

Morphologie, structure et propriétés thermodynamiques des auto-assemblages nucléolipides / acides nucléiques

Eric Schoentgen

▶ To cite this version:

Eric Schoentgen. Morphologie, structure et propriétés thermodynamiques des auto-assemblages nucléolipides / acides nucléiques. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT: 2015BORD0249. tel-01396894

HAL Id: tel-01396894 https://theses.hal.science/tel-01396894

Submitted on 15 Nov 2016 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ : CHIMIE PHYSIQUE

Par Eric SCHOENTGEN

Morphologie, structure et propriétés thermodynamiques des auto-assemblages nucléolipides / acides nucléiques

Sous la direction de : Laurence NAVAILLES

Soutenance prévue le 20 novembre 2015

Membres du jury :

M. BERRET, Jean-François Mme BOURGAUX, Claudie Mme NAVAILLES, Laurence Mme ALVES, Isabel M. TRIBET, Christophe Mme ZAKRI, Cécile M. BARTHELEMY, Philippe Directeur de Recherche, Paris 7 Chargée de Recherche, Paris-Sud Directrice de Recherche, CNRS Chargée de Recherche, CNRS Directeur de Recherche, ENS Paris Professeur à l'Université de Bordeaux Professeur à l'Université de Bordeaux

Rapporteur Rapportrice Directrice de thèse Examinatrice Examinateur Examinatrice Invité

Je dédie cette thèse à mon papi Norbert,

« Tout le monde est un génie. Mais si vous jugez un poisson sur sa capacité à grimper à un arbre, il passera sa vie à croire qu'il est stupide. » Albert Einstein

« L'enfant n'est pas un vase qu'on remplit, mais un feu qu'on allume. » Rabelais

Résumé.

Morphologie, structure et propriétés thermodynamique des auto-assemblages nucléolipides / acides nucléiques.

Les nucléolipides sont des molécules amphiphiles dont la structure bio-inspirée dérive de celle des acides nucléiques. Leur auto-assemblage en milieu aqueux aboutit à la formation d'objets supramoléculaires de morphologies et structures très diverses. La morphologie a été caractérisée par des techniques complémentaires de microscopie optique et de diffusion de la lumière, tandis que leur structure a été déterminée par la diffusion des rayons X. Il a ainsi été mis en évidence l'existence et le rôle fondamental des interactions faibles entre têtes polaires, au sein des auto-assemblages. La nature de ces interactions faibles a été déterminée par des techniques de spectroscopies IR et UV. Un premier objectif a été de mettre en évidence l'importance de ces interactions, ainsi que leur corrélation avec d'autres facteurs qui régissent le mécanisme d'auto-assemblage, tels que la nature chimique des amphiphiles, ou la morphologie et la structure des objets supramoléculaires en présence.

Par ailleurs, la tête polaire nucléotide permet également d'imaginer la formation d'interactions faibles entre les auto-assemblages et un monobrin d'acide nucléique, à l'image des interactions spécifiques entre bases azotées présentes dans l'ADN. Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés à une méthode de vectorisation d'acides nucléiques par des objets eux aussi chargés négativement. Contrairement aux approches classiques, l'interaction électrostatique est ici défavorable et l'association repose alors uniquement sur des interactions faibles spécifiques, estimées en spectroscopie. De façon surprenante, la formation des complexes a pu être mise en évidence par des expériences de diffraction des rayons X et un modèle approprié a permis de proposer des mécanismes de formation des complexes. Les propriétés thermodynamiques des différents complexes formés ont été évaluées par la technique de Calorimétrie à Titration Isotherme (ITC). Un point remarquable a été la mise en évidence systématique de trois types de comportements sur l'ensemble des complexes étudiés en fonction de la nature et de la spécificité des interactions mises en jeu. Ceci nous a ainsi permis de proposer différents mécanismes de formation pour chaque type de complexe observé.

Mots-clés : Nucléolipides ; Lipides nucléotides ; Acides nucléiques ; Auto-assemblage ; Interactions faibles ; pi-pi stacking ; Liaison hydrogène ; Interactions spécifiques ; Bicouche lipidique ; Membrane ; Vésicule ; Isothermal Titration Calorimetry (ITC) ; Constante d'association

Abstract.

Morphology, structure and thermodynamic properties of nucleolipids / nucleic acids self-assemblies.

Nucleolipids are amphiphilic molecules which bio-inspired structure derives from nucleic acid structure. Their self-assembling behaviour in aqueous medium leads to the formation of supramolecular objects of very different morphologies and structures. The morphology has been characterized with optical microscopy and light scattering complementary techniques, whereas their structure has been determined with X-ray scattering. Thus the existence and the fondamental role of weak interactions between polar heads inside the self-assemblies have been highlighted. The nature of these weak interactions has been determined with IR and UV spectroscopies techniques. A first objectif has been to highlight the importance of these interactions, as well as the their correlation with other factors which drive the mechanism of self-assembly, such as the chemical nature of amphiphiles or the morphology and structure of the supramolecular objects.

Moreover the nucleotide polar hear also allows to imagine the formation of weak interactions between the self-assemblies and a single-stranded nucleic acid, such as those highlighted in DNA. In this work, we found interest in a nucleic acid vectorisation method with negatively charged objects as well. On the contrary of classic approaches, electrostatic interaction was here defavorable and assembling relies only on specific weak interactions, estimated with spectroscopy methods. Surprisingly, complexes formation could be highlighted with X-ray scattering experiments, and an appropriate model has allowed the proposal of mechanisms for the formation of complexes. Thermodynamic properties of the different complexes formed have been evaluated with Isothermal Titration Calorimetry (ITC) technique. A remarkable point was the systematic highlighting of three types of behaviour on the whole set of complexes studied, depending of the nature and the specificity of the weak interactions implied. This led us to different proposals for the mechanism of formation of each type of complex studied.

Key words : Nucleolipids ; Nucleic acids ; Self-assembly ; Weak interactions ; pi-pi stacking ; Hydrogen bonding ; Specific interactions ; Lipidic bilayer ; Membrane ; Vesicle ; Isothermal Titration Calorimetry (ITC) ; Association constant

Remerciements.

Ce travail de thèse à présent achevé, je tiens, tout d'abord, à remercier tous les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail effectué au Centre de Recherche Paul Pascal pendant une durée totale de trois ans et demi. Tout particulièrement, je souhaite remercier chaleureusement Philippe Richetti qui m'a permis d'effectuer un séjour agréable au laboratoire, mais aussi, assuré le maintien de bonnes conditions de travail et d'ambiance générale lorsque le besoin s'en faisait ressentir. Je remercie également vivement Cécile Zakri pour la présidence qu'elle a assuré au sein de mon jury de thèse, mais également, et de manière plus générale, pour la disponibilité et la bonne humeur qu'elle a toujours pu témoigner à mon égard.

A l'issue de ces quelques années, les remerciements les plus vifs sont destinés à Laurence Navailles, qui est l'unique personne ayant assuré la direction de ma thèse. Depuis le début de mon stage de fin d'études, en février 2012, qui a été, par la suite, prolongé par cette thèse, Laurence a toujours fait preuve d'une très grande disponibilité. De plus, sa manière de travailler avec moi a toujours été en accord avec la demande que j'ai pu lui formuler dès le début, à savoir de me laisser la plus grande autonomie possible. Pour ceci, ainsi que pour sa célèbre franchise, je la remercie chaleureusement. La proximité dont elle faisait preuve avec moi, mais aussi la distance lorsqu'il s'agissait de me laisser prendre mes propres choix pour le projet, ont contribuées à me rendre d'autant plus impliqué au sein du projet. Egalement sur le plan personnel, Laurence s'est révélée être une directrice de thèse de grande qualité. Là où quelques problèmes d'ambiance au sein de l'équipe et de gestion des appareils sont apparus, et commençaient à entraver ma liberté de travail, elle a toujours su m'appuyer afin que je puisse avancer au mieux. De manière générale, Laurence a toujours contribué au meilleur déroulement possible pour ma thèse. Je ne l'en remercierai jamais assez.

Il est également important de moi de remercier une personne qui m'a beaucoup aidé quant à la gestion de l'aspect théorique de mon projet. Il s'agit de Frédéric Nallet qui, même si il ne figure pas explicitement dans mes directeurs de thèse, s'est toujours rendu extrêmement disponible pour discuter de différents points problématiques de mon projet. De plus, je tiens à le remercier tout particulièrement pour l'ensemble des modèles d'ajustement qu'il a pu développer dans le cadre de mon projet, et qui m'ont permis de donner à mon travail un aspect quantitatif non négligeable. Frédo a toujours représenté un modèle de savoir et d'humilité pour moi, et me donnait l'impression qu'il pouvait répondre à n'importe quelle question lorsqu'il s'agissait d'un domaine aussi général que la physique.

Pour l'aide apportée à Frédéric sur le développement du modèle dit « de la bicouche asymétrique », ainsi que pour les quelques discussions qu'il nous est arrivés d'avoir sur différents aspects de nos projets respectifs, je remercie tout particulièrement mon co-bureau Kévin Bougis qui s'est toujours montré, lui aussi, extrêmement disponible, tant pour les ajustements que pour la gestion de la manip de diffusion X.

Il est évident qu'une partie des résultats que j'ai obtenus ne seraient pas là sans les trois stagiaires qui ont travaillé avec moi au long de ma thèse. Respectivement Axel Dupouy (M2) pendant ma deuxième année, Clément Vigier & Thomas Missègue (L3) pendant ma troisième année. Je les remercie du fond du cœur pour leur implication dans le projet et leur dévouement.

Je tiens également à remercier Ahmed Bentaleb pour le temps passé à m'aider sur la manip de diffusion X. Il est toujours resté extrêmement disponible pour moi. J'ai apprécié sa bonne humeur et sa patience, qui font de lui quelqu'un de très appréciable en compagnie de qui travailler.

J'adresse un remerciement spécial à Philippe Barthelemy, du laboratoire ARNA (Univ. Bdx) qui est à l'origine du projet en vogue au sein de l'équipe, s'intéressant à la vectorisation d'acides nucléiques par des lipides nucléotides de structure originale. La collaboration entre le travail de synthèse de Philippe et la caractérisation physico-chimique de Laurence a été très fructueuse pendant les trois ans de ma thèse. De fait, en plus d'avoir accepté de m'évaluer le jour de ma soutenance, il m'a également accepté, mon stagiaire Axel et moi, pendant 2 mois au sein de son équipe afin de réaliser la synthèse chimique de mes lipides nucléotides. Il a toujours été disponible pour moi pendant cette période, et je remercie à cette occasion le post-doc Amit Patwa qui a assuré mon encadrement direct pendant ce travail au laboratoire.

Je remercie également Cédric Gaillard de la plateforme BIBS à Nantes, qui a assuré l'ensemble des travaux d'imagerie en microscopie électronique sur nos systèmes.

Il convient ensuite de remercier certaines personnes qui ont confirmé mon goût pour l'enseignement au cours de ces trois années. Je remercie tout d'abord Philippe Cluzeau qui m'a proposé, dès la première année, de participer à l'animation des ateliers de « Chimie Physique itinérante » au sein des collèges/lycées afin de présenter des manipulations ludiques sur quelques thèmes actuels de recherche. Comme le témoignent toutes les heures réalisées dans le cadre de ces actions, au cours des trois ans de ma thèse, ce fut pour moi une expérience extrêmement enrichissante et instructive, autant sur le plan pédagogique que sur le plan humain.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement Jean-Christophe Loudet et Thibaut Divoux pour ces quelques moments de discussion concernant l'enseignement, et qui ont toujours représenté un modèle de pédagogie pour moi. Mention spéciale à Fabien Durola qui m'a largement conseillé et recommandé vis-à-vis de la formation qui m'a occupée l'année suivante afin de préparer l'agrégation de chimie à l'ENS Lyon. Je le remercie chaleureusement pour l'aide et le temps qu'il m'a consacré.

Enfin, le point qui a donné une dimension toute particulière à ma thèse, et sans lequel ces trois années ne seraient pas passées aussi vite, est le monitorat (contrat d'enseignement) que j'ai effectué en L1 et à l'IUT, et que j'ai renouvelé pendant les trois années de ma thèse. En plus d'avoir confirmé mon goût pour l'enseignement, le monitorat a constitué une expérience formidable, compte tenu de l'aisance que j'ai pu acquérir devant un groupe d'étudiants. De plus, j'ai eu ainsi l'occasion de faire des rencontres extrêmement enrichissantes, autant parmi les enseignants que parmi les étudiants. A ce titre, je remercie chaleureusement Jean-Louis Bobet, directeur de l'UFR de Chimie de l'Université de Bordeaux, qui m'a permis d'effectuer ce contrat d'enseignement pendant les trois années de ma thèse, et qui a toujours été avenant à mon égard et resté extrêmement disponible, notamment pour me fournir tout type d'attestation pendant (et après !) ma thèse. A ce sujet, je souhaite adresser un remerciement spécial à Claire Rivenc, directrice du département « Mesures Physiques » à l'IUT qui, en plus de m'avoir permis de réaliser une grande partie de mon contrat à l'IUT, m'a accompagnée tout au long des trois ans de thèse et s'est toujours tenue disponible pour toute question ou conseil. Je la remercie du fond du cœur pour la sympathie qu'elle m'a témoignée.

La vie au laboratoire n'aurait pas été si agréable sans la présence de certaines personnes en particulier, avec lesquelles j'ai passé les meilleurs moments de mon séjour à Bordeaux (et ailleurs...). Je remercie Céline, dit Célinou, pour sa joie de vivre et sa disponibilité quand j'ai eu besoin de revenir à Bordeaux pour y préparer ma soutenance. Sa bonne humeur, son risotto et son « thé qui sent le bébé » m'ont permis de dynamiser mon quotidien !

Je remercie Christophe, dit la Mamie, pour son soutien et son célèbre sens de l'organisation. Il a toujours été là pour faire des sorties resto entre amis afin de se changer les idées, et a toujours partagé mon goût pour les jeux, notamment pour l'un d'entre eux, devenu célèbre entre nous... Mais « y'a pire : imagine que tu passes près d'une centrale nucléaire et qu'elle t'explose à la figure ! ».

Je remercie ensuite Pauline, dit Popo, qui a vraiment été « *la reine des* » confidences pour moi. Elle a toujours été présente pour que l'on discute tous les deux ou se confier. C'est une amie en la compagnie de qui on se sent toujours à l'aise et en qui j'apprécie la sincérité et le rôle de médiatrice au sein du groupe. Mention spéciale aux sessions de badminton et aux parties de Dixit !

Je remercie enfin Alexis, qui est la première personne avec qui j'ai accroché au laboratoire. Les contacts que l'on avait en commun et sa gentillesse ont fait de lui-même un bon ami. J'ai apprécié le fait qu'il soit toujours prêt à me venir en aide en cas de besoin. A cette occasion, j'en profite pour citer les amis communs que l'on a pu partager avec Alexis, et qui ont été importants pour moi au cours de ma thèse. D'une part, Sandra qui réalisait sa thèse entre le CRPP et un laboratoire en Italie, et qui a soutenu un an avant moi. Et d'autre part, la « Best Team », constituée d'anciens stagiaires du laboratoire également avec Laurence : Anaïs (dite « Anaïssou »), Alexandre (dit « Alex ») et Mounir (dit « Moumou »). Je les remercie pour tous ces bons moments de complicité passés chez les uns ou les autres autour d'un verre.

J'ajoute quelques personnes supplémentaires qu'il me faut remercier au sein des permanents du laboratoire, notamment Manue, pour son sourire en toute circonstance ; Nadine, pour son célèbre francparler ; le service gestion, pour sa disponibilité et sa gentillesse ; le club origami, constitué d'Elysabeth Hortolland, d'Isabelle Ly et de Karen Bertaux, pour la bonne ambiance des quelques sessions passées (même si notre œuvre n'a pas été finie...) ; le service informatique, et en particulier Anne Facq, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Il me reste maintenant à remercier les thésards qui m'ont suivi au cours de la dernière période de ma thèse et qui ont également été importants pour moi. Kébo, pour sa gentillesse, son accompagnement quotidien à la boulangerie « Matis », et ses connaissances en RMN ; Toinou, pour son grand cœur et ses cours de tarot ; Vivi, pour la vie qu'il a apportée au bureau voisin grâce à ses nombreux poissons rouges, et ses performances au jeu du président ; Mélo, pour son « Yo » sur le dossier d'une chaise et pour notre amour commun du Puddi Puddi ; Rafa et Nat, pour leur gentillesse et leur hospitalité ; Margot, pour son rire et son talent au tarot ; Mayadatoun, pour ses cours d'arabe et son rire communicatif (Hi Hiiiiii) ; Bosi, pour la fameuse bouteille d'alcool chinois qui n'a toujours pas été finie ; Hélène & Artem, pour leur gentillesse et l'apprentissage des premiers mots en « A » du dictionnaire russe.

Je tiens également à adresser un petit mot aux quelques stagiaires que j'ai pu croiser au laboratoire et qui m'ont marqué, notamment SofSof, P-E, Hélène, David, Armand, Rémy et Jules.

En dehors de la vie au laboratoire, je remercie mes amis de Rennes qui se sont déplacés jusqu'au CRPP pour pouvoir assister à ma soutenance et qui m'ont également bien aidé pour l'organisation : Expédite, Céline, Maureen et Fabien. Je tiens également à remercier Guillaume et Marie, qui n'ont pas pu faire le déplacement, mais qui m'ont été précieux grâce au soutien moral.

Enfin, il me doit évidemment de remercier Gildas, qui m'a accompagné, physiquement et moralement, dans notre appartement, pendant les trois ans de ma thèse. Il a constitué pour moi un soutien inestimable et je l'en remercie du fond du cœur. Mes plus vifs remerciements personnels vont à ma famille, Papa, Maman, Arnaud et Sarah, sans qui je n'aurai certainement pas réalisé cette thèse. En plus de s'être déplacés le jour de ma soutenance et d'avoir assuré l'ensemble de la mise en place du buffet, ils ont toujours été là pour moi au quotidien en cas de problème ou d'imprévu. Je ne les remercierai jamais assez.

INTRODUCTION	Ν	1
INTRODUCTION	۷	1

CHAPITRE 1 :	: ETAT DE L'ART	19
--------------	-----------------	----

1.1 LES	INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES	19
1.1.1. M	odèle de la liaison chimique et interaction électrostatique	19
1.1.1.a	La liaison covalente	19
1.1.1.b	La liaison polarisée	20
1.1.1.c)	La liaison ionique	21
1.1.1.d	Interaction électrostatique entre deux charges ponctuelles : l'interaction coulombienne	22
1.1.2. Po	larité d'une molécule : le dipôle permanent	23
1.1.2.a	Constitution d'un dipôle permanent	23
1.1.2.b	Interaction électrostatique entre deux charges ponctuelles : exemple de la solvatation d'un ion	23
1.1.3. Le	s interactions faibles	25
1.1.3.a)	Les états de la matière et conséquences sur les interactions faibles intermoléculaires	25
1.1.3.b	L'interaction de Van der Waals	26
1.1.3.c)	L'interaction aromatique (ou π - π stacking)	30
1.1.3.d	L'interaction hydrogène	32
1.1.3.e	L'effet hydrophobe	34
1.2 L'AI	JTO-ASSEMBLAGE	35
1.2.1. Or	igine physico-chimique de l'auto-assemblage	35
1.2.1.a	Les molécules amphiphiles	35
1.2.1.b	Mécanisme de formation d'un auto-assemblage	37
1.2.1.c)	Caractéristiques physiques d'une bicouche lipidique.	40
1.2.2. M	odèles prédictifs de l'auto-assemblage	42
1.2.2.a	Géométrie d'un auto-assemblage	42
1.2.2.b	Thermodynamique de l'auto-assemblage	44
1.2.3. Co	mportements en solution aqueuse : les cristaux liquides lyotropes	47
1.2.3.a)	Analogie avec les cristaux liquides	47
1.2.3.b	Caractère lyotrope des phospholipides.	49
1.3 LES	LIPIDES NUCLEOTIDES (OU NUCLEOLIPIDES)	51
1.3.1. Ac	ides nucléiques : structure et interactions faibles	51
1.3.1.a	Structure d'un monobrin d'ADN	51
1.3.1.b	Structure en double hélice de l'ADN	53
1.3.1.c)	Mise en évidence de l'interaction hydrogène entre nucléotides.	55
1.3.1.d	Mise en évidence du π - π stacking entre nucléotides	58
1.3.2. Le	s lipides nucléotides (ou nucléolipides)	59
1.3.2.a	Généralités	59
1.3.2.b	Les nucléolipides anioniques : étude du comportement à l'interface	62
1.3.2.c)	Les nucléolipides anioniques : étude du comportement en volume	64
1.3.3. M	esure quantitative de l'interaction entre acides nucléiques	66
1.3.3.a	Méthodes traditionnelles pour une mesure quantitative acide nucléique-acide nucléique	66
1.3.3.b	Calorimétrie à titration isotherme (ITC)	67
1.3.3.c)	Etude de l'interaction entre nucléolipides anioniques et acides nucléiques par ITC.	70

CHAF	CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	
2.1	Systemes etudies et protocoles.	74
2	2.1.1. Nucléolipides	74

2.1.2. Synt	hèse des nucléolipides	75
2.1.3. Acid	es nucléiques	77
2.1.4. Form	nulation des échantillons	78
2.1.4.a)	Tampon	78
2.1.4.b)	Protocole standard	79
2.2 MICR		79
221 Micr	osconie ontique à lumière nolarisée	70
2.2.1. When $2.2.1$		75
2.2.1.a) 2.2.1.b)	Drincine général	 80
2.2.1.0)	ntérêt pratique	81
2.2.1.C, 1	osconie ontique à contraste de nhase	01 81
2.2.2. Wild		01 87
2.2.2.a) 2.2.2.b)		02 97
2.2.2.D)	ntárát pratique	02 92
2.2.2.C		ол
		04
2.3.1. Princ	cipe general de la diffusion de la lumiere	84
2.3.1.a)	Diffusion d'un faisceau lumineux monochromatique	84
2.3.1.b)	Diffusion de Rayleigh	84
2.3.2. Mon	tage de diffusion de la lumière	87
2.3.3. Diffu	sion dynamique de la lumière	88
2.3.3.a)	Acquisition	88
2.3.3.b)	Fonction d'autocorrélation	89
2.3.3.c)	Modèles d'ajustement de la fonction d'autocorrélation	90
2.4 DIFFU	SION DES RAYONS X	93
2.4.1. Défir	nitions générales et contextualisation	93
2.4.1.a)	Rayons X	93
2.4.1.b)	Vecteur d'onde de diffusion	93
2.4.2. Mon	tage de diffusion/diffraction X	94
2.4.2.a)	Montage « Anode tournante ».	94
2.4.2.b)	Montage « Nanostar »	96
2.4.3. Princ	ipe général de la diffusion/diffraction X	97
2.4.3.a)	Diffusion X	97
2.4.3.b)	Diffraction X	99
2.4.3.c)	Configuration de l'appareillage et obtention du diffractogramme.	100
2.4.3.d)	Modèle d'ajustement.	103
2.5 SPECT	ROMETRIE ULTRAVIOLET/VISIBLE (UV/VIS)	106
2.5.1. Oria	ine de l'absorption UV/vis d'une molécule	106
251a)	Transitions électroniques d'une molécule	106
2.5.1.0) 2.5.1.b)	Effet de la délocalisation d'électrons π sur l'absorbance LIV/vis d'une molécule organique	107
252 Mon	tage de spectroscopie I IV/vis	107
252 Drin	ine général de la spectrosconie IIV/vis	100
2.3.3. FIIIIC	the general we to specific copie ov vis.	100
2.5.5.d)	Absorption ovyvis a un echancinon.	100
2.3.3.0)		110
2.0 SPECT		110
2.6.1. Origi	ine de l'absorption IR d'une molècule	110
2.6.2. Mon	tage de spectroscopie IR	112
2.6.3. Princ	ipe général de la spectroscopie IR	114
2.7 CALOF	RIMETRIE A TITRATION ISOTHERME (ITC).	115
2.7.1. Gran	deurs d'état associées à la formation d'une liaison	115
2.7.1.a)	Enthalpie	115
2.7.1.b)	Entropie	116
2.7.1.c)	Enthalpie libre	116
2.7.2. Prés	entation de l'appareillage	117
2.7.2.a)	Montage de Calorimétrie à Titration Isotherme (ITC)	117

2726)		110
2.7.2.0)	Deroulement à une experience à LTC.	118
2.7.2.c)	Protocoles standards	119
2.7.3. Tra	itement des thermogrammes	. 121
2.7.3.a)	Sens physique du thermogramme brut.	121
2.7.3.b)	Traitement et intégration du thermogramme brut.	122
2.7.3.c)	Sens physique de la courbe de Wiseman.	123
2.7.3.d)	Modèles utilisés pour l'ajustement de la courbe de Wiseman	125

CHAPITRE 3 : MORPHOLOGIE ET STRUCTURE	129
3.1 AUTO-ASSEMBLAGES DE NUCLEOLIPIDES.	129
3.1.1. Auto-assemblage du diC14dT	129
3.1.2. Effet du nombre de chaînes : auto-assemblage du C14dT	134
3.1.3. Effet de la longueur des chaînes : auto-assemblage du diC16dT	142
3.1.4. Effet de la contrainte de la tête polaire : auto-assemblage du diC16LNA-T	145
3.1.5. Effet de la nature de la tête polaire : auto-assemblages du diC14dA, du C14dA et du diC16L	NA-A.
	147
3.1.6. Bilan intermédiaire	154
3.2 COMPLEXES AUTO-ASSEMBLAGES/ACIDE NUCLEIQUE.	154
3.2.1. Complexes diC14dT/polyA et diC14dA/polyU	155
3.2.2. Effet de la spécificité de l'acide nucléique : complexes diC14dT/polyU et diC14dA/polyA	158
3.2.3. Effets de la multilamellarité et de l'état gel de la bicouche : complexe diC16dT/polyA, comp	lexe
diC16dT/poly U	162
3.2.4. Effet de la contrainte de la tête polaire et de l'état gel de la bicouche : complexes diC16LNA	-
T/polyA, diC16LNA-T/polyU, diC16LNA-A/polyU et diC16LNA-A/polyA	166
3.3 CONCLUSION GENERALE :	170

CHAPITR	E 4 : CARACTERISATION DES INTERACTIONS FAIBLES.	.73
4.1	INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES AU SEIN DE L'OBJET	173
4.1.1.	Auto-assemblage du diC14dT	173
4.1.2.	Effet du nombre de chaînes : auto-assemblage du C14dT	177
4.1.3.	Effet de la longueur des chaînes : auto-assemblage du diC16dT	180
4.1.4.	Effet de la contrainte de la tête polaire et état gel de la bicouche : auto-assemblage du diC16LNA	ι- <i>Τ</i> .
		181
4.1.5.	Effet de la nature de la tête polaire : auto-assemblages du diC14dA, du C14dA et du diC16LNA-A.	
		183
4.1.6.	Bilan intermédiaire	190
4.2	INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES AU SEIN DU COMPLEXE	192
4.2.1.	Complexes diC14dT/polyA et diC14dA/polyU	192
4.2.2.	Effet de la spécificité de l'acide nucléique : complexes diC14dT/polyU et diC14dA/polyA	195
4.2.3.	Effet de la forme de l'objet : complexe C14dT fibres/polyA, complexe C14dT vésicules/polyA,	
сотр	lexe C14dT fibres/polyU et complexe C14dT vésicules/polyU	197
4.2.4. 4.2.5.	Effet de la fluidité de la bicouche : complexe diC16dT/polyA, complexe diC16dT/poly U Effet de la contrainte de la tête polaire : complexe diC16LNA-T/polyA, complexe diC16LNA-T/poly	199 /U,
comp	lexe diC16LNA-A/polyU, complexe diC16LNA-A/polyA	202

CHAPIT	RE 5 : PROPRIETES THERMODYNAMIQUES DES COMPLEXES	206
5.1	MONOCATENAIRES : INTERACTIONS DES FIBRES.	206
5.1	.1. Interaction C14dT/polyA	206

_____ 13 **)**_____

5.1.2.	Interaction C14dT/polyU	214
5.1.3.	Interaction C14dA/polyU	217
5.1.4.	Interaction C14dA/polyA	218
5.2	INTERACTIONS COMPLEMENTAIRES DES VESICULES.	220
5.2.1.	Interaction diC14dT/polyA	220
5.2.2.	Interaction diC14dA/polyU	221
5.2.3.	Interaction diC16dT/polyA	223
5.2.4.	Interaction diC16LNA-T/polyA	225
5.2.5.	Interaction diC16LNA-A/polyU	227
5.3	INTERACTIONS NON COMPLEMENTAIRES DES VESICULES	229
5.3.1.	Interaction diC14dT/polyU	229
5.3.2.	Interaction diC14dA/polyA.	231
5.3.3.	Interaction diC16dT/polyU	232
5.3.4.	Interaction diC16LNA-T/polyU	233
5.3.5.	Interaction diC16LNA-A/polyA	235
5.4	CONCLUSION GENERALE	236

CONCLUSION	239
------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	242
---------------	-----

Introduction.

La thérapie génique est une technologie qui suscite de plus en plus d'intérêt, depuis le premier essai en 1990. Le principe général consiste à chercher à faire pénétrer du matériel génétique directement au sein d'un tissu ou de cellules, afin que l'allèle « malade » d'un gène, responsable d'une pathologie, puisse être substitué par l'allèle sain. Si l'idée d'une incorporation directe d'acide nucléique dans l'organisme paraît séduisante, le projet reste ambitieux, ce qui explique son développement tardif. En effet, lorsqu'une espèce telle qu'un acide nucléique est injectée directement chez un individu, celle-ci est détectée comme un corps étranger par l'ensemble du système immunitaire. La libération d'anticorps ou, de manière générale, le développement des barrières immunitaires de l'organisme sera dommageable pour l'acide nucléique, qui sera alors détruit avant d'atteindre sa cible. De plus, quand bien même le matériel génétique employé résiste aux barrières immunitaires, il convient d'imaginer une destruction potentielle en raison des conditions chimiques de chaque organe dans lesquels celui-ci est susceptible de passer. On peut, par exemple, citer le risque d'hydrolyse acide dans l'estomac, à cause de son pH très faible. Cette problématique soulève bien la difficulté d'administrer directement à un individu une espèce chimique aussi sensible qu'un acide nucléique.

