disparités montrent qu'un certain nombre de propriétés des membranes chargées ne sont pas encore totalement comprises, et nécessitent des expériences complémentaires sur des systèmes modèles.

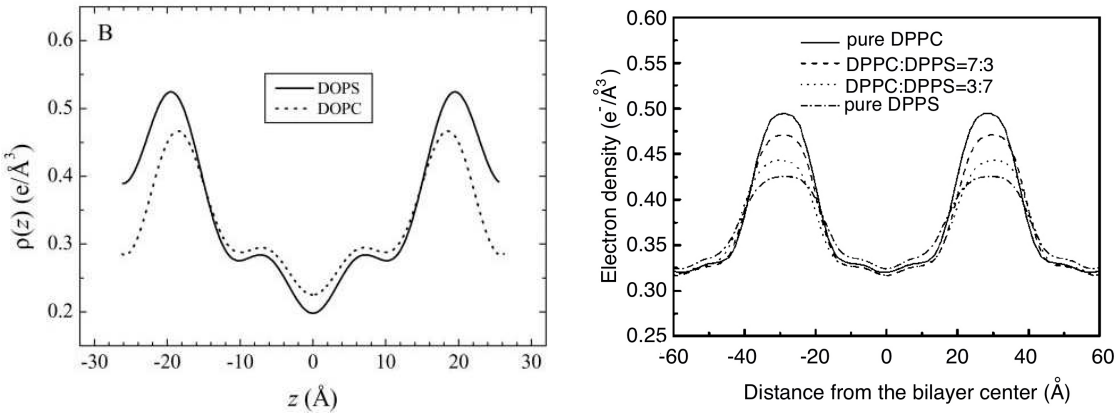


FIGURE 1.1 – Comparaison de profils de densité électronique de membranes composées de lipides zwitterioniques PC et de lipides chargés PS. A gauche : comparaison entre du DOPS et du DOPC (extrait de [154]). A droite : comparaison entre membranes composées de DPPC pur, d'un mélange DPPC/DPPS et de DPPS pur (extrait de [157]).

1.1.2 Propriétés élastiques

Diverses expériences menées sur des membranes chargées montrent que leur rigidité de courbure est plus grande que celle des bicouches neutres. En mesurant les fluctuations de forme de GUVs de DMPC, Rowat et al. montrent que l'ajout de

5% de surfactant ionique à la composition de la membrane augmente le module de courbure de 3 à 5 k_BT (soit $\sim$ 10% d'augmentation)[158].
Sur des systèmes assez différents de membranes catanioniques [1], Delorme et al. ont étudié l'origine électrostatique de ce module de courbure élevé en mesurant leur module d'Young par AFM [159]. En ajoutant du sel à la solution, le module de courbure initial de $\kappa = 450 \pm 38\,k_BT$ dans l'eau pure chute rapidement avec la force ionique jusqu'à atteindre un plateau à $\kappa \sim 230 k_BT$.

La contribution électrostatique $\delta\kappa^{el}$ au module de courbure a également fait l'objet de nombreuses études théoriques [90, 160, 161, 162]. Les modèles développés montrent que lorsque les charges sont fixes, la contribution $\delta\kappa^{el}$ est toujours stabilisante ($\delta\kappa^{el} > 0$). Kumaran prédit l'apparition d'une instabilité lorsque les charges sont libres de diffuser dans le plan de la membrane [163] : la densité de charge n'est alors plus homogène et se couple à la courbure de la bicouche. Il est possible que cette déstabilisation corresponde à celle observée pour des systèmes multilamellaires chargés à haute hydratation [164, 165, 166], sur lesquels nous reviendrons plus loin.

La grande rigidité des membranes chargées induit une diminution des fluctuations thermiques et rend de ce fait difficile l'étude des paramètres élastiques des empilements de membranes chargées par diffusion de rayons X. Les ajustements des pics de Bragg par une loi de Caillé et l'interprétation des résultats sont plus complexes, ne permettant pas une mesure indépendante du module de courbure et du module de compressibilité [154].

1.1.3 Interactions entre membranes chargées

Approche théorique Les interactions entre membranes fortement chargées sont plus complexes à analyser que les interactions entre membranes zwitterioniques. Aux interactions étudiées précédemment (van der Waals, répulsion d'hydratation, répulsion issue des fluctuations thermiques) s'ajoute une composante électrostatique qui, en l'absence de sel, correspond a priori à la limite de Gouy-Chapman de l'équation de Poisson-Boltzmann.
L'équation de Poisson-Boltzmann est une approximation de champ moyen et prédit nécessairement une répulsion entre deux surfaces chargées de même signe. Or, on sait aujourd'hui que deux surfaces identiques fortement chargées dont les contre-ions sont multivalents peuvent être attirées à courtes distances. Cet effet a notamment été mesuré expérimentalement par machine de force (SFA) [167] ainsi que par analyse des diagrammes de phases de systèmes multilamellaires chargés [168], et confirmé

1. Membranes constituées d'un mélange de tensioactifs cationiques et anioniques.

par simulation Monte Carlo [169, 170, 171, 172]. L'attraction observée montre les limites de la théorie de Poisson-Boltzmann lorsque les corrélations entre ions deviennent importantes, comme c'est le cas en présence de contre-ions multivalents ou de surfaces fortement chargées.

La théorie du couplage fort (*strong coupling*) initiée par Rouzina et al. [173] et développée par Netz et al. [150] permet de décrire les interactions entre surfaces chargées dans les limites où l'équation de Poisson-Boltzmann n'est plus valide, grâce à un développement du viriel du profil de densité des contre-ions. Deux paramètres sans dimensions régissent alors la physique du problème, la distance entre les surfaces $\tilde{d} = d_w/\ell_G$, et le paramètre de couplage $\Xi = v^2\ell_B/\ell_G$ où v est la valence des contre-ions (voir la figure 1.2). Cette théorie prédit bien une attraction pour certaines valeurs de $\tilde{d}$ et Ξ, correspondant à des surfaces fortement chargées ($\ell_G < \ell_B$), et est en bon accord avec les simulations Monte Carlo effectuées par Moreira et Netz [171, 172].

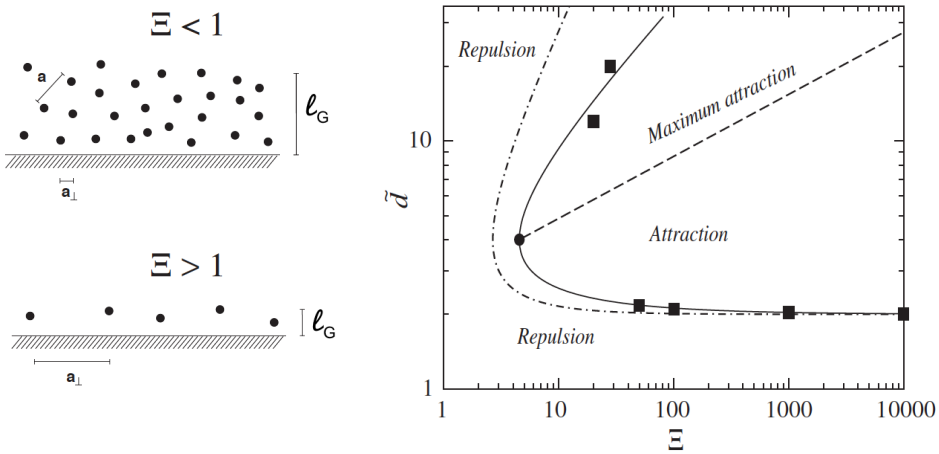


FIGURE 1.2 – A gauche : représentation schématique de la distribution des contre-ions en fonction du paramètre de couplage Ξ, qui quantifie les interactions électrostatiques (adapté de [150]). A droite : diagramme de phase attraction/répulsion entre deux surfaces identiquement chargées. Les carrés correspondent aux simulations Monte Carlo de la Réf. [171], la ligne discontinue résulte de la théorie du couplage fort développée par Netz et al. [150], et la ligne continue de la théorie *Wigner Strong Coupling* de Šamaj et al. [174] (extrait de [174]).

Plus récemment, Šamaj et Trizac ont amélioré l'accord entre la théorie du couplage fort et les simulations Monte Carlo, notamment à grands $\tilde{d}$ [151, 174, 175], en tenant compte de la limite asymptotique $\Xi \to \infty$ (voir la figure 1.2). En effet, pour de basses températures, fortes charges de surface ou grandes valences des contre-

ions, $\Xi \gg 1$, et les ions se condensent sur la surface en formant un cristal hexagonal. Ces corrections peuvent être importantes, et montrent la complexité des phénomènes mis en jeu dans l'étude des interactions entre surfaces chargées, nécessitant des expériences fines pour être comprises dans leur totalité.

Approche expérimentale Afin d'étudier les interactions électrostatiques entre membranes chargées, Petrache et al. ont mesuré le pas smectique dans des phases multilamellaires de DOPS en fonction de la pression osmotique appliquée, puis comparé les résultats à la courbe pression-distance obtenue avec de la DOPC [154] (voir la figure 1.3).

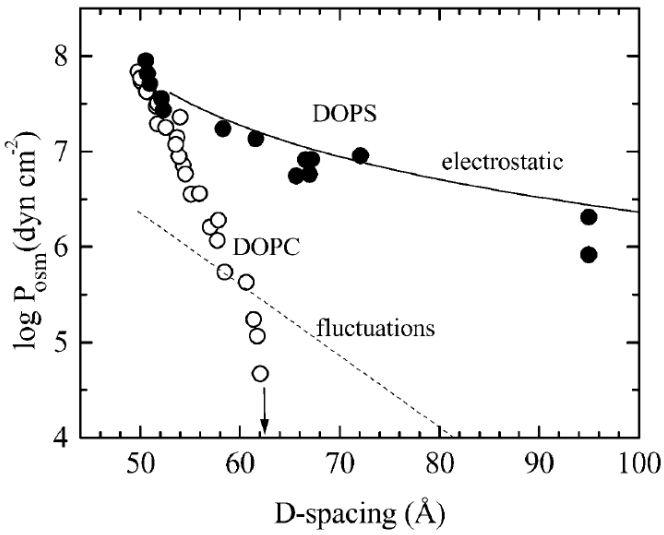


FIGURE 1.3 – Pas smectique D mesuré en fonction de la pression osmotique P_{osm} appliquée à des échantillons multilamellaires composés de phospholipides chargés (DOPS) ou zwitterioniques (DOPC). La ligne continue correspond à l'équation 1.1 page suivante et la ligne pointillée à une contribution issue des fluctuations thermiques calculée pour de la DOPC. On voit nettement que les interactions électrostatiques dominent dans le cas du DOPS (extrait de [154]).

Les courbes obtenues sont radicalement différentes : à pression osmotique nulle le pas smectique de la DOPC tend vers une valeur finie, tandis que celui de la DOPS semble croître indéfiniment (le plus grand pas smectique mesuré est de l'ordre de 10 nm). Les auteurs associent cette répulsion aux interactions électrostatiques entre bicouches, et obtiennent un bon accord à grande séparation avec les prédictions de

la théorie de Poisson-Boltzmann dans la limite de Gouy-Chapman [90] :

$$P_{el} = \frac{\pi k_B T}{2\ell_B d_w^2}. \tag{1.1}$$

Demé et al. ont étudié des phases lamellaires de DOPS par diffusion de rayons X et de neutrons aux petits angles pour une gamme plus grande de pression osmotique leur permettant d'atteindre des épaisseurs comprises entre 1 et 70 nm [166, 176]. Ils observent différentes structures en fonction de la pression appliquée : une phase lamellaire rigide à forte pression, suivi d'une phase lamellaire avec des fluctuations non-corrélées et de petite amplitude. A pression plus faible ces fluctuations deviennent importantes et les membranes sont fortement corrélées (voir la figure 1.4), et finalement pour un pas smectique > 70 nm les membranes se déstabilisent en formant des vésicules.

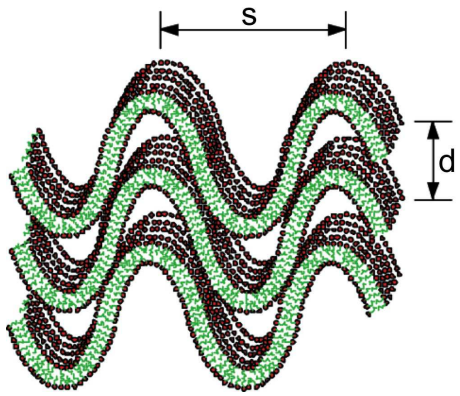


FIGURE 1.4 – Structure observée par Demé et al. [166] au stade précédant la déstabilisation en vésicules, les membranes sont fortement corrélées et les fluctuations importantes ($d \sim 70$ nm et $s \simeq 280$ nm).

Comme évoqué précédemment, la mesure directe du potentiel d'interaction entre membranes chargées par diffusion de rayons X sur des phases multilamellaires est limitée par les faibles fluctuations des bicouches. Nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les expériences de diffusion de rayons X sur des doubles bicouches supportées permettent de caractériser simultanément et indépendamment la structure d'une membrane flottante, ses paramètres élastiques γ et κ ainsi que ses interactions avec son environnement.
Dans son travail de thèse, L. Malaquin a montré qu'il était possible de déposer une double bicouche de DPPS pure sur un substrat de silicium, dans de l'eau milli-Q sans ajouter de sel, par la même combinaison de dépositions de Langmuir-Blodgett

et Langmuir-Schaefer que pour de la DSPC [11]. Les analyses préliminaires menées par réflectivité de neutrons confirment la structure des échantillons en doubles bicouches, et montrent que l'épaisseur d'eau est plus faible pour les membranes chargées ($d_w \simeq 8 - 12\,\text{Å}$) que pour les membranes neutres.

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus sur des phases multilamellaires, et semblent montrer les limites de la théorie de Poisson-Boltzmann qui prédit une répulsion entre les membranes. Afin d'améliorer notre compréhension des interactions électrostatiques entre membranes, nous avons mené plusieurs séries d'expériences de réflectivité et de diffusion hors-spéculaire de rayons X sur des doubles bicouches de DPPS.

1.2 Résultats expérimentaux

1.2.1 Analyse qualitative des courbes de réflectivité et de diffusion hors-spéculaire

La réflectivité spéculaire et la diffusion hors-spéculaire ont été mesurées pour différentes températures sur des doubles bicouches de DPPS (température de transition gel-fluide $T_m = 54°\text{C}$), et montrent de profondes différences avec les courbes obtenues sur de la DSPC (voir la figure 1.5 page suivante).