En réponse à cet obstacle, la technologie de vectorisation permet de proposer une alternative. Cette dernière repose sur la formation d'un vecteur par encapsulation du principe actif (l'acide nucléique) ou interaction de celui-ci avec un partenaire (le vecteur). L'encapsulation résout, tout d'abord, le problème de la sensibilité du principe actif face au milieu extérieur, et lui permet donc de naviguer à travers différentes conditions chimiques au sein de l'organisme sans toutefois risquer d'être détruit. Le vecteur pourra ainsi atteindre la cellule-cible et interagir avec les protéines constitutives de sa surface afin de mener à un relargage du matériel génétique dans l'espace intracellulaire. Ceci constitue les vecteurs les plus simples, dits « de première génération ». Cependant, afin d'être efficace, il a été soulevé qu'un vecteur doit être furtif. En effet, la majorité des échecs en termes de vectorisation vient d'un rejet de l'espèce administrée, qui se manifeste donc sous la forme d'une destruction du vecteur par les agents immunitaires de l'organisme. Afin de permettre au vecteur de pouvoir circuler plus librement et plus longtemps dans un milieu physiologique, le sang par exemple, afin d'espérer atteindre de nouveaux organes sans toutefois interagir avec les espèces présentes le long du trajet, le vecteur est rendu furtif grâce au recouvrement de sa surface par un polymère flexible, classiquement le polyéthylène glycol (PEG). Ce dernier lui permet ainsi d'éviter toute reconnaissance par une espèce autre que la cellule-cible. Le mécanisme permettant de présenter cette furtivité est lié à l'insertion d'interactions de déplétion dans le système grâce à la présence des polymères à la surface du vecteur. Il s'agit des vecteurs dits « de seconde génération ». Les derniers types de vecteurs, dits « vecteurs de troisième génération » incluent, en plus, une sélectivité particulière liée à la cible. Ainsi, les récepteurs présents sur le vecteur lui permettent d'éviter tout autre espèce à sa proximité, pour ne pouvoir présenter une reconnaissance qu'à la cellule à atteindre, et ce, de manière spécifique.

Lorsqu'une telle stratégie de vectorisation est développée, par exemple dans le cadre de la thérapie génique, l'étape préalable, antérieure à toutes ces considérations, est de constituer un vecteur présentant une interaction suffisante avec l'espèce à transporter. En effet, il n'est pas acceptable d'imaginer une dissociation du complexe vecteur/principe actif au cours du trajet dans l'organisme. Il faut donc permettre des interactions suffisamment fortes entre le principe actif et le vecteur pour assurer sa stabilité tout en permettant, dans l'espace et si possible aussi dans le temps, une dissociation spontanée ou non du principe actif et du vecteur. Les caractérisations physico-chimiques du vecteur sont essentielles pour atteindre cet objectif.

De très nombreux systèmes sont décrits dans la littérature en fonction de la nature chimique du vecteur : vecteurs viraux, vecteurs synthétiques, systèmes polymériques ou lipidiques etc. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous focaliserons sur un système original constitué d'une structure amphiphile lipidique bio-inspirée. Le caractère amphiphile de l'espèce lui permet de former, en solution aqueuse, des auto-assemblages pouvant interagir de façon spécifique avec le matériel génétique à transporter. Sa structure chimique, développée depuis plusieurs années dans l'équipe du professeur Philippe Barthélémy (laboratoire ARNA INSERM, Bordeaux), est particulièrement adaptée à cette application. Il s'agit du lipide nucléotide, dont la tête polaire est un nucléotide, à l'image du motif constitutif des acides nucléiques (association d'un phosphate, d'un sucre et d'une base azotée). Le choix de cette structure originale provient du fait qu'il a été montré que la cohésion particulièrement importante de la double hélice de l'ADN reposait sur la présence de nombreuses interactions faibles entre bases azotées complémentaires (Adénine -Thymine et Guanine – Cytosine). Il est donc permis de penser qu'une interaction entre des acides nucléiques et un auto-assemblage formé de lipides nucléotides maintiendra une cohésion suffisamment grande pour pouvoir former un complexe stable, en vue d'une éventuelle vectorisation, grâce à des interactions faibles et spécifiques de type liaisons hydrogène ou empilement π . La relative « faiblesse » des interactions mises en jeu pourra favoriser le relargage du principe actif.

En revanche, si cet argument est celui qui a motivé le projet développé par l'équipe de P. Barthélémy, il a rapidement été mis en évidence une très grande complexité des systèmes en fonction de la nature chimique du lipide nucléotide étudié et de l'acide nucléique associé. L'objectif principal de ce travail est de rationaliser l'ensemble des résultats obtenus afin de proposer des mécanismes de formation des complexes en fonction de la nature chimique des systèmes étudiés et des différents paramètres physico-chimiques mis en jeu. La stratégie suivie est une approche multi échelle qui permettra de caractériser les systèmes au niveau moléculaire mais également au niveau supramoléculaire. Pour ce faire, nous avons choisi une méthode expérimentale multi techniques. Ainsi, ce projet consiste en une étude approfondie et systématique de différents lipides nucléotides. Le choix des lipides nucléotides a été fait, en collaboration avec notre partenaire chimiste, en fonction des propriétés moléculaires susceptibles d'influencer les propriétés structurales des assemblages, les propriétés thermodynamiques des complexes et la nature des interactions mises en jeu.

Le manuscrit comporte 5 chapitres. Nous avons fait le choix de consacrer les deux premiers chapitres aux notions nécessaires à la compréhension de ce travail pour concentrer l'ensemble des résultats expérimentaux et des interprétations dans les trois chapitres suivants. Ainsi, le premier chapitre présente l'état de l'art du domaine général, ainsi que les notions importantes liées aux interactions. Le second chapitre présentera les différentes techniques expérimentales utilisées, les protocoles expérimentaux développés pour mener à bien les différentes études, ainsi que les modèles utilisés pour l'analyse des données. La synthèse organique réalisée pour les différentes molécules étudiées dans le cadre de ce travail sera également décrite. Le troisième chapitre permettra d'étudier la morphologie et la structure des systèmes par des techniques de diffusion de rayonnement (diffusion de la lumière et rayons X). Le quatrième chapitre se consacrera sur la mise en évidence des interactions intermoléculaires (au sein de la bicouche) et « supramoléculaires » (entre l'objet et l'acide nucléique) présentes dans les systèmes lipidiques seuls et complexés avec des acides nucléiques. Enfin, le dernier et cinquième chapitre sera dédié à la présentation des résultats obtenus par la technique de calorimétrie par titration isotherme (ITC) afin d'apporter des informations sur les propriétés thermodynamiques des assemblages supramoléculaires formés.

_____ 18]_____

Chapitre 1

Etat de l'art.

1.1 Les interactions intermoléculaires.

1.1.1. Modèle de la liaison chimique et interaction électrostatique.

Dans de nombreux domaines de la physico-chimie, les propriétés de la matière, qu'elles soient à l'échelle colloïdale ou macroscopique, peuvent être expliquées grâce à des considérations à l'échelle moléculaire, telles que les interactions faibles. Dans certains systèmes, tels que les systèmes amphiphiles, et de manière générale l'ensemble des autoassemblages, la notion d'interaction faible est même primordiale. Dans ce projet, il va simultanément être développé la mesure de telles interactions, ainsi que leur caractérisation. Ceci justifie l'introduction, ici, des différents types d'interactions faibles en jeu à l'échelle moléculaire.

1.1.1.a) La liaison covalente.

La manière dont les différents atomes s'assemblent au sein d'une molécule est usuellement décrite à l'aide du modèle de la liaison covalente. Intuitivement, on devine qu'un atome cherche, par le biais d'une liaison chimique, à satisfaire une stabilité qui lui est maximale. Pour se faire, il va tendre à capter des électrons de valence supplémentaires, de la part des atomes voisins, afin de présenter une configuration électronique optimale en termes de stabilité. Cette configuration particulière, adoptée par les atomes appartenant aux molécules organiques, correspond communément à celle du gaz rare le plus proche dans le tableau périodique, en accord avec la règle de l'octet. Ainsi, la mise en commun équitable de deux électrons, de la part de chacun des deux atomes, forme un doublet liant également appelé *liaison covalente*.

D'un point de vue quantique, les électrons d'un atome sont classés par énergie croissante dans des orbitales atomiques. Ces structures quantiques sont des fonctions mathématiques contenant l'ensemble des informations disponibles sur l'électron décrit dans le système atomique. Concernant les électrons de valence de manière plus spécifique, il est connu que deux orbitales atomiques de mêmes symétrie et énergie, et issues de deux atomes différents, peuvent se recouvrir. Ceci donne, par combinaison linéaire, deux orbitales moléculaires capables d'accueillir les électrons correspondants et décrivant ainsi leur comportement au sein de la molécule. Selon la géométrie de l'orbitale atomique impliquée dans le recouvrement, le type de l'orbitale moléculaire générée va différer. Un recouvrement à symétrie axiale est à l'origine de la création d'orbitales moléculaires σ , expliquant l'existence de liaisons simples. *A contrario*, un recouvrement à symétrie latérale est à l'origine de la création d'orbitales moléculaires π , expliquant l'existence de liaisons multiples. La théorie des orbitales moléculaires permet ainsi d'expliquer, d'un point de vue quantique, la formation de liaisons covalentes et la description des électrons de valence au sein de l'édifice polyatomique, mais également le caractère plus ou moins liant du système.

1.1.1.b) La liaison polarisée.

Les deux électrons d'une liaison σ covalente sont situés avec une probabilité de présence maximale sur l'axe internucléaire. Les orbitales moléculaires décrivant leur comportement sont autant décrites par l'orbitale atomique du premier atome que par celle du deuxième atome. Si l'on considère une liaison hétéronucléaire, l'électronégativité des atomes est un paramètre nécessaire à prendre en compte. L'atome le plus électronégatif va attirer vers lui la paire d'électrons liants. D'un point de vue quantique, ceci s'explique par le fait que les électrons de la liaison covalente sont davantage décrits par l'orbitale atomique de l'atome le plus électronégatif. Ainsi, une conséquence directe de cet état électronique est la création d'un pôle négatif constitué de l'atome le plus électronégatif légèrement enrichi en électrons et d'un pôle positif constitué de l'atome le moins électronégatif légèrement appauvri en électrons. Ce dipôle est donc défini par l'apparition d'un champ électrique caractéristique de la liaison covalente, alors dite polarisée. Les charges qui apparaissent de part et d'autre d'une liaison polarisée sont dites partielles, puisqu'elles ne proviennent que d'une asymétrie de la répartition des électrons le long de l'axe internucléaire, et non pas du gain ou de la perte effective d'un électron par les atomes liés. Pour une telle liaison, on décrit généralement, à l'aide d'un vecteur, le déplacement des électrons par rapport au cas d'une liaison non polarisée et donc purement covalente. Ce vecteur caractéristique, appelé moment dipolaire, est proportionnel à la charge nette portée par chaque atome, ainsi qu'à la distance interatomique. Il permet ainsi non seulement de quantifier la polarité d'une liaison covalente, mais également de décrire le sens et la direction du déplacement des électrons du pôle positif vers le pôle négatif. On peut trouver, FIGURE 1.1, les moments dipolaires de quelques liaisons covalentes communes, ainsi que leur longueur caractéristique et leur énergie de liaison associée. On observe essentiellement que, plus la polarisation de la liaison est grande, plus cette dernière possède une énergie faible puisqu'elle devient d'autant plus facile à casser. De plus, cette augmentation de polarité s'accompagne également d'une diminution de la longueur internucléaire, en raison du fait que le recouvrement entre les deux orbitales liantes devient d'autant plus fort.

	Moment dipolaire (D)	Longueur de la liaison (pm)	Energie de liaison (kJ/mol)
C-H	0,3	107	413
C=C	0	135	594
C=O	2,4	122	730
O-H	1,5	96	463
N-H	1,3	100	391

FIGURE 1.1 : Moments dipolaires, longueurs et énergies de liaison associés à différentes liaisons covalentes communes. Données tirées du site internet « classes.yale.edu » ^a et de l'ouvrage « Chemie » ¹

1.1.1.c) La liaison ionique.

Les liaisons covalentes ne présentent, en général, qu'une polarité restreinte. Intuitivement, il n'est, en effet, pas concevable de décrire une liaison covalente par une attraction totale de la paire électronique par un des deux atomes de la liaison. Ceci aboutirait inévitablement à la rupture de la liaison covalente. En réalité, on décrit, pour toute liaison polarisée, un pourcentage de caractère ionique. Ceci équivaut à une comparaison, en valeurs absolues, entre la charge réelle portée par chaque atome de la liaison polarisée et la charge maximale portée par un atome impliqué dans une liaison polarisée à l'extrême. On peut trouver, FIGURE 1.2, les pourcentages de caractère ionique des liaisons décrites dans la figure précédente.

	C-H	C=C	C=O	O-H	N-H
Moment dipolaire (D)	0,3	0	2,4	1,5	1,3
Pourcentage de caractère ionique (%)	5,8 %	0	41 %	33 %	27 %

FIGURE 1.2 : Moments dipolaires et pourcentages de caractère ionique associés à différentes liaisons covalentes communes.

Le cas limite d'une liaison polarisée à l'extrême est observé lorsque la différence d'électronégativité entre les deux atomes est tellement grande que le plus électronégatif capte vers lui l'ensemble du doublet liant. Ceci est donc à l'origine d'un doublet non liant sur l'atome électronégatif et d'une vacance électronique sur l'atome électropositif. Dans ce cas de figure, la charge nette portée par chacun des atomes correspond donc à la charge élémentaire : des charges formelles (+) et (-) apparaissent alors de part et d'autre de la liaison. Ainsi, la liaison covalente n'existe plus lorsque le pourcentage de caractère ionique de cette liaison dépasse 50 %. Il s'agit d'un cas limite de la liaison covalente appelé *liaison*

^a http://classes.yale.edu/chem220/STUDYAIDS/ESPotential/ESPdipoles.html

ionique. Afin d'inclure ce cas particulier au modèle de la liaison covalente, on parle par extension de *liaison iono-covalente*.

Les systèmes composés essentiellement de liaisons ioniques sont appelés *composés ioniques*. A l'état solide, un grand nombre de composés ioniques sont cristallins. On trouve notamment, parmi les exemples les plus courants, le chlorure de sodium NaCl, le bromure de potassium KBr ou le sulfure de zinc ZnS. Du fait de la « liaison » relativement importante entre les cations et les anions présents dans la maille, ces espèces sont en général caractérisées par de fortes constantes physiques, comme leur température de fusion, indiquant la présence de fortes interactions au sein du cristal. On peut, cependant, affirmer qu'il n'existe pas de liaison covalente, en tant que telle, dans la maille cristalline de chacun de ces composés.

1.1.1.d) Interaction électrostatique entre deux charges ponctuelles : l'interaction coulombienne.

On définit ainsi, pour les cristaux ioniques, une *interaction électrostatique* non covalente, responsable de la cohésion de l'édifice ionique, par opposition au cas d'une molécule dont la cohésion est assurée par les liaisons covalentes. Dans la mesure où cette liaison n'est plus vraiment le résultat d'un partage équitable d'électrons, elle est plutôt décrite par le terme d'*interaction faible*. Son énergie, également, n'est donc plus comparable à l'énergie d'une liaison covalente classique. Ainsi, plutôt que de parler d'une énergie de liaison, on définit donc une *énergie potentielle d'interaction*, également appelée *potentiel d'interaction*, responsable de la cohésion de l'édifice ionique. C'est l'*interaction coulombienne*.

Une interaction coulombienne concerne l'interaction électrostatique ressentie par toute charge électrique ponctuelle placée dans le champ créé par une autre charge électrique. Elle peut donc, suivant le signe des deux charges, être attractive ou répulsive. Une charge q₁ créé autour d'elle un potentiel électrique donné par la loi de Coulomb.

$$V = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \cdot \frac{q_1}{r}$$

FIGURE 1.3 : Expression du potentiel d'interaction électrostatique créé par une charge q_1 à une distance r dans le vide, selon la loi de Coulomb.

Il faut noter que ce potentiel électrique évolue avec la distance en 1/r. De plus, si l'on place dans cet environnement une charge q_2 , la force électrostatique ressentie par chacune des deux charges dérive alors de l'énergie potentielle d'interaction : elle évolue ainsi en - $1/r^2$. Il s'agit donc d'une interaction à longue portée.

$$E_{p \ 1 \to 2} = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \cdot \frac{q_1 \cdot q_2}{r}$$
$$F_{1 \to 2} = -\frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \cdot \frac{q_1 \cdot q_2}{r^2}$$

FIGURE 1.4 : Equation 1 : Expression de l'énergie potentielle d'interaction électrostatique existant entre deux charges q_1 et q_2 à une distance r dans le vide, selon la loi de Coulomb. Equation 2 : Expression de la force d'interaction électrostatique associée.

Une différence d'électronégativité entre deux atomes porteurs d'une liaison peut mener, dans le modèle de la liaison covalente, à une polarisation plus ou moins grande de cette dernière. Ceci est lié à l'asymétrie de la distribution électronique le long de l'axe interatomique. Si ce phénomène est valable à l'échelle de la liaison covalente, l'apparition d'un moment dipolaire caractéristique a également des répercussions à l'échelle moléculaire. Il devient ainsi possible de définir une polarité concernant la molécule toute entière.

1.1.2. Polarité d'une molécule : le dipôle permanent.

1.1.2.a) Constitution d'un dipôle permanent.

Lorsqu'une molécule possède au moins une liaison polaire, elle peut, dans certains cas, être qualifiée, elle aussi, de polaire. A l'image de la liaison covalente pure, et donc non polarisée, on peut imaginer définir une molécule apolaire comme un édifice atomique où la répartition électronique est homogène sur toute son étendue. Intuitivement, on comprend que le déplacement des électrons d'un côté ou de l'autre de la liaison dite polarisée, va entraîner l'apparition à l'échelle de la liaison covalente, mais aussi de la molécule toute entière, d'un pôle négatif enrichi en électrons et d'un pôle positif appauvri en électrons. Ceci explique pourquoi la molécule polaire est parfois qualifiée de *dipôle permanent*.

1.1.2.b) Interaction électrostatique entre deux charges ponctuelles : exemple de la solvatation d'un ion.

Puisque la molécule d'eau est très polaire et constitue par conséquent un dipôle permanent, il est possible de lui imaginer une interaction de type électrostatique avec une charge ponctuelle. A la différence d'une interaction purement coulombienne entre deux charges ponctuelles, le potentiel de cette interaction ne dépend pas seulement de la distance entre les deux espèces, mais également de l'orientation de la molécule d'eau. En effet, contrairement à un ion, qui peut s'apparenter en première approximation à une distribution sphérique d'électrons autour du noyau, la distribution électronique d'une molécule est anisotrope. En vertu de la libre rotation caractéristique de toute espèce présente en phase liquide, la molécule d'eau va donc pouvoir s'orienter préférentiellement de manière à engager une interaction ayant le potentiel le plus faible possible. Cette condition est respectée lorsque l'interaction électrostatique est de type attractive. Ceci mène ainsi la molécule d'eau à présenter à un cation sa face la plus riche en électrons, et à un anion sa face la plus appauvrie en électrons.



FIGURE 1.5 : Représentation schématique de l'orientation des molécules d'eau en fonction de la nature de l'ion solvaté.

Suivant sa taille et son affinité avec les molécules d'eau, un ion donné pourra donc être plus ou moins solvaté. On peut donc classer les anions et les cations par potentiel d'hydratation croissant. Il s'agit des séries de Hofmeister².

La dissolution d'un sel ionique dans l'eau permet ainsi aux cations et aux anions de rompre l'interaction régnant dans le cristal, en faveur de nouvelles interactions créées avec les molécules d'eau. Plus la solvatation des espèces ioniques est bonne, plus la dissolution du cristal ionique dans l'eau sera favorable. Pour montrer cette force d'hydratation, on peut mettre en relation la température de fusion d'un sel ionique avec la facilité à laquelle il est possible de dissoudre un cristal en milieu aqueux à température ambiante. A titre d'exemple, le chlorure de sodium NaCl fond à 801°C. Sous forme de liquide ionique, l'ordre cristallin est rompu. Les ions sont désorganisés et gagnent donc des degrés de liberté supplémentaires (translation et rotation). Il est possible d'atteindre le même état de désordre en solubilisant simplement à 25°C un cristal de NaCl dans de l'eau. La force d'interaction électrostatique mise en place entre l'eau et chacune des espèces ioniques suffira, même à température ambiante, à dissocier le cristal. L'eau est ainsi considérée comme un solvant remarquable du point de vue de plusieurs aspects considérés chez tout solvant. On définit ainsi les pouvoirs dissociant (rupture des interactions au sein d'un cristal ionique), dispersant (éloignement des solutés entre eux) et solvatant (hydratation des espèces grâce aux molécules d'eau interagissant).

Cependant, même si la solubilisation d'un cristal ionique parvient à rompre l'ordre cristallin en raison de l'hydratation de chaque espèce ionique, l'interaction électrostatique existant entre chaque paire d'ion n'est pas totalement rompue pour autant. Il subsiste également, en milieu aqueux, des interactions coulombiennes entre charges ponctuelles

mises en solution. La différence se trouve au niveau de la densité du milieu dans lequel ce couple est placé. Intuitivement, on comprend que l'interaction sera d'autant plus faible qu'il y a de molécules présentes entre les deux espèces interagissant, à une distance internucléaire donnée. En milieu aqueux, les molécules d'eau ont donc un effet d'écrantage des charges ponctuelles entrant en interaction. Le paramètre prenant cet aspect en compte, dans le calcul du potentiel d'interaction, est la constante diélectrique (ou permittivité) du milieu ε. Dans le cas d'un cristal ionique, on considère généralement la permittivité du vide ε_0 . Dans le cas d'une interaction coulombienne en milieu aqueux, la permittivité totale est donnée par $\varepsilon_0.\varepsilon_e$. En solution, le potentiel d'interaction est donc réduit d'un facteur ε_r . A titre d'exemple, on peut comparer la différence entre le potentiel d'interaction de Na⁺/Cl⁻ au sein d'un cristal de NaCl, et dans le cas, à la même distance interatomique, où les ions sont solvatés. La loi de Coulomb permet d'estimer, pour une distance de 250 pm et à 25°C, un potentiel d'interaction de 5.36 eV dans le vide pour un potentiel d'interaction de 0.068 eV dans l'eau. On constate donc que la qualité de très bon solvant de l'eau, lui assurant par ailleurs une constante diélectrique dans les plus élevées (ϵ_r =78.5 à 25°C) par comparaison aux autres solvants, induit une diminution drastique du potentiel électrostatique entre deux charges ponctuelles entre l'état cristallin et l'état hydraté.

1.1.3. Les interactions faibles.

On appelle usuellement « interaction faible » toute liaison, localisée ou non, entre deux entités, atomiques, moléculaires ou macro-moléculaires, et dont l'énergie est typiquement inférieure à celle de la liaison covalente. Elle peut donc comprendre différents types d'interactions suivant leur nature. Tandis qu'une liaison covalente donnée est très bien définie en énergie, il est relativement difficile de donner une estimation de l'énergie impliquée dans une interaction faible. Ceci peut s'expliquer par le fait que si la force d'une liaison covalente ne dépend, en première approximation, que du recouvrement orbitalaire entre les atomes liés, la force d'une interaction faible dépend de manière non négligeable de différents facteurs tels que l'environnement chimique, le type de solvant ou la nature de l'état physique du système. Il est donc difficile d'estimer l'énergie caractéristique d'une interaction faible donnée d'une manière plus précise que grâce à un intervalle très large.

En termes d'énergie de liaison, on considère généralement que la plus forte des interactions dites « faibles » est l'interaction électrostatique. Le reste des interactions faibles possède une énergie caractéristique qui devient comparable à l'énergie d'agitation thermique k_B.T, équivalant à 2-3 kJ/mol à 25°C. Ceci justifie le terme d'interaction « faible » et montre que, de ce fait, elles sont relativement sensibles à la température et à l'énvironnement chimique.

1.1.3.a) Les états de la matière et conséquences sur les interactions faibles intermoléculaires.

On s'intéresse particulièrement, dans cette sous-partie, aux interactions « faibles » intermoléculaires. Intuitivement, et comme précisé dans le paragraphe précédent, on comprend que la force de ces interactions dépend de l'état physique du système. En effet, certaines de ces interactions sont directives et la plupart est à relativement courte portée. De plus, étant donnée la faible énergie impliquée dans ces interactions, elles sont aussi relativement dépendantes de la température. Tout ceci implique que les interactions faibles intermoléculaires qui peuvent être mises en évidence au sein d'un système sont inhérentes à la nature de l'état physique en présence.

En phase solide, les molécules sont très proches les unes des autres et forment un réseau organisé et dense. Leur mobilité de translation est donc largement restreinte. Leur proximité spatiale leur permet d'interagir entre elles à très courte portée. Leur orientation est également figée dans une position où elles sont capables d'interagir avec leurs voisines, à l'aide des éventuelles interactions faibles directionnelles qu'elles sont capables d'engager. Ceci permet de stabiliser le système en lui attribuant une énergie totale minimale.

En phase liquide, les molécules gagnent deux degrés de liberté supplémentaires : elles sont maintenant capables de se déplacer dans l'espace et présentent également une possibilité de rotation. Cette mobilité est nuancée par la relative proximité des molécules entre elles. Même si leur position n'est pas figée, elles peuvent néanmoins présenter des interactions faibles de courte portée entre elles. Dans quelques cas (orientation spontanée des molécules, molécules de solvant), ces molécules sont même suffisamment proches pour engager des interactions faibles directives, tout comme en phase solide. On peut citer l'exemple de la molécule d'eau qui, bien que sous forme liquide dans les conditions normales de pression et de température, est capable de former quatre liaisons hydrogène avec des molécules d'eau voisines. En conséquent, bien que très désorganisée par rapport à la phase solide, la phase liquide peut tout de même présenter des interactions faibles intermoléculaires à relativement courte portée, qui peuvent même être directives dans certaines conditions.

En phase gazeuse, les molécules sont totalement dispersées dans l'espace. Elles sont encore plus mobiles qu'en phase liquide, et sont maintenant trop éloignées les unes des autres pour pouvoir interagir entre elles. On peut néanmoins imaginer la présence d'interactions faibles intermoléculaires à longue portée, dépendantes largement de la distance entre les espèces et donc de la pression du système. Dans ce type de phase, toute interaction faible directive est difficile à imaginer à pression modérée. Le désordre et l'agitation moléculaire y sont donc maximaux et, du point de vue de la densité moléculaire, on peut décrire les différentes espèces comment s'ignorant entre elles.

1.1.3.b) L'interaction de Van der Waals.

La plus importante, mais aussi la moins intense des interactions faibles est l'interaction dite « de Van der Waals ». On regroupe sous cette appellation la somme de plusieurs contributions énergétiques, présentes ou non en fonction de la nature des molécules interagissant. De manière générale, il est difficile d'estimer un ordre de grandeur pour des interactions faibles intermoléculaires, extrêmement dépendantes de leur environnement chimique. Cependant, on peut affirmer que la somme des contributions à l'interaction de Van der Waals est de l'ordre de 2-3 kJ/mol. Le paramètre permettant de prendre en compte la présence ou non de chaque contribution est la polarité des molécules.

Nous avons vu précédemment que la polarité d'une molécule permettait de définir l'existence d'un dipôle permanent, dû à l'asymétrie de la distribution électronique. Ainsi, de la même manière qu'une molécule d'eau s'oriente de manière préférentielle vis-à-vis d'un soluté ionique, deux dipôles permanents pourront s'orienter l'un par rapport à l'autre si leur mobilité n'est pas contrainte. Ainsi, en phase liquide, deux molécules polaires interagissent à courte portée et se présentent l'une à l'autre de façon à ce que le pôle riche en électrons de la première soit en vis-à-vis avec le pôle appauvri en électrons de la deuxième. Cette contribution à l'interaction de Van der Waals est appelée « interaction de Keesom ». Il s'agit ainsi d'une interaction directionnelle présente, par exemple, entre toutes molécules de solvant polaire, tel que l'eau ou l'éthanol. L'interaction de Keesom repose sur deux contributions. Tout d'abord, comme toute composante de l'interaction de Van der Waals, l'interaction de Keesom est d'origine électrostatique. En effet, sur le modèle d'une interaction coulombienne, et ceci même en l'absence de charge formelle, on peut imaginer un potentiel d'interaction entre les charges partielles des deux molécules. Cette contribution les pousse ainsi à s'aligner l'une avec l'autre. Mais il existe, en plus, une deuxième contribution antagoniste à la première, créée par l'agitation thermique intrinsèque au milieu liquide. Cette dernière a pour effet de perturber l'alignement des deux molécules polaires et leur confère donc un degré de liberté de rotation supplémentaire. L'expression du potentiel d'interaction de Keesom peut donc s'exprimer comme écrit FIGURE 1.6.

$$E_K = -\frac{\mu_1^2 \cdot \mu_2^2}{3. (4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r)^2. k_B. T. r^6}$$

FIGURE 1.6 : Expression du potentiel d'interaction de la contribution de Keesom existant entre deux molécules polaires de moments dipolaires μ_1 et μ_2 à une distance r.

Par ailleurs, et de manière contre-intuitive, un dipôle permanent peut également interagir avec une molécule apolaire. Ceci trouve son origine dans le phénomène d'induction. Une molécule polaire possède un moment dipolaire caractéristique, créant donc autour d'elle un léger champ électrique. Ainsi, lorsqu'on place une molécule apolaire dans ce champ, la distribution électronique perd son isotropie. Les orbitales moléculaires vont être légèrement déformées, ce qui pousse les électrons à se déplacer légèrement par rapport à leur trajectoire initiale. Ceci créé donc localement un nouveau moment dipolaire dit « induit ». La molécule apolaire voit donc une légère polarité apparaître lorsqu'on la place dans l'environnement d'une molécule polaire. Ceci justifie son appellation de « dipôle induit ». Sur le même modèle que l'interaction de Keesom, en phase liquide, la molécule polaire et la molécule apolaire peuvent donc interagir, de manière électrostatique et à courte portée, et s'alignent préférentiellement l'une à l'autre. Cette contribution à l'interaction de Van der Waals est appelée « interaction de Debye ». Il s'agit ainsi d'une interaction directionnelle de type « dipôle permanent - dipôle induit ». L'interaction de Debye repose donc sur la polarisabilité α de la molécule apolaire et créé donc un moment dipolaire induit égal à $\alpha.\mu_0$, avec μ_0 le champ électrique extérieur créé par le moment dipolaire du dipôle permanent. L'expression du potentiel d'interaction de Debye peut donc s'écrire comme à la FIGURE 1.7.

$$E_D = -\frac{\mu^2.\,\alpha}{(4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r)^2.\,r^6}$$

FIGURE 1.7 : Expression du potentiel d'interaction de la contribution de Debye existant entre une molécule polaire de moment dipolaire μ et une molécule apolaire de polarisabilité α à une distance r.