La figure 1.6 montre notamment que :
- les courbes (a) et (b), correspondant respectivement à des températures de 36 et 46°C, présentent peu de différences,
- la réflectivité de la phase fluide (c) est cohérente avec une augmentation des fluctuations thermiques : le contraste entre les "bosses" et les "creux" est moins nette. La diffusion-hors spéculaire est plus surprenante, l'ensemble de la courbe est plus haute que pour la phase gel et ce sur toute la gamme de vecteurs d'onde accessible, même dans la zone à petits q où la diffusion est censée être contrôlée par le substrat,
- le retour en phase gel (d) soulève également un certain nombre de questions. La réflectivité montre un changement de structure de l'échantillon, observable notamment vers $q_z \simeq 4 \times 10^9\,\text{m}^{-1}$ sur la figure 1.6. La diffusion hors-spéculaire, elle, reste quasiment identique à celle de la phase fluide.

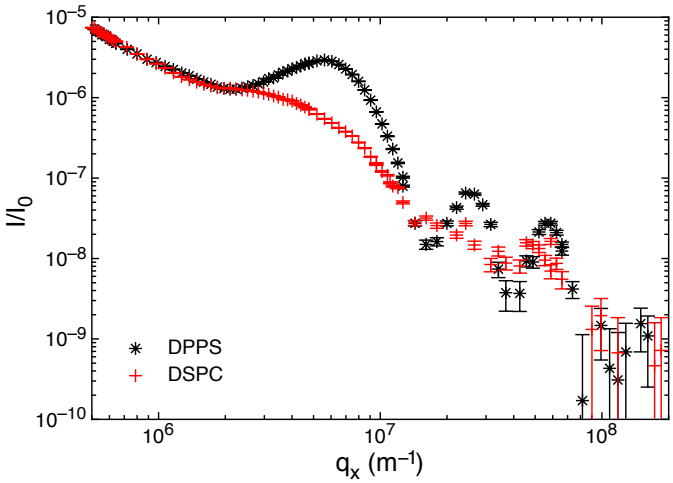


FIGURE 1.5 – Comparaison des courbes de diffusion hors-spéculaire d'une double bicouche de DSPC (lipides zwitterioniques) et d'une double bicouche de DPPS (lipides chargés) en phase gel, obtenues dans les mêmes conditions expérimentales.

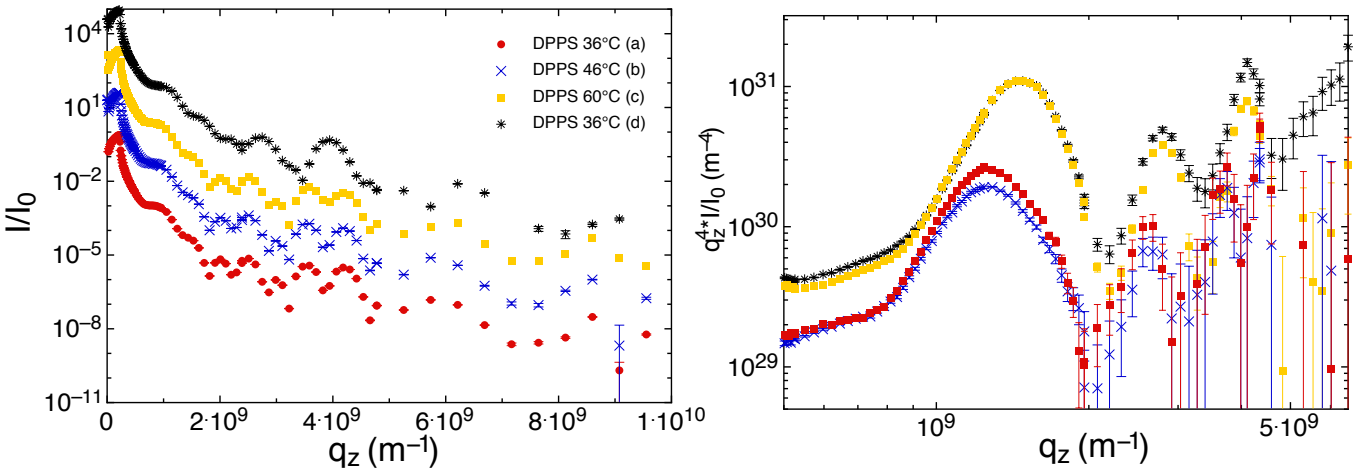


FIGURE 1.6 – A gauche : série de courbes de réflectivité spéculaire obtenues pour une double bicouche supportée de DPPS à différentes températures, décalées par soucis de lisibilité. A droite : courbes de diffusion hors-spéculaire correspondantes, non décalées.

Ces résultats sont reproductibles et ne résultent a priori pas d'un problème de soustraction du bruit de fond. Il parait également peu probable que la bicouche flottante se soit décollée à la transition de phase, les premières oscillations de la réflectivité étant caractéristiques d'une double bicouche.
Les réflectivités obtenues sont très difficiles à ajuster avec notre modèle de réflectivité (voir la figure 1.7), en particulier dans la région $3 \times 10^9\,\mathrm{m}^{-1} > q_z > 5 \times 10^9\,\mathrm{m}^{-1}$. Les ajustements obtenus par Malaquin et al. sur des courbes de réflectivité de neutrons sont meilleurs, mais sont limités à $q_z < 3 \times 10^9\,\mathrm{m}^{-1}$.

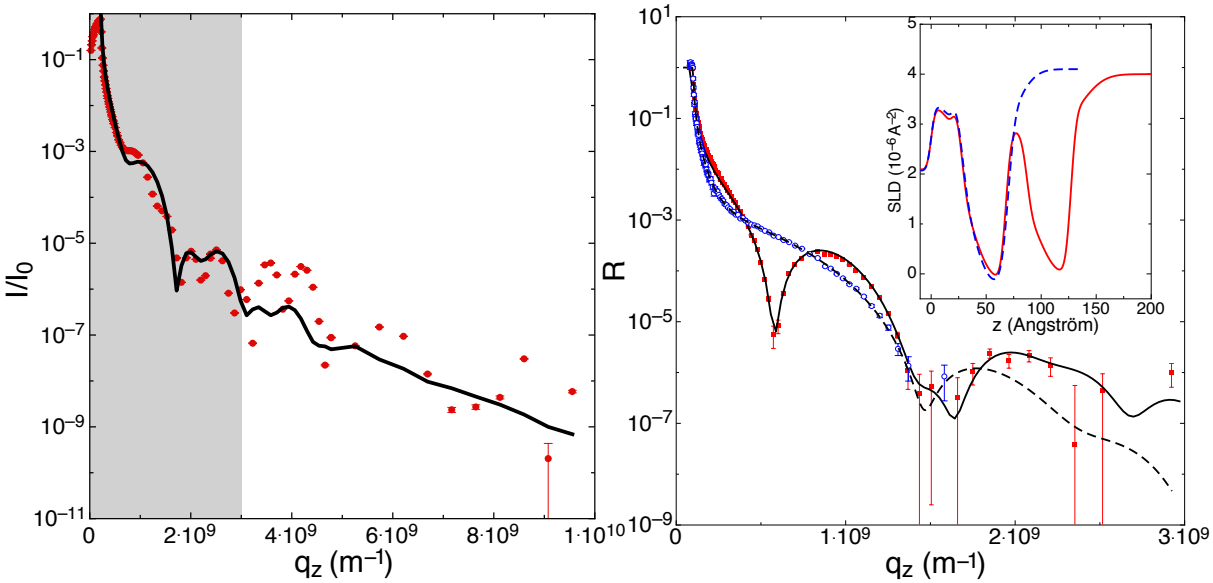


FIGURE 1.7 – A gauche : ajustement d'une courbe de réflectivité de rayons X d'une double bicouche de DPPS à 36 °C. La zone grisée représente la gamme de q_z accessible en réflectivité de neutrons. A droite : courbes de réflectivité de neutrons d'une bicouche de DPPS (○) et d'une double bicouche de DPPS (■), et ajustements associés obtenus par Malaquin et al. [11]. Insert : profils de densité de longueur de diffusion associés aux ajustements.

Nous parvenons à ajuster les courbes de diffusion hors-spéculaire, mais uniquement en autorisant les paramètres du substrat et de la première bicouche à beaucoup varier entre les phases fluide et gel. Ces difficultés montrent les limites de notre modélisation de la structure des membranes chargées. Néanmoins, nous allons tout de même analyser les résultats obtenus par ajustements des courbes de diffusion hors-spéculaire (voir le tableau 1.2 page 156 et la figure 1.8). Nous faisons l'hypothèse que la structure de double bicouche est conservée à petite échelle.

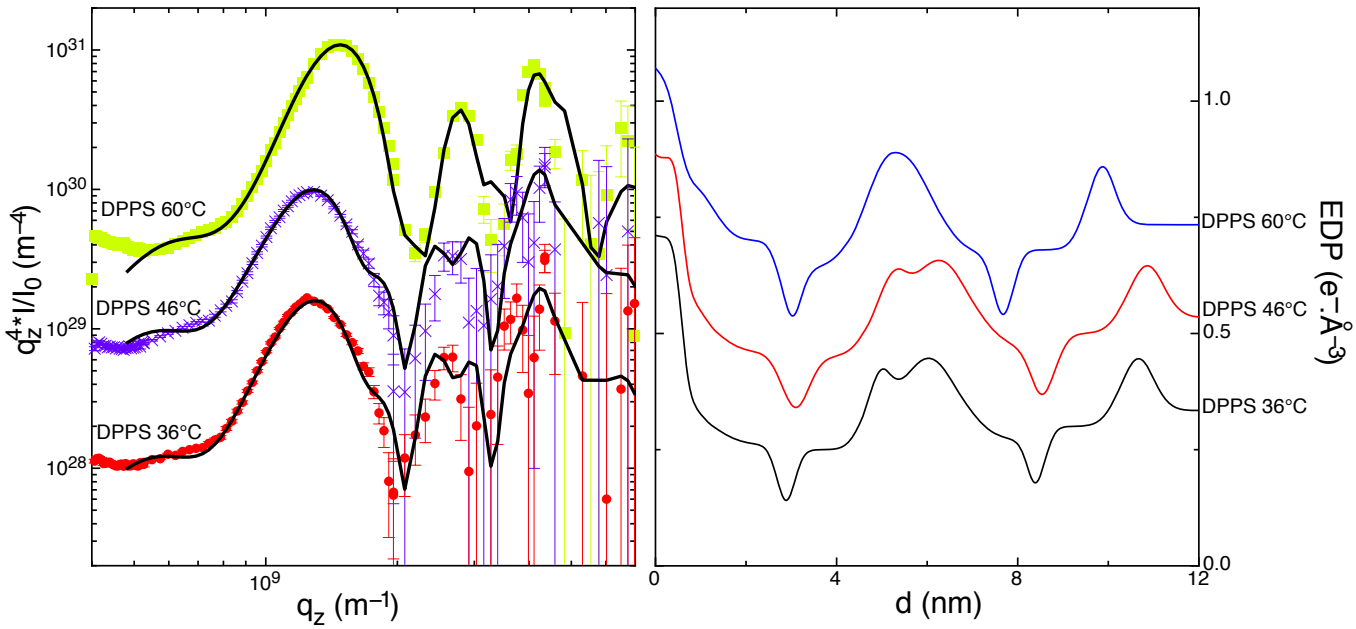


FIGURE 1.8 – Meilleurs ajustements obtenus des courbes de diffusion hors-spéculaire et profils de densité électronique associés.

1.2.2 Paramètres structuraux

Bien que l'évolution des courbes expérimentales avec la température soit difficile à interpréter, nous analysons les paramètres structuraux issus des ajustements des courbes de diffusion hors-spéculaire afin de vérifier leur pertinence. Les épaisseurs d'eau mesurées sont nettement inférieures à celles obtenues sur des doubles bicouches de DSPC : d_w est compris entre 10 et 15 Å en phase gel et décroit en phase fluide (voir la figure 1.9 page suivante). Les mesures de réflectivité de neutrons menées par Malaquin et al. donnent également des valeurs plus faibles de d_w pour les doubles bicouches chargées, comprises entre 5 et 12 Å en phase gel [11]. L'épaisseur des bicouches est cohérente avec les résultats obtenus en réflectivité de neutrons et diminue à la transition gel-fluide.

L'aire par lipide de la bicouche flottante $A_{\mathrm{L,bic2}} \simeq 45 \pm 5\,\text{Å}^2$ est en bon accord avec la valeur obtenue par Demel et al. [177] et varie peu avec la température (mise à part pour la série 3). Cette valeur est cohérente avec les résultats de la littérature et légèrement inférieure à l'aire par lipide de la DSPC (voir la figure 1.10). Le nombre de molécules d'eau situées dans la région des têtes reste également constant $n'_w \simeq 7$, et est comparable aux résultats obtenus avec de la DSPC. Il semble donc que la charge ne joue pas de rôle fort dans l'hydratation des têtes de lipides.

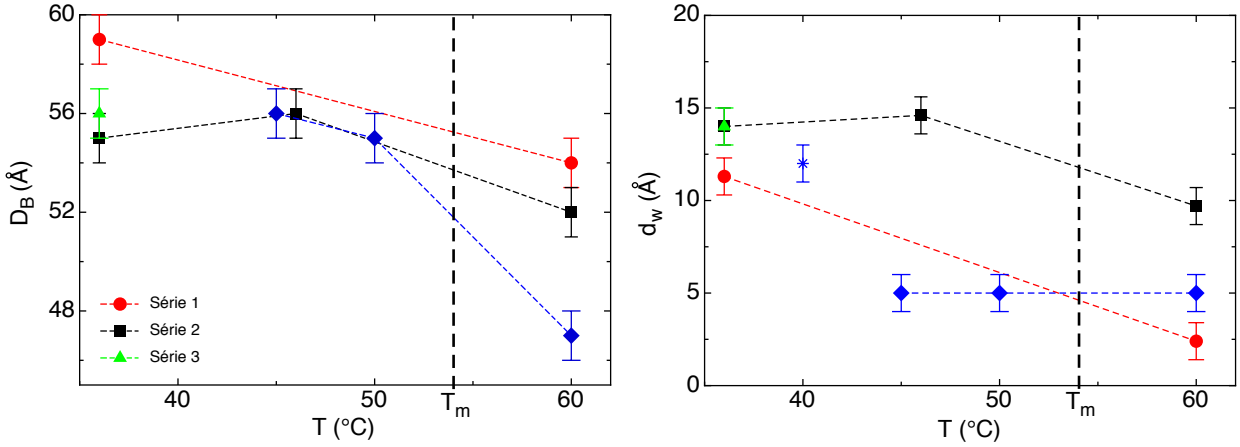


FIGURE 1.9 – A gauche : épaisseur de la bicouche flottante D_B en fonction de la température. (♦) et (⋆) : résultats obtenus par réflectivité de neutrons respectivement par Rondelli et al. (non publiés) et Malaquin et al. [11]. A droite : épaisseur d'eau inter-bicouche d_w en fonction de la température. Les lignes sont des guides pour les yeux.