Enfin, il est important de préciser que même une molécule apolaire peut également interagir avec une autre molécule apolaire, en conférant également un autre type de contribution d'origine électrostatique à l'interaction de Van der Waals. Ceci peut s'expliquer à l'aide du phénomène d'auto-induction. Comme expliqué ci-dessus, la répartition électronique autour d'une molécule est globalement isotrope. Pour affirmer ceci, on considère une moyenne dans le temps de la position de chaque électron. En revanche, si l'on fige la molécule à un instant donné, on pourrait cependant observer que les électrons ne sont pas tous répartis de manière statistiquement équitable autour du squelette de la molécule. Ceci provoque l'apparition, à ce moment précis, d'un moment dipolaire instantané, ayant pour cause la création de charges locales instantanées. Ce moment dipolaire est à l'origine de la formation d'un champ électrique qui, lui-même, peut induire l'apparition d'un nouveau moment dipolaire chez une molécule apolaire placée dans son entourage. De manière similaire aux contributions précédentes à l'interaction de Van der Waals, en phase liquide, deux molécules apolaires sont donc capables également d'interagir, de manière électrostatique et à courte portée. Cette contribution à l'interaction de Van der Waals est appelée « interaction de London ». Il s'agit ainsi d'une interaction non directionnelle de type « dipôle induit - dipôle induit ». Sa non-directionnalité repose sur le fait que la direction du moment dipolaire induit n'est pas prévisible, puisque son apparition est basée sur des lois statistiques. L'interaction de London repose donc sur la polarisabilité α des différentes molécules apolaires et l'expression de son potentiel d'interaction peut donc s'écrire comme FIGURE 1.8.

$$E_L = -\frac{3}{4} \cdot \frac{h \cdot v \cdot \alpha_1 \cdot \alpha_2}{(4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r)^2 \cdot r^6}$$

FIGURE 1.8 : Expression du potentiel d'interaction de la contribution de London existant entre deux molécules apolaires de polarisabilités α_1 et α_2 à une distance r.

On peut également préciser que le potentiel d'interaction augmente avec la taille des molécules en raison de leur polarisabilité croissante. A cause du fait que cette interaction

attractive est présente quelque soit le type de molécule considérée, elle est parfois appelée « force de dispersion ». C'est donc la contribution de Van der Waals la plus importante, bien que, prise seule, elle soit également la plus faible. Elle permet notamment d'expliquer la présence de phases condensées pour les espèces chimiques apolaires, ou la capacité du gecko à pouvoir s'accrocher à une surface lisse.

De manière générale, toute contribution à l'interaction de Van der Waals présente un potentiel évoluant en $-1/r^6$ avec la distance intermoléculaire r. Il s'agit donc d'une interaction attractive à très courte portée. L'expression générale du potentiel de l'interaction de Van der Waals est donnée FIGURE 1.9.

$$E_{VdW} = -\frac{1}{r^6} \cdot \left(\frac{\mu_1^2 \cdot \mu_2^2}{3 \cdot (4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r)^2 \cdot k_B \cdot T} + \frac{\mu^2 \cdot \alpha}{(4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r)^2} + \frac{3}{4} \cdot \frac{h \cdot v \cdot \alpha_1 \cdot \alpha_2}{(4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r)^2} \right)$$

FIGURE 1.9 : Expression générale du potentiel de l'interaction de Van der Waals à une distance r.

Pour un couple de molécules donné, l'ensemble des trois contributions à l'interaction de Van der Waals ne peut exister *a priori* que si les molécules considérées sont polaires. Généralement, pour un couple de molécules polaires, la composante de London est la plus faible des interactions de Van der Waals en termes d'intensité. Mais du fait qu'elle existe quelque soit le couple de molécules considéré, la force globale des interactions de Van der Waals sera essentiellement dominée par la contribution de London, dû au très grand nombre d'interactions de ce type.

Les interactions de Van der Waals sont fondamentales lorsque l'on considère une molécule diatomique. Dans ce système, la liaison covalente existant entre les deux atomes présente une longueur particulière permettant aux interactions interatomiques de Van der Waals de conférer une énergie minimale au système. La fonction permettant d'exprimer le potentiel d'un tel système en fonction de la longueur l de la liaison est dite de « Lennard-Jones ».

$$E_p(l) = 4. E_0 \cdot \left[\left(\frac{d}{l}\right)^{12} - \left(\frac{d}{l}\right)^6 \right]$$

FIGURE 1.10 : Expression de la fonction de Lennard-Jones caractérisant l'évolution du potentiel d'interaction d'un système diatomique en fonction de la longueur l'interatomique. La distance d représente la valeur particulière de l'pour laquelle l'énergie potentielle du système s'annule. Le coefficient E₀ est une constante caractéristique du système considéré.

Elle repose essentiellement sur l'attraction de Van der Waals observée à grande distance, et évolue donc en $-1/l^6$. Si l'on ne considère que cette contribution, la liaison aurait tendance à voir sa longueur diminuer jusqu'à ce que les atomes entrent en contact. En réalité, un deuxième effet empêche ceci en faveur d'une brusque augmentation du potentiel aux très courtes distances, évoluant en $1/l^{12}$, permettant d'éviter aux atomes de

s'interpénétrer. Ceci peut s'expliquer en raison de la très forte répulsion des nuages électroniques lorsqu'on les force à s'approcher trop près. On représente la fonction de Lennard-Jones FIGURE 1.11.



Distance interatomique 1

FIGURE 1.11 : Courbe de Lennard-Jones (trait plein en rouge) représentant l'évolution de l'énergie potentielle d'interaction d'un système diatomique en fonction de la longueur l de la liaison interatomique. Les évolutions en $1/r^{12}$ (trait à pointillés larges en vert) et en $-1/r^{6}$ (trait à pointillés fins en bleu) sont également représentées.

Cette représentation présente notamment un puits de potentiel à une longueur l_{min} . Cette longueur doit donc correspondre au minimum d'énergie potentielle, obtenu pour une distance relativement proche des atomes, sans permettre toutefois aux nuages électroniques de ceux-ci d'entrer en contact. Dans cette configuration la plus stable, on évoque parfois le terme de « rayon de Van der Waals ». Il s'agit du rayon entre le centre du noyau et la périphérie du nuage électronique pour un atome donné au sein d'une molécule diatomique, d'où l_{min} =2.r_{Vdw}. Plus les interactions de type Van der Waals sont importantes entre les deux atomes, plus ceux-ci auront tendance à se rapprocher. Ceci entraîne donc une diminution de la longueur de la liaison l_{min} , et donc également du rayon de Van der Waals de chacun des deux atomes.

1.1.3.c) L'interaction aromatique (ou π - π stacking).

Suite à des calculs orbitalaires effectués sur des hydrocarbures monocycliques conjugués, Hückel formula une règle permettant d'énoncer un critère d'aromaticité pour un composé moléculaire. Ainsi, selon la règle de Hückel, un composé est dit « aromatique » si celui-ci est cyclique, plan, et possède 4n+2 électrons délocalisables. Ces électrons délocalisables peuvent être des électrons π ou des électrons non liants. Le nombre n est un entier correspondant au nombre de cycles accolés dans la molécule. De plus, les cycles ne sont pas nécessairement seulement constitués de carbones, mais peuvent présenter des hétéroatomes tels que des oxygènes ou des azotes. L'aromaticité d'un composé implique

une délocalisation de ces 4n+2 électrons. C'est pourquoi, pour certaines structures hétérocycliques, certains doublets non liants ne sont pas impliqués dans la mésomérie de la molécule. Au contraire, il est parfois nécessaire de considérer certains doublets non liants dans le système π de la molécule pour pouvoir la considérer comme aromatique. La FIGURE 1.12 montre l'exemple de deux molécules aromatiques.



FIGURE 1.12 : Formes mésomères de la pyrimidine et du furane.

Dans le premier cas, il s'agit de la pyrimidine. Ce cycle diazoté à 4 carbones présente déjà 6 électrons π délocalisables. La délocalisation des doublets non liants des deux azotes n'entre donc en jeu dans aucune des formes mésomères. Le deuxième cas présente le furane. Afin de pouvoir considérer ce cycle oxygéné à 4 carbones comme aromatique, il faut considérer, en plus des 4 électrons π , l'implication d'un des deux doublets non liants de l'oxygène dans le système π . Ceci est possible du fait que ce doublet non liant se trouve sur une orbitale 2p de l'oxygène, géométriquement perpendiculaire au plan moyen du cycle.

Un composé aromatique présente une répartition d'électrons π délocalisés sur une certaine surface moléculaire. La distribution totale de charge sur l'ensemble de la molécule est caractérisée par un moment quadripolaire électrique. Ce moment ne peut s'annuler que si la répartition électronique est sphérique. Une anisotropie de la distribution sera donc à l'origine d'une séparation de charges, induisant ainsi un moment quadripolaire électrique. En solution, il est donc possible d'appareiller deux à deux des molécules à caractère aromatique, grâce à une interaction de type « quadripôle-quadripôle ». Cette interaction porte le nom « d'interaction aromatique », appelée également « π - π stacking » ou encore empilement π .



FIGURE 1.13 : Représentation schématique d'un quadripôle électrique.

Le π - π stacking est donc, par définition, une interaction faible intermoléculaire non spécifique. Une entité aromatique peut, en effet, interagir avec n'importe quelle autre entité aromatique. La présence uniquement d'un moment quadripôle électrique est requise pour former un tel empilement. De plus, cette interaction est également directionnelle. En effet, l'interaction se formant entre les deux moments quadripolaires électriques peut mener les deux molécules à occuper différentes configurations possibles. La première qui vient à l'esprit lorsqu'on imagine deux cycles aromatiques interagir ensemble, via une interaction quadripolaire, est constituée des deux plans moyens alignés parallèlement et face-à-face. Il s'agit de la configuration la plus courante, appelée « sandwich ». Cependant, plusieurs autres configurations sont également possibles, notamment celle constituée des deux cycles parallèles mais légèrement décalés l'un par rapport à l'autre, dénommée « parallel-displaced », ainsi que celle présentant les deux cycles de manière perpendiculaire l'un par rapport à l'autre, appelée « T-shaped ».



FIGURE 1.14 : Représentation schématique des différentes configurations possibles pour deux cycles aromatiques interagissant via une interaction de type π - π stacking, resp. (1) : « sandwich », (2) : « T-shaped », (3) : « parallel-displaced ». Schéma tiré du site internet « Wikipedia » ^b

De manière générale, même si l'intensité de l'interaction aromatique dépend beaucoup de l'aromaticité des espèces chimiques utilisées et de l'environnement chimique (notamment le solvant), on peut estimer un ordre de grandeur de cette interaction autour de 10 kJ/mol.

1.1.3.d) L'interaction hydrogène.

Une des interactions faibles les plus importantes à l'échelle moléculaire est l'interaction hydrogène. Il s'agit d'une interaction faible mettant en jeu un doublet non liant porté par un atome particulièrement électronégatif (comme l'azote ou l'oxygène) et l'atome d'hydrogène d'un deuxième groupement porté par un atome électronégatif. Cette configuration confère au doublet non liant un caractère basique selon Lewis, et à l'atome d'hydrogène un caractère labile propre à un acide selon Brønsted. Dans cette interaction l'atome d'hydrogène est mis en commun entre l'atome électronégatif A qui le porte via une liaison covalente et l'atome basique B engageant un doublet non liant avec lui. La liaison hydrogène, à proprement parler, constitue simplement la liaison faible existant entre B et H. Un intérêt particulier est porté à cette interaction, dans la mesure où celle-ci est

^b https://en.wikipedia.org/wiki/Stacking_(chemistry)

directionnelle. Ainsi, dans cette configuration, les atomes A, H et B sont colinéaires. L'interaction hydrogène existe généralement entre plusieurs molécules susceptibles d'interagir, mais elle peut également exister de manière intramoléculaire. Dans ce cas, les conditions géométriques qu'elle impose pour l'enchaînement A, H et B permettent de stabiliser la molécule dans une conformation particulière. On trouve notamment une illustration de cet effet au sein des protéines, où les interactions hydrogène permettent de stabiliser la macromolécule dans une configuration particulière, en constituant la *structure secondaire* de la protéine.

Une des particularités, souvent mise en avant pour cette interaction, est son caractère spécifique. Il est vrai que, de par sa définition, un groupement A-H (avec A électronégatif) n'a en effet la capacité d'interagir qu'avec un atome B suffisamment basique et porteur d'un doublet non liant. Ceci impose donc une certaine sélectivité quant au partenaire pouvant interagir avec la molécule. La liaison hydrogène permet, par exemple, d'expliquer pourquoi le réseau des molécules d'eau en phase liquide est si cohésif par rapport à n'importe quel autre solvant polaire capable simplement d'interactions de Van der Waals, comme l'acétone. La petite taille de la molécule d'eau la rend particulièrement susceptible de pouvoir interagir avec ses voisines ou n'importe quel soluté protique, via une interaction hydrogène. Ceci permet, en partie, d'expliquer pourquoi, au-delà de la très grande polarité de cette molécule par rapport aux autres solvants, l'eau est en général un excellent solvant pour n'importe quel soluté polaire, et, à plus forte raison, protique.

D'un point de vue électrostatique, la liaison hydrogène peut être considérée comme étant de nature électrostatique. En effet, elle revient à considérer une interaction de Keesom, entre deux groupements polaires, où l'atome H porte une charge partielle δ + et où l'atome B porte une charge partielle δ -. Mais, au-delà de cet aspect, la mise en commun de l'atome d'hydrogène rend cette interaction particulièrement stable et permet d'expliquer l'ordre de grandeur, en général observé, pouvant aller jusqu'à 50 kJ/mol pour cette liaison. De plus, du fait qu'il ne s'agit pas d'une simple interaction de nature électrostatique, comme l'interaction de Van der Waals, mais également d'une liaison « semi-dative », sa portée est relativement courte. En effet, si l'ordre de grandeur de la longueur d'une liaison covalente typique est de 100 pm, la longueur d'une liaison hydrogène est typiquement de 200 pm et il n'est pas permis d'imaginer une longueur beaucoup plus grande pour une telle interaction. En raison de sa très courte portée, il paraît logique que l'interaction hydrogène est extrêmement dépendante de son environnement chimique, de l'état physique du milieu dans lequel elle se trouve, ainsi que de sa température. Une proximité des deux groupements interagissant va favoriser une interaction hydrogène forte, tandis qu'un état désordonné et une agitation thermique conséquente va plutôt avoir tendance à la fragiliser.

Il est difficile d'estimer l'effet de la liaison hydrogène seule sur les constantes physiques de quelques composés issus d'une même série homologue. En effet, entre deux molécules différentes, mais capables toutes deux d'interagir via une interaction hydrogène, la polarité va nécessairement varier, du fait même de la nature chimique des groupements pouvant former une liaison hydrogène. Une modification dans la structure moléculaire va donc avoir pour conséquence directe d'affecter non seulement les interactions hydrogène potentiellement présentes, mais aussi les interactions de Van der Waals que la molécule pourra former. Cependant, on peut affirmer que l'effet principal d'une modification de la structure moléculaire sur les températures de changement d'état est lié principalement à la modification des interactions hydrogène, celles-ci étant dominantes devant les interactions de Van der Waals.

1.1.3.e) L'effet hydrophobe.

La dernière interaction présentée ici n'est pas une interaction à proprement parler. Elle concerne essentiellement les solutés hydrophobes placés en milieu aqueux. Les mécanismes qui définissent l'affinité d'une molécule pour un milieu reposent sur les forces d'attraction existant entre les deux types de molécules. Lorsque l'on place une molécule polaire en phase aqueuse, il existe, comme vu précédemment, de fortes forces d'attractions (notamment électrostatique, hydrogène et de Van der Waals) qui génèrent une contribution positive à la solvatation du soluté. Lorsque l'on place une molécule apolaire en phase aqueuse ou organique, les forces d'attraction générées sont beaucoup plus faibles, même si elles sont un peu plus fortes en milieu aqueux (contributions de Debye et de London) qu'en milieu organique (contribution de London seulement). L'affinité très marquée d'un soluté aliphatique, par exemple, pour une phase huileuse ne s'explique donc pas par la présence d'interactions plus fortes entre cette molécule et les molécules de la phase organique qu'entre cette molécule et les molécules d'eau.

En réalité, le coefficient de partage d'un soluté aliphatique observé entre une phase aqueuse et une phase organique peut s'expliquer par le fait que l'eau liquide forme un réseau très dense grâce à la multitude d'interactions faibles existant à très courte portée (interactions de Van der Waals, mais surtout interactions hydrogène). La cohésion des molécules d'eau solvantes fait que les chaînes alkyles vont avoir tendance à être chassées du milieu aqueux. En effet, la désorganisation du réseau des molécules d'eau occasionnerait une déstabilisation considérable, même si l'eau créait de nouvelles interactions faibles avec le soluté. Il est donc plus favorable de conserver les interactions hydrogène entre molécules d'eau, quitte à rejeter tout solvant hydrophobe ne pouvant pas générer d'interactions suffisamment stabilisantes avec les molécules d'eau. Ceci est à mettre en parallèle avec la solubilisation d'un soluté hydrophile, par exemple une espèce ionique. Les interactions hydrophobes rompues au sein de l'eau sont compensées par la création de nouvelles interactions eau/ion de nature électrostatique et relativement stabilisatrices. L'interaction hydrophobe n'est donc pas une interaction à proprement parler, mais il s'agit plutôt d'un effet entropique, dû à la perturbation du réseau organisé. De fait, l'eau est un solvant particulier vis-à-vis des solutés hydrophobes. L'absence de fortes interactions attractives entre les solutés hydrophobes et la plupart des solvants fait que les molécules hydrophobes sont, en général, relativement mal solvatées. Néanmoins, la polarité remarquable de l'eau, ainsi que la présence de son réseau cohésif, fait qu'elle possède un pouvoir solvant extrêmement faible pour ce type de molécules.³

La singularité de cette « interaction » rend difficile de réaliser une estimation quant à l'ordre de grandeur de son potentiel d'interaction. Il est néanmoins possible d'effectuer une approche thermodynamique basée sur les potentiels chimiques du soluté placé à une interface eau/huile dans chacune des deux phases, afin d'avoir accès à son coefficient de partage. De cette manière, on pourrait réussir à estimer, de manière semi-quantitative, la difficulté de la solubilisation d'un soluté hydrophobe donné en milieu aqueux.

1.2 L'auto-assemblage.

1.2.1. Origine physico-chimique de l'auto-assemblage.

1.2.1.a) Les molécules amphiphiles.

Dans la Nature, on peut trouver une variété immense de molécules possédant différentes propriétés physico-chimiques intéressantes. C'est le cas notamment des molécules amphiphiles. Ce type de molécules présente une richesse en termes d'applications du fait de la singularité de sa structure chimique : il s'agit d'un type de molécules constituées d'une partie polaire (appelée couramment « tête hydrophile ») et d'une partie apolaire (appelée couramment « queue hydrophobe »). Cette particularité chimique la rend, contrairement aux autres molécules, tout à fait adaptée aux milieux interfaciaux. Ainsi, lorsqu'elle est placée à une interface eau/huile, elle tend à se disposer de manière à minimiser son énergie, c'est-à-dire à l'interface, la tête dans l'eau et la queue dans l'huile. Elle sera également présente dans le volume du liquide (appelé « bulk », à mettre en opposition avec « interface »), mais son coût énergétique sera moindre dans la région interfaciale, notamment en raison de l'effet hydrophobe occasionné par sa (ses) chaîne(s) aliphatique(s) présentes dans le « bulk ».



FIGURE 1.15 : Représentation schématique d'une interface huile/eau occupée par des amphiphiles.
Une partie des molécules amphiphiles présente également certaines propriétés intéressantes. Il s'agit des tensioactifs. Dans ce cas, le fait, pour la molécule amphiphile, de se placer en priorité dans les régions interfaciales a également pour conséquence d'abaisser la tension de surface du liquide considéré. En réalité, n'importe quel solvant possède une tension superficielle qui caractérise son interface avec l'air. Elle peut s'expliquer par l'excès énergétique des molécules se trouvant à la surface. Du fait d'un manque d'interactions stabilisantes de la part de ses voisines, comme pour une molécule se trouvant dans le « bulk », les molécules se trouvant au niveau de l'interface liquide/air présentent un excédent énergétique, caractéristique des interactions intermoléculaires en jeu dans le « bulk » (et donc caractéristique du liquide considéré). On parle de « tension de surface » ou de « tension interfaciale ». C'est ce phénomène qui permet d'expliquer la capillarité de l'eau ou bien le fait que des objets légers et peu denses, mais présentant une grande surface de contact (comme un trombone ou bien les insectes Gerris) sont capables de flotter sur l'eau. On pourrait ainsi rompre la tension interfaciale de l'eau, et y faire couler l'objet flottant, en y versant quelques gouttes de liquide vaisselle. Ce comportement de tensioactif concerne, en effet, le cas général du savon et de toutes les molécules détergentes.



FIGURE 1.16 : Schéma : Représentation schématique d'un trombone flottant sur l'interface air/eau en raison de la tension superficielle de l'eau. Photographie : Photo d'un Gerris marchant sur la surface de l'eau en raison de la tension interfaciale de l'eau. Photo tirée du site internet « Wikipedia » ^c.

Industriellement, un tensioactif est caractérisé par une balance hydrophile/hydrophobe (appelée également « HLB »). Suivant cette valeur, ses propriétés seront légèrement différentes. Même si celles-ci reposent toujours sur le même principe, il pourra, suivant le milieu pour lequel il présente l'affinité la plus grande, servir d'agent de mouillage, d'émulsifiant ou bien d'agent moussant.

Par ailleurs, à l'état naturel, une catégorie très répandue de molécules amphiphiles justifie largement ces propriétés interfaciales, il s'agit des lipides. Les lipides sont connus pour constituer l'ensemble de la matière grasse à l'échelle naturelle, de par le caractère très hydrophobe de leur longue chaîne aliphatique. Mais les lipides, tout comme les amphiphiles de manière générale, ne présentent pas nécessairement qu'une seule chaîne. Ils peuvent aussi en présenter deux. On parle ainsi, respectivement, d'espèces « monocaténaires » et

^c https://fr.wikipedia.org/wiki/Gerris

« bicaténaires ». Parmi les lipides, on peut notamment trouver les mono-, di- et triglycérides, ainsi que les phospholipides. Plus particulièrement, les phospholipides sont connus pour être les espèces constitutives des membranes biologiques, comme au sein des cellules par exemple. Leur propriété interfaciale leur permet ainsi de pouvoir séparer deux milieux aqueux différents, ici l'espace intra- et extra-cellulaire.



FIGURE 1.17 : Représentation schématique d'une membrane cellulaire constituée de phospholipides. Schéma inspiré du site internet « virologie.free.fr » ^d.

Effectivement, le fait de dissoudre un amphiphile dans l'eau ne mène pas à une solution comme la plupart des molécules. A très faible concentration, le lipide va tout d'abord se placer, comme décrit ci-dessus, à l'interface eau/air du fait de son affinité particulière pour cette région et du fait de l'effet hydrophobe. Quelques rares amphiphiles seront également présents dans le « bulk », de manière relativement modérée, de manière à ne pas provoquer une contribution énergétique trop défavorable pour le système. A partir d'une certaine concentration (appelée la CMC ou la CVC, respectivement « Concentration Micellaire Critique » ou « Concentration Vésiculaire Critique » suivant le type d'amphiphile utilisé), l'interface est suffisamment chargée en amphiphiles. Pour toute concentration supérieure à cette concentration critique, on force ainsi les lipides à entrer en solution. Le système adopte alors un état d'énergie minimale, et l'on peut mettre en évidence par différentes techniques expérimentales, la formation d'objets supramoléculaires à l'origine d'une « dispersion » (à mettre en parallèle avec « solution »). Ces objets seront, par la suite, nommés « auto-assemblages ».

1.2.1.b) Mécanisme de formation d'un auto-assemblage.

Physiquement, l'évolution spontanée d'un système est guidée par des lois thermodynamiques. En particulier, l'excédent d'énergie que l'on ajoute à un système lorsque l'on introduit une mole d'un composé i, à pression et température fixées, est

^d http://virologie.free.fr/documents/virologie/03-transport_intracell_prot/transport_intracell_prot.htm

appelée « potentiel chimique de l'espèce i ». En d'autres termes, le potentiel chimique quantifie donc la capacité d'une espèce à réagir ou se déplacer d'une phase à l'autre. Lorsqu'on place une telle molécule dans un système multiphasique, l'équilibre est atteint lorsque le potentiel chimique de l'espèce i est le même dans chacune des phases. Tant que cette condition n'est pas atteinte, l'équilibre sera déplacé jusqu'à ce que la condition de Gibbs soit vérifiée. Physiquement, cela signifie qu'aucun des sous-systèmes (constitués des différentes phases contenant l'espèce chimique) ne présente une énergie excédentaire, ce qui entraînerait la diffusion de la molécule de la phase où son potentiel est le plus grand vers la phase où son potentiel est le plus faible. A l'état d'équilibre, l'égalité des potentiels fait que la distribution de la molécule dans les différentes phases donne une enthalpie libre totale minimale pour le système. C'est la condition de Gibbs.

$$\mu_{i} = G_{i}/n_{i} \qquad d\mu_{i} = dG_{i}/dn_{i}$$

$$\mu_{i}(phase 1) = \mu_{i}(phase 2) = \dots = \mu_{i}(phase n)$$

$$G(système) = \sum_{j} \left[\sum_{i} \left[\frac{dG_{i}(phase j)}{dn_{i}} . n_{i}(phase j) \right] \right]$$

$$dG(système) = \sum_{j} \left[\sum_{i} [\mu_{i}(phase j) . dn_{i}(phase j)] \right]$$

FIGURE 1.18 : Calcul de l'enthalpie libre d'un système multiphasique à l'aide des potentiels chimiques.

La condition d'équilibre selon Gibbs est donc vérifiée pour dG(système)=0. Il en va de même pour une transition de phase d'un corps pur, à pression et température données. Lorsque l'on passe de part et d'autre de la température de transition, le potentiel chimique de la molécule dans une des phases devient inférieur. Il devient alors spontané pour la molécule i d'occuper cette phase plutôt que l'autre.

Le potentiel chimique étant physiquement défini comme l'enthalpie libre molaire Gi d'un composé i dans une phase j, et donc l'énergie ajoutée au système lorsque l'on ajoute une mole de composé i, cette grandeur est, par conséquent, constituée de deux termes : un terme enthalpique et un terme entropique. Le terme enthalpique est une contribution qui dépend fortement du soluté et du solvant. Elle correspond à la partie spécifique du potentiel chimique, appelée « potentiel unitaire ou standard ». Celle-ci inclut l'enthalpie libre inhérente à la molécule i prise isolée, en mouvement dans la phase j, et dans des conditions standard. Elle inclut aussi l'enthalpie libre due aux interactions entre i et les molécules de solvant et aux interactions intermoléculaires entre molécules de type i. Le terme entropique est une contribution qui ne dépend pas du soluté ni du solvant. Elle représente un terme statistique d'entropie de mélange, en vertu de la tendance à la dispersion, correspondant au Second Principe de la Thermodynamique. On peut donc réécrire l'enthalpie libre d'un composé i dans une phase j sous la forme présentée FIGURE 1.19.

$\mu_i(\text{phase } j) = \mu_i^\circ(\text{phase } j) + RT.\ln[x_i(\text{phase } j)]$

FIGURE 1.19 : Expression des deux composantes enthalpique et entropique du potentiel chimique d'un constituant i dans une phase j.

Le transfert de la molécule i d'une phase j à une phase k se fait toujours du potentiel chimique μ_i le plus élevé vers le potentiel chimique μ_i le plus faible, ce qui correspond à une évolution spontanée, puisque la diffusion s'accompagne d'une diminution de l'enthalpie libre du système. Ceci s'accompagne d'une diminution de l'enthalpie globale du système, en raison de la variation de μ_i° dans chacune des phases j et k.

Pour une même molécule i considérée dans 2 phases différentes, la contribution entropique du potentiel chimique est identique. La différence entre les potentiels standards de i dans une phase j et dans une phase k vient donc essentiellement des différentes interactions intermoléculaires de type i/solvant et i/i. De plus, si la phase j constitue un autoassemblage et la phase k constitue le solvant en « bulk », la préférence d'une molécule pour la phase j que pour la phase k implique une différence significative entre μ_i° (phase j) et μ_i° (phase k). Ainsi, pour un hydrocarbure aliphatique placé dans 2 phases différentes, μ_i° (eau) > μ_i° (huile), car la molécule se place plus favorablement dans l'huile que dans l'eau et il existe donc un gradient de potentiel chimique de l'eau vers l'huile.

$$\mu_i(huile) - \mu_i(eau) = \mu_i^{\circ}(huile) - \mu_i^{\circ}(eau)$$

FIGURE 1.20 : Expression du gradient de potentiel chimique d'un composant i dans un système biphasique huile/eau.

Le fait d'ajouter quelques molécules i dans la phase aqueuse augmente l'enthalpie libre de l'espèce chimique dans celle-ci. C'est donc un processus défavorable. Ceci conduit donc à l'expression d'un potentiel chimique μ_i (eau) positif. Alternativement, le fait d'ajouter quelques molécules i dans la phase organique diminue l'enthalpie libre de l'espèce chimique dans celle-ci. C'est donc un processus favorable. Ceci conduit donc à l'expression d'un potentiel chimique μ_i (huile) négatif. La variation observée pour μ_i dans chacune des deux phases s'explique essentiellement par la variation de la partie enthalpique (potentiel unitaire μ_i°). En effet, les interactions formées entre i et les molécules d'eau sont à l'origine d'une déstabilisation relative : l'énergie du système augmente fortement. Par ailleurs, les interactions formées entre i et les molécules sont à l'origine d'une stabilisation relative : l'énergie du système augmente moindre. En conclusion, on peut affirmer que plus le terme μ_i° (huile)- μ_i° (eau) est négatif, plus la molécule montre une préférence pour la phase huileuse. En revanche, plus le terme μ_i° (huile)- μ_i° (eau) est positif, plus la molécule montre une préférence pour la phase aqueuse.

Considérons maintenant une molécule amphiphile en milieu aqueux. Le potentiel chimique standard peut être calculé en additionnant les composantes dues à la partie polaire de i ($\mu_i^{\circ}_{pol}(eau)$) et à la partie apolaire de i ($\mu_i^{\circ}_{apo}(eau)$). De même, pour un

amphiphile distribué dans un mélange biphasique eau/huile, chacune des deux parties de la molécule se comporte comme si elle était seule dans chacune des deux phases.

$$\mu^{\circ}_{i}(huile) - \mu^{\circ}_{i}(eau) = \left[\mu^{\circ}_{i pol}(huile) - \mu^{\circ}_{i apo}(huile) \right] - \left[\mu^{\circ}_{i pol}(eau) - \mu^{\circ}_{i apo}(eau) \right]$$

FIGURE 1.21 : Expression du gradient de potentiel chimique d'un constituant amphiphile i dans un système biphasique huile/eau.

Comme vu précédemment, l'affinité eau/tête polaire implique une contribution positive au terme μ_i° (huile)- μ_i° (eau). De même, l'interaction très défavorable eau/queue aliphatique implique une contribution très négative au terme μ_i° (huile)- μ_i° (eau), en raison de l'effet hydrophobe. Pour faire face à cet effet antagoniste, dès que l'on dispose, en solution aqueuse, une concentration suffisamment élevée de molécules amphiphiles, il devient favorable thermodynamiquement, pour le système, de réarranger les molécules dans un procédé coopératif. La concentration critique dépend essentiellement de la taille de la partie hydrophobe. Plus celle-ci est longue, plus la concentration critique sera faible, car l'introduction de la chaîne dans le réseau 3D de molécules d'eau sera largement défavorable. On observe, certes, une perte d'entropie liée à l'auto-assemblage, expliquée par le confinement des amphiphiles, par la diffusion 2D dans l'auto-assemblage faisant place à la diffusion 3D dans le « bulk », et par la disparition des faibles forces d'attraction chaîne/eau. Cependant, celle-ci est largement compensée par la restructuration du réseau d'interactions hydrogène, déstructuré par la présence de la chaîne aliphatique, et par la création de nouvelles forces d'attractions chaîne/chaîne. Il s'agit d'une conséquence de l'effet hydrophobe pour les molécules amphiphiles.^{2,4}

1.2.1.c) Caractéristiques physiques d'une bicouche lipidique.