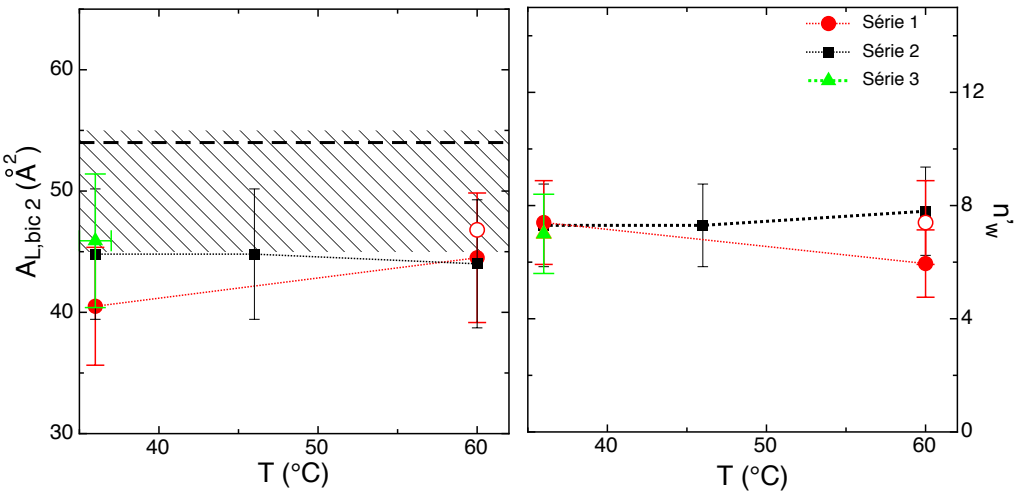


FIGURE 1.10 – A gauche : aire par lipide de la bicouche libre en fonction de la température. La zone hachurée correspond aux valeurs limites de la littérature obtenues en phase gel [155, 177, 178, 179]. La ligne pointillée représente la valeur obtenue pour de la DSPC. A droite, nombre de molécules d'eau comprises dans la zone des têtes n'_w. Les points ouverts désignent les expériences avec ajout de sel.

1.2.3 Paramètres élastiques et interactions

La comparaison des courbes de diffusion hors-spéculaire de doubles bicouches de DSPC et de DPPS, obtenues dans la même configuration expérimentale, montre un comportement sensiblement différent entre les deux systèmes (voir la figure 1.5). Les fortes ondulations de la courbe de la bicouche DPPS autour de $q_x \simeq 6 \times 10^6\,\mathrm{m}^{-1}$ sont a priori signes de corrélations très fortes entre les membranes. Nous mesurons en effet une courbure du potentiel d'interaction un ordre de grandeur supérieur dans le cas de la DPPS ($U''_{M_1,M_2} \sim 10^{14}\,\mathrm{J{\cdot}m^{-4}}$), dans la phase gel comme dans la phase fluide.

Comme attendu, le module de courbure de la membrane libre κ_2 obtenu est élevé. Il est compris entre 100 et 600 $\mathrm{k_B T}$ (voir le tableau 1.2) et les fluctuations thermiques restent faibles[2] ($\sigma_{2,th} \sim 2 - 6\,\text{Å}$). La tension γ_2 mesurée est l'ordre de celle mesurée sur les doubles bicouches de DSPC.

Nous avons également ajouté un sel monovalent (NaCl) à des doubles bicouches en phase fluide et en phase gel avec des concentrations respectives de $0.13\,\mathrm{mol{\cdot}L^{-1}}$ ($\ell_D \simeq 0.8\,\mathrm{nm}$) et $0.01\,\mathrm{mol{\cdot}L^{-1}}$ ($\ell_D \simeq 3\,\mathrm{nm}$). Dans le premier cas κ_2 diminue nettement avec l'ajout de sel, tandis qu'il reste quasi-constant pour la plus faible concentration (voir la figure 1.11). Dans les deux cas U''_{M_1,M_2} diminue légèrement et les fluctuations de la membrane flottante augmentent.

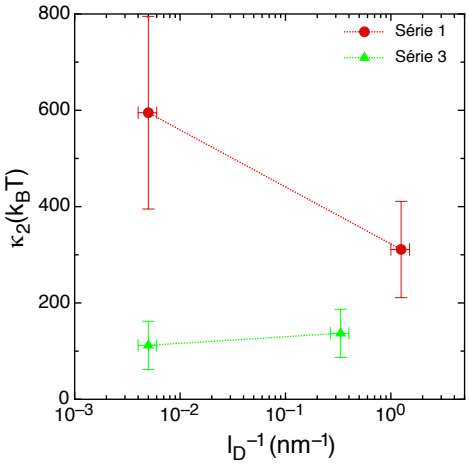


FIGURE 1.11 – Evolution du module de courbure de la bicouche libre κ_2 en fonction de l'inverse de la longueur de Debye ℓ_D^{-1}, présentée pour les séries d'expériences avec ajout de sel à température constante.

2. Ces faibles fluctuations sont également à l'origine des barres d'erreurs importantes sur la mesure des paramètres élastiques.

Série 1 (●)	DPPS 36°C	DPPS 60°C	DPPS 60°C NaCl 0.13 M
d_w[Å]	11.3 ± 1	2.4 ± 1	3.1 ± 1
κ_2 [k_BT]	170 ± 50	600 ± 150	300 ± 100
γ_2 [mN/m]	1.4 ± 0.5	0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.2
$\sigma_{2,st}$ [Å]	2 ± 0.5	2 ± 0.5	3 ± 0.5
$\sigma_{2,th}$ [Å]	4 ± 1	8 ± 1	9 ± 1
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	13.8 ± 0.2	14.2 ± 0.2	14.0 ± 0.2

Série 2 (■)	DPPS 36°C	DPPS 46°C	DPPS 60°C
d_w[Å]	14.0 ± 1	14.6 ± 1	9.7 ± 1
κ_2 [k_BT]	300 ± 100	600 ± 150	200 ± 50
γ_2 [mN/m]	1.4 ± 0.5	2.0 ± 0.2	1.7 ± 0.5
$\sigma_{2,st}$ [Å]	2 ± 0.5	2 ± 0.5	2 ± 0.5
$\sigma_{2,th}$ [Å]	3 ± 1	3 ± 1	5 ± 1
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	14.0 ± 0.2	14.0 ± 0.2	13.8 ± 0.2

Série 3 (▲)	DPPS 36°C	DPPS 36°C NaCl 0.01 M
d_w[Å]	14.0 ± 1	13.7 ± 1
κ_2 [k_BT]	110±50	140±50
γ_2[mN/m]	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2
$\sigma_{2,st}$ [Å]	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2
$\sigma_{2,th}$ [Å]	6 ± 1	7 ± 1
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	13.7 ± 0.2	13.2 ± 0.2

TABLE 1.2 – Paramètres structuraux et élastiques de doubles bicouches de DPPS obtenus par ajustement des courbes de diffusion hors-spéculaire, classées par séries d'expériences.

2. Discussion et perspectives

Ces analyses préliminaires montrent que la physique des membranes chargées est très riche. Bien que des avancées récentes permettent d'en comprendre certains aspects, de nombreuses questions restent ouvertes.

Malgré nos difficultés à caractériser les changements de structure qui semblent s'opérer à la transition de phase, nos mesures permettent de retrouver un certain nombre de caractéristiques des membranes chargées présentes dans la littérature :

- les membranes chargées sont plus rigides que les membranes neutres, et fluctuent de ce fait moins (résultats cohérents avec ceux de Petrache et al. [154]),
- l'aire par lipide chargé est plus faible que l'aire par lipide zwitterionique,
- la valeur de la densité électronique que nous mesurons ($\rho_{\text{head}} \sim 0.45\,\text{e}^{-}\cdot\text{Å}^{3}$) est proche de celle mesurée par Jing et al. [157]. La densité électronique des têtes PS est plus grande que celle des têtes PC, en accord avec les observations de Petrache et al. [154],
- le module de courbure chute d'environ $200\,\text{k}_\text{B}\text{T}$ dans une solution fortement concentrée en sel (0.13 M NaCl), comme observé par Delorme et al. [159].

La possibilité de pouvoir déposer des doubles bicouches chargées dans de l'eau pure va à l'encontre des observations faites sur des systèmes multilamellaires de même nature, instables sans pression osmotique appliquée. L'épaisseur d'eau faible ($d_w \simeq 13\,\text{Å}$ en phase gel) et les fortes corrélations entre les membranes ($U'' \simeq 10^{14}\,\text{J}\cdot\text{m}^{-4}$) confirment que nous ne sommes pas dans un régime d'interactions électrostatiques répulsives, ce qui est en contradiction avec la théorie de Poisson-Boltzmann.

La densité surfacique de charge des bicouches de DPPS est grande ($\sim 1\,\text{e}^{-}/50\,\text{Å}^{2}$) et mène à une longueur de Gouy-Chapman de l'ordre de 1.1 Å. La constante de couplage correspondante est grande $\Xi \simeq 6.4 \gg 1$, et nos systèmes devraient être mieux décrits par une théorie de couplage fort. Nous avons reporté nos valeurs expérimentales sur le diagramme de phase répulsion/attraction issu de cette théorie (voir la

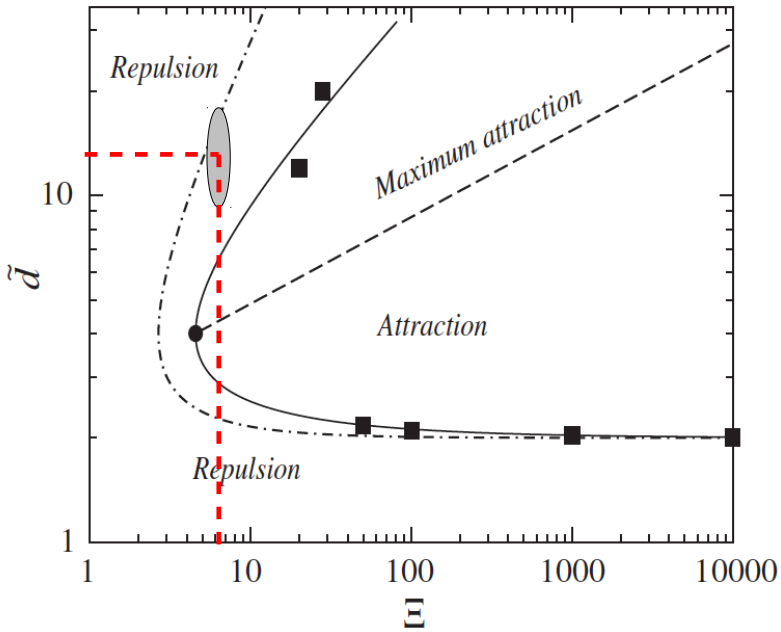


FIGURE 2.1 – Diagramme de phase répulsion/attraction calculé pour deux surfaces planes chargées dans de l'eau pure (adapté de [174]). Les carrés représentent les résultats des simulations Monte Carlo de Moreira et Netz [172] pour $\Xi > 20$. La ligne tirets-pointillés désigne le calcul par développement du viriel (SC) de R. Netz [150], et la ligne continue la théorie WSC développée par Šamaj et Trizac [174]. La zone grisée correspond à nos résultats expérimentaux.

figure 2.1). Nous nous situons dans une zone proche de la zone d'attraction prédite par les simulations Monte Carlo, où les corrections de la théorie WSC de Šamaj et Trizac ont une grande importance. Il serait intéressant d'effectuer de nouvelles expériences avec des mélanges homogènes de lipides zwitterioniques et de lipides chargés. En variant la fraction de lipides chargés nous pourrions modifier la longueur de Gouy-Chapman et explorer les différentes zones de ce diagramme.

Les analyses présentées dans cette partie sont effectuées uniquement à partir d'ajustements sur des courbes de diffusion hors-spéculaire. Les variations brusques observées à la transition de phase ne peuvent être correctement ajustées qu'en modifiant les paramètres de la bicouche supportée et du substrat.
Il nous est indispensable de comprendre les changements de structure qui s'opèrent à la transition de phase gel-fluide pour conclure sur nos observations. Il est possible qu'une structuration de grande longueur d'onde, telle que celle observée par Demé et al. [166], soit à l'origine de ces disparités et échappe à notre modèle de calcul des courbes de réflectivité et de diffusion hors-spéculaire. Diverses expériences sont

envisageables pour parvenir à observer directement des changements de structure à la transition de phase : microscopie de fluorescence, AFM, microscopie confocale ...

Conclusion générale et perspectives

Dans le but de mieux comprendre les propriétés des membranes phospholipidiques à l'échelle submicronique, nous avons étudié dans ce travail de thèse des systèmes composés d'une ou deux bicouches supportées.

La combinaison d'expériences de réflectivité et de diffusion hors-spéculaire de rayons X menées sur des doubles bicouches supportées permet d'accéder aux propriétés d'une membrane unique, libre de fluctuer. La première partie de ce travail a consisté à mesurer les paramètres élastiques de la membrane flottante et le potentiel d'interaction avec son environnement. Une modélisation minutieuse des interactions microscopiques nous a permis de mettre en évidence la faible répulsion électrostatique entre des bicouches composées uniquement de lipides zwitterioniques. Nous avons également montré que parmi les différents modèles de répulsion entropique disponibles dans la littérature, seule une théorie de potentiel effectif avec un potentiel "soft" est à même de décrire nos résultats. Finalement, nous parvenons à appliquer une pression osmotique sur une double bicouche afin d'accéder aux interactions à plus courte portée, ce qui n'avait -à notre connaissance- jamais été fait auparavant.

Nous avons également étudié les différentes étapes de la déstabilisation d'une membrane par un champ électrique alternatif. Les expériences de diffusion hors-spéculaire de rayons X menées sur des doubles bicouches supportées de DSPC nous ont permis d'accéder aux premières étapes de cette déstabilisation. Nous montrons que la structure de la membrane libre n'est que légèrement modifiée par le champ électrique, tandis que ses paramètres élastiques sont au contraire fortement affectés par le champ. Nous mesurons en particulier une contribution positive du champ au module de courbure et une contribution négative à la tension de surface, en accord avec la théorie de Lacoste et al. [140, 142].

Les étapes suivant la déstabilisation ont ensuite été étudiées sur de simples bicouches de DPPC observées par microscopie de fluorescence. Nous montrons qu'il est possible sous certaines conditions de former des vésicules à partir d'une bicouche supportée sur une lame ITO. Les paramètres qui régissent cette déstabilisation sont nombreux, et nous avons étudié en particulier les effets de la fréquence du champ et de son amplitude, de la température ainsi que de la longueur des chaînes. Les diamètres des plus petites vésicules observées ($\sim 2\,\mu$m) sont en bon accord avec nos résultats obtenus en diffusion de rayons X, ainsi qu'avec les théories de l'électroformation. De plus, l'analyse statistique de la cinétique de croissance des vésicules montre que des vésicules de petite taille sont formées continûment, en accord avec les mécanismes prédits par la théorie.
De nombreuses perspectives sont envisageables pour poursuivre cette étude. Il est dans un premier temps nécessaire de comprendre le rôle de chaque paramètre dans la déstabilisation. Il serait par exemple très instructif de parvenir à former des vésicules avec un autre lipide que la DPPC, et de vérifier s'il est suffisant d'être en phase fluide ou s'il faut, en plus, être proche de la température de transition.
L'étude des mécanismes de croissance par microscopie confocale peut être également intéressante, en nous permettant d'observer directement si les vésicules croissent par fusion et/ou par échange de lipides avec la membrane.

Finalement, nous avons étudié les propriétés de doubles bicouches chargées (DPPS) dans de l'eau pure, par réflectivité spéculaire et diffusion hors-spéculaire de rayons X. Ces travaux préliminaires nous permettent de tester la validité de la théorie de Poisson-Boltzmann dans le cas de surfaces fortement chargées, où les corrélations entre ions peuvent être importantes.
Les mesures effectuées mettent en évidence un changement de structure de l'échantillon à grande échelle lors de la transition de phase gel-fluide, qui ne peut être correctement décrit par nos calculs de la réflectivité spéculaire et de la diffusion hors-spéculaire. Nous supposons que la structure de double bicouche est conservée à petite échelle, et nous mesurons les propriétés des membranes par ajustement des courbes de diffusion hors-spéculaire. Les bicouches interagissent très fortement ($U''_{1,2} \simeq 10^{14}\,\mathrm{J{\cdot}m^{-4}}$), et l'épaisseur d'eau inter-membranaire est faible ($d_w \sim 1\,\mathrm{nm}$). Ces résultats vont à l'encontre de la théorie de Poisson-Boltzmann qui prédit une répulsion entre surfaces identiquement chargées, et devraient être mieux décrits par les théories de couplage fort [150, 174].
Plusieurs pistes sont envisageables pour améliorer ces résultats. Des expériences sur des bicouches de DPPC à des échelles plus grandes (microscopie, AFM, ...) nous permettraient éventuellement de comprendre les changements de structures à

la transition de phase gel-fluide. Nous pourrions alors adapter nos modèles de réflectivité et de diffusion hors-spéculaire pour ajuster les courbes expérimentales sur l'ensemble de la gamme de vecteurs d'onde accessible.

De façon plus générale, nous pouvons envisager d'appliquer ces expériences de diffusion de rayons X à des systèmes plus complexes. Il serait par exemple intéressant d'étudier les fluctuations activées via des protéines, l'électrophorèse de protéines membranaires, ou encore les interactions entre membranes et nanoparticules.
Notre connaissance profonde des systèmes modèles de doubles bicouches neutres, associée à des expériences de diffusion de rayons X précises pour une large gamme de vecteurs d'onde, nous permet d'envisager une comparaison directe avec des simulations numériques de membranes. En effet, les plus petites tailles accessibles actuellement par diffusion de rayons X sont de l'ordre des plus grandes tailles de membranes accessibles par des simulations réalistes (de l'ordre de quelques nanomètres pour atteindre des temps de simulation suffisamment longs). Nos expériences pourraient permettre de contraindre les modèles utilisés dans les simulations numériques de systèmes complexes.

Annexes

A.1 Phospholipides utilisés

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles composées d'une tête hydrophile et de deux chaînes aliphatiques hydrophobes de différentes natures (longueur et insaturations). Il existe une terminologie particulière pour décrire les phospholipides les plus usuels : deux premières lettres décrivent la nature des chaînes, suivies de deux lettres décrivant les espèces chimiques de la tête (voir la figure A.1.1).

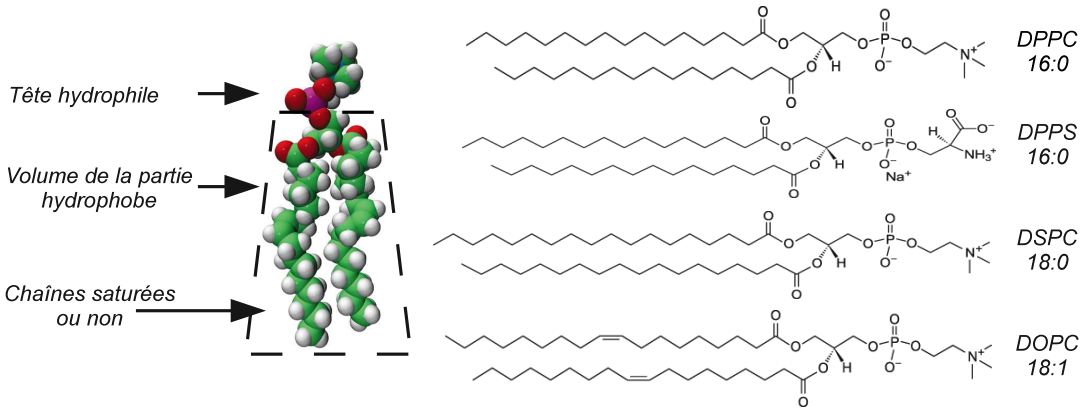


FIGURE A.1.1 – A gauche : représentation schématique de la géométrie d'un phospholipide. A droite : exemples de structures chimiques de phospholipides.

Par exemple le terme DSPC désigne la molécule 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, avec DS pour distearoyl (deux chaînes de stearoyl contenant chacune 18 atomes de carbone) et PC pour phosphocholine, parfois noté 18:0-18:0 PC où le 0 dénote le nombre d'insaturation par chaîne. Les caractéristiques essentielles des phospholipides utilisés dans cette thèse sont regroupées dans le tableau A.1.1, avec certaines de leurs propriétés.

Lipide	Tête	Charge nette à pH neutre	Chaînes	T_m (d'après [116])
DSPC	phosphocholine	0	18:0-18:0	55 °C
DOPC	phosphocholine	0	18:1-18:1	−20 °C
DPPS	phosphatidylsérine	-1	16:0-16:0	54 °C
DPPC	phosphocholine	0	16:0-16:0	41 °C
13:0 PC	phosphocholine	0	13:0-13:0	14 °C

Table A.1.1 – Caractéristiques des phospholipides utilisés dans cette thèse.

Les bicouches de DPPC observées par microscopie de fluorescence sont marquées par ajout d'un faible pourcentage ($\sim 0.5\%$) de DPPE possédant un groupement NBD (7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) fluorescent greffé sur leur tête (voir la figure A.1.2). Son spectre présente un maximum d'absorption pour $\lambda \simeq 460\,\text{nm}$, adapté à nos expériences de microscopie.

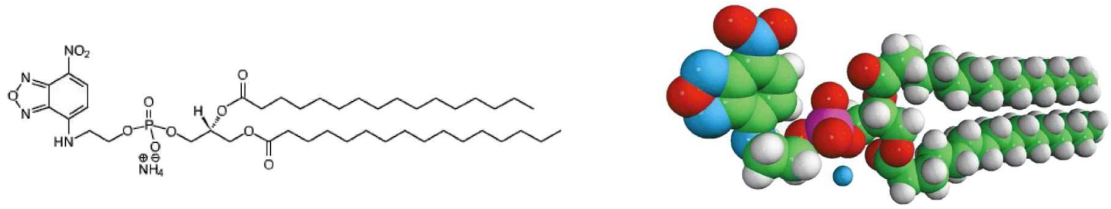


Figure A.1.2 – Structure du DPPE-NBD utilisé comme marqueur fluorescent.

A.2 Méthode de préparation d'une double bicouche supportée

Les doubles bicouches sont transférées sur le substrat monocouche par monocouche par une combinaison de dépositions dites de Langmuir-Blodgett et de Langmuir-Schaefer [54]. Les phospholipides sont placés à l'interface eau-air d'une cuve de Langmuir, et forment une monocouche dont l'aire accessible est contrôlée par des barrières mobiles. Une balance de Langmuir permet de mesurer la tension de surface du film moléculaire γ en fonction de l'aire par molécule de la monocouche. La pression (2D) qui s'applique sur les barrières a pour expression $\Pi = \gamma - \gamma_0$ où γ_0 est la tension superficielle de l'interface eau-air.

Considérons le cas du transfert d'une double bicouche sur un substrat de silicium. La première étape est une isotherme de compression : les barrières compriment lentement le film de lipides ($10\,\mathrm{cm}^2\cdot\mathrm{min}^{-1}$ au maximum), jusqu'à une pression de $40\,\mathrm{mN}\cdot\mathrm{m}^{-1}$, pression pour laquelle l'aire par molécule du film est proche de celle d'une bicouche.
Le substrat de silicium, initialement placé dans un puits au fond de la cuve, est sorti lentement et entraîne la monocouche située à l'interface eau-air (voir la figure A.2.1). La pression est maintenue fixe à $40\,\mathrm{mN}\cdot\mathrm{m}^{-1}$ lors du dépôt, grâce à un asservissement de la position des barrières. Cette déposition, nommée déposition de Langmuir-Blodgett, est répétée en redescendant le système "substrat+monocouche" dans la cuve. Finalement, nous déposons une troisième monocouche en ressortant une dernière fois le substrat. La qualité de ces dépositions est caractérisée par leur taux de transfert défini comme étant le rapport entre l'aire balayée par les barrières et l'aire de l'échantillon. Les doubles bicouches utilisées pour nos expériences ont toutes des taux de transfert $> 95\%$.

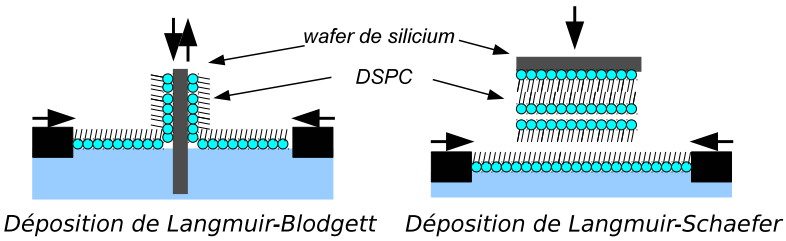


FIGURE A.2.1 – Représentation schématique des dépositions de Langmuir-Blodgett et de Langmuir-Schaefer (adapté de [11]).

Nous ne parvenons pas à déposer plus de trois monocouches par cette méthode. Si nous tentons de déposer une quatrième monocouche par une déposition de Langmuir-Blodgett, la troisième monocouche est systématiquement arrachée et les molécules retournent à l'interface eau-air. Nous déposons la quatrième monocouche par une déposition dite de Langmuir-Schaefer : le substrat traverse la cuve en étant le plus parallèle possible au film de lipides. Le saut de pression observable lors du transfert (au moment du contact) permet de vérifier la qualité de la déposition. Idéalement, il est nul pour un taux de transfert de 100 %. Nous obtenons en pratique des sauts de pression inférieurs à $0.5\,\mathrm{mN{\cdot}m^{-1}}$, signes d'un bon taux de transfert.

A.3 Meilleurs paramètres d'ajustements obtenus

A.3.1 OTS-DSPC

	42.9°C	49.7°C	51.5°C	52.0°C	52.9°C
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	12.9	11.7	9.2	7.9	6.8
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	4.0	3.9	4.2	4.2	4.1
$\xi_s[\mu\text{m}]$	1.0	1.0	4.4	6.8	8.2
H_s	0.44	0.41	0.39	0.44	0.44
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	6	6	4	5	2
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.48	0.45	0.44	0.48	0.46
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.33	0.32	0.33	0.33	0.33
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.41	0.42	0.40	0.40	0.40
$d_{1,head}[\text{Å}]$	4.6	5.0	4.9	5.0	5.0
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	23.0	21.9	22.1	22.8	21.2
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	2.1	2.1	1.9	2.0	2.1
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	23.8	21.0	23.7	25.0	21.1
$d_{2,head}[\text{Å}]$	3.1	4.0	3.8	3.8	2.9
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	25.0	26.5	26.9	28.1	29.7
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.42	0.41	0.41	0.40	0.40
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.31	0.29	0.33	0.29	0.29
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.23	0.23	0.23	0.22	0.24
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.33	0.30	0.30	0.28	0.31
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.46	0.41	0.40	0.40	0.40
$d_{3,head}[\text{Å}]$	3.4	3.8	4.0	3.9	4.0
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	21.7	21.7	21.4	21.2	22.7
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	1.9	2.0	1.7	2.0	2.0
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	21.1	21.9	22.7	21.2	25.5
$d_{4,head}[\text{Å}]$	3.3	3.7	3.6	3.9	3.2
$\text{U}''_{M_1,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	8.5 ± 1	8.6 ± 1	9.4 ± 1	8.4 ± 1	8.3 ± 1
κ_1 [k_BT]	304 ± 100	440 ± 100	467 ± 100	464 ± 100	462 ± 100
γ_1 [mN/m]	9.0 ± 2	9.0 ± 2	10.1 ± 2	19.0 ± 2	14.0 ± 2
$\text{U}''_{M_2,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	9.1 ± 1	9.0 ± 1	9.0 ± 1	8.6 ± 1	8.6± 1
κ_2 [k_BT]	280±50	300±50	200±50	60±20	50±20
γ_2 [mN/m]	0.3±0.2	0.3±0.2	0.4±0.2	0.4±0.2	0.5±0.2
U''_{M_1,M_2} $[10^x$ J/m$^4]$	12.1±0.3	11.8±0.3	11.6±0.3	11.7±0.3	11.5±0.3

TABLE A.3.1 – Effets de la température sur les paramètres structuraux et élastiques de doubles bicouches OTS-DSPC. La définition des paramètres est donnée dans le chapitre 2 de la partie I.