Lorsqu'un lipide est placé en milieu aqueux, au-delà de la concentration critique, il s'auto-assemble. Il peut alors former spontanément des objets supramoléculaires de différentes morphologies, en fonction de sa nature chimique. Quelque soit le type d'auto-assemblage en présence, les molécules lipidiques vont toujours s'organiser localement de la même manière. Considérons le cas classique d'un phospholipide bicaténaire. Alors que la tête du lipide sera favorable à un contact avec la phase continue aqueuse, la queue doit minimiser son contact avec l'eau, et par conséquent rester confinée dans un espace hydrophobe. Pour ce type de système, il est observé expérimentalement que l'auto-assemblage mène à un enchaînement du type tête-queue-queue-tête. De cette manière, chaque lipide est ainsi en contact, d'une part avec l'eau à l'extérieur, et d'autre part avec la chaîne d'une autre molécule à l'intérieur. Cette configuration permet, par conséquent, de bénéficier en même temps des interactions stabilisantes tête/eau et queue/queue. Une telle structure lipidique porte le nom de « bicouche ».

L'état des chaînes au sein de la bicouche est déterminant pour la caractérisation de la structure de celle-ci. On distingue principalement deux types d'état possibles. Dans l'état dit

« fluide », les chaînes sont désordonnées. Il n'existe donc ni orientation propre pour chaque chaîne au sein de la bicouche, ni ordre de position des lipides entre eux. Ceci indique donc qu'à l'état fluide, aucune orientation n'est définie pour la bicouche, dans aucune des deux directions le long du plan moyen. *A contrario*, l'état « gel » est défini par une organisation des chaînes dans l'espace hydrophobe de la bicouche. Cette organisation se matérialise par des chaînes rigides et présentant un ordre dans chacune des deux directions couvrant le plan moyen de la bicouche. En outre, la périodicité 2D se retrouve également, sur la surface de la bicouche, au niveau des têtes polaires.



FIGURE 1.22 : Représentation schématique d'une bicouche lipidique, resp. sous forme « fluide » et « gel ».

Enfin, il est important de préciser que, quelque soit le lipide considéré, la transition gel/fluide est réalisable et s'effectue en température. De plus, comme toute transition de phase classique, cette conversion est réversible et s'observe à une température donnée et dépendant du lipide, appelée également « température de fusion ». Cette transition gel/fluide a une incidence sur l'aspect macroscopique de l'échantillon. A l'image de la transition observée entre la solidité du beurre froid et celle du beurre lorsqu'il a été laissé longtemps à température ambiante, on observe une différence significative de la consistance des échantillons gel et fluide. En effet, la viscosité des échantillons gel est relativement importante, tandis que celle des échantillons fluides s'apparente plus à celle de l'eau. On peut trouver, ci-dessous, les températures de transition gel/fluide pour différents phospholipides bicaténaires. Etant donné que le phénomène décrit ci-dessus concerne uniquement les chaînes hydrophobes, on fixe la même tête polaire pour tous les lipides de la série homologue.

	14:0 PC	16:0 PC	18:0 PC	18:1c9 PC	20:0 PC
Température de transition gel/fluide (°C)	24	41	55	-17	66

FIGURE 1.23 : Températures de transition gel/fluide associées à différents phospholipides de tête phosphatidylcholine (PC) et de type de chaînes variable. Données tirées du site internet « Avanti, polar lipids »

On peut voir, dans le tableau FIGURE 1.23, l'effet de deux paramètres liés aux chaînes. D'une part, la tendance observée pour la température de fusion lorsque la longueur des deux chaînes augmente. L'augmentation de la température de transition gel/fluide indique que plus les chaînes sont longues, plus on se trouve, à une température donnée, dans un état organisé. Ceci est à mettre en parallèle avec l'augmentation continue des interactions hydrophobes chaîne/chaîne lorsque le nombre de carbones augmente, ce qui permet une meilleure stabilité du système sous forme gel à basse température. De plus, on peut également mettre en évidence un effet lié à la présence d'insaturations. On observe donc que pour une même longueur de chaînes, la présence d'une insaturation fait chuter largement la température de fusion du lipide. En effet, alors qu'une chaîne saturée va présenter, à une température donnée, une légère fluctuation du fait de l'agitation thermique et de la légère flexibilité que peut présenter une longue chaîne, le fait de lui ajouter une insaturation en milieu de chaîne va lui permettre, en raison d'arguments géométriques, d'occuper un volume plus important en désorganisant encore plus la bicouche. Ainsi, à une température donnée, la bicouche sera d'autant plus fluide qu'il y aura d'insaturations.

1.2.2. Modèles prédictifs de l'auto-assemblage.

1.2.2.a) Géométrie d'un auto-assemblage.

Il a été décrit, ci-dessus, qu'une molécule amphiphile peut s'auto-assembler, en milieu aqueux, afin de pouvoir donner différents types d'objets suivant la nature chimique de l'amphiphile. Concernant les lipides bicaténaires, il a été montré que la structure locale est généralement constituée d'une bicouche, c'est-à-dire un enchaînement de type têtequeue-queue-tête. En revanche, si la structure locale est donnée par ce motif au sein de la bicouche, il est difficile de connaître a priori la morphologie de l'objet formé, à l'échelle colloïdale. En effet, suivant la courbure que va prendre la bicouche, il est possible de former différents types de morphologies à plus grande échelle. Par exemple, si l'on considère une bicouche plane, on pourra imaginer la formation d'une structure anisotrope formée de plusieurs bicouches hydratées et parallèles entre elles. Il s'agira alors d'une phase lamellaire. Si l'on considère une bicouche courbée, on pourra imaginer un objet où la bicouche se referme sur elle-même, de manière à former une vésicule, à plus grande échelle. Les caractéristiques physiques des auto-assemblages peuvent donc, en partie, être expliquées par la courbure locale des bicouches. De même, si l'on considère un amphiphile monocaténaire, on constate expérimentalement qu'il s'auto-assemble en solution aqueuse de manière à former une monocouche d'amphiphiles. Cette monocouche se referme donc sur elle, à grande distance, afin de former un espace hydrophobe à l'intérieur de l'objet. Ce type d'auto-assemblage s'appelle une micelle.

Israelachvili énonce, en 1976, sa théorie ^{5,6} stipulant qu'un des paramètres essentiels conduisant à la formation de différentes morphologies supramoléculaires est la courbure locale de la bicouche ou de la monocouche d'amphiphiles. Celle-ci permet de prévoir la courbure du motif local en fonction des caractéristiques géométriques de l'amphiphile en considérant un amphiphile comme une brique de base, et dont l'empilement permet de

construire l'enchaînement constitutif de la bicouche ou de la monocouche. Ainsi, deux paramètres géométriques caractéristiques de l'amphiphile entrent en jeu : d'une part, la surface occupée par tête polaire, d'autre part, le nombre et la longueur des queues hydrophobes. On peut ainsi modéliser la molécule en question par un cône, dont la base représente la surface par tête polaire et dont la hauteur représente le volume hydrophobe dans lequel sont confinées les queues. De façon intuitive, on peut faire les considérations suivantes. Plus la tête est grosse et occupe une aire importante sur la surface de la bicouche, plus le cône sera large et la courbure de la bicouche ou de la monocouche importante. Plus les chaînes sont nombreuses ou longues, plus le cône sera haut et la courbure de la bicouche ou de la monocouche faible. Afin de pouvoir rendre à ces considérations un aspect quantitatif, on définit un paramètre appelé « paramètre d'empilement » (ou « packing parameter »), caractéristique d'un amphiphile donné, et donné FIGURE 1.24.

$$P = \frac{V_C}{a * l_C}$$

FIGURE 1.24 : Expression du paramètre d'empilement critique P en fonction du volume V_c réellement occupé par les chaînes hydrophobes, de la surface a occupée par tête polaire et de la longueur I_c des chaînes hydrophobes.

Le calcul du « paramètre d'empilement critique » (ou « critical packing parameter ») se fait en effectuant le ratio du volume réellement occupé par les chaînes hydrophobes avec le volume hydrophobe optimal obtenu en multipliant la surface de la tête polaire par la longueur des chaînes. Ce volume optimal peut donc être considéré comme le volume hydrophobe maximal qui serait occupé par les chaînes si la géométrie modélisant l'amphiphile était un cylindre. On constate donc que plus ce ratio prend une valeur faible devant 1, plus la géométrie modélisée prend une forme de cône ouvert. Ceci permet ainsi d'imaginer la formation spontanée d'objets où la monocouche, typiquement, sera très courbée, comme au sein d'une micelle. En revanche, plus ce ratio prend une valeur proche de 1, plus la géométrie modélisée prend une forme apparentée à un cylindre. Ceci permet d'imaginer la formation spontanée d'auto-assemblages où la bicouche, typiquement, sera plane, comme au sein de grandes vésicules ou d'une phase lamellaire. Une remarque importante est que la surface de la tête polaire n'est pas seulement une caractéristique géométrique de l'amphiphile seul, c'est surtout une mesure de l'aire occupée par la tête polaire au sein de l'auto-assemblage à l'équilibre. En effet, différents facteurs sont susceptibles d'influencer l'aire des têtes polaires en surface d'un objet supramoléculaire, tels que le solvant, les interactions intermoléculaires en jeu ou la température. Une molécule amphiphile donnée peut donc, suivant les conditions, s'auto-assembler en formant différents objets de morphologies variées, en raison de la variation de l'aire de la tête polaire à l'équilibre et donc du paramètre d'empilement. Le tableau FIGURE 1.25 regroupe les différentes valeurs pouvant être prises par le paramètre d'empilement critique et les différentes morphologies associées pour les auto-assemblages formés spontanément.

Amphiphile	Paramètre d'empilement critique (P)	Forme géométrique	Type d'organisation	Exemple de phase
Monocaténaire à large tête polaire	P < ½			Micelle directe
Monocaténaire de type non- ionique	P ≈ ½			Micelle globulaire Micelle allongée
Bicaténaire à large tête polaire	½ < P < 1			Vésicule Phase lamellaire flexible
Bicaténaire à tête polaire moyenne	P ≈ 1			Phase Iamellaire
Bicaténaire à petite tête polaire	P > 1			Micelle inverse

FIGURE 1.25 : Géométries et courbures spontanées observées pour différents types d'amphiphiles. Tableau inspiré de la thèse de Romain Bordes ^e

1.2.2.b) Thermodynamique de l'auto-assemblage.⁷

Comme introduit précédemment, l'enthalpie libre G (également appelée « énergie libre de Gibbs ») est un paramètre d'état intimement lié au potentiel chimique des molécules au sein d'un système. Pour cause, le potentiel chimique d'une espèce est également appelé « enthalpie libre molaire » de cette espèce. Cette fonction G est particulièrement utile pour quantifier la spontanéité d'un phénomène physico-chimique. Ainsi, si un évènement pousse une molécule à migrer ou à réagir spontanément de manière à minimiser son potentiel chimique, la variation d'énergie libre de Gibbs Δ G au cours de ce processus sera négative. Dans le cas d'une réaction chimique effectuée à une température donnée, la variation d'enthalpie libre Δ G est donc reliée directement à la constante d'équilibre de cette réaction et permet d'estimer le sens dans lequel la réaction est spontanée.

Il a été décrit, dans la partie précédente, que le phénomène d'auto-assemblage pouvait être expliqué, d'un point de vue thermodynamique, grâce aux potentiels chimiques d'une molécule amphiphile dans la phase continue aqueuse et au sein d'un auto-

^e Thèse de Romain Bordes, « Synthèse, physicochimie et polymérisation de tensioactifs paires d'ions dérivés du norbornène », Univ. Toulouse III, octobre 2007

assemblage. Par analogie avec un système classique, considérons de l'eau à une pression de 1 bar et à une température de 5°C. Dans ces conditions, les molécules d'eau ont un potentiel chimique inférieur lorsqu'elles se trouvent à l'état liquide. Ceci définit donc l'état standard de l'eau dans ces conditions de pression et de température. Cependant, si l'on diminue la température de manière isobare jusqu'à atteindre 0°C, on observe l'apparition d'une deuxième phase en équilibre avec la première à cette température précise. Dans ces conditions, les potentiels chimiques de l'eau en phases solide et liquide sont en effet égaux, ce qui définit donc des conditions relatives à un équilibre thermodynamique. Macroscopiquement, on observe donc une séparation de phases à 0°C, en raison du changement d'état observé de part et d'autre de la température de transition. Pour un système amphiphile au-delà de la concentration critique, la création d'une « microphase » (aussi appelée « pseudo-phase »), matérialisée par l'auto-assemblage, où les molécules verront leur potentiel chimique diminuer, pousse les amphiphiles à migrer spontanément du « bulk » vers les objets supramoléculaires. On parle ainsi du modèle de la séparation de micro-phases.

Thermodynamiquement, l'apparition d'une pseudo-phase nécessite un coût énergétique. Elle n'est donc favorable que si ce coût est moindre et si elle permet donc globalement à l'enthalpie libre de diminuer. Le modèle de Tanford ³, décrit FIGURE 1.26, permet ainsi de séparer la contribution liée à chaque phénomène intrinsèque à la formation d'un auto-assemblage à partir d'un système amphiphile infiniment dilué.

$$\left(\frac{\Delta\mu^{\circ}_{\ g}}{kT}\right) = \left(\frac{\Delta\mu^{\circ}_{\ g}}{kT}\right)_{transfert} + \left(\frac{\Delta\mu^{\circ}_{\ g}}{kT}\right)_{interface} + \left(\frac{\Delta\mu^{\circ}_{\ g}}{kT}\right)_{t\hat{e}te}$$

FIGURE 1.26 : Modèle de Tanford.

Le premier évènement à considérer est la contribution liée au transfert des amphiphiles du « bulk » vers l'auto-assemblage. Cette dernière étant favorable en raison de l'effet hydrophobe, elle constitue en outre le phénomène moteur de la formation d'objets supramoléculaires auto-assemblés. La variation d'enthalpie libre liée à cet évènement sera donc négative. La deuxième contribution à considérer est liée à la création d'une nouvelle interface entre l'objet supramoléculaire et l'eau, ainsi qu'à la présence résiduelle de molécules d'eau en contact avec les chaînes hydrophobes. Globalement, la formation d'une interface est à l'origine d'un coût énergétique défavorable et mène donc à une variation d'enthalpie libre positive au sein du processus d'auto-assemblage. Le troisième et dernier évènement s'accompagnant d'une contribution énergétique est la répulsion présente entre les têtes polaires au sein de l'objet. En « bulk », les amphiphiles sont suffisamment éloignés l'un de l'autre pour pouvoir s'ignorer relativement bien. La proximité imposée par l'autoassemblage force les têtes polaires à entrer en contact. Il en résulte donc une répulsion liée à un effet stérique évident, mais qui peut éventuellement s'accompagner d'une répulsion électrostatique si les têtes polaires sont chargées. Cette contribution étant donc défavorable pour le système, la variation d'enthalpie libre associée sera positive. En conclusion, chacun des évènements présentés précédemment est à l'origine d'une contribution énergétique permettant ainsi de rendre le processus global spontané ou non. La formation d'un autoassemblage présente donc plusieurs aspects défavorables pour le système, notamment un effet entropique liée à une organisation partielle, la gêne stérique imposée par la proximité des espèces auto-assemblées, et la présence résiduelle de molécules d'eau au sein de l'espace hydrophobe des auto-assemblages. Cependant, dans le cas où la formation d'objets supramoléculaires est spontanée, ces contributions sont compensées en raison de l'effet hydrophobe, constituant ainsi une participation favorable à l'auto-assemblage.

L'intérêt particulier du modèle de Tanford réside dans le fait de pouvoir prévoir, grâce à des aspects thermodynamiques, l'aire a_e par tête polaire au sein de l'autoassemblage, une fois l'équilibre atteint. Il a été expliqué, ci-dessus, que la surface par tête polaire a, pour un amphiphile donné, dépend des conditions et peut donc varier avec différents paramètres, menant ainsi à différents types d'auto-assemblages éventuels. De plus, on considère que le nombre d'agrégation g, représentant le nombre d'amphiphiles présents au sein d'un auto-assemblage, varie de manière inversement proportionnelle avec l'aire a par tête polaire. L'apport de Tanford consiste en une condition particulière sur l'enthalpie libre du système. Il énonce qu'à l'équilibre, cette fonction d'état doit prendre une valeur minimale à une valeur précise pour la surface par tête polaire a. Cette valeur a_e, permettant ainsi de minimiser l'énergie du système, va donc être celle que vont prendre spontanément l'ensemble des têtes polaires à la surface de l'auto-assemblage, à l'équilibre.

$$\frac{\partial}{\partial a} \left(\frac{\Delta \mu^{\circ}_{g}}{kT} \right) = 0 \quad \Rightarrow \quad \left(\frac{\sigma}{kT} \right) - \left(\frac{\alpha}{kT} \right) \cdot \frac{1}{a_{e}^{2}} = 0$$

FIGURE 1.27 : Condition de Tanford sur la minimisation de l'enthalpie libre pour a=a_e.

$$a_e = \left(\frac{\alpha}{\sigma}\right)^{1/2}$$

FIGURE 1.28 : Expression de la surface a_e par tête polaire à l'équilibre, d'après le modèle de Tanford.

Alors que la contribution du transfert ne dépend aucunement de la surface par tête polaire, les deux autres contributions en sont dépendantes. La contribution à l'enthalpie libre liée à la formation de l'interface, où les têtes polaires ont une surface a, s'écrit σ .a, avec σ la tension interfaciale liée à la présence de l'objet supramoléculaire dans l'eau. Cette dépendance s'explique par le fait que plus on augmente le nombre d'agrégation g d'un auto-assemblage, plus la surface a disponible par tête polaire diminue, et moins il y a de contacts défavorables entre les molécules d'eau résiduelles et les chaînes hydrophobes. Ainsi, la contribution à l'enthalpie libre diminue et devient donc de moins en moins défavorable. Cet effet tend donc à favoriser la croissance de l'auto-assemblage. La contribution à l'enthalpie libre liée à la répulsion des têtes de surface a, s'écrit α/a , avec α un paramètre lié à la force de la répulsion entre les têtes polaires en surface de l'auto-assemblage. Cette dépendance

en 1/a a été proposée par Tanford, puisque plus on diminue le nombre d'agrégation g d'un auto-assemblage, plus la surface a disponible par tête polaire augmente, et plus on évite la gêne stérique et les éventuelles interactions répulsives entre têtes polaires. Ainsi, la contribution à l'enthalpie libre diminue et devient donc de moins en moins défavorable. Cette dernière tend donc à limiter la croissance de l'auto-assemblage. En dérivant chaque contribution par rapport à la surface par tête polaire a, le modèle de Tanford permet donc de mener à une expression de la surface prise par chaque tête polaire au sein d'un autoassemblage à l'équilibre, dépendant ainsi essentiellement de la tension interfaciale et du paramètre de répulsion des têtes polaires.

L'inconvénient majeur de l'approche de Tanford est qu'elle ne tient compte que de la tête polaire de l'amphiphile. En revanche, il a été vérifié expérimentalement que la longueur et le nombre des chaînes grasses, comme énoncé par Israelachvili, influence également la courbure spontanée prise par une bicouche lipidique, et donc le phénomène d'autoassemblage de manière générale. Il faut donc davantage considérer le modèle du paramètre d'empilement d'Israelachvili et le modèle de l'énergie libre de Tanford comme deux approches complémentaires, plutôt que deux approches se suffisant l'une à l'autre.

1.2.3. Comportements en solution aqueuse : les cristaux liquides

lyotropes.

1.2.3.a) Analogie avec les cristaux liquides.

En 1888, Friedrich Reinitzer, un botaniste autrichien, remarqua que la fusion du benzoate de cholésterol à 145°C donnait lieu à l'apparition d'un liquide d'apparence trouble, qui ne devenait translucide qu'à partir de 179°C. Peu de temps après, le physicien allemand Otto Lehmann mis en évidence⁸, pour ce liquide trouble, des propriétés optiques particulières impropres aux liquides classiques, mais jusqu'à maintenant observées pour des états cristallins. On énonce généralement que la matière peut se trouver sous trois états physiques, caractérisés chacun par leurs propriétés macroscopiques et moléculaires : l'état solide, l'état liquide et l'état gazeux. Tandis qu'un matériau solide possède une forme propre et une structure moléculaire très ordonnée et compacte, un système liquide peut s'adapter à la forme du contenant grâce à sa structure moléculaire beaucoup plus désorganisée et libre. Il existe cependant des états intermédiaires entre le solide et le liquide, qui sont susceptibles de présenter des comportements propres aux deux états physiques. Ces systèmes particuliers sont regroupés sous le nom général de « matière molle » et suscitent de l'intérêt, en recherche fondamentale, à l'égard de la compréhension de la structure et des mécanismes aboutissant à ce type d'état. En particulier, on peut trouver dans la Nature des espèces présentant des propriétés caractéristiques de l'état liquide, comme la viscosité à l'échelle macroscopique et une dynamique liquide, à l'échelle moléculaire, dans au moins une des directions de l'espace, mais également des propriétés solides à l'échelle moléculaire en raison d'une organisation locale, dans au moins une des directions de l'espace. De ce fait, ce type de système constitue un état intermédiaire entre l'état cristallin, parfaitement organisé, et l'état liquide, parfaitement désordonné. On qualifie par conséquent cet état de « cristal liquide ». Il est important de noter que les objets présentant une orientation en phase cristal liquide peuvent être soit des molécules seules, soit des objets de plus grosse taille, supramoléculaires ou colloïdaux. On leur donne l'appellation générale de « mésogènes ».

Le terme « cristal liquide » (CL) regroupe, en fait, plusieurs types de phases, intermédiaires entre l'état liquide et l'état solide, et qualifiées de « mésophases ». Il est possible de les différencier les unes des autres grâce à leur structure physique. Elles ne sont pas nécessairement toutes présentes pour un mésogène donné, mais l'ensemble des mésophases observées couramment s'organise généralement des états les moins confinés, et donc les plus proches de l'état liquide, vers les états les plus confinés, et donc les plus proches de l'état solide. Elles diffèrent donc par leurs degrés de liberté et par leur ordre d'orientation et de position dans les différentes directions de l'éspace.



FIGURE 1.29 : Représentation schématique des mésophases les plus communes obtenues pour un système CL.

Dans l'ordre présenté FIGURE 1.29, on retrouve la phase isotrope, caractérisée par un désordre total à l'échelle moléculaire, caractéristique de l'état liquide. Puis la phase nématique, qui gagne un ordre d'orientation des mésogènes les uns par rapport aux autres, et donc caractérisée par une anisotropie dans une direction de l'espace. Ensuite, on trouve la phase smectique, qui, en plus de posséder un ordre d'orientation, présente un ordre de position, ce qui permet de mettre en évidence des couches smectiques, et donc une organisation de type 1D. Parfois, on retrouve ensuite la phase colonnaire, caractéristique d'un état très organisé, et où le système conserve son anisotropie 1D, mais perd la présence des couches smectiques, menant ainsi à de longs bâtonnets constitués des mésogènes alignées les uns avec les autres. Même si cette mésophase présente une organisation quasicristalline, la distance entre les colonnes fluctue et ne permet donc pas de définir une périodicité 3D. Finalement, on arrive ensuite à l'état solide, totalement cristallin, où le système est parfaitement organisé et ne bénéficie plus du tout de la dynamique propre à l'état liquide de par son ordre 3D à grande distance. Afin de pouvoir passer d'une phase CL à l'autre, pour un composé mésogène, on définit un « paramètre d'état ». En faisant varier celui-ci, il est donc possible de couvrir l'ensemble des phases CL présentes pour un composé donné. Sur cette base, on distingue deux classes de cristaux liquides : les thermotropes et les lyotropes. Les composés thermotropes sont capables de présenter des transitions entre mésophases en fonction de la température. Il s'agit d'une propriété présente essentiellement pour un composé pur. Le caractère lyotrope est plutôt observé pour des mésogènes en solution. Ces espèces sont susceptibles de présenter des transitions de phase en fonction de la température également, mais surtout en fonction de la concentration en mésogène, ce qui constitue alors les deux paramètres d'état. La présence de molécules de solvant au sein des systèmes lyotropes leur confère alors une fluidité absente dans les systèmes thermotropes, ainsi qu'une variété de mésophases potentiellement observables ⁹.

Les cristaux liquides ont vu leurs champs d'applications exploser depuis la mise au point de la technologie d'affichage relative aux écrans LCD (« Liquid Crystal Display »). L'intérêt particulier de l'état CL se trouve dans la diversité de leurs comportements, par exemple face à une contrainte soumise au système. On peut ainsi trouver, parmi certaines espèces présentant des phases CL, un effet piézoélectrique que l'on définit comme l'apparition d'un courant électrique généré par l'application d'une contrainte mécanique ¹⁰, ou bien un effet Kerr caractérisé par l'apparition d'une orientation créée en appliquant un champ électrique ¹¹. Cette dernière propriété est d'ailleurs celle qui est exploitée dans les écrans LCD. En présence d'un champ électrique imposé à une phase CL, une orientation des mésogènes survient au sein de l'échantillon et mène ainsi à une modification des propriétés optiques du système. De manière générale, la structure des mésophases peut être caractérisée à l'aide de leurs propriétés optiques. La présence d'une anisotropie intrinsèque au degré d'ordre qui y est présent leur confère un comportement biréfringent. Un tel système possède deux indices de réfraction différents dans deux directions de l'espace. Ceci implique qu'une onde lumineuse incidente polarisée qui entre dans un tel matériau est capable de se réfracter en donnant naissance à deux ondes, voyageant à des vitesses de propagation différentes dans deux directions de l'espace. De plus, une des deux ondes présente une polarisation différente de l'onde incidente. On peut donc observer les différentes mésophases par microscopie optique à lumière polarisée, en travaillant entre polariseur et analyseur croisés. La texture obtenue est caractéristique du type de mésophase en présence. A titre d'exemple, si la lumière utilisée est de longueur d'onde comparable à la périodicité observée entre deux couches d'une phase smectique, un phénomène de diffraction peut être observé et donnera naissance à une texture particulière, présentant une succession de lignes horizontales périodiques, spécifique à ce type de mésophase. Ainsi, il est possible, pour les mésogènes utilisés dans l'affichage LCD, de générer l'apparition d'une texture optique par simple application d'un champ électrique et donc orientation instantanée des mésogènes, conduisant ainsi à une transition de type isotrope/nématique.

1.2.3.b) Caractère lyotrope des phospholipides.

Les CL lyotropes doivent être constitués d'un mésogène en solution, de manière à présenter au moins une mésophase. Le type de phase observé varie en fonction de la concentration en mésogène, mais est également susceptible de varier avec la température. De plus, comme précisé ci-dessus, la présence du solvant n'est pas anodine. Il dilue la phase

CL en présence et participe à l'organisation du matériau en procurant une fluidité au système. Dans le cas d'un solvant aqueux, et afin de permettre la création d'un ordre local au sein d'une éventuelle mésophase, il est nécessaire de choisir un soluté qui peut potentiellement présenter des propriétés d'auto-assemblage. C'est ainsi que les solutions d'amphiphiles constituent une des catégories les plus courantes de CL lyotropes. De ce fait, les propriétés d'auto-assemblage des phospholipides, par exemple, décrites dans la partie précédente, sont affectées par la concentration en mésogène. Pour la suite, les différentes considérations sur un tel système lyotrope seront toujours faites sur un mésogène de type phospholipide et dans un solvant aqueux. Dans ces conditions, la mésophase en présence sera systématiquement désignée par le terme équivalent « auto-assemblage ».

Quand on regarde la constitution d'une phase auto-assemblée, telle qu'une vésicule ou une phase lamellaire, on comprend que les molécules d'eau font partie intégrante de la phase de type CL, et donc que sa proportion, reliée également à la fraction volumique en phospholipide, est un paramètre crucial pour définir le type d'auto-assemblage en présence. Il est possible de représenter graphiquement la nature des différents auto-assemblages formés, en fonction de la gamme de concentration et de la température dans laquelle le système se trouve. Pour ceci, on utilise un diagramme de phases permettant de repérer les domaines de stabilité de chaque phase en fonction de la température, en ordonnée, et de la fraction volumique en phospholipide ou bien de la pression, ayant un rôle direct sur le confinement du système, en abscisse. Le diagramme de phases typique d'un phospholipide est donné FIGURE 1.30.



FIGURE 1.30 : Diagramme de phases typique d'un système lyotrope de type phospholipide. Image tirée du site internet « www.whatislife.fr » ⁶.

On met en évidence, quelque soit le phospholipide considéré, une transition de type isotrope/nématique lorsque l'on dépasse la concentration critique en amphiphile. En effet, on passe d'un état désordonné où les molécules sont toutes totalement libres en solution, à

⁶ http://www.whatislife.com/reader2/biophysics/Thermodynamics.htm

un état présentant un ordre d'orientation et où les molécules forment une constitution locale de type bicouche (ou monocouche) au sein de vésicules (ou de micelles). Au-delà d'une concentration suffisamment grande en mésogène, le confinement de plus en plus important du système contraint souvent les objets à présenter une transition vers une phase lamellaire. associer cette transition de phase à On peut une transition nématique/smectique. Effectivement, une phase lamellaire lipidique présente, tout comme une phase smectique, des amphiphiles jouant le rôle de mésogène, organisés suivant un ordre d'orientation et de position, et dont les bicouches hydratées sont séparées entre elles d'une distance périodique pouvant être apparentée au pas smectique d'une phase CL. Une dernière particularité du diagramme de phases, pouvant être développée, est la présence, quelque soit le type de phospholipide considéré ici encore, d'une transition en température entre deux mésophases, illustrant également l'effet du paramètre « température » sur de tels systèmes. Il s'agit, plus précisément, d'une transition de type L_{α}/L_{β} pour une phase lamellaire, où les chaînes aliphatiques du lipide passent d'un état fluide à un état gel au sein de la bicouche, de part et d'autre de la température de transition gel/fluide.

Cet exemple de diagramme de phases permet d'illustrer la richesse du comportement d'un système amphiphile en solution aqueuse. Par ailleurs, la complexité et la structure des phases auto-assemblées, pouvant être formées en fonction de paramètres tels que la fraction volumique et la température, permet d'effectuer un rapprochement étroit avec les mésophases d'un système de type cristal liquide.

1.3 Les lipides nucléotides (ou nucléolipides).

1.3.1. Acides nucléiques : structure et interactions faibles.

1.3.1.a) Structure d'un monobrin d'ADN.