A.3.2 DSPC + NaCl

	Phase fluide			Phase gel	
	Sans sel	ℓ_D=0.45 nm	ℓ_D=0.3 nm	Sans sel	ℓ_D=0.3 nm
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.59	0.59	0.68	0.62	0.65
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	11.1	11.0	11.0	9.9	8.5
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	3.2	3.5	3.7	3.5	4.2
$\xi_s[\mu\text{m}]$	2.2	3.5	2.8	1.9	1.5
H_s	0.5	0.5	0.33	0.57	0.39
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	5	5	5	5	5
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.36	0.35	0.38	0.36	0.37
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.28	0.26	0.28	0.26
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.22	0.22	0.22	0.20	0.21
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.32	0.33	0.33	0.32	0.32
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.42	0.42	0.42	0.47	0.5
$d_{1,head}[\text{Å}]$	2.4	2.1	2.2	2.6	6.9
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	17.2	21.4	22.5	24.6	24.5
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	2.5	2.0	3.3	2.4	3.4
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	18.4	16.8	22.2	21.6	23.0
$d_{2,head}[\text{Å}]$	4.4	5.4	4.7	2.1	2.0
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	28.0	24.6	20.3	24.3	22.2
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.36	0.37	0.39	0.35	0.35
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.28	0.28	0.29	0.26	0.27
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.21	0.21	0.25	0.21	0.23
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.28	0.30	0.26	0.27
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.38	0.38	0.42	0.44	0.36
$d_{3,head}[\text{Å}]$	3.7	4.9	2.5	6.0	5.5
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	18.0	18.0	18.5	23.5	19.1
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	4.2	3.4	1.7	2.3	3.0
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	18.0	18.0	21.2	21.9	18.0
$d_{4,head}[\text{Å}]$	3.5	5.0	4.2	3.4	3.8
$\text{U}''_{M_1,sub}$ [10^x J/m^4]	8.2 ± 1	9.1 ± 1	9.9 ± 1	9.2 ± 1	8.0 ± 1
κ_1 [k_BT]	23 ± 10	450 ± 100	886 ± 100	821 ± 200	830 ± 200
γ_1 [mN/m]	27 ± 2	27 ± 2	39 ± 2	24 ± 2	21 ± 2
$\text{U}''_{M_2,sub}$ [10^x J/m^4]	8.0 ± 1	8.3 ± 1	10.5 ± 1	8.1± 1	8.6 ± 1
κ_2 [k_BT]	80 ±50	473 ±50	232 ±50	75 ±10	175 ± 10
γ_2 [mN/m]	0.80 ± 0.2	0.15±0.2	0.79 ± 0.2	0.69 ± 0.2	0.51±0.2
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	12.1 ±0.1	12.9 ±0.1	13.3 ± 0.1	12.2 ±0.3	13.0 ±0.1

TABLE A.3.2 – Paramètres structuraux et élastiques issus des meilleurs ajustements des expériences avec sel sur des doubles bicouches de DSPC.

A.3.3 DSPC + PVP

	Avant PVP	PVP 4%	PVP 30%
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.56	0.56	0.62
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	7.5	7.5	15
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	4.5	4.5	2.0
$\xi_s[\mu\text{m}]$	0.8	0.8	2.0
H_s	0.38	0.38	0.65
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	5	5	5
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.38	0.50	0.49
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.27	0.26	0.28
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.22	0.25	0.21
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.32	0.30	0.32
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.50	0.50	0.49
$d_{1,head}[\text{Å}]$	2.9	1.6	3.1
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	19.6	18.4	17.6
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	2.5	1.5	2.0
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	23.0	20.2	16.1
$d_{2,head}[\text{Å}]$	1.7	1.4	1.8
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	22.0	18.0	14.0
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.47	0.50	0.38
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.27	0.33	0.33
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.25	0.21	0.26
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.32	0.31	0.27
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.43	0.49	0.50
$d_{3,head}[\text{Å}]$	4.5	3.3	1.5
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	17.7	21.6	21.3
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	1.6	4.0	2.2
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	24.7	24.2	21.6
$d_{4,head}[\text{Å}]$	1.5	4.1	2.7
$\text{U}''_{M_1,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	8.6 ± 1	8.1 ± 1	9.1 ± 1
κ_1 [k_BT]	685 ± 100	900 ± 200	435 ± 100
γ_1 [mN/m]	20 ± 2	44 ± 2	56 ± 2
$\text{U}''_{M_2,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	8.7 ± 1	8.5 ± 1	8.1 ± 1
κ_2 [k_BT]	100±20	200±50	500±50
γ_2 [mN/m]	0.24±0.2	1.11± 0.3	0.3±0.1
U''_{M_1,M_2} $[10^x$ J/m$^4]$	12.0±0.1	13.9±0.1	14.5±0.1

TABLE A.3.3 – Effets de la pression osmotique sur les paramètres structuraux et élastiques de doubles bicouches de DSPC.

A.3.4 DSPC + champ électrique

Série 1	Avant Champ	1V 50Hz	2V 50Hz	5V 50Hz	5V 10Hz
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.65	0.65	0.65	0.65	0.66
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	11.0	10.7	10.8	10.8	10.1
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	4.5	4.5	4.4	3.4	3.3
$\xi_s[\mu\text{m}]$	1.7	1.8	1.8	1.9	1.5
H_s	0.48	0.53	0.51	0.48	0.47
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	2	4	1	3	5
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.40	0.40	0.40	0.40	0.41
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.31	0.31	0.31	0.31	0.3
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.26	0.26	0.25	0.26	0.25
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.29	0.29	0.30	0.33
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.40	0.40	0.40	0.41	0.44
$d_{1,head}[\text{Å}]$	2.0	2.0	2.0	2.2	2.1
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	16.0	16.2	15.9	15.8	14.7
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	3.3	3.0	2.0	2.0	2.1
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	16.1	15.5	14.5	14.2	14.6
$d_{2,head}[\text{Å}]$	4.0	3.5	4.9	4.9	2.3
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	22.5	16.9	13.9	14.3	8.6
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.40	0.41	0.40	0.40	0.40
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.30	0.29	0.29	0.30
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.26	0.24	0.23	0.23	0.26
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.30	0.30	0.30	0.31
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.40	0.42	0.41	0.41	0.40
$d_{3,head}[\text{Å}]$	5.1	3.3	4.9	4.1	3.7
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	18.0	18.9	19.5	19.5	17.9
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	3.7	2.6	3.9	3.9	3.7
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	21.6	19.5	19.7	19.4	17.3
$d_{4,head}[\text{Å}]$	5.5	2.7	3.0	3.0	3.2
$\text{U}''_{M_1,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	8.0 (7-10)	9.5 (8-10.5)	9.5 (8-10.2)	10. (8-10.5)	10.5 (8-11.2)
κ_1 [k_BT]	100 (30-300)	250 (30-500)	60 (10-300)	100 (20-300)	100 (20-300)
γ_1 [mN/m]	12.1 ± 2	9.5 ± 2	12.0 ± 2	12.2 ± 2	11.0 ± 2
$\text{U}''_{M_2,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	10.4 (9.5-10.5)	10.6 (10.2-10.9)	9.7 (8-10.2)	9.9 (8-10.2)	10.2 (8-10.5)
κ_2 [k_BT]	20 (10-35)	16 (10-30)	60 (45-80)	66 (50-90)	176 (150-220)
γ_2 [mN/m]	1.6 ± 0.2	1.52 ± 0.2	0.76 ± 0.2	0.55 ± 0.2	0.4 ± 0.2
U''_{M_1,M_2} $[10^x$ J/m$^4]$	12.7 ± 0.2	12.3 ± 0.2	11.9 ± 0.2	11.9 ± 0.2	11.2 ± 0.2

TABLE A.3.4 – Paramètres structuraux et élastiques issus des meilleurs ajustements de la série 1 (double bicouche de DSPC en phase fluide sous champ électrique).

Série 2	Avant Champ	5V 50Hz	5V 30Hz	5V 10Hz
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.68	0.65	0.67	0.66
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	9.9	9.4	8.4	9.6
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	3.5	3.5	3.7	3.5
$\xi_s[\mu\text{m}]$	3.0	2.0	1.8	2.8
H_s	0.47	0.38	0.38	0.43
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	4	5	2	7
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.42	0.50	0.42	0.48
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.30	0.29	0.29	0.29
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.22	0.24	0.26	0.24
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.31	0.28	0.31
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.39	0.38	0.41	0.40
$d_{1,head}[\text{Å}]$	4.1	5.0	5.5	5.1
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	17.9	23.9	24.9	25.0
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	4.0	2.8	2.3	2.7
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	17.0	25.2	24.8	23.
$d_{2,head}[\text{Å}]$	4.0	4.3	5.2	5.3
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	22.0	8.7	7.0	4.8
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.44	0.43	0.41	0.40
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.28	0.32	0.28	0.31
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.22	0.24	0.26	0.24
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.30	0.30	0.30
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.39	0.39	0.39	0.42
$d_{3,head}[\text{Å}]$	5.5	5.0	4.2	3.1
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	18.4	17.7	18.8	19.6
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	3.9	4.0	3.3	2.6
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	20.2	21.5	20.8	16.7
$d_{4,head}[\text{Å}]$	5.5	3.8	3.0	5.2
$\text{U}''_{M_1,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	8.1 (7-10.2)	9.7 (8-10.1)	11.17 (11-11.4)	10.48 (10.2-10.7)
κ_1 [k_BT]	66 (10-150)	54 (30-120)	440 (200-700)	507 (300-750)
γ_1 [mN/m]	9.8 ± 2	7.0 ± 2	5.1 ± 2	2.7 ± 2
$\text{U}''_{M_2,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	8.05 (7-10.2)	8.99 (7-9.6)	11.50 (11.45-11.55)	10.24 (9.6-10.5)
κ_2 [k_BT]	20 (15-30)	160 (130-210)	184 (150-220)	230 (200-280)
γ_2 [mN/m]	0.78 ± 0.2	0.68 ± 0.2	0.41 ± 0.2	0.14 ± 0.2
U''_{M_1,M_2} $[10^x$ J/m$^4]$	12.9 ± 0.2	12.7 ± 0.2	11.8 ± 0.2	11.0 ± 0.2

TABLE A.3.5 – Paramètres structuraux et élastiques issus des meilleurs ajustements de la série 2 (double bicouche de DSPC en phase fluide sous champ électrique).

Série 3	Avant Champ	5V 10Hz	10V 10Hz
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.54	0.52	0.52
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	8.2	9.9	8.9
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	2.6	2.6	2.7
$\xi_s[\mu\text{m}]$	1.8	2.8	1.7
H_s	0.46	0.55	0.55
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	2	5	5
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.41	0.40	0.40
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.33	0.29	0.29
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.22	0.22	0.25
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.30	0.29	0.32
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.42	0.46	0.46
$d_{1,head}[\text{Å}]$	4.5	2.0	2.0
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	20.3	25.0	25.0
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	2.0	4.0	2.1
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	19.7	20.3	19.5
$d_{2,head}[\text{Å}]$	2.1	5.5	5.0
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	22.5	18.4	17.3
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.45	0.40	0.40
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.31	0.29
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.26	0.24	0.22
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.28	0.28	0.29
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.40	0.40	0.40
$d_{3,head}[\text{Å}]$	5.5	3.9	2.7
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	25.5	18.6	18.2
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	4.0	3.2	4.0
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	25.5	17.9	17.9
$d_{4,head}[\text{Å}]$	5.0	4.4	3.9
$\text{U}''_{M_1,sub}$ [10^x J/m^4]	8.4(7-9.8)	9.2 (7- 10)	8.1 (7-9.7)
κ_1 [$\text{k}_\text{B}\text{T}$]	11(5-200)	757 (300-1200)	1095 (700-1400)
γ_1 [mN/m]	25.4 ± 2	20.8 ± 2	16.6 ± 2
$\text{U}''_{M_2,sub}$ [10^x J/m^4]	8.0 (7-10)	8.4 (7-9.8)	8.0 (7-9.8)
κ_2 [$\text{k}_\text{B}\text{T}$]	20 (15-40)	447 (200-600)	697 (500-1000)
γ_2 [mN/m]	0.50 ± 0.2	-0.14 ± 0.2	-1.56 ± 0.2
U''_{M_1,M_2} [10^x J/m^4]	12.7 ± 0.2	12.9 ± 0.2	12.7 ± 0.2

TABLE A.3.6 – Paramètres structuraux et élastiques issus des meilleurs ajustements de la série 3 (double bicouche de DSPC en phase fluide sous champ électrique).

Série 4	Avant Champ	1V50Hz
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.70	0.69
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	9.3	9.2
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	3.3	3.3
$\xi_s[\mu\text{m}]$	2.6	2.4
H_s	0.48	0.45
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	1	3
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.45	0.42
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.29
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.24	0.26
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.29
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.40	0.40
$d_{1,head}[\text{Å}]$	3.0	3.3
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	23.0	23.0
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	2.0	2.1
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	23.0	23.0
$d_{2,head}[\text{Å}]$	5.5	4.0
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	23.5	7.5
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.40	0.40
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.30
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.26	0.26
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.33	0.31
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.41	0.40
$d_{3,head}[\text{Å}]$	3.2	3.0
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	19.0	18.0
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	2.0	2.0
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	20.8	19.9
$d_{4,head}[\text{Å}]$	5.5	5.5
$\text{U}''_{M_1,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	9.6 (7-10)	9.0 (7-9.5)
κ_1 [k$_\text{B}$T]	46 (10-300)	25 (10-220)
γ_1 [mN/m]	11.7 ± 2	13.2 ± 2
$\text{U}''_{M_2,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	9.2 (7-10)	8. (7-9.5)
κ_2 [k$_\text{B}$T]	28 (20-35)	39 (35-50)
γ_2[mN/m]	0.13 ± 0.2	-0.07 ± 0.2
U''_{M_1,M_2} $[10^x$ J/m$^4]$	11.5 ± 0.2	12.5 ± 0.2

TABLE A.3.7 – Paramètres structuraux et élastiques issus des meilleurs ajustements de la série 4 (double bicouche de DSPC en phase fluide sous champ électrique).

A.3.5 DPPS

Série 1	DPPS 36°C	DPPS 60°C	DPPS 60°C NaCl 0.13 M
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.65	0.65	0.64
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	1.2	3.6	3.9
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	1.8	3.0	4.5
$\xi_s[\mu\text{m}]$	1.7	1.0	0.64
H_s	0.65	0.60	0.60
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	1	6	4
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.44	0.44	0.45
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.27	0.27	0.29
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.21	0.21	0.22
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.26	0.25	0.25
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.41	0.41	0.42
$d_{1,head}[\text{Å}]$	6.0	6.5	6.5
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	18.6	19.0	18.0
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	3.6	3.3	3.2
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	21.3	21.3	20.7
$d_{2,head}[\text{Å}]$	3.0	3.9	3.2
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	11.3	2.4	3.1
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.40	0.40	0.42
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.27	0.27	0.27
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.23	0.22	0.22
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.30	0.30
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.38	0.40	0.43
$d_{3,head}[\text{Å}]$	6.0	4.3	4.8
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	23.6	22.0	22.0
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	1.0	1.7	1.6
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	23.7	22.0	20.6
$d_{4,head}[\text{Å}]$	5.9	4.0	4.7
$\text{U}''_{M_1,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	9.0 ± 2	9.8 ± 2	10.0 ± 2
κ_1 [k_BT]	481± 100	598± 100	390± 100
γ_1 [mN/m]	20 ± 2	1 ± 1	1 ± 1
$\text{U}''_{M_2,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	11.5 ± 2	10.7 ± 2	10.2 ± 2
κ_2 [k_BT]	172 ± 50	595 ± 150	311 ± 100
γ_2 [mN/m]	1.39 ± 0.5	0.34 ± 0.2	0.7 ± 0.2
U''_{M_1,M_2} $[10^x$ J/m$^4]$	13.8 ± 0.2	14.2 ± 0.2	14.0 ± 0.2

TABLE A.3.8 – Paramètres structuraux et élastiques issus des meilleurs ajustements de la série 1 (double bicouche de DPPS).

Série 2	DPPS 36°C	DPPS 46°C	DPPS 60°C
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.66	0.66	0.65
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	5.7	5.7	5.0
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	1.95	1.95	3.0
$\xi_s[\mu\text{m}]$	1.5	1.5	1.0
H_s	0.53	0.53	0.60
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	1	1	5
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.40	0.40	0.43
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.26	0.26	0.30
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.22	0.22	0.21
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.25	0.25	0.24
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.43	0.43	0.43
$d_{1,head}[\text{Å}]$	6.0	6.0	3.8
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	21.9	21.9	19.5
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	2.0	2.0	2.3
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	19.6	19.6	18.1
$d_{2,head}[\text{Å}]$	3.0	3.0	4.7
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	14.0	14.6	9.7
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.48	0.48	0.48
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.27	0.27	0.27
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.23	0.23	0.20
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.31	0.31	0.29
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.46	0.46	0.48
$d_{3,head}[\text{Å}]$	6.0	6.0	5.5
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	22.0	22.0	19.6
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	2.0	2.0	2.2
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	21.6	21.6	21.0
$d_{4,head}[\text{Å}]$	3.7	3.7	3.1
$\text{U}''_{M_1,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	10.8 ± 2	8.5 ± 2	10.7± 2
κ_1 [k$_\text{B}$T]	600 ± 100	595 ± 100	130 ± 50
γ_1 [mN/m]	28 ± 2	35 ± 2	10 ± 2
$\text{U}''_{M_2,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	11.1 ± 2	11.5 ± 2	10.0 ± 2
κ_2 [k$_\text{B}$T]	300 ±100	596 ±150	197 ±50
γ_2 [mN/m]	1.4 ±0.2	1.98±0.2	1.7 ±0.2
U''_{M_1,M_2} $[10^x$ J/m$^4]$	14.0 ±0.2	14.0 ±0.2	13.8 ±0.2

TABLE A.3.9 – Paramètres structuraux et élastiques issus des meilleurs ajustements de la série 2 (double bicouche de DPPS).

Série 3	DPPS 36°C	DPPS 36°C NaCl 0.01M
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.61	0.61
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	6.0	6.0
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	3.8	3.8
$\xi_s[\mu\text{m}]$	1.6	1.6
H_s	0.60	0.60
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	1	1
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.40	0.40
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.27	0.27
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.20	0.20
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.24	0.23
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.42	0.42
$d_{1,head}[\text{Å}]$	6.0	6.0
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	22.0	22.0
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	3.0	2.6
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	22.0	22.0
$d_{2,head}[\text{Å}]$	3.0	3.9
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	14.0	13.7
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.45	0.44
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.24	0.25
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.20	0.20
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.29	0.28
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.48	0.49
$d_{3,head}[\text{Å}]$	5.9	6.0
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	22.0	21.7
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	1.6	1.8
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	22.0	21.8
$d_{4,head}[\text{Å}]$	3.0	3.0
$\text{U}''_{M_1,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	8.2 ± 2	8.1 ± 2
κ_1 [k_BT]	414 ± 100	282 ± 100
γ_1 [mN/m]	16 ± 2	12 ± 2
$\text{U}''_{M_2,sub}$ $[10^x$ J/m$^4]$	8.0 ± 2	8.2 ± 2
κ_2 [k_BT]	112 ±50	137 ±50
γ_2 [mN/m]	0.57 ±0.2	0.74 ±0.2
U''_{M_1,M_2} $[10^x$ J/m$^4]$	13.7 ±0.2	13.2 ±0.2

TABLE A.3.10 – Paramètres structuraux et élastiques issus des meilleurs ajustements de la série 3 (double bicouche de DPPS).

A.3.6 Barres d'erreurs sur les paramètres structuraux

	$\pm$
$\rho_{SiO_2}[e^-/\text{Å}^3]$	0.02
$D_{Si0_2}[\text{Å}]$	1
$\sigma_{Si0_2}[\text{Å}]$	0.1
$\xi_s[\mu\text{m}]$	1
H_s	0.1
$D_{1,H_2O}[\text{Å}]$	5
$\rho_{1,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.02
$\rho_{1,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.01
$\rho_{1,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.02
$\rho_{2,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.01
$\rho_{2,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.02
$d_{1,head}[\text{Å}]$	0.2
$D_{1,tail}[\text{Å}]$	0.5
$d_{1,CH_3}[\text{Å}]$	0.2
$D_{2,tail}[\text{Å}]$	0.5
$d_{2,head}[\text{Å}]$	0.2
$D_{2,H_2O}[\text{Å}]$	1
$\rho_{3,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.02
$\rho_{3,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.01
$\rho_{2,CH_3}[e^-/\text{Å}^3]$	0.02
$\rho_{4,tail}[e^-/\text{Å}^3]$	0.01
$\rho_{4,head}[e^-/\text{Å}^3]$	0.02
$d_{3,head}[\text{Å}]$	0.2
$D_{3,tail}[\text{Å}]$	0.5
$d_{2,CH_3}[\text{Å}]$	0.2
$D_{4,tail}[\text{Å}]$	0.5
$d_{4,head}[\text{Å}]$	0.5

TABLE A.3.11 – Barres d'erreur des paramètres d'ajustement.

Bibliographie

[1] E. Sackmann. *Handbook of Biological Physics*, chapter Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles, pages 213–303. Elsevier Science B.V., 1995.

[2] E.T. Castellana and P.S. Cremer. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports*, 61(10):429 – 444, 2006.

[3] O. Mouritsen and O. Andersen. *In search of a new biomembrane model, Biologiske Skrifter*. The Royal Danish Academy of Science and Letters, Copenhagen, 1998.

[4] R. Lipowsky. *Generic Interactions of Flexible Membranes*, chapter Ch. 11, page 521. Elsevier, 1995.

[5] J. Rädler, T.J. Feder, H.H. Strey, and E. Sackmann. Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Physical Review E*, 51:4526–4536, 1995.

[6] J. Pécréaux, H.-G. Döbereiner, J. Prost, J.-F. Joanny, and P. Bassereau. Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *European Physical Journal E*, 13:277–290, 2004.

[7] J. B. Manneville, P. Bassereau, S. Ramaswamy, and J. Prost. Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration. *Physical Review E*, 64:021908, 2001.

[8] E. Evans and W. Rawicz. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Physical Review Letters*, 64:2094–2097, 1990.

[9] H.I. Petrache, N. Gouliaev, S. Tristram-Nagle, S. Zhang, R.M. Suter, and J.F. Nagle. Interbilayer interactions from high-resolution x-ray scattering. *Physical Review E*, 57:7014–7024, 1998.

[10] T. Salditt, C. Li, A. Spaar, and U. Mennicke. X-ray reflectivity of solid-supported, multilamellar membranes. *European Physical Journal E*, 7:105–116, 2002.

[11] L. Malaquin. *Interactions et destabilisation de membranes lipidiques supportées*. PhD thesis, Université de Strasbourg, 2009.

[12] S. Lecuyer. *Fluctuations et déstabilisation d'une bicouche lipidique supportée*. PhD thesis, Université Louis Pasteur, 2006.

[13] N. Campbell, J. Reece, M. Taylor, and E. Simon. *Biology: Concepts and Connections*. Pearson Benjamin Cummings, sixth edition, 2009.

[14] W.P. Williams, E. Selstam, and T. Brain. X-ray diffraction studies of the structural organisation of prolamellar bodies isolated from zea mays. *FEBS Letters*, 422(2):252 – 254, 1998.

[15] K. Gounaris, A.P.R. Brain, P.J. Quinn, and W.P. Williams. Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes. *FEBS Letters*, 153(1):47 – 52, 1983.

[16] A. Tardieu, V. Luzzati, and F.C. Reman. Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: A study of lecithin-water phases. *J. Mol. Biol.*, 75(4):711–718, April 1973.

[17] C. Scomparin, S. Lecuyer, M. Ferreira, T. Charitat, and B. Tinland. Diffusion in supported lipid bilayers: Influence of substrate and preparation technique on the internal dynamics. *Eur. Phys. J. E*, 28(2):211–220, feb 2009.

[18] Z. Derzko and K. Jacobson. Comparative lateral diffusion of fluorescent lipid analogs in phospholipid multibilayers. *Biochemistry*, 19(26):6050–6057, 1980.

[19] W.L.C. Vaz, R.M. Clegg, and D. Hallmann. Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phase phosphatidylcholine multibilayers. a comparison of experiment with theory. *Biochemistry*, 24(3):781–786, 1985.

[20] P.F.F. Almeida, L.C. Vaz, and T.E. Thompson. Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: A free volume analysis. *Biochemistry*, 31:6739–6747, 1992.

[21] J.T. Woodward and J.A. Zasadzinski. Amplitude, wave form, and temperature dependence of bilayer ripples in the p beta ' phase. *Physical Review E*, 53:3044, 1996.

[22] T. Heimburg. A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain melting transition. *Biophysical Journal*, 78:1154–1165, 2000.

[23] E. Lindahl and O. Edholm. Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid bilayers from molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 79:426–433, 2000.

[24] J. Liu and J. C. Conboy. 1,2-Diacyl-Phosphatidylcholine Flip-Flop Measured Directly by Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 89(4):2522–2532, 2005.

[25] A. Castegna, C.M. Lauderback, H. Mohmmad-Abdul, and D.A. Butterfield. Modulation of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by the lipid peroxidation products, 4-hydroxynonenal and acrolein: implications for alzheimer's disease. *Brain Research*, 1004(1-2):193 – 197, 2004.

[26] W. Helfrich. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift für Naturforschung*, 28:693–703, 1973.

[27] P. Canham. The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell. *J. Theor. Bio.*, 26:61, 1970.

[28] E. Evans and D. Needham. Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion, and colloidal interactions. *Journal of Physical Chemistry*, 91:4219–4228, 1987.

[29] J.-B. Fournier, A. Ajdari, and L. Peliti. Effective-area elasticity and tension of micromanipulated membranes. *Physical Review Letters*, 86:4970–4973, 2001.

[30] J. Daillant, E. Bellet-Amalric, A. Braslau, T. Charitat, G. Fragneto, F. Graner, S. Mora, F. Rieutord, and B. Stidder. Structure and fluctuations of a single floating lipid bilayer. *The Proceding of the National Academy of Sciences USA*, 102:11639–11644, 2005.

[31] F. Schmid. Fluctuations in lipid bilayers: Are they understood? *Biophysical Reviews and Letters*, 08(01-02):1–20, 2013.

[32] L. Auvray, F. Devreux, and B. Duplantier. Physique des membranes et polymères biologiques, cours de l'école polytechnique, non publié. 2006.

[33] J.M. Seddon and R.H. Templer. *Structure and Dynamics of Membranes - from Cells to Vesicles, volume 1A*. Springer, 1995.

[34] L. Malaquin, T. Charitat, and J. Daillant. Supported bilayers: combined specular and diffuse x-ray scattering. *European Physical Journal E*, 31:285–301, 2010.

[35] T. Charitat, S. Lecuyer, and G. Fragneto. Fluctuations and destabilization of single phospholipid bilayers. *Biointerphases*, 3:FB3–FB15, 2008.

[36] B.W. Koenig, H.H. Strey, and K. Gawrisch. Membrane lateral compressibility determined by nmr and x-ray diffraction: effect of acyl chain polyunsaturation. *Biophys J*, 73(4):1954–1966, 1997.

[37] `http://avantilipids.com/`.

[38] D.D. Lasic. *Liposomes in Gene Delivery*. CRC PressINC, 1997.

[39] C.-H. Lee, W.-C. Lin, and J. Wang. All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions. *Physical Review E*, 64:020901, 2001.

[40] J. Bernardino de la Serna, J. Perez-Gil, A.C. Simonsen, and L.A. Bagatolli. Cholesterol rules: Direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39):40715–40722, 2004.