Les acides nucléiques font partie des grandes catégories de molécules constituant les êtres humains et décrites par la biologie structurale, au même titre que les glucides, les protéines et les lipides ¹². D'un point de vue moléculaire, elles consistent en une chaîne linéaire formée par l'assemblage de briques de base, appelées « nucléotides ». Ces nucléotides sont, eux-mêmes, constitués par l'association d'un à trois groupements phosphate, d'un sucre cyclique oxygéné à cinq carbones de type pentose, et d'une base azotée. L'ensemble du sucre et de la base azotée est couramment appelée « nucléoside ».



FIGURE 1.31 : Structures moléculaires d'un nucléoside et des différents nucléotides dérivés.

Un nucléotide peut donc être considéré comme un nucléoside phosphorylé. La d'acide nucléique, structure moléculaire d'un monobrin également appelé « polynucléotide », est donc formée d'unités nucléotides liées entre elles. Cet enchaînement macromoléculaire peut également être décrit comme une succession de nucléosides liés grâce à des groupements phosphate. Du point de vue de la nomenclature, ces acides phosphoriques complexes sont liés, au sein d'un brin d'acide nucléique, via leurs groupements phosphate, pour former un polyester phosphorique complexe. Cependant, ces groupes phosphates peuvent potentiellement faire le lien entre différentes positions sur le sucre des deux nucléotides voisins. C'est pourquoi les cinq carbones de l'ose sont numérotés de 1' à 5' en partant de l'oxygène. Ceci permet ainsi de connaître la position relative de chaque substituant phosphorylé sur le sucre d'un nucléotide. A titre d'exemple, on peut parler du nucléotide-3'-monophosphate et du polynucléotide-3'-5'-monophosphate.

Au sein d'un monobrin d'acide nucléigue, c'est la base azotée qui porte l'information génétique relative à chaque nucléotide. Elles sont au nombre de quatre : l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G). On distingue les bases azotées de type pyrimidine, comme la thymine et la cytosine, des bases azotées de type purine, comme l'adénine et la guanine. Le motif purique est un bicycle constitué lui-même de deux groupements pyrimidine et imidazole accolés. La combinaison des différentes bases dans une séquence d'acide nucléique, appelée « gène », permet alors de transmettre une information génétique particulière. Selon leur rôle biologique, il peut exister plusieurs types d'acides nucléiques dans l'organisme : notamment l'ADN, ou acide désoxyribonucléique, et l'ARN, ou acide ribonucléique. La différence structurale vient du fait que le ribose, constituant le sucre des unités nucléotides, peut être décrite par le suffixe « désoxy » lorsque le groupement alcool, typiquement en position 3', est absent pour être substitué par un simple hydrogène. De plus, il existe une légère différence entre l'ADN et l'ARN en termes de bases azotées. En effet, la thymine, pouvant être présente dans une séquence d'ADN, est remplacée par une nouvelle base azotée, l'uracile (U), au sein de la séquence d'ARN correspondante, durant le processus de transcription. D'un point de vue moléculaire, les deux bases azotées sont équivalentes, la seule différence étant la présence, pour la thymine, d'un groupement méthyle additionnel sur le cycle aromatique.



FIGURE 1.32 : Structures moléculaires des quatre bases azotées présentes dans l'ADN.

De manière générale, un acide nucléique, ADN ou ARN, constitué d'un faible nombre de nucléotides pouvant aller d'une dizaine à une centaine d'unités, est appelé « oligonucléotide ». Par ailleurs, dans le cas où l'ensemble des bases azotées présentes sur toute la séquence sont identiques, on parlera de « polynucléotide modèle » (ou « d'oligonucléotide modèle » dépendant du nombre d'unités présentes dans la séquence). A titre d'exemple, on pourra trouver le poly(A), ou acide polyadénylique, ou bien le poly(U), ou acide polyuridylique.

D'un point de vue biologique, les acides nucléiques sont essentiels au fonctionnement général de l'organisme. Cependant, chaque type d'acide nucléique a un rôle particulier à jouer. Ainsi, alors que l'ADN constitue le support du message génétique conservé dans le noyau cellulaire et répliqué au cours de la division cellulaire, l'ARN intervient dans la synthèse des protéines au cours du phénomène de traduction, en étant converti en une séquence d'acides aminés.

1.3.1.b) Structure en double hélice de l'ADN.

En 1953, Francis H. Crick et James D. Watson découvrirent la structure de l'ADN natif en proposant un modèle moléculaire inédit ¹³. L'originalité vint du fait qu'ils ne se basèrent sur aucun fait expérimental nouveau, mais plutôt sur une reconsidération de tous les faits connus jusqu'alors à l'époque. La structure qu'ils proposèrent est représentée sous la forme de deux monobrins hélicoïdaux, de pas 3,4 nm, enroulés autour d'un même axe et maintenus liés de manière non covalente. Dans cette géométrie, les nucléotides des deux monobrins sont appareillés deux à deux de manière complémentaire. La structure en double brin de l'ADN est à distinguer de la structure en monobrin de l'ARN. Dans cette dernière, les nucléotides complémentaires qui interagissent ensemble font partie de la même séquence, et mènent donc à un repliement de la chaîne d'ARN, et à une configuration 3D de type multiépingle à cheveux ou multi-tige boucle, propre à chaque séquence ¹².



FIGURE 1.33 : Image 1 : Vision d'artiste de la structure en double hélice de l'ADN (bleu : C, jaune : G, vert : T, rouge : A). Image tirée du site internet « www.dnareplication.info »⁷. Image 2 : Modélisation de la structure 3D d'un motif en « épingle à cheveux » d'une séquence d'ARN. Image inspirée de l'article « Dynamic Behavior of the Telomerase RNA Hairpin Structure and Its Relationship to Dyskerastosis Congenita »⁸

De manière générale, on peut caractériser un acide nucléique quelconque par sa masse moléculaire, son nombre de bases et sa longueur. La masse moléculaire d'une macromolécule telle qu'un acide nucléique est généralement exprimée en Dalton (Da). C'est une unité adaptée aux espèces biologiques et qui équivaut à 1 g/mol. La masse moléculaire d'un polynucléotide dépend de sa composition précise en différentes bases azotées, ainsi que de sa longueur totale. Il est possible de l'estimer par la technique de l'électrophorèse. En ce qui concerne le nombre de bases présentes dans un monobrin d'ARN, on trouve entre 50 et 5000 bases. En revanche, pour un double brin d'ADN, on peut dénombrer entre 5000 et plus de 100 millions de paires de bases. Ce nombre varie suivant le type d'acide nucléique considéré et l'espèce dont celui-ci est issu. Typiquement, l'ADN humain comporte 3,2 milliards de paires de bases sur l'ensemble du génome. Puisque l'on compte 46 chromosomes humains, on en déduit une longueur caractéristique de 70 millions de paires de bases azotées par double brin d'ADN humain. De plus, sachant que deux bases consécutives sont espacées de 0,34 nm au sein d'un brin d'acide nucléique, s'il était possible de déplier l'ensemble de l'ADN issu d'une cellule humaine, on observerait un brin d'une longueur de 2,2 mètres. A l'état natif, comme toute macromolécule, les acides nucléiques se trouvent cependant sous une forme extrêmement condensée, la chromatine, en raison d'interactions intramoléculaires stabilisatrices responsables des structures secondaire et tertiaire de la molécule.

Par ailleurs, Watson et Crick ont mis en évidence une telle structure en double hélice droite, pour le double brin d'ADN, notamment en raison de l'interaction complémentaire des bases azotées deux à deux. En effet, on sait désormais que la structure moléculaire d'une base thymine lui permet d'interagir spécifiquement avec une base adénine. En généralisant, on observe toujours les doublets A-T et G-C, en interaction de part et d'autre de la structure hélicoïdale. De plus, ces liaisons n'étant pas covalentes, la forte cohésion des deux brins de l'ADN est essentiellement expliquée par la quantité et l'intensité relative des

⁷ www.dnareplication.info/dnadoublehelix.php

⁸ Y.G. Yingling, B.A. Shapiro, Journal of Molecular Biology, 348, 27-42, 2005

interactions faibles entre bases azotées complémentaires. La nature de ces dernières a d'ailleurs été largement caractérisée.

De très nombreux travaux ¹⁴ ¹⁵ ¹⁶ ¹⁷ avancent l'existence de liaisons hydrogène, responsables en grande partie de la cohésion entre bases azotées au sein de la structure en double brin de l'ADN. En effet, l'ordre de grandeur de 2 nm pour le diamètre de la structure hélicoïdale, ainsi que l'orientation des bases azotées le long des deux brins, permet aux unités complémentaires d'interagir deux à deux via une interaction hydrogène, à très courte portée et de manière directionnelle.

Il a également été suggéré ¹⁸ que la cohésion de l'édifice hélicoïdal pourrait, en partie, être expliquée par la présence de π - π stacking en raison de la structure aromatique des bases azotées. Développons le cas des bases thymine et adénine. La thymine est une base pyrimidique. Si l'on compte les deux électrons π issus de sa liaison C=C, ainsi que les quatre électrons non liants issus de ses deux azotes, on dénombre 6 électrons délocalisables. D'après le critère d'aromaticité de Hückel, on peut donc prétendre que la thymine est aromatique. L'adénine est une base purique. En suivant le même type de raisonnement que pour la thymine, cette dernière inclut les huit électrons π issus de ses quatre liaisons C=C, ainsi que deux électrons délocalisables. D'après le critère d'aromaticité de Hückel, on peut donc prétendre que la thymine est aromatique deux électrons non liants issus de l'azote de son groupe imidazole, dans son système π d'électrons délocalisables. D'après le critère d'aromaticité de Hückel, on peut donc prétendre que l'adénine est également aromatique. On peut, en réalité, étendre cette démarche à l'ensemble des quatre bases azotées afin de montrer qu'elles sont toutes aromatiques, et donc que l'interaction des doublets A-T et G-C contient une composante de type π - π stacking.

Il semble donc correct de dire que la forte cohésion de la structure en double hélice de l'ADN est due à la présence d'interactions, certes non covalentes, mais spécifiques et de différentes natures, comme l'interaction hydrogène et l'interaction aromatique. De plus, même si un doublet de bases azotées est engagé dans une interaction d'intensité relativement faible, le grand nombre d'interactions faibles observées sur la totalité du double brin permet d'expliquer la cohésion particulièrement importante pour cette structure.

1.3.1.c) Mise en évidence de l'interaction hydrogène entre nucléotides.

Il a été énoncé, dans la littérature, la possibilité d'étudier la présence de liaisons hydrogène engagées par des bases thymine et adénine. L'interaction hydrogène peut, en effet, être étudiée par spectroscopie IR, via la modification de la fréquence pour un mode de vibration donnée d'une liaison impliquée dans l'interaction. Cette caractérisation a déjà été décrite dans la littérature pour les systèmes thymine et adénine ¹⁹, et cette étude doit donc être adaptée à la structure chimique de la molécule concernée par la liaison hydrogène. De plus, une caractérisation plus précise de la configuration des deux bases au sein du doublet a

déjà été décrite, et peut être effectuée par RMN, en suivant l'augmentation du déplacement chimique des atomes de la molécule engagés dans l'interaction hydrogène ²⁰.

Afin de repérer la présence d'une liaison hydrogène dans un doublet de bases, il est important d'avoir une idée primaire de la configuration dans laquelle se placent les deux bases. En effet, ceci va permettre d'identifier les atomes ou liaisons concernés par l'interaction, et qui serviront donc à la mettre en évidence. *A contrario*, il est aussi possible d'utiliser ces techniques de caractérisation afin d'étudier la configuration précise en présence, à l'aide de la modification des propriétés physiques de certains atomes ou liaisons particulières, telles que le déplacement chimique ou la fréquence de vibration. De manière générale, l'affinité particulière des bases pyrimidiques pour les bases puriques peut s'expliquer par le fait que leur structure leur permet de former deux liaisons hydrogène au sein d'un doublet A-T et trois liaisons hydrogène au sein d'un doublet G-C. Néanmoins, suivant l'orientation relative des deux bases azotées placées en vis-à-vis, leur structure complexe leur permet de pouvoir interagir suivant différents types de configuration.

La plus courante est également celle que l'on retrouve au sein de la structure en double hélice de l'ADN, et, par conséquent, appelée « Watson-Crick ». Dans le cas du doublet A-T, elle consiste en une interaction, respectivement, du carbonyle en position 2 et de l'azote en position 3 chez la thymine, avec l'azote en position 1 et l'azote primaire en position 6 chez l'adénine. On peut également, dans d'autres conditions, retrouver un doublet A-T présentant une configuration différente. Par exemple, la configuration de type « Hoogsteen » permet au groupement imidazole de l'adénine d'être impliqué dans l'interaction. Plus précisément, elle consiste en une interaction, respectivement, du carbonyle en position 4 et de l'azote en position 3 chez la thymine, avec l'azote en position 7 et l'azote primaire en position 6 chez l'adénine. De manière similaire, si l'on retourne la thymine sur elle-même, on peut imaginer une interaction, respectivement, du carbonyle en position 2 et de l'azote en position 3 chez la thymine, toujours avec l'azote en position 7 et l'azote primaire en position 6 chez l'adénine. Par analogie avec la configuration précédente, ceci justifie l'appellation de « reverse Hoogsteen ». La prépondérance d'une configuration par rapport aux autres est généralement justifiée en raison d'aspects géométriques. Puisque le nombre d'interactions hydrogène stabilisatrices est le même quelque soit le type de conformation en présence, on doit alors faire appel à un autre type d'argument pour comparer les configurations entre elles. Suivant les contraintes géométriques imposées par l'environnement chimique des deux nucléotides, l'orientation relative des chaînes latérales liant les bases azotées au reste du nucléotide ne peut pas être arbitraire comme si les deux bases étaient libres en solution. Ainsi, la contrainte de l'environnement imposée par l'orientation préférentielle des groupements entre eux, et des chaînes latérales en particulier, rend généralement une des configurations plus favorable que les autres, comme la configuration « Watson-Crick » au sein de la structure en double hélice de l'ADN.



FIGURE 1.34 : Configuration des différents appariements A-T, resp. Watson-Crick, Hoogsteen, Reverse Hoogsteen.

Lorsque la thymine réalise une interaction hydrogène, et ceci quelque soit la configuration du doublet de bases, on s'attend à ce qu'elle engage dans la liaison un de ses deux groupements carbonyles, jouant le rôle de base de Lewis, ainsi que l'amide en position 3, jouant le rôle d'acide de Brønsted. En spectroscopie IR, la vibration d'élongation de la liaison N-H d'une amide est difficilement exploitable. Certes, sa fréquence de vibration est sensée se déplacer vers les plus faibles valeurs, en raison de la stabilisation de la liaison si celle-ci devient liée par liaison hydrogène, mais le signal correspondant est relativement large en raison du caractère labile du proton, ce qui empêche une indexation suffisamment précise. Cependant, on peut s'intéresser à la vibration d'élongation de la liaison carbonyle. On prévoit ainsi la présence d'un pic étroit par liaison carbonyle existant dans la molécule dans la région 1550-1800 cm⁻¹. La littérature ¹⁹ décrit cependant l'apparition d'un pic supplémentaire, vers les fréquences les plus élevées, pour chaque liaison hydrogène engagée par un carbonyle donné avec un partenaire donné. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence, dans le système, de deux types de liaisons pour un carbonyle donné. Premièrement, le carbonyle libre vibrant à sa fréquence initiale, mais également le carbonyle lié par interaction hydrogène, jouant le rôle de base de Lewis et qui voit donc sa fréquence de vibration augmenter du fait de l'appauvrissement de sa liaison. A titre d'exemple, un carbonyle pouvant potentiellement se lier à deux molécules différentes, via une interaction hydrogène, apparaîtra sous la forme de trois pics dans cette région du spectre. Puisqu'il est possible, pour un tel carbonyle, d'interagir via une liaison hydrogène avec une molécule d'eau issue du solvant, un moyen de vérifier cette théorie est de formuler le système dans de l'eau lourde D₂O, afin de modifier la fréquence de vibration liée à l'interaction C=0.....D₂O ²¹. Ainsi, on doit normalement constater la disparition du pic relatif à cette interaction de la zone d'intérêt du spectre. Ce phénomène peut être expliqué, lui aussi, à l'aide du modèle de Hooke (voir CH.2).

Lorsque l'adénine réalise une interaction hydrogène, et ceci quelque soit la configuration du doublet de bases, on s'attend à ce qu'elle engage dans la liaison un de ses deux azotes aromatiques en positions 1 ou 7, jouant le rôle de base de Lewis, ainsi que l'amine primaire en position 6, jouant le rôle d'acide de Brønsted. En spectroscopie IR, et pour les mêmes raisons que celles développées pour la thymine, la vibration d'élongation de la liaison N-H de l'amine primaire est difficilement exploitable. Une alternative utilisée dans la littérature est d'exploiter les modifications de la fréquence de vibration de cisaillement NH₂ de l'amine primaire, nécessairement engagée dans la liaison hydrogène si celle-ci existe. Il aurait été *a priori* envisageable d'utiliser également les vibrations d'élongation des liaisons

carbone-azote présentes dans le centre aromatique afin de détecter un shift. L'adénine constitue une structure qui présente plusieurs liaisons (C-N, C-C, C=N, C=C) de fréquences de vibration d'élongation similaires, qui en plus, sont conjuguées dans la même partie de la molécule. Ces conditions font que chaque liaison ne va pas vibrer suivant une fréquence indépendante des autres, comme en mode classique dit « mode normal », mais un pic particulier de cette région du spectre est corrélé à la vibration de plusieurs de ces liaisons couplées ensemble ²². Ce mode est donc appelé « mode couplé ». Généralement, les vibrations d'élongation de ces liaisons ne présentent qu'un faible intérêt pour la détection d'une potentielle interaction hydrogène. En effet, toutes ces liaisons seraient attendues dans la région des « empreintes digitales », ce qui empêcherait toute indexation fiable, et de plus, l'existence du mode couplé gêne la possibilité de relier le shift d'un pic à la modification de la fréquence de vibration d'une liaison particulière. Cependant, dans le cadre de la caractérisation d'une interaction hydrogène engagée par l'adénine, l'avantage majeur vient du fait qu'un des trois pics majeurs couplés apparaissant dans la zone 1500-1700 cm⁻¹ est majoritairement lié à la vibration de cisaillement du groupe NH₂. Le shift éventuel de ce pic vers les hautes fréquences permet donc de mettre en évidence une augmentation de l'interaction hydrogène engagée par l'adénine. La référence étant typiquement un système présentant un groupement adénine libre, où toute interaction hydrogène est donc absente. La vibration de cisaillement du groupement NH₂ d'un tel système a donc la fréquence la plus faible qu'il est possible de présenter. Toute contribution de type liaison hydrogène va donc contribuer à déplacer ce signal vers les hautes fréquences. Tout comme pour la thymine, la littérature décrit la possibilité de formuler un tel système dans l'eau lourde D₂O²³. L'effet sera de deutérer l'amine primaire, qui verra donc sa fréquence de vibration d'élongation et de cisaillement varier. Une conséquence directe sera la rupture du mode couplé pour le groupement ND₂, en raison du fait que ses fréquences de vibration ne sont maintenant plus comparables aux fréquences de vibration typiques du cycle aromatique de l'adénine. L'allure du spectre change donc radicalement, dans cette région, mettant ainsi en évidence le couplage de l'amine primaire avec le reste de l'adénine.

1.3.1.d) Mise en évidence du π - π stacking entre nucléotides.

Comme décrit auparavant, il existe un deuxième type d'interaction ayant été suggéré entre deux bases complémentaires, telles que la thymine et l'adénine. Il s'agit de l'interaction aromatique, également appelée π - π stacking. Nous avons vu, plus haut, que les bases puriques et pyrimidiques pouvaient être considérées comme aromatiques, du point de vue de Hückel. De plus, il a également été décrit que la spectroscopie UV est un bon moyen d'étudier la présence de π - π stacking.

Pour étudier cette composante d'interaction au sein d'un système auto-assemblé constitué de dérivés de la thymine, il est nécessaire d'effectuer deux mesures. Une première mesure est d'abord faite, où l'on mesure l'absorbance UV dans les conditions dans lesquelles on veut mettre en évidence l'interaction aromatique de type base-base. Ensuite, dans les mêmes conditions de concentrations, on doit effectuer une mesure du même système non assemblé. Dans ce cas, une mesure d'absorbance UV sur une solution de thymidine suffit. En

effet, dans le domaine UV, c'est la base azotée qui absorbe majoritairement le rayonnement. Quelque soit la base azotée, le maximum d'absorbance UV est toujours aux alentours de 260 nm. Le groupement phosphate est également actif en UV, mais à plus faible dose, son maximum d'absorption étant situé vers 230 nm. Si on prépare une solution contenant simplement la base azotée, comme par exemple une solution du nucléotide associé, tout auto-assemblage sera alors évité. Ceci peut s'expliquer en raison du fait que chaque molécule sera recouverte de molécules d'eau, écrantant ainsi l'interaction intermoléculaire éventuelle qui pourrait être mise en place. On retrouve ainsi, de l'échantillon avec et sans auto-assemblage, la même concentration de l'espèce active en UV, c'est-à-dire le même motif possédant donc un coefficient d'extinction molaire donné. Au niveau de la longueur d'onde d'absorbance maximale, l'effet hypochromique observé entre l'échantillon contenant les bases auto-assemblées et l'échantillon contenant les bases libres, à la même concentration, permet donc de conclure sur la présence d'une interaction aromatique basebase ²⁴.

Cette méthode présente l'avantage qu'elle peut être utilisée de la même manière, quelque soit la base azotée d'intérêt où le type d'auto-assemblage en présence (doublet base-base dans l'ADN, interaction intermoléculaire base-base au sein d'un objet autoassemblé). Cependant, même si cette méthode permet une approche un peu plus quantitative que la spectroscopie IR qui permet de mettre en évidence la présence d'interaction hydrogène entre bases, elle reste semi-quantitative dans la mesure où elle ne permet pas de remonter à une mesure précise de l'intensité de l'interaction impliquée au sein du système.

1.3.2. Les lipides nucléotides (ou nucléolipides).

1.3.2.a) Généralités.

Il existe un système bénéficiant à la fois des propriétés du lipide et du nucléotide. Il s'agit d'une structure hybride amphiphile, appelée « lipide nucléotide » ou « nucléolipide », et dont la tête polaire est constituée d'un groupe nucléotide. L'intérêt majeur de ce type de molécule est qu'elle peut mener à la formation spontanée d'auto-assemblages en milieu aqueux, en raison de l'effet hydrophobe créé par la présence de ses chaînes aliphatiques. De plus, le choix particulier de la tête polaire peut être justifié par le fait que l'on s'attend à former des interactions faibles, et éventuellement spécifiques, telles que des liaisons hydrogène ou des interactions de type π - π stacking, avec un partenaire, via cette tête polaire. En jouant sur la nature chimique du nucléotide, on est donc amené à imaginer former des interactions intermoléculaires qui, à terme, pourront être contrôlées et dont le mécanisme d'action pourra être compris. La littérature présente un grand nombre de travaux effectués sur ces systèmes et montre, notamment, que leur comportement peut être extrêmement varié et ne saurait se réduire simplement aux propriétés d'auto-

assemblage d'un lipide et aux propriétés de reconnaissance moléculaire d'un nucléotide, pris indépendamment.

A l'état naturel, on a pu mettre en évidence la présence de plusieurs nucléolipides qui présentent des propriétés biologiques diverses incluant des activités antimicrobienne, antifongique, antivirale et antitumorale. On peut trouver, ci-dessous, les structures moléculaires de différents exemples de lipides nucléotides naturels et synthétiques ²⁵, ²⁴.

Concernant la structure moléculaire générale que doit présenter un lipide nucléotide, la tête polaire est nécessairement constituée d'une base azotée, sur les quatre existantes. Plusieurs possibilités sont envisageables pour le sucre, à savoir un groupe de type ribose ou désoxyribose. Dans les deux cas, les positions 1' et 4' étant déjà occupées, on peut imaginer placer un substituant sur les positions 3', 5', ainsi que sur la position 2' dans le cas d'un ribose. Sur un des groupements hydroxyles libres en ces différentes positions, on peut placer le groupement phosphate. On le trouve généralement en position 3' ou 5'. Il est également possible de trouver, soit porté par le phosphate, soit directement lié au sucre par l'intermédiaire d'un groupe hydroxyle, la présence d'un groupement spécifique, comme par exemple une tête choline, un polymère de type PEG, ou bien un deuxième sucre de type furanose ou pyranose, capable de conférer à la molécule des propriétés physico-chimiques particulières. L'intérêt majeur d'introduire un tel groupement additionnel est expliqué par la volonté de mettre en place des interactions faibles multiples, qu'elles soient spécifiques ou non. Enfin, les chaînes lipidiques peuvent, elles aussi, être positionnées à plusieurs endroits de la molécule. Tout d'abord, si le lipide est un monocaténaire, on peut substituer la chaîne directement sur le groupement phosphate, ou bien sur une des positions hydroxylées libres du ribose à l'aide d'un groupement ester. Si le lipide est un bicaténaire, les deux chaînes peuvent généralement occuper deux positions libres différentes sur le ribose. Une deuxième stratégie utilisée est d'introduire un groupe glycérol sur le sucre ou sur le groupement phosphate. Ce groupement a pour intérêt d'y attacher les deux chaînes, en une seule étape, qui serviront directement de queues hydrophobes une fois le couplage réalisé.

Un autre avantage de ce système est son caractère bio-inspiré. En effet, comme décrit ci-dessus, les espèces lipidiques et les dérivés nucléotidiques sont des systèmes biologiques présents largement dans l'organisme, comme par exemple au sein de la cellule. Même si leur rôle biologique peut être très varié, il est donc permis de penser que ce type de système peut présenter une biocompatibilité particulière, notamment en vue d'applications pharmaceutiques. C'est d'ailleurs une des premières perspectives d'utilisation qui ont motivé l'étude des lipides nucléotides. L'idée générale repose sur le principe de la vectorisation. Les auto-assemblages issus de ces systèmes amphiphiles constituent un vecteur potentiel, grâce auquel on peut imaginer transmettre un principe actif au sein de l'organisme, en formant un complexe suffisamment stable entre l'objet supramoléculaire et la molécule à vectoriser. Les principes actifs adaptés, par excellence, à une telle utilisation des nucléolipides sont les acides nucléiques. En effet, on est amené à penser que des interactions faibles peuvent potentiellement être mises en place, au sein du vecteur, et par là, contribuer à la formation d'un complexe stable à partir d'un vecteur éventuellement sélectif vis-à-vis de son principe actif. Cette stratégie générale n'est pas sans rappeler la structure en double hélice de l'ADN, où l'on espère idéalement arriver à une cohésion de cette force au sein des complexes pour ce type de vectorisation.

Nom du nucléolipide	Didanosine	Zidovudine	Cytidinediphosphate diacylglyérol	Tunicamycine
Structure			$HN \rightarrow O \rightarrow $	HN + O + O + O + O + O + O + O + O + O +
Base azotée analogue	А	т	С	С
Origine	Synthétique	Synthétique	Naturelle	Synthétique

FIGURE 1.35 : Noms et structures de quelques nucléolipides synthétiques et naturels.

Cependant, le type d'interaction impliquée dans la formation du complexe supramoléculaire dépend, pour beaucoup, de la structure chimique du nucléolipide utilisé. Si l'on prend un lipide nucléotide classique, sans aucun groupement particulier additionnel, celui-ci est anionique en milieu aqueux. En effet, l'acidité relativement forte du proton relatif à l'acide phosphorique confère à la molécule une charge formelle négative, une fois le lipide placé dans l'eau, à l'image de l'ensemble des acides nucléiques en milieu physiologique. Par ailleurs, on pourrait imaginer la structure que donnerait un lipide nucléoside. L'absence de groupe phosphate confèrerait donc à celui-ci un caractère non ionique. A partir d'un lipide nucléotide classique, l'introduction d'une tête choline lui permettrait de gagner un caractère zwitterionique, puisqu'il présenterait alors deux charges formelles, au sein de sa structure, mais resterait globalement neutre électriquement. Afin d'obtenir un lipide nucléotide cationique, il faut donc se débarrasser de la charge formelle liée du phosphate, et donc plutôt travailler avec un dérivé de nucléoside. A cette tête nucléoside, on peut imaginer y substituer tout groupement naturellement porteur d'une charge positive, comme une tête choline ^{26 27}.

L'intérêt qu'ont suscité les lipides nucléotides cationiques, qui sont d'ailleurs les premiers à avoir présenté des perspectives prometteuses *in vitro* depuis la première publication ²⁸, est basé sur le fait que l'interaction potentiellement observée entre ces lipides et un brin d'acide nucléique à vectoriser est essentiellement de nature électrostatique. De ce fait, on s'attend à la formation d'un complexe stable basé sur une interaction relativement forte. Ce type de système a longtemps constitué un centre d'intérêt

marqué, et bon nombre de références peuvent être trouvées dans la littérature sur des essais de vectorisation via ce type de lipides ^{29 30 31 32 33 34}. Cependant, ce genre de système présente plusieurs problèmes à l'échelle in vivo. On observe, en effet, une certaine cytotoxicité, lorsqu'ils sont utilisés par voie systémique, en raison d'une interaction avec les protéines plasmiques. Ceci provoque généralement l'activation d'une réponse inflammatoire. De plus, ils possèdent des problèmes pharmacocinétiques, menant à une accumulation dans les poumons et dans le foie, où ils sont dégradés. Enfin, leur efficacité de transfection n'est pas très élevée vis-à-vis des autres systèmes développés jusqu'alors ^{35 36}. C'est, en partie, ce qui a poussé à étudier d'autres types de nucléolipides, notamment les lipides non-ioniques, zwitterioniques et anioniques. Même si l'interaction qui pourra être mise en place avec un partenaire de type acide nucléique sera, de toute évidence, moins forte que dans le cas des lipides cationiques, une faible toxicité a été montrée, par exemple pour les nucléolipides anioniques, et rend donc ce type de systèmes particulièrement prometteurs. Cependant, la présence d'interactions électrostatiques répulsives, lorsque l'on cherche à former un complexe entre un nucléolipide anionique et un acide nucléique tous deux chargés négativement, reste défavorable pour ce processus. Ceci permet de justifier le très faible nombre de travaux, dans la littérature, sur des auto-assemblages formés uniquement à partir de tels systèmes. La stratégie traditionnellement utilisée était de doper un auto-assemblage constitué d'un lipide nucléotide non-ionique, par exemple le 1,2dioleoyl-sn-glycero-3-phosphaethanolamine (DOPE) qui a tendance à former une phase hexagonale inverse, avec un lipide nucléotide chargé ³⁶. En procédant ainsi, la coformulation permet de minimiser l'effet de l'interaction électrostatique défavorable, mais on peut, tout de même, réaliser une étude sur des objets chargés. Ce n'est qu'assez récemment que des études ont été menées sur des systèmes uniquement constitués de nucléolipides chargés.