[41] K.A. Riske and R. Dimova. Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. *Biophysical Journal*, 88(2):1143 – 1155, 2005.

[42] G. Weber. *Modifications photo-induites de membranes modèles*. PhD thesis, Université de Strasbourg, 2012.

[43] H.I. Petrache, S. Tristram-Nagle, and J.F. Nagle. Fluid phase structure of epc and dmpc bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 95:83–94, 1998.

[44] S. Tristram-Nagle, H.I. Petrache, and J.F. Nagle. Structure and interactions of fully hydrated dioleolylphosphatidylcholine bilayers. *Biophysical Journal*, 75:917–925, 1998.

[45] T. Hianik, J. Dlugopolsky, V.I. Passechnik, D.F. Sargent, and S.A. Ivanov. Electrostriction and membrane potential of lipid bilayers on a metal support. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 106(2-3):109 – 118, 1996. Electrostriction.

[46] S. Micelli, E. Gallucci, D. Meleleo, V. Stipani, and V. Picciarelli. Mitochondrial porin incorporation into black lipid membranes: ionic and gating contribution to the total current. *Bioelectrochemistry*, 57(2):97 – 106, 2002.

[47] A. Beerlink, S. Thutupalli, M. Mell, M. Bartels, P. Cloetens, S. Herminghaus, and T. Salditt. X-ray propagation imaging of a lipid bilayer in solution. *Soft Matter*, 8:4595–4601, 2012.

[48] T. Salditt. Thermal fluctuations and stability of solid-supported lipid membranes. *J. Phys.-Cond. Mat.*, 17(6):R287–R314, February 2005.

[49] U. Mennicke and T. Salditt. Preparation of solid-supported lipid bilayers by spin-coating. *Langmuir*, 18:8172–8177, 2002.

[50] J. Schmitt, B. Danner, and T.M. Bayerl. Polymer cushions in supported phospholipid bilayers reduce significantly the frictional drag between bilayer and solid surface. *Langmuir*, 17:244–246, 2001.

[51] E. Sackmann. Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science*, 271:43–48, 1996.

[52] A.V. Hughes, S.J. Roser, M.C. Gestenberg, A. Goldar, B. Stidder, R. Feldenhans'l, and J. Bradshaw. Phase behavior of dmpc free supported bilayer studied by neutron reflectivity. *Langmuir*, 18:8161–8171, 2002.

[53] A.V. Hughes, A. Goldar, M.C. Gestenberg, S.J. Roser, and J. Bradshaw. A hybrid sam phospholipid approach to fabricating a free supported lipid bilayer. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4:2371–2378, 2002.

[54] T. Charitat, E. Bellet-Amalric, G. Fragneto, and F. Graner. Adsorbed and free lipid bilayers at the solid-liquid interface. *European Physical Journal B*, 8:583–593, 1999.

[55] E. Sinner and W. Knoll. Functional tethered membranes. *Curr. Op. Chem. Biol.*, 5:705–711, 2001.

[56] F. Harb, J. Sarkis, N. Ferte, and B. Tinland. Beyond saffman-delbruck approximation: A new regime for 2d diffusion of alpha-hemolysin complexes in supported lipid bilayer. *The European Physical Journal E*, 35(11):1–9, 2012.

[57] F. Harb and B. Tinland. Effect of ionic strength on dynamics of supported phosphatidylcholine lipid bilayer revealed by frapp and langmuir-blodgett transfer ratios. *Langmuir*, 29(18):5540–5546, 2013.

[58] F. Harb. *Etude d'un système biomimétique simple : diffusion brownienne et mobilité électrophorétique d'une protéine membranaire modèle insérée dans une bicouche lipidique supportée.* PhD thesis, Université d'Aix-Marseille, 2012.

[59] P.G. de Gennes and C. Taupin. Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces. *Journal of Physical Chemistry*, 86:2294–2304, 1982.

[60] L. Peliti and S. Leibler. Effects of thermal fluctuations on systems with small surface tension. *Physical Review Letters*, 54:1690–1693, 1985.

[61] H.P. Duwe and E. Sackmann. Bending elasticity and thermal excitations of lipid bilayer membranes: modulation by solutes. *Phys. A*, 163:410–428, 1990.

[62] G. Palasantzas and J. Krim. Effect of the form of the height-height correlation function on diffuse x-ray scattering from a self-affine surface. *Phys. Rev. B*, 48(5):2873–2877, Aug 1993.

[63] P.S. Swain and D. Andelman. The influence of substrate structure on membrane adhesion. *Langmuir*, 15:8902–8914, 1999.

[64] P.S. Swain and D. Andelman. Supported membranes on chemically structured and rough surfaces. *Physical Review E*, 63:51911, 2001.

[65] J.F. Nagle. Introductory lecture: Basic quantities in model biomembranes. *Faraday Discuss.*, 161:11–29, 2013.

[66] M.C. Watson, E.S. Penev, P.M. Welch, and F.L.H. Brown. Thermal fluctuations in shape, thickness, and molecular orientation in lipid bilayers. *J Chem Phys*, 135(24):244701, Dec 2011.

[67] M.C. Watson, E.G. Brandt, P.M. Welch, and F.L.H. Brown. Determining biomembrane bending rigidities from simulations of modest size. *Phys. Rev. Lett.*, 109:028102, Jul 2012.

[68] J.F. Nagle and S. Tristram-Nagle. Structure of lipid bilayers. *BBA Biomembranes*, 1469:159–195, 2000.

[69] M.C. Wiener, R.M. Suter, and J.F. Nagle. Structure of the fully hydrated gel phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophysical Journal*, 55:315–25, 1989.

[70] J.F. Nagle and M.C. Wiener. Relations for lipid bilayers: connections of electron density to other structural quantities. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 144:235–255, 1989.

[71] J. Daillant and M. Alba. High-resolution x-ray scattering measurements: I surfaces. *Reports on Progress in Physics*, 63:1725–1777, 2000.

[72] J. Daillant and A. Gibaud, editors. *X-ray and neutron reflectivity: principles and applications*, volume m58 of *Lecture notes in physics*. Springer-Verlag, Heidelberg, 1999.

[73] S. Mora. *Structure d'interface de fluides complexes*. PhD thesis, Université Paris 11, 2003.

[74] E. Novakova, K. Giewekemeyer, and T. Salditt. Structure of two-component lipid membranes on solid support: An x-ray reflectivity study. *Physical Review E (Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics)*, 74(5):051911, 2006.

[75] A. Corana, M. Marchesi, C. Martini, and S. Ridella. Minimizing multimodal functions of continuous variables with the simulated annealing algorithm. *ACM Trans. Math. Softw.*, 13(3):262–280, 1987.

[76] J. Mahanty and B.W. Ninham. *Dispersion forces*. London ; New York : Academic Press, 1976. Includes bibliographies and index.

[77] B.W. Ninham and V.A. Parsegian. van der waals forces. *Biophysical Journal*, 10:646–663, 1970.

[78] V.E. Shubin and P. Kékicheff. Electrical double layer structure revisited via a surface force apparatus: Mica interfaces in lithium nitrate solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 155(1):108 – 123, 1993.

[79] T.J. Senden and C.J. Drummond. Surface chemistry and tip-sample interactions in atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 94(1):29 – 51, 1995.

[80] R.J. Hunter and L.R. White. *Foundations of colloid science*. Number vol. 2 in Oxford science publications. Clarendon Press, 1987.

[81] J.N. Israelachvili and H. Wennerström. Entropic forces between amphiphilic surfaces in liquids. *Journal of Physical Chemistry*, 96:520–531, 1992.

[82] S. Marcelja and N. Radic. Repulsion of interfaces due to boundary water. *Chemical Physics Letters*, 42(1):129 – 130, 1976.

[83] A. Pertsin, D. Platonov, and M. Grunze. Origin of short-range repulsion between hydrated phospholipid bilayers: A computer simulation study. *Langmuir*, 23(3):1388–1393, 2007. PMID: 17241063.

[84] C. Eun and M.L. Berkowitz. Origin of the hydration force: Water-mediated interaction between two hydrophilic plates. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(40):13222–13228, 2009. PMID: 19518117.

[85] E. Schneck, F. Sedlmeier, and R.R. Netz. Hydration repulsion between biomembranes results from an interplay of dehydration and depolarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(36):14405–14409, 2012.

[86] R.P. Rand and V.A. Parsegian. Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 988:351–376, 1989.

[87] E. Schneck and R. Netz. From simple surface models to lipid membranes: Universal aspects of the hydration interaction from solvent-explicit simulations. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, In Press, Corrected Proof:–, 2011.

[88] R. Lipowsky and S. Grotehans. Hydration vs. protrusion forces between lipid bilayers. *Europhys. Lett.*, 23:599–604, 1993.

[89] C.G. Crocker and D.G. Grier. Microscopic measurement of the pair interaction potential of charge-stabilized colloid. *Phys Rev Lett*, 73(2):352–355, Jul 1994.

[90] D. Andelman. *Handbook of biological physics*, chapter 12-Electrostatic Properties of Membranes: The Poisson-Boltzmann Theory. Elsevier Science, 1995.

[91] H. Vink. Precision measurements of osmotic pressure in concentrated polymer solutions. *European Polymer Journal*, 7(10):1411 – 1419, 1971.

[92] T.J. McIntosh and S.A. Simon. Hydration force and bilayer deformation: a reevaluation. *Biochemistry*, 25(14):4058–4066, 1986.

[93] V.A. Parsegian, N. Fuller, and R.P. Rand. Measured work of deformation and repulsion of lecithin bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(6):2750–2754, 1979.

[94] E.A. Evans and V.A. Parsegian. Thermal-mechanical fluctuations enhance repulsion between bimolecular layers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(19):7132–7136, 1986.

[95] A. Pierres, V. Monnet-Corti, A.-M. Benoliel, and P. Bongrand. Do membrane undulations help cells probe the world? *Trends in Cell Biology*, 19(9):428 – 433, 2009.

[96] K.R. Mecke. Thermal fluctuations of thin liquid films. *Journal of Physics: Condensed matter*, 13:4615–4636, 2001.

[97] R.R. Netz and R. Lipowsky. Stacks of fluid membranes under pressure and tension. *EPL (Europhysics Letters)*, 29(4):345, 1995.

[98] S. Milner and D. Roux. Flory theory of the unbinding transition. *Journal de Physique I*, 2:1741–1754, September 1992.

[99] R. Lipowsky. From bunches of membranes to bundles of strings. *Zeitschrift fur Physik B Condensed Matter*, 97(2):193–203, 1995.

[100] R. Podgornik and V.A. Parsegian. Thermal-mechanical fluctuations of fluid membranes in confined geometries: the case of soft confinement. *Langmuir*, 8:557–562, 1992.

[101] K.R. Mecke, T. Charitat, and F. Graner. Fluctuating lipid bilayer in an arbitrary potential: Theory and experimental determination of bending rigidity. *Langmuir*, 19:2080–2087, 2003.

[102] M. Manghi and N. Destainville. Statistical mechanics and dynamics of two supported stacked lipid bilayers. *Langmuir*, 26:4057–4068, 2010.

[103] W. Helfrich. Steric interaction of fluid membranes in multilayer systems. *Zeitschrift für Naturforschung*, 33:305–315, 1978.

[104] G. Gompper and D.M. Kroll. Random surface discretizations and the renormalization of the bending rigidity. *Journal de Physique*, 6:1305–1320, 1996.

[105] W. Janke, H. Kleinert, and M. Meinhart. Monte carlo study of a stack of self-avoiding surfaces with extrinsic curvature stiffness. *Physics Letters B*, 217(4):525 – 529, 1989.

[106] A. Hemmerle, L. Malaquin, T. Charitat, S. Lecuyer, G. Fragneto, and J. Daillant. Controlling interactions in supported bilayers from weak electrostatic repulsion to high osmotic pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(49):19938–19942, 2012.

[107] C.R. Safinya, D. Roux, G.S. Smith, S.K. Sinha, P. Dimon, N.A. Clark, and A.M. Bellocq. Steric interactions in a model multimembrane system: a synchrotron x-ray study. *Physical Review Letters*, 57(4):2718–2721, 1986.

[108] U. Seifert. Self-consistent theory of bound vesicles. *Physical Review Letters*, 74:5060–5063, 1995.

[109] D. Sornette and N. Ostrowsky. Importance of membrane fluidity on bilayer interactions. *The Journal of Chemical Physics*, 84(7):4062–4067, 1986.

[110] G. Gompper and D.M. Kroll. Steric interactions in a multimembrane system: a monte-carlo study. *Europhys. Lett.*, 9:59, 1989.

[111] J.F. Nagle, R. Zhang, S. Tristram-Nagle, W. Sun, H.I. Petrache, and R.M. Suter. X-ray structure determination of fully hydrated l_α phase of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophysical Journal*, 70:1419–31, 1996.

[112] R. Zhang, S. Suter, R.M., and J.F. Nagle. Theory of the structure factor of lipid bilayers. *Physical Review E*, 50:5047–5060, 1994.

[113] U. Mennicke, D. Constantin, and T. Salditt. Structure and interaction potentials in solid-supported lipid membranes studied by x-ray reflectivity at varied osmotic pressure. *The European Physical Journal E*, 20(2):221–230, 2006.

[114] M. Vogel, C. Munster, W. Fenzl, and T. Salditt. Thermal unbinding of highly oriented phospholipid membranes. *Physical Review Letters*, 84:390–393, 2000.

[115] C. Li, D. Constantin, and T. Salditt. Biomimetic membranes of lipid, peptide model systems prepared on solid support. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16(26):S2439, 2004.

[116] G. Cevc. *Phospholipids Handbook*. Marcel Dekker, Inc., 1993.

[117] C. Naumann, T. Brumm, and T.M. Bayerl. Phase transition behavior of single phosphatidylcholine bilayers on a solid spherical support studied by dsc, nmr and ft-ir. *Biophysical Journal*, 63:1314–1319, 1992.

[118] F. Tokumasu, A.J. Jin, G.W. Feigenson, and J.A. Dvorak. Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation. *Ultramicroscopy*, 97:217 – 227, 2003.

[119] A.F. Xie, R. Yamada, A.A. Gewirth, and S. Granick. Materials science of the gel to fluid phase transition in a supported phospholipid bilayer. *Phys. Rev. Lett.*, 89:246103, Nov 2002.