A terme, l'étude des nucléolipides non-ioniques et anioniques peut permettre l'étude de complexes basés sur l'existence d'interactions faibles plus spécifiques, comme les interactions hydrogène ou les interactions aromatiques. En effet, puisque la présence d'une complexation d'origine électrostatique, dans le cas des lipides cationiques, vient masquer totalement les effets fins liés à la présence d'interactions plus faibles, mais potentiellement plus modulables, l'étude des systèmes anioniques ne se révèle pas simplement intéressante dans un objectif de vectorisation, mais surtout sur le plan fondamental où il peut être intéressant de comprendre les mécanismes de formation de tels complexes à haute spécificité.

1.3.2.b) Les nucléolipides anioniques : étude du comportement à l'interface.

En raison du très grand nombre de travaux de caractérisation à l'interface et en volume réalisés sur les systèmes de type lipide nucléotide, nous ne nous intéresserons, à partir de cette partie, qu'aux lipides nucléotides anioniques qui constituent l'objet d'étude de ce travail de thèse. Comme l'ensemble des lipides nucléotides, les nucléolipides anioniques présentent des propriétés originales à l'interface air/eau. L'intérêt majeur ayant

motivé les études à l'interface pour ce type de système vient du fait qu'une organisation 2D des lipides nucléotides à l'interface laissait présager une interaction entre bases au sein de la monocouche, notamment au cours d'une isotherme de compression. Cette interaction sert à mettre en évidence une éventuelle reconnaissance moléculaire entre bases complémentaires.

Rädler et al. ont montré que les dérivés du type nucléoside 5'-palmitoylphosphate (C16-5'-dN, où N est un nucléotide quelconque) présentent effectivement une organisation 2D sous forme de monocouche à l'interface air/eau, lorsqu'un cation bivalent est ajouté dans le milieu. De plus, l'isotherme de compression de ce film de Langmuir sert à mettre en évidence une interaction spécifique entre bases azotées complémentaires au niveau de l'interface. L'utilité du cation bivalent est de ponter chaque doublet de bases spécifiques, grâce aux interactions électrostatiques, afin de leur permettre de mieux interagir entre elles ³⁷. Les propriétés à l'interface des 1,2- dioctanoyl-sn-glycero-5'-phosphate-adenosine et 1,2dioctanoyl-sn-glycero-5'-phosphate-uridine (diC8-5'-dA et diC8-5'-dU) ont été étudiées par Berti et al, mais ne servent ici qu'à confirmer la formation de micelles dans le « bulk » grâce à l'allure caractéristique de l'isotherme de compression ³⁸. Ils mettent cependant en évidence, sur un mélange entre le 1,2-dioléoyl-5'-phosphatydil-adénosine et le 1,2-dioléoyl-5'-phosphatydil-uridine une interaction entre bases à l'interface air/eau qu'ils n'observent pas pour un mélange entre les dérivés DOP-Ade et DOP-Cyt, donc entre bases non complémentaires. Ceci laisse penser à une interaction ressemblant à celle de type Watson-Crick au sein de la double hélice d'ADN, et où les têtes polaires s'orientent de manière à pouvoir interagir de telle manière ^{39 40}. Desbat et al. a également mis en évidence un comportement particulier pour les nucléolipides anioniques à l'interface air/eau. Il a été montré, pour le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3'-phosphate thymidine et le 1,2-dipalmitoyl-snglycéro-3'-phosphate adénosine qu'un assemblage 2D à l'interface provoquait non seulement la formation de domaines constitués d'une bicouche, mais que cette dernière était inversée (enchaînement queue-tête-tête-queue) à faible compression du film. Ce comportement original, contrastant avec la formation habituelle d'une unique monocouche dans les films de Langmuir de phospholipides, se révèle sensible aux espèces ioniques présentes dans le milieu aqueux. Il a, en effet, été avancé que c'est la nature du contre-ion présent sur le groupement phosphate anionique qui, suivant la force de l'interaction électrostatique, rend les bicouches plus ou moins chargées négativement, et permet ou non la formation d'une telle structure interfaciale⁴¹.

Le problème majeur de ce type d'étude, est que le comportement à l'interface, tel que la reconnaissance moléculaire éventuellement mise en évidence, n'est pas nécessairement révélateur du comportement de l'amphiphile en volume. Il en est de même pour les études d'interactions de monocouches 2D sur films solides supportés, qui sont relativement éloignées des conditions du « bulk ». De plus, même si ces résultats semblent mettre en évidence la formation d'interactions base-base à l'interface, il est assez difficile d'en faire un parallèle avec les propriétés d'interaction dans les auto-assemblages en volume, où l'ensemble des interfaces sont couvertes de molécules d'eau et où les propriétés

sont essentiellement dominées par une dynamique extrêmement différente de cette observée à l'interface.

1.3.2.c) Les nucléolipides anioniques : étude du comportement en volume.

L'originalité de la structure chimique du nucléolipide lui permet d'arborer une palette de comportements divers et variés, aussi bien à l'interface air/eau qu'en volume. Ces comportements sont fonction de différents paramètres, comme la structure chimique, la géométrie et la charge nette du lipide, mais aussi la morphologie et la courbure des objets formés dans le « bulk ». Puisqu'il est primordial d'étudier les propriétés d'auto-assemblage des lipides nucléotides seuls, et non d'un mélange hybride co-formulé à l'aide d'un lipide neutre qui gouverne, en quasi-totalité, la structure et la morphologie des auto-assemblages, la bibliographie développée par la suite ne concerne que des systèmes constitués essentiellement de nucléolipides anioniques, en milieu aqueux. De plus, les concentrations auxquelles nous nous intéressons permettant de se placer en régime dilué, nous ne considérerons pas les références décrivant la morphologie de systèmes concentrés.

Constatons tout d'abord l'effet de la structure chimique sur les propriétés d'autoassemblage d'un nucléolipide monocaténaire. Campins et al. ont montré que les dérivés C16-3'-dT et C20-3'-dT formaient spontanément de petits objets de type fibres, tandis que les analogues C16-3'-dA et C20-3'-dA donnent des auto-assemblages similaires à des agrégats constitués de petits cristaux. Les morphologies très différentes semblent cependant très liées à la nature de la base azotée. Par ailleurs, la longueur de la chaîne ne semble jouer un rôle que très modéré. Il a, par ailleurs, été montré que la morphologie des objets formés par le C20-3'-dT révèle une structure nanoscopique de type lamellaire, dont la diffraction des rayons X permet d'identifier une symétrie orthorhombique. Au contraire, les nanocristaux des dérivés de l'adénosine ont été assimilés à une structure triclinique. Ceci permet de mettre en évidence le rôle prépondérant de la nature du nucléotide sur la morphologie des objets, mais également sur la nanostructure formée par l'agencement des molécules entre elles ⁴². Il est intéressant de constater que lorsque l'on considère l'analogue des C16-3'-dT et -dA, avec le groupement phosphate en position 5', la morphologie et la structure des objets formés change totalement. Ainsi, il suffit de permuter la position des chaînes sur le désoxyribose pour passer d'objets de type fibres ou micro-agrégats vers des objets de type vésicules, et ceci, indépendamment de la nature de la tête polaire ²⁰.

Quant aux nucléolipides anioniques bicaténaires, comme prévu par la théorie d'Israelachvili, la deuxième chaîne grasse additionnelle modifie totalement la morphologie des objets formés spontanément. L'équipe de Berti et Baglioni mettent en évidence, pour les diC8-5'-Ade et -Uri, deux nucléolipides à courte chaîne, la formation de micelles ellipsoïdales quasi sphériques d'environ 15 à 30 Å. La taille caractéristique, ainsi que le nombre d'agrégation des objets, ne semblent pas évoluer drastiquement en fonction de la nature de la base azotée ^{38 39 43}. Pour des chaînes légèrement plus longues, en C12, la littérature décrit la présence de micelles allongées semi-flexibles qualifiées de « polymerlike micelles » ⁴⁴. La

taille caractéristique de ces objets semble dépendre de la fraction volumique du lipide nucléotide en phase aqueuse et de la nature de la tête polaire. De plus, il a été montré que la texture de ces micelles était hélicoïdale, dans le cas du diC12-5'-Ade, ce qui menait à des objets supramoléculaires torsadés à faible fraction volumique, et à un réseau d'objets flexibles emmêlés à plus haute fraction volumique. Par opposition, l'étude du dérivé diC12-5'-Uri a également montré des objets micellaires allongés, mais de structure non hélicoïdale, ce qui semble révéler une interaction moins forte entre bases azotées dans ce cas ^{45 46}. Dans un cas légèrement similaire, il a été mis en évidence que le diC14-5'-dC formait deux types de structures hélicoïdales simultanément : des brins torsadés fins, ainsi que des brins torsadés plus épais. Il a été montré, comme dans le cas des dérivés en diC12, que ces morphologies consistaient en une superstructure à l'équilibre. En effet, la formulation de ces systèmes a été décrite comme donnant en premier lieu des vésicules très polydisperses (20-160 nm), constituant un état métastable, mais qui évoluaient spontanément en rubans hélicoïdaux au terme d'un vieillissement d'un jour à 25°C⁴⁷. Pour les lipides bicaténaires également, il est possible d'évaluer l'influence de la position des chaînes aliphatiques sur le sucre du nucléotide à l'aide d'un système de référence dont les deux dérivés analogues sont décrits dans la littérature. On choisira le diC18:1-Uri et le diC18:1dT. On sait, d'une part, que le diC18:1-Uri forme spontanément des vésicules en dispersion aqueuse. Il est cependant difficile d'en connaître la taille exacte. En effet, même si la polydispersité de ce système a été bien décrite, l'ensemble des auteurs effectuent une étape d'extrusion sur ces vésicules afin d'en réduire la taille moyenne et de les rendre plus monodisperses, en vue d'une étude ultérieure. Ceci empêche malheureusement d'en connaître plus sur le comportement spontané de ce système dans l'eau ^{46 48 49}. D'autre part, le diC18:1-3'-dT permet d'obtenir des vésicules d'environ 150 nm, dont la présence a été confirmée, par ailleurs, par cryomicroscopie électronique à transmission. Pour ce système, la position des chaînes sur le sucre à l'échelle moléculaire ne semble avoir aucun impact sur la morphologie des autoassemblages en présence ; tout comme la longueur des chaînes, puisque il est également décrit que le système diC14-3'-dT donne spontanément des vésicules légèrement plus petites, de l'ordre de grandeur de 45 nm. Un dernier système intéressant que l'auteur décrit consiste en un nucléolipide décoré d'un acide aminé phénylalanine en position 5'. Il effectue cette modification sur les deux dérivés diC18:1-3'-dT et diC14-3'-dT, de manière à favoriser une éventuelle interaction aromatique intermoléculaire. Dans les deux cas, la formation préférentielle de vésicules multi-lamellaires, cette fois, est décrite. Les tailles sont largement supérieures aux analogues sans acide aminé, respectivement 650 et 100 nm, ce qui laisse imaginer une diminution de la courbure spontanée des bicouches en présence. Le motif supplémentaire sur la tête polaire permet donc, probablement par gêne stérique comme avancé par l'auteur, de favoriser les interactions entre bicouches afin de former des systèmes multi-lamellaires ⁵⁰.

La diversité exceptionnelle de ce type de système, bien que constitués exclusivement de nucléolipides anioniques, permet de soulever leur grande complexité. Afin de dégager une relation structure-propriétés entre la nature originale du lipide nucléotide et la diversité d'auto-assemblages pouvant potentiellement être formés en solution aqueuse, il est donc important de chercher à caractériser les interactions pouvant être mises en places entre deux motifs de type nucléotide. Bien loin du comportement des détergents classiques en solution aqueuse, la nature particulière de la tête polaire des lipides nucléotides permet en effet d'imaginer la formation d'interactions spécifiques entre plusieurs bases azotées, mises en évidence par les différents travaux, notamment à l'interface, mais également en volume au sein de mélanges d'auto-assemblages, de bases complémentaires ou non.

1.3.3. Mesure quantitative de l'interaction entre acides nucléiques.

1.3.3.a) Méthodes traditionnelles pour une mesure quantitative acide nucléiqueacide nucléique.

Dans la littérature, plusieurs techniques complémentaires permettent de remonter à une mesure plus ou moins directe de l'interaction engagée entre deux acides nucléiques, ou entre deux motifs nucléotide de manière générale.

Parmi ces techniques, on trouve généralement le BIAcore reposant sur le principe de la Résonance Plasmon de Surface (SPR). Le principe général est de déposer une couche du ligand sur un substrat solide, généralement en polymère, déposé sur une feuille d'or qui est, elle-même, déposée sur une plaque de verre. L'autre espèce avec laquelle on veut observer l'interaction circule dans une cellule de microfluidique, qui est directement en contact avec le substrat. L'interaction est mesurée à l'aide d'un prisme, situé à l'arrière de la puce sur laquelle est déposée la couche de ligand. L'intérêt principal de cette technique est que l'on est capable de remonter aux constantes thermodynamiques caractéristiques du complexe formé, et par là, au mode d'interaction ⁵¹. On peut même, puisque la mesure est continue, repérer les variations des constantes d'association au cours du temps. Le défaut principal du BIAcore est que cette technique nécessite de figer totalement les ligands sur une surface immobile. Ainsi, et de la même manière que l'on peut estimer une reconnaissance moléculaire à l'aide d'une monocouche de molécules constituant un film de Langmuir à l'interface air/eau, les molécules sont ainsi contrainte, autant en terme d'orientation que de dynamique. C'est pourquoi il est préférable de rester sur des systèmes en volume pour éviter de perdre l'auto-assemblage et la dynamique des systèmes.

Une méthode couramment utilisée pour déterminer les propriétés d'interaction que peuvent présenter deux motifs d'acide nucléique l'un pour l'autre est le dichroïsme circulaire. Le principe repose sur le fait qu'une molécule, en général chirale, puisse présenter des propriétés d'absorption différentes selon qu'on lui envoie un rayonnement de polarisation circulaire droite ou un rayonnement circulaire gauche. Puisque tout rayonnement peut se décomposer en chacune de ces deux composantes droite et gauche, la conséquence directe pour un échantillon présentant un « dichroïsme circulaire » est une absorption plus rapide d'une des composantes que de l'autre. Cette technique est donc un outil performant permettant de mettre en évidence toute anisotropie au sein d'une structure, qu'elle soit de l'ordre moléculaire (comme la chiralité) ou de l'ordre supramoléculaire (comme la structure secondaire d'une protéine, ou une interaction impliquant plusieurs espèces orientées alors dans une configuration précise) ⁵². La principale limitation de cette méthode de caractérisation est que la bande d'absorption n'est accessible, typiquement, que dans l'UV lointain, vers 100-200 nm. Bien que cette technique soit particulièrement performante en termes d'informations concernant la structure interne de l'échantillon, la gamme d'UV concernée est, d'une part, difficile d'accès, mais également celle, d'autre part, dans laquelle le dioxygène de l'air et la majorité des tampons absorbent. Il est donc difficile de séparer les différentes contributions du signal afin de pouvoir interpréter les phénomènes inhérents à l'interaction en jeu.

Une dernière technique intéressante et communément utilisée concernant l'étude de l'interaction entre acides nucléiques est la spectroscopie de fluorescence. Celle-ci se base sur le principe, qui sera décrit plus en détail dans le chapitre 2, des niveaux énergétiques d'une molécule, dits « états électroniques », puis pour chaque état électronique, des états fins caractérisant chacun un état dit « vibrationnel ». Lorsqu'une molécule reçoit un photon d'une gamme énergétique suffisamment élevée, elle peut alors passer de son état fondamental vers un état électronique excité. La perte d'énergie induite essentiellement par les collisions statistiques entre molécules provoque une transition vers l'état vibrationnel le plus bas au sein de l'état électronique excité. Cette désexcitation s'accompagne ensuite d'une relaxation complète vers un état vibrationnel quelconque de l'état électronique fondamental. Une analyse des photons émis au cours de ce processus permet de connaître la structure des différents états vibrationnels. Cette technique très riche est donc également capable de fournir des informations précieuses concernant la modification des propriétés de fluorescence d'une espèce moléculaire, en fonction du pH, du type de milieu, des ligands éventuellement présents autour d'elle ou bien de la structure supramoléculaire adoptée par le système. L'inconvénient énorme de cette technique est que, bien qu'elle soit largement adaptée à des systèmes biologiques, elle nécessite de modifier l'échantillon à l'aide d'un marqueur fluorescent appelé « fluorophore ». En effet, toutes les molécules ne bénéficient pas de ce type de propriétés. Il est donc impossible d'imaginer appliquer cette technique sur un échantillon brut présentant un système « natif ». En termes d'interactions, il est toujours préférable de ne pas modifier la structure de l'échantillon, la présence d'un marqueur ou d'une espèce tierce liée à l'utilisation de la technique de caractérisation pourrait être susceptible de modifier la structure et/ou les interactions intermoléculaires en jeu au sein du système.

1.3.3.b) Calorimétrie à titration isotherme (ITC).

En alternative à ces nombreuses techniques complémentaires permettant de mesurer de manière quantitative une interaction de manière imparfaite, une technique particulièrement performante présente suffisamment d'avantages aux différents inconvénients listés précédemment pour susciter un intérêt dans la mesure d'interactions faibles impliquées dans ce type de systèmes. Il s'agit de la calorimétrie à titration isotherme, appelée ITC (en anglais, « Isothermal Titration Calorimetry »). Le principe de fonctionnement de l'appareil et les détails liés à la détection et au traitement du signal seront développés

dans le chapitre suivant. L'ITC est une méthode puissante de caractérisation capable de mesurer avec précision la chaleur libérée ou absorbée par l'interaction entre deux espèces. Dans un premier temps, une simple lecture de cette chaleur permet d'estimer l'intensité de l'interaction. Dans un second temps, le traitement du signal à l'aide d'un modèle adapté permet de déterminer davantage d'informations concernant l'interaction, notamment les constantes thermodynamiques, comme les constantes d'association (ou de dissociation), l'enthalpie de mélange et la stœchiométrie de l'interaction.

L'avantage notable de cette méthode est qu'elle est extrêmement sensible, et donc capable de détecter des variations de chaleur de l'ordre du centième de la µcal/mol. Parmi l'ensemble des constantes tirées de l'interprétation des données, il est également possible de déduire beaucoup plus d'informations que grâce aux techniques traditionnelles, notamment le mode d'interaction selon lequel les deux espèces chimiques se présentent l'une à l'autre. Les quelques difficultés techniques viennent du fait que cette technique souffre des inconvénients de ses avantages. En effet, la très grande sensibilité de cet appareillage implique que la mesure puisse être perturbée en cas d'écart trop important de la température extérieure, ou bien en cas de la présence d'une impureté ou d'une bulle d'air résiduelle, ou encore d'une instabilité électrique. Quant aux avantages de l'ITC par rapport aux autres techniques, il est important de citer que c'est une méthode permettant de rendre possible la mesure directe de l'interaction en volume. On conserve ainsi la mobilité et la dynamique liée à la phase liquide, plutôt que de figer les molécules ou les objets supramoléculaires sur un substrat solide. L'interaction mise en évidence et mesurée est donc une interaction effective. Il n'y a pas de limitation liée au poids moléculaire des espèces chimiques en présence. De plus, l'intérêt particulier de cette technique vis-à-vis des systèmes biologiques vient du fait que les échantillons sur lesquels la mesure est réalisée peuvent contenir des espèces sous leur forme native. Il n'y a donc aucun besoin de modifier le système afin de le préparer à la caractérisation, ce qui est particulièrement pertinent pour l'utilisation de macromolécules biologiques possédant une structure complexe. Enfin, cette technique est « non destructive » et elle permet donc de récupérer le système après l'expérience, afin de poursuivre des études ultérieures sur le même échantillon.

L'ITC est donc une technique de choix pour les systèmes biologiques, ce qui justifie son utilisation majoritaire dans le domaine de la pharmacologie et de la biochimie. Il s'agit, en effet, d'une méthode de pointe pour la caractérisation de complexes hautement spécifiques du type enzyme/substrat ou pour évaluer l'affinité de différentes molécules ligand pour un récepteur donné pouvant être, typiquement, une macromolécule. Le fait que cette technique permette la détection d'une simple chaleur d'interaction la rend toute indiquée pour des systèmes aussi complexes que des protéines ou des macromolécules. L'interaction mise en jeu par de tels systèmes pourrait être étudiée grâce à une technique d'analyse chimique puissante, telle que la RMN, mais présenterait l'inconvénient majeur d'être relativement fastidieuse à interpréter.

La calorimétrie à titration isotherme permet une mesure d'interactions faibles, mais en général non spécifiques, notamment lorsqu'il s'agit de complexes entre petites molécules. En effet, les espèces chargées s'associant notamment en raison de l'interaction électrostatique, la chaleur impliquée dans ce processus est plus intense devant celle impliquée dans des interactions faibles plus spécifiques telles que l'interaction hydrogène. Turnbull et Daranas ont montré qu'il était possible d'utiliser l'ITC pour étudier des interactions faibles, voire même de très faible intensité ⁵³.

Parmi le spectre très large d'interactions faibles pouvant être étudiées par la technique d'ITC, on peut mesurer les interactions entre des espèces aussi variées que des protéines, des ligands, des lipides, des acides nucléiques, des nanoparticules, des peptides, des polymères, ou encore des complexes anticorps/antigène. En outre, sur l'ensemble de ces systèmes, la technique d'ITC ne permet pas simplement de mesurer une interaction mais elle peut également, au choix, mesurer l'activité biologique d'une cible, procéder à des études structurales de systèmes macromoléculaires ou supramoléculaires complexes, confirmer les bons candidats en termes d'interaction avec un récepteur à la suite d'un screening, renseigner sur la thermodynamique de phénomènes physico-chimiques ayant lieu au sein de la cellule de mesure, caractériser divers types de mécanismes d'action, mais également permettre une étude cinétique de différents phénomènes ⁵⁴.

L'interaction de petites molécules avec un acide nucléique est un sujet récurrent dans la littérature. Buurma et Haq décrivent l'étude par ITC de ce type d'interaction en proposant une approche permettant de construire un modèle « sur mesure » pour une interaction complexe impliquant plusieurs équilibres, chaque équilibre aboutissant à la formation de différents complexes de stœchiométries différentes ⁵⁵. Concernant les dérivés d'acide nucléique de manière générale, quelques études par ITC ont déjà été menées à ce sujet. Varghese et al. ont notamment mesuré la force de l'interaction de différentes bases azotées et nucléosides avec du graphène. Puisque ce type d'interaction est essentiellement gouvernée par l'interaction aromatique, indirectement, ceci a permis de classer chaque motif par ordre décroissant d'aromaticité, soit $G > A > C \sim T$ ⁵⁶.

Par ailleurs, on peut trouver des références décrivant l'interaction de lipides cationiques avec un acide nucléique. Ces études sont généralement réalisées dans un objectif général de vectorisation. De manière générale, il a été montré que la complexation de lipides cationiques et d'acide nucléique était relativement faible, même en vertu de la charge positive portée par le lipide, et engendrait une faible signature enthalpique endothermique. Les auteurs ont donc écrit le processus comme étant globalement gouverné par l'entropie, en raison des réarrangements importants des molécules d'eau, et de la forte cohésion des lipides entre eux grâce à l'effet hydrophobe ^{57 58 59 60 61 62 63 64}.

L'interaction entre acides nucléiques a toujours été une problématique forte depuis la structure hypothétique proposée par Watson et Crick en 1953. L'ITC est une technique adéquate pour pouvoir, non seulement, estimer la force des interactions entre motifs nucléotide suivant le type de base en présence, mais également l'interaction entre un acide nucléique ligand et n'importe quel type de macromolécule réceptrice de type protéine. L'intérêt biologique immédiat de ce type de mesure, en plus de l'aspect fondamental, est d'estimer l'affinité, voire la spécificité, d'un récepteur macromoléculaire pour un tel ligand en vue d'une potentielle activité biologique recherchée. Il est même envisageable, grâce au système de régulation en température, de mesurer la chaleur échangée lors de la dénaturation d'une telle espèce macromoléculaire, et donc de pouvoir remonter aux propriétés thermodynamiques et morphologiques de la structure secondaire d'un acide nucléique ⁶⁵.

L'ITC est donc une technique de choix pour permettre d'obtenir différents niveaux d'informations, essentiellement d'origine thermodynamique, tels que la mesure des constantes thermodynamiques, la mise en évidence des interactions faibles spécifiques (interaction hydrogène), la mise en évidence des phénomènes d'origine entropique (réarrangement conformationnel, interactions hydrophobes), mais également d'origine cinétique. De plus, cette technique se montre parfaitement adaptée pour étudier non seulement la force d'interactions faibles et spécifiques, de type acide nucléique-acide nucléique, mais également le mode d'interaction associé à la structure et à l'orientation des molécules interagissant, par exemple dans le cas d'une interaction entre un auto-assemblage et un acide nucléique, dans l'objectif de caractériser la composante liée à chaque type d'interaction en présence.

1.3.3.c) Etude de l'interaction entre nucléolipides anioniques et acides nucléiques par ITC.

Un travail a été réalisé, au sein de l'équipe, qui permet de décomposer l'interaction acide nucléique-acide nucléique, mesurée par ITC, de manière rationnelle. La stratégie a été de partir des plus petites unités de base constituant l'acide nucléique, c'est-à-dire les bases azotées, et d'en mesurer les interactions pour des motifs complémentaires ou non. Ensuite, peu à peu, les auteurs ont complexifié la structure des espèces interagissant de manière à comprendre l'effet de chaque partie de la molécule d'acide nucléique. L'interaction nucléoside/nucléoside a donc été abordée, puis enfin l'interaction nucléotide/nucléotide. L'étude finit par la détection et l'interprétation d'une interaction nucléolipidepolynucléotide, qu'elle soit complémentaire ou non, sur la base des considérations précédentes. Cette longue étude permet donc de fournir des outils rationnels simples pour comprendre le signal mesuré par ITC pour une interaction aussi complexe que celle entre un auto-assemblage et un brin d'acide nucléique. De plus, la présence attendue d'un certain nombre d'interactions faibles, spécifiques ou non, et d'une composante entropique non négligeable caractérisant les phénomènes d'échange en jeu, rend l'interprétation encore plus fastidieuse si l'expérimentateur n'a aucune base de compréhension sur laquelle partir ⁶⁶ 53.

Il n'y a, de manière générale, que très peu de travaux dans la littérature sur le suivi par la technique d'ITC de l'interaction entre des auto-assemblages de lipides nucléotides anioniques et d'acides nucléiques. Comme démontré ci-dessus, cette méthode constitue réellement une technique de choix pour mesurer de manière quantitative ce type d'interaction, et même comprendre l'origine même du signal détecté, afin de pouvoir remonter au mode d'interaction des deux espèces. Bien que chacune des espèces dont l'interaction est attendue possède la même charge, l'auto-assemblage spontané des lipides nucléotides anioniques a montré, dans la littérature ⁶⁶, que le caractère favorable du processus d'auto-assemblage, certainement en raison des interactions intermoléculaires base-base, réussissait à contrebalancer l'effet défavorable lié à la répulsion électrostatique des espèces. Il peut en être de même pour une interaction entre un auto-assemblage et un brin de polynucléotide. La formation ou non d'un complexe, de paramètres thermodynamiques donnés, nous renseignera donc sur la spontanéité et la nature d'une éventuelle interaction, malgré le côté défavorable lié à la présence d'une même charge sur les deux objets.

Une première étude a été menée par Tonelli et al., qui montre la modification du signal mesuré par ITC, lorsque celui-ci réalise une interaction entre le diC14-3'-dT, formant des objets de type vésicules unilamellaires, ou entre le diC14-3'-dT-Phe, formant des objets de type vésicules multilamellaires, avec un monobrin d'oligonucléotide complémentaire de type poly(A). Le traitement du signal par un modèle adapté révèle une constante d'association du même ordre de grandeur dans les deux cas, mais une stœchiométrie plus faible pour le système multilamellaire que pour le système unilamellaire. Ceci a pu être expliqué par le fait que les bicouches intérieures à l'objet sont cachées, et ne sont donc pas disponibles pour réaliser une interaction avec un partenaire, d'où une stœchiométrie apparente plus faible. Ceci permet d'illustrer qu'au-delà de la structure moléculaire des deux groupements en interaction, la morphologie et la structure des objets mis en jeu sont déterminantes pour connaître les paramètres thermodynamiques d'une interaction. De plus, dans les deux cas, l'enthalpie de mélange est endothermique alors que l'on s'attend plutôt à un phénomène exothermique lorsque l'on créé un doublet de bases conjointement liées. Ceci a été expliqué par la présence certaine de phénomènes entropiques conjoints, tels que le réarrangement des molécules et la libération de molécules d'eau adsorbées sur les espèces en interaction. Ceci montre bien, tout comme il a déjà été démontré dans les études, par ITC, de l'interaction lipide cationique-acide nucléique, que ces phénomènes présentent une interaction relativement faible et sont globalement gouvernés par l'entropie 50.

Enfin, une dernière étude a pu être réalisée sur le même genre de système. Les nucléolipides d'intérêt sont, ici, les diC16-3'-dT et diC16-3'-LNA-T, ainsi que leurs analogues avec une tête adénosine. L'appellation LNA signifie « Locked Nucleic Acid ». Il s'agit d'une nouvelle classe de lipides nucléotides, dont les propriétés d'auto-assemblage n'ont pas encore réellement été étudiées. La spécificité vient du fait qu'une liaison osidique, en position 2'-4', vient bloquer la libre rotation du désoxyribose. La conséquence directe est que le nucléotide devient alors figé en termes d'orientation et perd alors un degré de liberté de rotation. En ITC, uniquement les interactions avec les oligonucléotides complémentaires ont été mesurées. On observe ainsi, pour ces systèmes, une augmentation d'un à deux ordres de grandeur pour les constantes d'associations lorsqu'il s'agit des dérivés LNA. On constate ainsi que l'orientation et la dynamique de rotation des groupements en interaction au sein d'un auto-assemblage sont déterminants quant aux propriétés thermodynamiques mises en évidence grâce à l'interaction, ce qui montre bien l'effet de la structure de type
LNA sur les propriétés d'interaction. De plus, les interactions des diC16-3'-dT et diC16-3'-LNA-T avec le polyA sont à l'origine d'un signal endothermique, tandis que les interactions des diC16-3'-dA et diC16-3'-LNA-A avec le polyU sont à l'origine d'un signal exothermique. Les auteurs ont d'ailleurs mis en évidence la présence d'un signal d'ITC original, en double vague, pour l'interaction entre le diC16-3'-LNA-A et le polyU, qui contraste avec les signaux classiques à simple vague. Le comportement des différents partenaires au sein de l'interaction n'est pas encore totalement compris, sur la base de l'interprétation des mesures d'ITC. Cependant, celles-ci permettent assurément de soulever l'effet drastique du LNA sur les propriétés d'interaction du lipide auto-assemblé.