[120] A. Charrier and F. Thibaudau. Main phase transitions in supported lipid single-bilayer. *Biophysical Journal*, 89(2):1094–1101, August 2005.

[121] J. Marra and J. Israelachvili. Direct measurements of forces between phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers in aqueous electrolyte solutions. *Biochemistry*, 24:4608–4618, 1985.

[122] V.A. Parsegian. Reconciliation of van der waals force measurements between phosphatidylcholine bilayers in water and between bilayer-coated mica surfaces. *Langmuir*, 9:3625–3628, 1993.

[123] T. Sanden, L. Salomonsson, P. Brzezinski, and J. Widengren. Surface-coupled proton exchange of a membrane-bound proton acceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9):4129–4134, 2010.

[124] F. Pincet, S. Cribier, and P. Perez. Bilayers of neutral lipids bear a small but significant charge. *The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems*, 11:127–130, 1999.

[125] M.M. Koerner, L.A. Palacio, J.W. Wright, K.S. Schweitzer, B.D. Ray, and H.I. Petrache. Electrodynamics of lipid membrane interactions in the presence of zwitterionic buffers. *Biophysical Journal*, 101(2):362 – 369, 2011.

[126] R. Dimova, N. Bezlyepkina, M. Domange Jordo, R.L. Knorr, K. Riske, M. Staykova, P.M. Vlahovska, T. Yamamoto, P. Yang, and R. Lipowsky. Vesicles in electric fields: Some novel aspects of membrane behavior. *Soft Matter*, 5:3201–3212, 2009.

[127] M. Winterhalter and W. Helfrich. Effect of voltage on pores in membranes. *Physical Review A*, 36:5874–5876, 1987.

[128] H. Isambert. Understanding the electroporation of cells and artificial bilayer membranes. *Physical Review Letters*, 80:3404–3407, 1998.

[129] E. Neumann, A.E. Sowers, and C.A. Jordan. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology.* Springer, 1989.

[130] J.P. Reeves and R.M. Dowben. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *J. Cell. Physiol.*, 73:49–60, 1969.

[131] D. Needham and E. Evans. Structure and mechanical properties of giant lipid (dmpc) vesicle bilayers from 20°c below to 10°c above the liquid crystal-crystalline phase transition at 24°c. *Biochemistry*, 27:8261–8269, 1988.

[132] M.I. Angelova and D.S. Dimitrov. Liposome electroformation. *Faraday Discussion*, 81:303–311, 1986.

[133] M.I. Angelova, S. Soléau, P. Méléard, J. Faucon, and P. Bothorel. Preparation of giant vesicles by external ac electric fields. *Progr. Coll. Pol. Sci.*, 89:127–133, 1992.

[134] R. Dimova, S. Aranda, N. Bezlyepkina, V. Nikolov, K.A. Riske, and R. Lipowsky. A practical guide to giant vesicles: Probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(28):S1151, 2006.

[135] M. Mikelj, T. Praper, R. Demic, V. Hodnik, T. Turk, and G. Anderluh. Electroformation of giant unilamellar vesicles from erythrocyte membranes under low-salt conditions. *Analytical Biochemistry*, 435(2):174 – 180, 2013.

[136] P. Méléard, L.A. Bagatolli, and T. Pott. *Giant Unilamellar Vesicle Electroformation.* Elsevier, 2009.

[137] P. Taylor, C. Xu, P.D.I. Fletcher, and V.N. Paunov. A novel technique for preparation of monodisperse giant liposomes. *Chem. Commun.*, 0:1732–1733, 2003.

[138] T.J. Politano, V.E. Froude, B. Jing, and Y. Zhu. Ac-electric field dependent electroformation of giant lipid vesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(1):75 – 82, 2010.

[139] P. Sens and H. Isambert. Undulation instability of lipid membranes under electric field. *Physical Review Letters*, 88:128102, 2002.

[140] D. Lacoste, G.I. Menon, M.Z. Bazant, and J.F. Joanny. Electrostatic and electrokinetic contributions to the elastic moduli of a driven membrane. *Eur. Phys. J. E*, 28(3):243–264, mar 2009.

[141] F. Ziebert and D. Lacoste. A poisson-boltzmann approach for a lipid membrane in an electric fields. *New Journal of Physics*, 12(9):095002, 2010.

[142] F. Ziebert, M.Z. Bazant, and D. Lacoste. Effective zero-thickness model for a conductive membrane driven by an electric field. *Phys. Rev. E*, 81:031912, Mar 2010.

[143] T. Ambjörnsson, M.A. Lomholt, and P.L. Hansen. Applying a potential across a biomembrane: Electrostatic contribution to the bending rigidity and membrane instability. *Phys. Rev. E*, 75:051916, May 2007.

[144] D. Constantin, C. Ollinger, M. Vogel, and T. Salditt. Electric field unbinding of solid-supported lipid multilayers. *The European Physical Journal E*, 18 (3):273–278, 2005.

[145] S. Lecuyer, G. Fragneto, and T. Charitat. Effect of an electric field on a floating lipid bilayer: A neutron reflectivity study. *The European Physical Journal E*, 21:153–159, 2006.

[146] T. Hianik. Electrostriction and dynamics of solid supported lipid films. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(3):189 – 205, 2000.

[147] V. Atanasov, N. Knorr, R.S. Duran, S. Ingebrandt, A. Offenhäusser, W. Knoll, and I. Köper. Membrane on a chip: A functional tethered lipid bilayer membrane on silicon oxide surfaces. *Biophysical Journal*, 89:1780–1788, 2005.

[148] F.A. Henn and T.E. Thomson. Synthetic lipid bilayer membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 38:241–262, 1969.

[149] O. Purrucker, H. Hillebrandt, K. Adlkofer, and M. Tanaka. Deposition of highly resistive lipid bilayer on silicon-silicon dioxide electrode and incorporation of gramicidin studied by ac impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, 47:791–798, 2001.

[150] R.R. Netz. Electrostatistics of counter-ions at and between planar charged walls: From poisson-boltzmann to the strong-coupling theory. *The European Physical Journal E*, 5(1):557–574, 2001.

[151] L. Šamaj and E. Trizac. Ground-state structure of a bilayer wigner crystal with repulsive dielectric images. *EPL (Europhysics Letters)*, 100(5):56005, 2012.

[152] V.A. Fadok, D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton, and P.M. Henson. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 148(7):2207–16, 1992.

[153] F.G. Blankenberg, P.D. Katsikis, J.F. Tait, R.E. Davis, L. Naumovski, K. Ohtsuki, S. Kopiwoda, M.J. Abrams, M. Darkes, R.C. Robbins, H.T. Maecker, and H.W. Strauss. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11):6349–6354, 1998.

[154] H.I. Petrache, S. Tristram-Nagle, K. Gawrisch, D. Harries, V.A. Parsegian, and J.F. Nagle. Structure and fluctuations of charged phosphatidylserine bilayers in the absence of salt. *Biophysical Journal*, 86:1574–1586, 2004.

[155] S.A. Pandit and M.L. Berkowitz. Molecular dynamics simulation of dipalmitoylphosphatidylserine bilayer with na+ counterions. *Biophysical Journal*, 82(4):1818 – 1827, 2002.

[156] R.L. Thurmond, S.W. Dodd, and M.F. Brown. Molecular areas of phospholipids as determined by 2h nmr spectroscopy. comparison of phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines. *Biophysical journal*, 59(1):108–113, 01 1991.

[157] H.Y. Jing, D.H. Hong, B.D. Kwak, D.J. Choi, K. Shin, C.J. Yu, J.W. Kim, D.Y. Noh, and Y.S. Seo. X-ray reflectivity study on the structure and phase stability of mixed phospholipid multilayers. *Langmuir*, 25(7):4198–4202, Apr 2009.

[158] A.C. Rowat, P.L. Hansen, and J.H. Ipsen. Experimental evidence of the electrostatic contribution to membrane bending rigidity. *Europhys. Lett.*, 67(1):144–149, 2004.

[159] N. Delorme, J.-F. Bardeau, D. Carriere, M. Dubois, A. Gourbil, H. Mohwald, T. Zemb, and A. Fery. Experimental evidence of the electrostatic contribution to the bending rigidity of charged membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(10):2503–2505, 2007.

[160] D. Bensimon, F. David, S. Leibler, and A. Pumir. Stability of charged membranes. *J. Phys. France*, 51(8):689–695, 1990.

[161] A. Fogden, J. Daicic, D.J. Mitchell, and B.W. Ninham. Electrostatic rigidity of charged membranes in systems without added salt. *Physica A*, 234:167–188, 1996.

[162] P.G. Higgs and J.-F. Joanny. Enhanced membrane rigidity in charged lamellar phases. *J. Phys. France*, 51(20):2307–2320, 1990.

[163] V. Kumaran. Instabilities due to charge-density-curvature coupling in charged membranes. *Phys Rev Lett*, 85(23):4996–9, 2000.

[164] E.W. Kaler, A.K. Murthy, B.E. Rodriguez, and J.A. Zasadzinski. Spontaneous vesicle formation in aqueous mixtures of single-tailed surfactants. *Science*, 245(4924):1371–1374, 1989.

[165] H. Hoffmann, C. Thunig, P. Schmiedel, and U. Munkert. Surfactant systems with charged multilamellar vesicles and their rheological properties. *Langmuir*, 10(11):3972–3981, 1994.

[166] B. Demé, M. Dubois, T. Gulik-Krzywicki, and T. Zemb. Giant collective fluctuations of charged membranes at the lamellar-to-vesicle unbinding transition. 1. characterization of a new lipid morphology by sans, saxs, and electron microscopy. *Langmuir*, 18(4):997–1004, 2002.

[167] P. Kékicheff, T.J. Marcelja, S. ans Senden, and V.E. Shubin. Charge reversal seen in electrocal double-layer interaction of surfaces immersed in 2-1 calcium electrolyte. *J. Chem. Phys.*, 99:6098–6113, 1993.

[168] M. Dubois, T. Zemb, N. Fuller, R.P. Rand, and V.A. Parsegian. Equation of state of a charged bilayer system: Measure of the entropy of the lamellar–lamellar transition in ddabr. *The Journal of Chemical Physics*, 108(18):7855–7869, 1998.

[169] L. Guldbrand, B. Jonsson, H. Wennerström, and P.Linse. Electrical double layer forces. a monte carlo study. *The Journal of Chemical Physics*, 80(5):2221–2228, 1984.

[170] D. Bratko, B. Jönsson, and H. Wennerström. Electrical double layer interactions with image charges. *Chemical Physics Letters*, 128(5-6):449 – 454, 1986.

[171] A.G. Moreira and R.R. Netz. Binding of similarly charged plates with counterions only. *Phys. Rev. Lett.*, 87(7):078301, Jul 2001.

[172] A.G. Moreira and R.R. Netz. Simulations of counterions at charged plates. *The European Physical Journal E*, 8(1):33–58, 2002.

[173] I. Rouzina and V.A. Bloomfield. Macroion attraction due to electrostatic correlation between screening counterions. 1. mobile surface-adsorbed ions and diffuse ion cloud. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(23):9977–9989, 1996.

[174] L. Šamaj and E. Trizac. Counterions at highly charged interfaces: From one plate to like-charge attraction. *Phys. Rev. Lett.*, 106:078301, Feb 2011.

[175] L. Šamaj and E. Trizac. Wigner-crystal formulation of strong-coupling theory for counter-ions near planar charged interfaces. *Physical Review E*, 84:041401, 2011.

[176] B. Demé, M. Dubois, and T. Zemb. Giant collective fluctuations of charged membranes at the lamellar-to-vesicle unbinding transition. 2. equation of state in the absence of salt. *Langmuir*, 18(4):1005–1013, 2002.

[177] R.A. Demel, F. Paltauf, and H. Hauser. Monolayer characteristics and thermal behavior of natural and synthetic phosphatidylserines. *Biochemistry*, 26(26):8659–8665, 1987.

[178] G. Cevc, A. Watts, and D. Marsh. Titration of the phase transition of phosphatidylserine bilayer membranes. effects of ph, surface electrostatics, ion binding, and head-group hydration. *Biochemistry*, 20(17):4955–4965, 1981.

[179] J.J. Lopez Cascales, J. Garcia de la Torre, S.J. Marrink, and H.J.C. Berendsen. Molecular dynamics simulation of a charged biological membrane. *The Journal of Chemical Physics*, 104(7):2713–2720, 1996.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Arnaud HEMMERLE

Diffusion de rayons X sur une membrane unique : potentiel d'interaction et effets du champ électrique

Résumé

Nous avons déterminé par diffusion de rayons X le potentiel d'interaction entre deux bicouches, une première adsorbée sur un substrat solide et une deuxième flottant à proximité. Nous montrons que les interactions dans ces systèmes fortement hydratés sont deux ordres de grandeur plus faibles que dans les travaux précédents menés sur des phases multilamellaires. Cette caractéristique est attribuée à la répulsion électrostatique due à la faible fraction de lipides ionisés. Nous avons de plus accès aux potentiels de répulsion entropique, et testons les différents modèles théoriques existants.

Les effets d'un champ électrique sur les membranes ont également été étudiés. Nous montrons que le champ induit une tension négative et une rigidité positive, et mène à la déstabilisation d'une bicouche supportée sous certaines conditions.

Finalement, nous mesurons les propriétés de membranes chargées par diffusion de rayons X, nous permettant d'accéder aux limites de la théorie de Poisson-Boltzmann.

Membranes ; Fluctuations thermiques ; Physique statistique ; Biophysique ; Electrostatique

Résumé en anglais

We have determined by grazing incidence X-ray scattering the interaction potential between two lipid bilayers, one adsorbed on a solid surface and the other floating close by. We find that interactions in this highly hydrated system are two orders of magnitude softer than in previously reported work on multilayer stacks. This is attributed to the weak electrostatic repulsion due to the small fraction of ionized lipids in defectless supported bilayers. We also access the entropic repulsion potentials, allowing us to discriminate between the different existing models.

The effects of an electric field on the properties of membranes have also been studied. We show that the field induces a negative tension and an increase of the rigidity. We also show that it is possible to destabilize a supported bilayer by an electric field under certain conditions.

Finally, we measure the properties of charged membranes using X-ray scattering, giving access to the limits of the Poisson-Boltzmann theory.

Membranes ; Thermal fluctuations; Statistical physics ; Biophysics ; Electrostatics