La corrélation entre la structure moléculaire d'un lipide nucléotide et ses propriétés d'auto-assemblage n'est pas totalement comprise, et reste extrêmement complexe au vu de la palette de morphologies d'objets supramoléculaires offerte par ce genre de système en dispersion dans l'eau. Même si la théorie d'Israelachvili suffit parfois pour expliquer l'évolution de la courbure spontanée avec la longueur des chaînes notamment, on se rend compte que la nature chimique de la tête polaire joue un rôle primordial dans l'existence d'un auto-assemblage. Les interactions de type base-base ont pu être mises en évidence et visent à montrer une potentielle « reconnaissance moléculaire » des motifs nucléotide ⁶⁶. Dans l'eau, on tend à corréler également la structure moléculaire du lipide avec ses propriétés d'interactions via-à-vis d'un oligonucléotide présentant une base azotée complémentaire ou non. Au-delà de la simple interaction de type acide nucléique-acide nucléique, l'ensemble de la littérature des nucléolipides anioniques tend à montrer, ici encore, la complexité du système et le fait que les propriétés thermodynamiques de la formation des complexes supramoléculaires sont également liés à la morphologie des autoassemblages en interaction. Il est donc nécessaire, afin d'arriver à un rationnel, d'investiguer les interactions faibles en présence au sein des objets supramoléculaires, et d'étudier leur rôle quant à l'interaction qui pourra être formée avec un partenaire.

_____ **(** 73 **)**

Chapitre 2

Matériel et méthodes.

2.1 Systèmes étudiés et protocoles.

2.1.1. Nucléolipides.

Au cours de ce projet, les propriétés physico-chimiques de sept nucléolipides ont été étudiées. Il s'agit de lipides nucléotides phosphorylés anioniques, dont la nature de la tête polaire, ainsi que le nombre et la longueur des chaînes est variable. Seulement les dérivés de la thymine et de l'adénine ont été caractérisés. Le nom, la structure moléculaire et la masse molaire de chacun de ces composés sont donnés FIGURE 2.1.

Nom du nucléolipide	C14dT	C14dA	diC14dT	diC14dA	diC16dT	diC16LNA-T	diC16LNA-A
Structure	HO O = P O = P O $R_1 = -(C)$ $R_2 = -A$	$\frac{1}{2} = \frac{R^2}{R^1}$ H ₂) ₁₃ CH ₃ A ou – T	HO O=F (0) R ₁ = -(CH ₂)	$HO = \frac{R_{2}}{O} + \frac{R_{2}}{O} + \frac{R_{1}}{O} + \frac{R_{1}}{$		$R_{1} = -(CH_{2})_{14}CH_{3}$ $R_{2} = -A \text{ ou } -T$	
Masse molaire (g/mol)	620	629	918	927	946	974	983

FIGURE 2.1 : Noms, structures et masses molaires des nucléolipides caractérisés au cours de ce travail.

2.1.2. Synthèse des nucléolipides.

La synthèse des nucléolipides suivants a été réalisée : diC14dT, diC14dA, diC16dT, diC16LNA-T et diC16LNA-A. Le protocole de synthèse a été totalement repris, pour le diC14dT, ou bien largement inspiré d'une synthèse déjà référencée par Barthelemy et al. sur des nucléolipides anioniques similaires, notamment le diC18:1dT ^{50 67}. L'ensemble des caractérisations par RMN et spectroscopie de masse y sont présentées, ainsi que les rendements pour chaque molécule. La totalité des réactifs et des solvants a été acheté chez Aldrich, Bachem, Glen Research et Exiqon, et ont été utilisés sans purification préalable. Du gel de silice 60 (taille des particules : 45 µm) a été utilisé pour la chromatographie flash (Biotage). La chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée avec des plaques d'aluminium enrobées de gel de silice 60 F254 (Merck). La solution utilisée pour la révélation des CCM est une solution d'acide sulfurique (95 mL d'éthanol et 5 mL d'acide sulfurique).

Du fait que le protocole référent soit déjà publié, on présentera ici uniquement le protocole de synthèse utilisé pour le diC14dA, suivi d'une discussion sur les différentes étapes réactionnelles abordées. Cependant, l'ensemble des quantités de chaque réactif ajouté, ainsi que les rendements finaux, seront cependant regroupés dans un tableau récapitulatif pour chaque molécule synthétisée. De plus, la pureté finale des différents produits n'a pas été caractérisée ici, du fait que ce protocole de synthèse ait déjà été utilisé pour des molécules similaires. Cependant, des CCM ont été réalisées régulièrement et entre chaque étape, afin d'attester de l'avancement et du succès des différentes étapes.

On présente, ci-après, la synthèse du 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3'-phosphate adénosine (diC14dA). Tout d'abord, la 5'-diméthoxytrityl-N-acétyl-2'-désoxyadénosine-3'-[(2cyanoéthyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite (650 mg, 1 éq, 0.76 mmol) a été dissoute dans une solution de méthylamine à 2M dans du THF anhydre sous argon (7.6 mL, 20 éq, 15.2 mmol). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2h. Une colonne séparatrice de gel de silice est ensuite réalisée sur le produit (DCM/MeOH/TEA de 97:3 à 100:0 + quelques gouttes de TEA). Le produit intermédiaire (500 mg, 1 éq, 0.66 mmol) et le 1,2-dimyristoyl-sn-glycérol (442 mg, 1.3 éq, 0.86 mmol) sont ensuite dissous dans 10 mL de THF anhydre sous argon. Une solution de tétrazole à 0.45M dans du THF (2.6 mL, 1.75 éq, 1.16 mmol) est ajoutée, après 10 min, au mélange sous agitation. On conserve l'agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant 24h. Ensuite, une solution de diiode à 0.02M dans un mélange THF/Pyr/H₂O (58 mL, 1.75 ég, 1.16 mmol) est ajoutée dans le mélange, et celui-ci est laissé à nouveau sous agitation pendant une nuit. Le brut réactionnel a ensuite été évaporé sous vide, puis les produits intermédiaires sont redissous dans 30 mL d'éther éthylique et lavés avec 2x 20 mL d'une solution aqueuse de thiosulfate de sodium. La phase aqueuse est relavée avec 2x 10 mL d'éther éthylique. L'ensemble des phases organiques est ensuite collecté et séché avec du sulfate de sodium anhydre. Après évaporation du solvant, le produit résultant est redissous dans 10 mL de DCM anhydre sous argon, puis une solution d'acide trichloroacétique à 3% w/w dans du DCM y est ajoutée (7.5 mL, 1.79 mmol). Après 4h d'agitation à température ambiante, 5 mL de méthanol et 20 mL de solution d'hydrogénocarbonate de sodium sont ajoutés au milieu réactionnel. La phase aqueuse est relavée avec 3x 50 mL de DCM. L'ensemble des phases organiques est ensuite collecté et séché avec du sulfate de sodium anhydre. Après évaporation du solvant, le produit intermédiaire est dissous dans 20 mL de DCM et 10 mL de TEA, et laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le solvant est enfin évaporé sous vide, et le produit final est isolé après purification sur une colonne séparatrice de gel de silice (DCM/MeOH/TEA de 97:3 à 95:5 + quelques gouttes de TEA).

Pour les dérivés de l'adénosine, la phosphoramidite est commercialisée sous forme protégée (dA-Bz). Il est donc nécessaire, avant toute chose, de déprotéger le groupement adénine à l'aide de la méthylamine [étape 1]. Il est important de noter que la phosphoramidite est très sensible aux conditions acides. Aussi, l'ensemble des CCM et des colonnes de gel de silice réalisées doivent être, auparavant, mouillées avec un éluant contenant quelques gouttes de TEA afin de neutraliser l'acidité de la silice. Une fois la déprotection effectuée, le glycérol est ajouté à la phosphoramidite déprotégée pour l'étape de couplage, en présence de tétrazole qui permet d'activer le phosphore en vue du couplage avec le glycérol. Pour les dérivés de la thymidine, cette étape constitue la première qui a lieu [étape 2]. Il faut noter que les conditions doivent être strictement anhydres, en raison de la très grande sensibilité de la phosphoramidite pour l'eau et tout oxydant de manière générale. L'ajout d'une solution de diiode permet d'oxyder le phosphore (III) en phosphore (V), et donc de former le groupement phosphate du lipide [étape 3]. Il s'agit maintenant de déprotéger tous les groupes ayant pu présenter des possibilités de réactions préalables. Ainsi, l'ajout d'acide trichloroacétique permet de cliver la liaison avec le groupe protecteur DMT en position 5' [étape 4]. On peut noter qu'en raison de la formation du cation DMT⁺, le milieu réactionnel prend alors une vive couleur orangée. Enfin, la dernière étape a pour rôle de déprotéger la chaîne cyanoéthyle, présente sur le phosphate, à l'aide de la triéthylamine ajoutée en excès [étape 5].



4 $R_1 = -(CH_2)_{12}$ -CH₃ $R_2 = Adénine$

(a) Tetrazole 0.45 M dans CH₃CN, 16h, TA ; (b) I_2 0.02 M dans THF/Pyr/H₂O, 6h, TA ; (c) TCA 3% dans DCM, 4h, TA ; (d) TEA, DCM, 16h, TA.

FIGURE 2.2 : Schéma général de synthèse des nucléolipides diC14dT et diC14dA. Les autres analogues ont été synthétisés à l'aide de la même réaction de couplage.

	diC14dT	diC14dA	diC16dT	diC16LNA-T	diC16LNA-A
Phosphoramidite		650 mg, 1 éq, 0.76 mmol			1 g, 1 éq, 1.13 mmol
Méthylamine		7.6 mL, 20 éq, 15.2 mmol			11.3 mL, 20 éq, 22.6 mmol
Phosphoramidite déprotégée	500 mg, 1 éq, 0.67 mmol	500 mg, 1 éq, 0.66 mmol	500 mg, 1 éq, 0.67 mmol	500 mg, 1 éq, 0.65 mmol	500 mg, 1 éq, 0.64 mmol
Glycérol	447 mg, 1.3 éq, 0.87 mmol	442 mg, 1.3 éq, 0.86 mmol	496 mg, 1.3 éq, 0.87 mmol	479 mg, 1.3 éq, 0.84 mmol	473 mg, 1.3 éq, 0.83 mmol
Tétrazole	2.6 mL, 1.75 éq, 1.17 mmol	2.6 mL, 1.75 éq, 1.16 mmol	2.6 mL, 1.75 éq, 1.17 mmol	2.5 mL, 1.75 éq, 1.13 mmol	2.5 mL, 1.75 éq, 1.12 mmol
Diiode	58 mL, 1.75 éq, 1.17 mmol	58 mL, 1.75 éq, 1.16 mmol	58.7mL, 1.75éq, 1.17 mmol	56.6mL, 1.75éq, 1.13 mmol	56 mL, 1.75 éq, 1.12 mmol
Rendement global	64 %	36 %	28 %	39 %	36 %

FIGURE 2.3 : Tableau récapitulatif des masses, quantités et nombres d'équivalents introduits pour chaque réactif. Le rendement global des cinq synthèses est également précisé.

2.1.3. Acides nucléiques.

Les acides nucléiques utilisés pour étudier l'interaction avec les objets lipidiques autoassemblés sont des oligonucléotides « modèles ». Ils sont caractérisés par une centaine de bases azotées identiques sur l'ensemble de la longueur de la chaîne. Cette structure modèle permet donc d'étudier un type d'interaction précis avec un partenaire, qu'il soit complémentaire ou non. Il est intéressant de noter que l'oligonucléotide dérivé de la thymine est en réalité l'analogue uracile, à l'image d'un monobrin d'ARN. On considère que les structures très similaires des deux analogues ne changeront rien en termes de propriétés d'interaction avec un partenaire. Au sein de cette étude, deux oligonucléotides seront utilisés, de nature chimique différente. Le nom, la structure moléculaire et la masse molaire de chacun de ces composés sont donnés FIGURE 2.4.

Nom de l'oligonucléotide	polyA	polyU		
Nomonclature officialla	acide	acide		
Nomenciature officiene	polyadénylique	polyuridylique		
Structure				
Masse molaire (g/mol)	330	306		

FIGURE 2.4 : Noms, structures et masses molaires des deux oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.

2.1.4. Formulation des échantillons.

2.1.4.a) Tampon.

Le tampon utilisé pour l'ensemble des échantillons est le tampon HEPES. Son nom, en nomenclature officielle, est l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique. Il s'agit donc d'un composé zwitterionnique dont l'utilisation est relativement courante en biochimie pour la culture cellulaire, en raison d'une stabilité accrue au pH physiologique. De plus, le pKa du couple acido-basique relatif à l'HEPES impose pour la solution tampon, un pH de 7,2, particulièrement proche du pH physiologique et donc parfaitement adapté à des systèmes à visée biologique, tels que les lipides nucléotides. De plus, l'intérêt particulier de ce tampon dans le cadre du projet réside dans le fait que l'on minimise les interactions de type tampon/lipide que l'on pourrait éventuellement créer et mesurer en ITC par exemple, comme il aurait été possible de le faire avec une espèce phosphorylée, telle que le tampon phosphate par exemple. La structure chimique de la molécule d'HEPES est représentée FIGURE 2.5.



FIGURE 2.5 : Structure moléculaire de l'HEPES.

Son protocole de préparation, pour une solution à 50 mM en HEPES, est le suivant. On pèse une masse d'HEPES « acid-free » relative à la préparation d'un volume donné, en général 300 mL, de solution tampon. On y ajoute ensuite 250 mL d'eau milliQ. L'espèce est ensuite titrée par de la soude molaire jusqu'à ce que le pH du milieu atteigne le pKa du couple acido-basique à l'équivalence. Au cours de cet ajout, l'HEPES « acid-free » est peu à peu déprotoné jusqu'à ce qu'on ait formé une quantité équimolaire d'HEPES déprotoné et d'HEPES protoné. A ce moment, la solution tampon est prête. Ses caractéristiques sont récapitulées dans le tableau FIGURE 2.6.

Masse molaire	рКа	Concentration	Force ionique
(g/mol)		(mol/L)	(mol/L)
238,3	7,66	0,05	0,012

FIGURE 2.6 : Caractéristiques de la molécule d'HEPES et du tampon réalisé à partir de cette espèce.

2.1.4.b) Protocole standard.

Afin de préparer les différents échantillons de nucléolipides qui seront caractérisés par la suite, le protocole standard est le suivant. On calcule et on pèse la masse précise pour réaliser un volume donné, en général 1500 μ L, de dispersion de concentration donnée. On ajoute ensuite le volume correspondant de tampon HEPES, dont les caractéristiques seront détaillées dans le paragraphe suivant. Enfin, l'échantillon est agité vigoureusement au vortex pendant 30 secondes, puis il est laissé sous agitation constante, à 1200 rpm et à 35°C, toute la nuit. Le lendemain, l'homogénéité de la dispersion est vérifiée optiquement.

Au contraire, les échantillons d'oligonucléotides sont préparés le jour même. On suit le même protocole de formulation. Puis l'échantillon est agité vigoureusement au vortex pendant 30 secondes à 1 min. L'homogénéité de la solution est vérifiée optiquement.

2.2 Microscopie optique.

2.2.1. Microscopie optique à lumière polarisée.

2.2.1.a) Montage.

Un microscope optique à lumière polarisée est construit comme indiqué FIGURE 2.7.



FIGURE 2.7 : Schéma d'un microscope à lumière polarisée.

La source blanche produit une lumière polychromatique envoyée dans toutes les directions de l'espace. Celle-ci passe ensuite dans un filtre polarisant appelé « polariseur ». Le rôle du diaphragme de champ est ensuite de sélectionner une partie du rayonnement et limite donc, par là, l'ouverture angulaire du faisceau. Généralement, plus le champ est large, moins l'éclairement sera homogène et moins la qualité optique sera bonne. Il est donc

important de se placer dans les conditions de l'éclairage de Köhler, de manière à n'illuminer que le champ d'observation et donc à bénéficier d'un contraste maximal. Les rayons sont ensuite sélectionnés par un deuxième diaphragme, le diaphragme d'ouverture. Le rôle de celui-ci est de jouer sur l'éclairement du champ. En effet, le condenseur, situé juste après, est une lentille convergente dont le rôle est de former un pinceau lumineux parallèle à l'axe optique, envoyé sur le champ d'observation. Ainsi, plus le diaphragme d'ouverture est fermé, plus le champ recevra un éclairement faible. La lumière issue du condenseur arrive ensuite sur une partie relativement large de l'échantillon, mais l'optique limite les dimensions du champ d'observation à une petite surface. Après, le rôle de l'objectif est, par un jeu de lentilles convergentes, de construire une image intermédiaire agrandie d'un objet situé sur le champ d'observation. Tout l'intérêt de la microscopie réside dans le grossissement qui pourra être fait de cet objet et apprécié par l'expérimentateur. Sur cet appareillage, les grossissements disponibles sont x20, x40 et x100. Par la suite, un deuxième filtre polarisant est disposé sur le trajet optique, il s'agit de « l'analyseur ». Après passage dans le filtre, l'image intermédiaire est positionnée dans le plan focal objet de l'oculaire, une deuxième lentille convergente. Ainsi, l'image finale qui en est donnée est repoussée à l'infini. C'est le rôle principal de l'oculaire. Enfin, l'œil étant constitué d'une lentille convergente, le cristallin, celui-ci permet, sans effort, de faire converger les rayons lumineux parallèles sur son plan focal image sur lequel se trouve la rétine, qui constitue le fond de l'œil et joue donc le rôle d'écran. L'image est alors perçue nette par l'utilisateur, en lumière directe ou via une caméra permettant une acquisition en temps réel ⁹¹⁰.

2.2.1.b) Principe général.

La spécificité du microscope à lumière polarisée devant les microscopes optiques classiques réside dans la présence des deux filtres polarisants. La polarisation d'une onde électromagnétique, telle que la lumière, représente la trajectoire parcourue par le vecteur champ électrique au fur et à mesure du déplacement de l'onde. Si cette trajectoire est aléatoire, et donc que le champ électrique peut prendre n'importe quelle orientation instantanée, alors on dit que la lumière est « naturelle » ou « non polarisée ». Si en revanche, le champ électrique n'occupe que des orientations particulières au fur et à mesure du l'onde se propage, on parlera d'onde « polarisée ». Les différentes polarisations pouvant être prises par un rayonnement lumineux sont, par exemple, de type rectiligne, elliptique ou circulaire.

Le premier filtre polarisant placé devant le trajet du pinceau lumineux a pour effet de polariser la lumière naturelle, généralement de manière rectiligne. Ainsi, l'orientation du champ électrique de la lumière après le filtre se présente nécessairement suivant la direction imposée par le polariseur. Prenons le cas où l'échantillon n'a aucune propriété

⁹ Inspiré du site http://biogeol.free.fr/WP/?page_id=794

¹⁰ Inspiré du site http://www.microscopies.com/DOSSIERS/Microscopies/PHOTONIQUE/ Le%20Microscope/EKohler.htm

optique. Le deuxième filtre polarisant, similaire au polariseur, présente la particularité de pouvoir tourner selon un angle décidé par l'utilisateur. Si l'angle sous lequel l'analyseur est placé permet à la direction de polarisation sélectionnée par celui-ci d'être la même que la direction de polarisation sélectionnée par le polariseur, alors l'intégralité de la lumière arrivant sur le deuxième filtre va pouvoir passer vers l'oculaire. A l'extrême, si les deux directions de polarisation sélectionnées par les filtres sont perpendiculaires, c'est-à-dire en configuration dite « polariseur-analyseur croisés », alors l'intégralité de la lumière polarisée arrivant sur l'analyseur sera retenue, et l'oculaire ne recevra alors aucune lumière.

L'intérêt particulier de ce montage est qu'il peut donner des informations quant aux propriétés optiques de l'échantillon. Si l'on dépose un échantillon présentant une biréfringence, comme présenté dans le CH.1, la conséquence directe est que celui-ci sera optiquement actif. L'un des deux axes suivant lesquels la lumière peut se propager au sein du milieu provoque une variation dans la polarisation de celle-ci. Un tel échantillon est donc capable de faire tourner la direction de polarisation de la lumière selon une déviation caractéristique. Ainsi, même en configuration « polariseur-analyseur croisés », l'oculaire va tout de même recevoir de la lumière issue du système optique, en raison des propriétés optiques biréfringentes de l'échantillon.



FIGURE 2.8 : Schéma du principe d'un microscope à lumière polarisée.

2.2.1.c) Intérêt pratique.

La mise en évidence de la biréfringence d'un échantillon est particulièrement utile pour caractériser sa structure. En effet, et de manière générale, la biréfringence d'un système est une conséquence de l'anisotropie des espèces au sein de l'échantillon. Par exemple, les systèmes de type « cristaux liquides » présentant une large gamme de structures et d'orientations à l'échelle moléculaire ou colloïdale sont des systèmes particulièrement biréfringents. Cependant, comme précisé dans le CH.1, chaque type de mésophase présente une texture particulière suivant sa biréfringence, mais toutes les structures anisotropes ne sont pas biréfringentes.

2.2.2. Microscopie optique à contraste de phase.

2.2.2.a) Montage.

Dans le cas de systèmes transparents ne présentant aucune biréfringence, il est difficile d'opter pour une technique de microscopie optique permettant de constater la présence d'objets. On fait alors appel à une technique dite « à contraste de phase », développée par le physicien Frederik Zernike en 1935, pour observer de tels systèmes. Tout comme le microscope optique à lumière polarisée, les premiers éléments optiques restent les mêmes, à l'exception des filtres polarisants. On retrouve ainsi la source lumineuse, le collecteur, les diaphragmes de champ et d'ouverture, et le condenseur. L'échantillon est toujours éclairé, par un faisceau parallèle, sur un champ d'observation relativement large. L'ensemble des rayons lumineux, dont le faisceau est délimité par le diamètre du diaphragme d'ouverture, converge alors, après l'objectif, au foyer image de la lentille. Si la direction des rayons lumineux n'est pas modifiée par l'échantillon, en cas d'absence d'objet par exemple, celui-ci les transmet alors et l'objectif les fait converger en son foyer image. Les objectifs disponibles sur cet appareillage sont de grossissements x10 et x63. La spécificité de la microscopie à contraste de phase intervient à partir de maintenant. Sur le foyer image de l'objectif, se trouve un petit diélectrique transparent appelé « lame quart d'onde ». Cependant, l'échantillon ne fait pas que transmettre la lumière, mais peut, a priori, contenir des éléments qui diffusent bien sûr la lumière, mais également qui la diffractent. Cette diffraction s'opère suivant un cône d'ouverture dépendant de la taille caractéristique des défauts. Le faisceau diffracté va s'étaler dans le plan focal image de l'objectif, mais pas précisément sur son foyer image. L'oculaire créé une image finale à partir de l'ensemble de l'image intermédiaire placée, comme pour le microscope optique à lumière polarisée, sur son plan focal objet. Comme précédemment, cette image est enfin formée sur la rétine, par l'intermédiaire du cristallin. Celle-ci est alors perçue nette par l'utilisateur en lumière directe, ou bien via une caméra permettant une acquisition en temps réel.



FIGURE 2.9 : Schéma du principe d'un microscope à contraste de phase.

2.2.2.b) Principe général.

Le principe général du contraste de phase vient du fait que toute structure ou effets de bords présents au niveau des objets au sein d'un échantillon sont à l'origine de la diffraction de la lumière. Contrairement à la simple transmission de la phase continue où les rayons convergent tous au foyer image de l'objectif, les objets diffractent le rayonnement pour l'envoyer ailleurs sur le plan focal image. Il faut noter que l'onde transmise de référence et l'onde issue de la diffraction par un objet sont issues du même point source et sont donc cohérentes. De ce fait, elles vont donc pouvoir interférer. Ainsi, l'image intermédiaire et l'image finale de l'objet diffractant résulte donc des interférences entre l'onde transmise et l'onde diffractée. Cependant, le déphasage entre l'onde directe et l'onde diffractée est souvent trop faible pour être détectable. C'est pourquoi on place, au foyer image de l'objectif, une lame quart d'onde. Il s'agit d'un système optique destiné à induire un retard de phase de $\pi/2$, ou $\lambda/4$ d'où le nom de « quart d'onde », par rapport à une onde ne traversant pas la lame. La conséquence directe est que les seuls rayons subissant ce déphasage sont ceux qui sont simplement transmis par l'échantillon. Les rayons diffusés et diffractés ne convergeant pas au foyer image de l'objectif, ils conservent donc le simple retard de phase additionnel créé par la traversée de l'objet. Grâce à la lame quart d'onde, un rayon transmis et un rayon diffracté deviennent quasiment en phase (ou en opposition de phase). Ainsi, l'œil est maintenant capable de traduire le déphasage important entre les ondes formant l'image de l'objet et les ondes formant le fond par un contraste d'intensité visible à l'œil et proportionnel au déphasage induit par l'objet diffractant.

2.2.2.c) Intérêt pratique.

La microscopie à contraste de phase est une technique utile pour observer des objets transparents et ne présentant aucune variation notable d'indice de réfraction. Elle est donc toute indiquée pour les objets biologiques, tels que les cellules et les bactéries. Puisque la vision de l'objet est notamment provoquée par les effets de bords, tout dioptre ou membrane va retarder la phase du rayonnement et induire un déphasage visible à l'œil. D'ailleurs, la diffraction par les bords explique le léger halo blanc observé autour des objets avec cette technique, comme FIGURE 2.10. En temps normal, pour observer de tels systèmes en microscopie optique classique, il faudrait utiliser un marqueur ou un colorant, qui pourraient alors potentiellement modifier la structure ou les propriétés physico-chimiques des objets. L'avantage notable du contraste de phase est donc que l'on peut observer des systèmes *in situ* et sous leur forme native, sans avoir recours à une quelconque modification.



FIGURE 2.10 : Cliché de microscopie optique à contraste de phase d'une cellule épithéliale de joue. Image tirée du site internet « Wikipedia » ¹¹.

¹¹ https://fr.wikipedia.org/wiki/Microscope_%C3%A0_contraste_de_phase

2.3 Diffusion dynamique de la lumière (DLS).

2.3.1. Principe général de la diffusion de la lumière.

2.3.1.a) Diffusion d'un faisceau lumineux monochromatique.

Il existe différents types d'interactions entre un rayonnement électromagnétique, tel que la lumière, et la matière. Le phénomène de diffusion de la lumière s'observe lorsque le faisceau traverse un milieu où la matière est finement dispersée, c'est-à-dire un matériau hétérogène. C'est la présence d'irrégularités, pouvant s'apparenter à des points diffusants modifiant localement l'indice de réfraction du milieu, qui va créer le phénomène de diffusion. Ainsi, un matériau parfaitement homogène, tel que le vide, va permettre à un faisceau incident de se propager sans perte d'énergie, et donc sans aucune diffusion. Dans un milieu dispersé, un faisceau incident va alors, en plus d'être transmis dans la même direction que celle du rayon incident, être également envoyé dans toutes les directions de l'espace. En général, la diffusion par un objet est dite « élastique », c'est-à-dire que l'énergie captée par l'objet diffusant est totalement et instantanément restituée sous forme de rayonnement transmis ou diffusé. Aucun quantum d'énergie ne sert à augmenter l'énergie interne de la particule par absorption. De plus, la diffusion est très liée à la taille et aux caractéristiques physiques des objets diffusant. L'origine du phénomène de diffusion vient du fait qu'un objet de taille quelconque, molécule ou particule, irradié par un rayonnement lumineux voit ses électrons mis en mouvement en raison de la présence du champ électrique. A cause de la nouvelle répartition des charges, cet objet voit donc un champ électrique induit apparaître, et devient donc un dipôle (ou un multipôle) dit « oscillant ». De ce fait, le rayonnement incident va être réémis sous la forme d'un rayonnement dipolaire de même longueur d'onde, et dont l'énergie sera répartie dans toutes les directions de l'espace en raison du phénomène de diffusion. La répartition de l'énergie totale dépend essentiellement de la taille et des caractéristiques physiques de l'objet. Si l'on envoie sur un objet une lumière blanche, alors, en fonction de l'intensité de chaque rayonnement monochromatique diffusé à un angle de diffusion donné, ce phénomène peut même expliquer la couleur des milieux dispersés. Ceci reste essentiellement valable à partir du moment où les objets diffusants sont également non absorbants ¹².

2.3.1.b) Diffusion de Rayleigh.

Lorsque l'objet diffusant possède une taille caractéristique, *i.e.* un diamètre moyen, largement inférieure à la longueur d'onde du rayonnement lumineux incident (on considère en général d $\leq \lambda/10$), la diffusion occasionnée est dite « de Rayleigh ». Ainsi, pour une lumière dans le domaine visible, l'objet diffusant doit mesurer au maximum plusieurs

¹² http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/couleurs/loupe_diff_lumiere.html

dizaines de nm pour pouvoir occasionner une diffusion de Rayleigh. Il pourra donc être considéré comme ponctuel devant la longueur d'onde. Les conditions imposent à l'objet d'être sphérique, non absorbant et de présenter un indice optique proche de 1. Dans ce cas, on définit l'intensité diffusée grâce à l'expression FIGURE 2.11. Elle provient de la puissance rayonnée par chaque dipôle oscillant.

$$i_{\theta}/i_{0} = \frac{8.\pi^{4}.a^{6}}{r^{2}.\lambda^{4}} \cdot \left(\frac{n^{2}-1}{n^{2}+2}\right)^{2} \cdot (1+\cos^{2}\theta)$$
$$i_{\theta}/i_{0} = \frac{2.\pi^{2}.M}{r^{2}.\lambda^{4}.N_{A}.\rho} \cdot (n-1)^{2} \cdot (1+\cos^{2}\theta)$$

FIGURE 2.11 : Equation 1 : Loi de Rayleigh. Equation 2 : Loi de Rayleigh pour des particules en phase gazeuse.

La diffusion statique de la lumière (Static Light Scattering, SLS) permet de mesurer l'intensité diffusée à un angle donné afin d'en déduire des informations sur le système diffusant à l'aide de l'expression de l'intensité diffusée dans le régime considéré. Il s'agit cependant d'une intensité mesurée de manière instantanée, il faut donc en effectuer une moyenne dans le temps. La loi de Rayleigh classique considère chaque particule comme quasi-ponctuelle devant la longueur d'onde, et donc comme une source de diffusion incohérente et indépendante des autres.



FIGURE 2.12 : Représentation schématique de la diffusion de Rayleigh d'une particule.

Dans ces conditions, on peut faire plusieurs remarques. D'une part, on constate que la diffusion du rayonnement n'est pas isotrope. L'intensité diffusée est la somme d'une composante continue et d'une composante dépendant essentiellement du cos² de l'angle de diffusion. L'intensité diffusée est donc maximale pour un angle qui tend vers 0, c'est-à-dire vers le faisceau transmis. D'autre part, cette intensité augmente également avec la masse des objets ponctuels. Une mesure de l'intensité diffusée à un angle de diffusion donné permet donc de remonter à la masse des particules. On peut, dès lors, affirmer un résultat important, valable d'ailleurs quelque soit la loi de diffusion utilisée : les particules les plus lourdes, ou par extension les plus grosses lorsque l'on peut associer à leur masse un volume

non négligeable, diffusent le plus. Par ailleurs, l'intensité diffusée dépend de la distance à laquelle on observe le point diffusant et évolue en 1/r².

Enfin, on constate que l'intensité diffusée dépend de la longueur d'onde à la puissance 4. Ainsi, pour une molécule diatomique agissant comme un dipôle oscillant, ou pour de petites particules dans le régime de Rayleigh, si l'on mesure, à une longueur d'onde λ_1 et à une longueur d'onde $\lambda_2 = \lambda_1/2$, l'intensité diffusée à un angle donné, on constatera que la lumière de longueur d'onde λ_1 diffuse 16 fois plus que la lumière de longueur d'onde λ_2 . Le phénomène de diffusion est donc, intrinsèquement, très sensible à la longueur d'onde utilisée. C'est pourquoi, lorsqu'on utilise une lumière polychromatique comme la lumière du soleil, chaque radiation monochromatique n'est pas diffusée de manière équivalente. Par un calcul rapide, on constate que les radiations bleues ($\lambda \sim 460$ nm) sont diffusées 3.5 fois plus que les radiations rouges ($\lambda \sim 630$ nm). Ce phénomène permet donc d'expliquer la diffusion majoritaire des radiations bleues, donnant sa couleur bleue au ciel (en raison de la diffusion par les molécules de dioxygène) et donnant sa couleur bleutée aux dispersions colloïdales comme la fumée (en raison de la diffusion par les particules colloïdales de fumée). De même, si l'on regarde le faisceau transmis à travers un tel système, on constatera que la diffusion l'a appauvri de l'ensemble de ses radiations de faible longueur d'onde et lui confère donc une couleur orangée. Ceci permet d'expliquer la couleur rouge du coucher de soleil, lorsque le soleil descend vers l'horizon et que la couche d'air traversée par le rayonnement incident augmente.

En phase liquide, le problème se complexifie légèrement. De manière générale, on considère que la diffusion d'une dispersion gazeuse ou liquide provient, d'une part, de la fluctuation de la concentration en colloïde, et d'autre part, de la fluctuation de la densité du « solvant ». Ces deux effets peuvent être susceptibles de provoquer une variation d'indice de réfraction, ce qui provoque donc une diffusion. Ainsi, afin de faire varier l'indice optique local d'un milieu, on peut imaginer une augmentation locale de concentration en colloïde, ou bien une augmentation locale de la masse volumique de « solvant ». Dans le cas d'une dispersion gazeuse, la diffusion est très faible quelque soit l'angle d'observation. La variation d'indice optique est dominée par la fluctuation de la masse volumique du gaz, étant donné sa compressibilité. Les deux contributions sont, par ailleurs, toutes les deux faibles. Au contraire, dans le cas d'une dispersion liquide, la diffusion est plus importante. La variation d'indice optique est, ici, dominée par la fluctuation de concentration locale en colloïde, en raison du mouvement brownien et de la très faible compressibilité du liquide, et donc de la pression osmotique, que l'on peut écrire sous forme d'un développement du viriel à partir de l'inverse de la masse molaire. Dans ce cas précis, on écrit alors l'expression générale de l'intensité diffusée, qui a donc été simplifiée dans le cas d'un gaz, pour écrire l'expression FIGURE 2.13.

$$i_{\theta}/i_{0} = \frac{2 \cdot \pi^{2} \cdot [n \cdot (dn/dc)]^{2} \cdot c}{r^{2} \cdot \lambda^{4} \cdot N_{A} \cdot (1/M + 2 \cdot B \cdot c)} \cdot (1 + \cos^{2}\theta)$$

FIGURE 2.13 : Loi de Rayleigh pour des particules en phase liquide.

L'expression de l'intensité diffusée à un angle θ (ou à un vecteur d'onde de diffusion q) se complexifie ainsi au fur et à mesure où les objets deviennent de plus en plus gros. Cependant, nous ne développerons, ici, que l'expression analytique la plus simple, dans le cas où les objets sont considérés comme des points massiques dans le régime de Rayleigh, en raison du fait qu'ils n'ont pas de taille importante devant la longueur d'onde utilisée. Si les objets diffusants sont suffisamment gros devant celle-ci, il faut alors considérer une autre loi de diffusion, comme celle utilisée en diffusion X. Cette dernière sera développée plus tard.

Un dernier aspect important concerne l'évolution de la dépendance angulaire de l'intensité diffusée en fonction de la taille de l'objet. On ne considère plus, ici, un simple objet ponctuel auquel on peut associer une masse en raison de sa masse molaire, mais un objet plus gros et donc doté de caractéristiques géométriques. Suivant sa taille caractéristique, on peut définir une contribution différente de la diffusion de la lumière aux petits et aux grands angles. Ceci peut être exprimé à l'aide d'une expression plus complexe que la loi de Rayleigh, incluant des considérations géométriques telles que le facteur de forme, mais gualitativement, on peut expliciter cette relation comme suit. En raison du fait que la diffusion provient d'un phénomène d'interférence, on est plus à même d'observer des interférences destructives si le trajet optique entre les deux ondes cohérentes est grand. Ceci s'obtient typiquement, soit dans le cas où les points diffusant sont éloignés, et donc où l'objet est gros, soit dans le cas où l'on mesure la diffusion à un angle important. Ainsi, on résumera cette propriété remarquable de la diffusion de la lumière comme ceci. L'intensité diffusée par les petits objets est similaire quelque soit l'angle, cependant, les gros objets diffusent davantage aux grands angles. On a donc ainsi une contribution plus grande des petits objets à la courbe d'auto-corrélation mesurée aux grands angles, et une contribution plus grande des gros objets à la courbe d'auto-corrélation mesurée aux petits angles.

2.3.2. Montage de diffusion de la lumière.

Le montage de diffusion de la lumière est constitué de la manière indiquée FIGURE 2.14.



FIGURE 2.14 : Montage expérimental de diffusion dynamique de la lumière (DLS).

87

Un laser monochromatique constitue la source lumineuse. Il s'agit d'un laser de couleur verte de longueur d'onde 532 nm et de puissance de sortie inférieure à 500 mW. Il est commandé par un générateur alimentant sa production. De plus, un bain thermostaté permet de réguler la température du système, susceptible de chauffer en raison de la puissance du laser. Celui-ci passe ensuite à travers un miroir semi-réfléchissant de position réglable, dont le rôle est d'atténuer l'intensité du laser si celle-ci est trop importante. Un ensemble de différents diaphragmes, également appelés « collimateurs », sert à obtenir un faisceau laser bien parallèle en ayant éliminé les rayons parasites divergents. L'ouverture est fixée à 150 µm. Le laser arrive alors au sein de la chambre de l'échantillon. Il s'agit d'une cuve circulaire à parois transparentes. Celle-ci est remplie d'un hydrocarbure aliphatique, le décahydronaphtalène ou décaline, dans lequel plonge le tube en verre contenant l'échantillon. L'intérêt principal de la décaline est qu'elle permet d'égaliser l'indice de réfraction (« matching ») du verre constituant le tube. Ainsi, du point de vue du laser, aucun dioptre ne sera à l'origine d'une éventuelle réfraction. L'échantillon contenant les objets diffusant provoque donc un phénomène de diffusion en envoyant le rayonnement lumineux dans toutes les directions de l'espace. A un angle de diffusion donné, la détection est possible grâce à un tube photomultiplicateur EMI-9863 monté sur un goniomètre BI-200SM, couplé avec un corrélateur digital BI-9000AT. L'ensemble de ces constituants provient de Brookhaven Instruments. Le goniomètre est centré sur la cuve de décaline et son angle est commandé automatiquement par le système informatique. L'origine de cet angle (0°) est prise au niveau du faisceau transmis. Une valeur de 90° correspond à un angle de diffusion moyen. Un angle supérieur entre dans la gamme des grands angles de diffusion. A un angle donné, le détecteur capte les photons reçus par une plaque photosensible pendant une certaine durée. Afin de ne pas dégrader le détecteur, mais de pouvoir tout de même réaliser une acquisition présentant un bruit suffisamment faible, deux systèmes optiques sont présents à l'intérieur du détecteur. Le premier est une molette à régler suivant la longueur d'onde utilisée. Le deuxième, correspondant à l'ouverture d'un diaphragme, est à adapter en fonction de l'efficacité de diffusion d'un échantillon à un angle donné. Lorsque les réglages sont faits, une acquisition de 3 min est lancée via l'ordinateur. La valeur de l'angle de diffusion prise par le détecteur, ainsi que les acquisitions, sont commandées directement à partir du système informatique.

Ce montage de diffusion de la lumière peut *a priori* servir pour la technique de diffusion statique de la lumière (SLS), développée dans le paragraphe précédent, mais également pour la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS), qui constitue la méthode qui va nous intéresser en particulier. C'est en DLS que sera utilisé le corrélateur digital. La technique générale sera explicitée dans la sous-partie suivante.

2.3.3. Diffusion dynamique de la lumière.

2.3.3.a) Acquisition.

Au cours des 3 min d'acquisition, le détecteur mesure le nombre de coups par unité de temps reçus sur le tube photomultiplicateur. Chaque coup correspond typiquement à un paquet de photons diffusés par l'échantillon à un angle donné. Le système informatique trace, en temps réel, le graphe du nombre de coups instantané en fonction du temps. En raison du mouvement brownien essentiellement, mais également en raison des fluctuations liées à la densité du solvant, l'intensité diffusée par le système à un angle donné n'est pas constante. Elle fluctue légèrement en fonction de la taille des objets passant devant le trajet du faisceau incident. L'intensité diffusée étant inversement proportionnelle au carré du rayon des objets diffusant, il est facile de constater la présence d'objets anormalement gros dans l'échantillon. En effet, si une poussière ou un agrégat quelconque passe devant le trajet du faisceau incident, une fluctuation plus grosse se détachera nettement des fluctuations régulières. Il est donc nécessaire, afin d'obtenir des résultats caractéristiques des objets que l'on veut étudier, de manipuler des échantillons les plus propres possibles et d'effectuer une acquisition qui présente un signal régulier pour le nombre de coups par unité de temps.

2.3.3.b) Fonction d'autocorrélation.

Le signal présenté ci-dessus n'est, en réalité, pas le seul qui est tracé au cours du temps. Il existe un deuxième graphe qui est acquis au fur et à mesure où l'expérience progresse, et qui trace une fonction appelée « fonction d'autocorrélation ». C'est ce signal qui est réellement important pour les interprétations et capable de nous donner des informations sur le système diffusant.

La fonction d'autocorrélation est exprimée FIGURE 2.15. Elle consiste en une comparaison de l'intensité diffusée par le système à un angle donné avec la même intensité diffusée au même angle mais à un temps τ plus tard, appelé « délai ». Il s'agit donc d'une fonction de τ .

$$g(q,\tau) = \frac{\langle I(t), I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

FIGURE 2.15 : Expression de la fonction d'autocorrélation utilisée en DLS.

Intuitivement, on comprend que plus le délai est long, plus l'intensité $I(t+\tau)$ est éloignée de I(t). En réalité, ceci s'explique par le fait que l'intensité diffusée mesurée à l'instant initial n'existe qu'en raison des différents objets diffusant se trouvant sur son trajet optique. A un instant légèrement plus tard, ces objets ont bougé, notamment en raison du mouvement brownien. Ceci implique qu'il ne se trouve pas les mêmes objets que précédemment sur le trajet optique du faisceau incident. La mesure de cette quantité se fait de manière répétée au cours de l'acquisition, afin de permettre d'augmenter la statistique du tracé de l'autocorrélation. Si l'on considère les bornes de cette fonction, on devine qu'à un délai nul, les objets sont restés à la même position qu'au temps initial. La moyenne temporelle vaut alors <l²> et la fonction d'autocorrélation normalisée vaut donc 1. Au contraire, si on fait tendre le délai t vers une valeur extrêmement grande, la position initiale et la position finale des objets deviennent alors totalement décorrélées. La moyenne temporelle vaut alors <l>² et la fonction d'autocorrélation normalisée vaut donc 0. Ceci permet alors d'expliquer la forme caractéristique sigmoïdale de la courbe d'autocorrélation, représentée FIGURE 2.16.



FIGURE 2.16 : Courbe caractéristique d'autocorrélation.

Bien sûr, l'intérêt de tracer une telle fonction est de remonter à un paramètre caractéristique de la population d'objets. Intuitivement, on imagine que plus la taille des objets est grande, plus leur déplacement au sein de la dispersion sera lent. Au contraire, le mouvement brownien, à la même température donnée, va permettre aux objets d'évoluer plus vite et de présenter une décorrélation de la position entre t et t+ τ d'autant plus grande que la population est constituée de petits objets. Afin d'introduire des considérations quantitatives sur ce raisonnement, il est nécessaire de choisir un modèle adéquat afin d'ajuster la courbe d'autocorrélation à l'aide d'une fonction décrivant la décorrélation d'une population « modèle », donc monodisperse, entre un instant t et un instant t+ τ .

2.3.3.c) Modèles d'ajustement de la fonction d'autocorrélation.

Dans le cas où la population d'objets est monodisperse, la décroissance de la fonction d'autocorrélation est modélisée par une fonction à décroissance exponentielle. Il s'agit du modèle le plus simple qui puisse être utilisé. La fonction mathématique du modèle dit « à monoexponentielle » est décrite FIGURE 2.17.

$$g(\tau) = (C_0 - C_\infty) \cdot exp\left[-2 \cdot \frac{\tau}{\Delta}\right] + C_\infty$$

FIGURE 2.17 : Fonction d'ajustement monoexponentielle de la courbe d'autocorrélation.

Qualitativement, trois paramètres interviennent dans l'expression de la fonction d'ajustement : la valeur initiale notée C₀, la valeur finale notée C_∞ et le temps caractéristique Δ . Ce dernier paramètre est une grandeur permettant de décrire quantitativement la rapidité de la relaxation pour la corrélation d'un objet avec lui-même un instant τ plus tard. Il représente donc, qualitativement, l'abscisse du point d'inflexion de la courbe sigmoïdale. Par la suite, il est possible, en écrivant les expressions du coefficient de diffusion D des objets, du vecteur de diffusion q et de l'équation de Stokes-Einstein, de pouvoir calculer le diamètre hydrodynamique d_H des objets en fonction du temps de relaxation Δ et de l'angle de diffusion θ . Les expressions correspondantes sont précisées FIGURE 2.18.

$$D = q^2 \cdot \Delta \quad (1)$$

$$q = \frac{4.\pi.n}{\lambda} . \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2)$$

$$D = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_H} \quad (3)$$

$$d_{H} = \frac{16.\pi}{3} \cdot \frac{n^{2} \cdot k_{B} \cdot T}{\eta \cdot \lambda^{2}} \cdot \sin^{2}\left(\frac{\theta}{2}\right) \cdot \Delta \quad (4)$$

FIGURE 2.18 : Equation 1 : Expression du coefficient de diffusion D en fonction du vecteur d'onde de diffusion q. Equation 2 : Expression du vecteur d'onde de diffusion q. Equation 3 : Relation de Stokes-Einstein. Equation 4 : Calcul du diamètre hydrodynamique d_{H} .

L'avantage majeur de ce modèle est que, lorsque l'ajustement est convenable, le très faible nombre de paramètres intervenant dans la fonction rend aisée l'interprétation. Par ailleurs, si l'ajustement n'est pas convenable, on ne peut introduire, à l'aide de ce modèle, aucun écart à l'idéalité d'une population monodisperse. Il est donc nécessaire de basculer vers un modèle légèrement plus complexe, et donc faisant intervenir un peu plus de paramètres ajustant, mais dont l'interprétation sera moins facile.

Dans le cas où l'autocorrélation ne correspond pas à la décroissante typique d'une population monodisperse, l'ajustement par une fonction monoexponentielle se révélera défaillant. Qualitativement, on verra que si la fonction d'ajustement est globalement centrée sur le temps caractéristique Δ de la population, la défaillance de l'ajustement vient du fait que la décroissance observée expérimentalement pour la fonction d'autocorrélation est trop lente par rapport à celle prévue par un modèle simple à monoexponentielle. Physiquement, cela signifie qu'il existe des objets de différentes tailles, dont des objets plus gros que la taille moyenne qui provoquent ainsi une relaxation plus lente aux temps longs. Il faut ainsi introduire une modification purement mathématique de la fonction afin de pouvoir effectuer un ajustement satisfaisant. Le modèle obtenu est appelé « monoexponentielle étirée » et exprimé FIGURE 2.19.

$$g(\tau) = (C_0 - C_\infty) \cdot exp\left[-2 \cdot \left(\frac{\tau}{\Delta}\right)^{\beta}\right] + C_\infty$$

FIGURE 2.19 : Fonction d'ajustement à monoexponentielle étirée de la courbe d'autocorrélation.

Qualitativement, on constate qu'il existe les mêmes trois paramètres que ceux décrits précédemment dans la monoexponentielle simple. Cependant, un coefficient β est présent pour « étirer » artficiellement la fonction et rendre la décroissance plus lente que ce qu'elle n'est dans la monoexponentielle simple. Il s'agit, en réalité, d'un coefficient mathématique qui n'a aucune signification physique. Il est, cependant, possible de faire un lien entre cet exposant β et la polydispersité de la population. En effet, si l'on compare une population monodisperse de temps de relaxation Δ et une population polydisperse présentant le même temps de relaxation caractéristique, on constate que la décroissance va d'autant plus durer aux temps longs que la population est polydisperse. On peut voir ceci comme une conséquence du fait qu'il existe différentes tailles en dispersion, présentant chacune un temps de relaxation caractéristique. Concrètement, et même si les populations mono- et polydisperse sont caractérisées par le même Δ , la polydispersité impose donc à la fonction d'autocorrélation un certain « étirement » aux temps longs. Du fait que le paramètre β ne constitue qu'une simple correction mathématique, il est possible d'extraire une taille caractéristique pour la population en présence à l'aide du coefficient Δ et des mêmes formules que précédemment. Il faut cependant garder en tête que la présence de l'exposant β montre bien que la population n'est pas monodisperse, et que la taille caractéristique calculée n'est que relativement représentative du système, un peu comme une moyenne. Par ailleurs, il n'existe pas réellement de limite de validité pour le paramètre β , mais en-deca d'un certain seuil, la fonction devient tellement étirée que la taille caractéristique issue du paramètre Δ n'est plus réellement considérée comme caractéristique du système en présence.

Pour finir, il existe différents modèles plus complexes, et dont le nombre de paramètres d'ajustement est supérieur à ceux présentés ci-avant. La difficulté d'interprétation vient du fait qu'un ajustement à l'aide d'un nombre élevé de paramètres est, mathématiquement, plus à même d'ajuster correctement un signal expérimental quelconque. Néanmoins, son interprétation physique est souvent d'autant plus difficile qu'il y a de paramètres. On trouve, par exemple, la méthode des cumulants, qui permet d'introduire la polydispersité sous la forme d'un facteur β très faible, intervenant dans la courbure de la sigmoïde. Cette méthode se base sur le fait que l'on puisse considérer l'écart à la monoexponentielle comme un développement limité, et donc une série de cumulants. On peut donc exprimer une valeur pour la polydispersité, en tenant compte de ces

cumulants, bien que son interprétation physique soit, dans cette méthode aussi, assez peu fiable. Enfin, on peut recourir à un modèle dit « à bi-exponentielles », afin d'ajuster au mieux la fonction d'autocorrélation. Celui-ci considère l'ajustement comme une somme de deux monoexponentielles avec des poids relatifs différents. Mathématiquement, il est bien entendu plus facile d'arriver à un ajustement correct, mais physiquement, il est nécessaire d'être capable de justifier le choix de ce modèle et le fait que l'on considère la présence de deux populations bien distinctes concernant les objets diffusant.

2.4 Diffusion des rayons X.

2.4.1. Définitions générales.

2.4.1.a) Rayons X.

En 1895, le physicien allemand Wilhelm Röntgen découvrit qu'un tube à décharge envoyant un rayonnement sur une plaque de baryum platino-cyanide à l'intérieur d'une boîte noire isolée de la lumière extérieure provoquait une fluorescence sur ce matériau. En plaçant différents obstacles entre la plaque fluorescence et un détecteur photosensible, il se rendit compte que les objets faisaient plus ou moins obstacle au rayonnement. Il a été découvert un peu plus tard qu'il s'agit d'un nouveau type d'onde électromagnétique : les rayons X (RX). Ces derniers peuvent, en effet, être considérés comme de la lumière, mais non visible. Dans le spectre électromagnétique, le domaine des RX se situe approximativement entre 0.01 nm et 10 nm. Par comparaison avec la lumière visible, il s'agit donc d'une onde très énergétique. C'est pourquoi la production et l'utilisation des RX sont extrêmement réglementées de par leur caractère ionisant.

2.4.1.b) Vecteur d'onde de diffusion.

De manière générale, et quelque soit le type d'onde électromagnétique considéré, on peut caractériser le changement de direction observé pour un faisceau diffusé ou diffracté par son angle de déviation θ , utile pour apporter des informations structurales sur le système étudié. En général, en diffusion ou diffraction des rayons X, il est plus pratique de caractériser ce paramètre par un « vecteur d'onde de diffusion », noté q. Il s'agit d'une construction vectorielle exprimant la différence entre le vecteur d'onde du faisceau transmis et le vecteur d'onde du faisceau diffusé ou diffracté à l'angle θ . Géométriquement, on peut exprimer ce vecteur d'onde en fonction de l'angle θ entre les deux rayons, comme FIGURE 2.20.

$$q = \frac{4.\pi}{\lambda} . \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

FIGURE 2.20 : Expression du vecteur d'onde de diffusion q.

Si l'on imagine que les faisceaux transmis et diffusé/diffracté arrivent sur le détecteur à une distance échantillon-détecteur notée D, on peut estimer, dans la limite des petits angles θ , la valeur du vecteur d'onde de diffusion. Pour ce faire, on mesure directement sur le détecteur, la distance entre le centre du détecteur, où arrive le faisceau transmis, et la position où arrive le faisceau diffusé/diffracté à un angle θ , à l'aide du tracé du « triangle de diffusion »



FIGURE 2.21 : Relation géométrique entre le vecteur d'onde de diffusion q et l'angle de diffusion θ .

Géométriquement, on constate que l'on peut également déduire une relation graphique entre le vecteur d'onde de diffusion q et l'angle θ entre les deux faisceaux. Cette expression, donnée FIGURE 2.22, reste valable dans la limite des petits angles.



FIGURE 2.22 : Equation : Relation entre l'angle de diffusion θ , le vecteur d'onde de diffusion q et la distance échantillon-détecteur D. Schéma : Relation géométrique entre ces termes.

2.4.2. Montage de diffusion/diffraction X.

2.4.2.a) Montage « Anode tournante ».



FIGURE 2.23 : Schéma du montage de diffusion X dit « anode tournante ».

Sur cet appareillage, le montage de diffusion/diffraction X est, comme toujours, constitué d'une source de rayons X. Dans le cas de ce prototype réalisé au laboratoire, et appelé « anode tournante », la production est assurée par un système du type « tube de Coolidge ». Le fonctionnement est le suivant. Un filament de tungstène est chauffé et émet donc des électrons en raison de l'effet thermo-ionique. Ces électrons sont attirés par une pièce en cuivre portée à un potentiel positif (+) très important. De ce fait, elle constitue donc une anode. Le filament, également relié au circuit électrique, représente donc le pôle (-) du système en raison du fait que les électrons y sont produits, et constitue donc la cathode. Dans ce système électrique à haute tension, des électrons à haute énergie sont donc accélérés par la différence de potentiel entre l'anode et la cathode, pour frapper la surface de l'anode, également appelée « anti-cathode ». L'interaction entre l'électron et la matière peut être de différents types. Si la collision frappe un électron, un réarrangement électronique va s'opérer au sein de la matière. L'énergie du photon qui est alors émis est d'autant plus grande que l'électron frappé est proche du noyau. On observe ainsi un phénomène de fluorescence avec émission d'un photon d'énergie plus ou moins grande. Le phénomène important est le suivant. De manière générale, lorsqu'un électron d'énergie cinétique importante s'approche d'un atome, il ressent alors une forte attraction électrostatique. Celle-ci provoque donc un léger changement de direction, ainsi qu'un ralentissement non négligeable. L'énergie ainsi perdue par l'électron va être cédée sous la forme de photons très énergétiques, constituant un « rayonnement de freinage » (ou « Bremsstrahlung »). Cet effet est appelé « effet synchrotron », et est également appliqué dans la production des RX aux synchrotrons. En raison du fait que la majeure partie de l'énergie fournie par l'interaction rayonnement-matière est néanmoins cédée sous la forme de chaleur, l'anode est refroidie par une régulation thermique, et tourne sur elle-même afin de répartir la chaleur sur l'ensemble de sa surface. C'est pourquoi ce type de production des rayons X porte le nom « d'anode tournante ». Les rayons X issus de l'anode possèdent une énergie caractéristique du cuivre. Ce rayonnement n'est donc pas monochromatique, mais possède plusieurs raies discrètes et caractéristiques : les raies K_{α} et K_{β} du cuivre.

Afin de ne récupérer qu'un rayonnement monochromatique, il faut faire passer ce rayonnement sur un monochromateur à monocristal. Celui-ci a pour effet de sélectionner une seule longueur d'onde, par diffraction sur un réseau, à partir d'un faisceau polychromatique. La raie sélectionnée est la plus intense, il s'agit de la raie K_{a1} du cuivre, de longueur d'onde 1.5418 Å. Au fur et à mesure que le rayonnement parcourt son trajet dans un tube à vide, celui-ci passe ensuite dans un ensemble de plusieurs « pinholes » alignés et

formant le collimateur, de tailles respectives 0.5 mm, 0.3 mm et 0.8 mm. Le rayonnement X arrive, par la suite, sur un porte-échantillon de position dans le plan orthogonal au faisceau direct. Celui-ci peut être éventuellement régulé en température en le plaçant dans un four ou à l'aide d'un Peltier. L'échantillon se trouve dans un capillaire en quartz ou en verre, scellé au chalumeau et à la colle silicone « CAF4 » de Bluestar Silicones. Afin de détecter les rayons diffusés et diffractés par cet échantillon, un détecteur MAR345 de Marresearch, consistant en une plaque photosensible, est monté sur un rail et motorisé afin de pouvoir régler la distance D échantillon-détecteur. Cette distance est donc adaptable de 122 mm à 1200 mm, ce qui correspond à une gamme de vecteurs d'onde de diffusion accessible de 0.021 Å⁻¹ à 3.7 Å⁻¹. Afin que le faisceau transmis n'endommage le détecteur, une petite pastille de plomb, le « beamstop », se trouve en son centre afin d'absorber les rayons X émis dans cette direction.

L'avantage majeur de cet appareillage est que la configuration du système permet d'y insérer une régulation thermique pouvant aussi bien aller en-dessous qu'au-dessus de la température ambiante, ce qui permet ainsi de mener des études en température. De plus, le réglage précis de la distance échantillon-détecteur est un avantage étant donné que l'on peut décider exactement, en fonction du signal attendu, de la gamme de vecteurs d'onde de diffusion à atteindre. Un dernier point positif est que l'on peut, en outre, placer le détecteur très proche de l'échantillon, de manière à obtenir un signal aux grands angles.

2.4.2.b) Montage « Nanostar H.I. ».



FIGURE 2.24 : Schéma du montage de diffusion X dit « Nanostar ».

Sur le montage dit « Nanostar », un tube rayons X, permet de générer un faisceau présentant les raies caractéristiques d'émission du cuivre. Ce processus est assuré de la même manière que dans le cas de l'appareillage précédent. Tout comme ce dernier, un monochromateur à monocristal est présent afin de récupérer la même raie K_{a1} du cuivre, de longueur d'onde 1.5418 Å. Ici, le trajet du rayonnement X est essentiellement effectué sous vide relativement poussé. Les « pinholes » alignés présents ici, et formant le collimateur, sont au nombre de trois. Le premier, de 750 μ m, sert à sélectionner un faisceau large. Le deuxième, de 400 μ m, sert à définir un diamètre plus précis pour le faisceau. Le troisième,

de 1000 µm, sert à éliminer la diffraction due au deuxième. Le faisceau parallèle arrive, par la suite, dans une chambre à vide contenant le porte-échantillon. Le vide est créé et cassé à l'aide d'une pompe à vide et d'un système de vannes, jusqu'à atteindre un vide primaire d'environ 10 mbar. Le porte-échantillon présente une position qui peut varier dans le plan orthogonal au faisceau direct. Celui-ci est régulé en température à l'aide d'un réfrigérant, mais la consigne en température peut donc aller moins haut que dans le cas de l'anode tournante. L'échantillon se trouve, ici aussi, dans un capillaire en quartz ou en verre, scellé au chalumeau et à la colle silicone « CAF4 » de Bluestar Silicones. La spécificité du Nanostar est que le détecteur peut se trouver uniquement à trois distances précises de l'échantillon, correspondant ainsi à trois configurations disponibles dites « petits angles » (PA), « moyens angles » (MA) et « grands angles » (GA). Le détecteur est un détecteur HI-STAR bidimensionnel à gaz, de Bruker, et fonctionnant en régime proportionnel. Suivant les trois configurations possibles, il est possible de se placer à une distance D échantillon-détecteur de 1060 mm (PA), de 650 mm (MA), ou bien de 100 mm (GA), ce qui correspond à une gamme de vecteurs d'onde de diffusion accessible de 0.092 Å⁻¹ à 0.2 Å⁻¹ (PA), de 0.0196 Å⁻¹ à 0.35 Å⁻¹ (MA), ou bien de 0.04 Å⁻¹ à 0.8 Å⁻¹ (GA). Celui-ci possède également un « beamstop » en son centre.

L'avantage majeur de cet appareillage est que l'ensemble du système est maintenu sous vide poussé. Ceci permet d'éviter la diffusion du rayonnement X par les molécules présentes dans l'air, et ainsi d'optimiser le rapport signal/bruit. La résolution du signal est donc bien meilleure, essentiellement aux petits angles. De plus, il est possible de descendre beaucoup plus bas, en termes de vecteurs d'onde de diffusion, que dans le cas de l'anode tournante.

2.4.3. Principe général de la diffusion/diffraction X.

2.4.3.a) Diffusion X.

Tout comme la diffusion d'un faisceau lumineux, présentée dans la partie précédente, les rayons X sont également susceptibles d'être diffusés par des objets colloïdaux. En réalité, la diffusion X est sensible au contraste entre la densité électronique de la phase continue et la densité électronique locale. Contrairement à la diffusion dynamique de la lumière, et à l'instar d'une approche similaire à la diffusion statique de la lumière, nous allons nous intéresser à la relation précise qui existe entre l'intensité diffusée dans ces conditions et les caractéristiques des objets diffusant. Cependant, à l'inverse du cas simple de la diffusion de Rayleigh, les objets sont ici non ponctuels, mais sont, en plus, considérés comme relativement gros devant la longueur d'onde de 1,5418 Å. Si la taille caractéristique de l'objet devient du même ordre de grandeur que la longueur d'onde, la loi de Rayleigh n'est plus valable et on fait alors appel à une correction, appelée « approximation de Rayleigh-Gans-Debye » (RGB). Si la taille caractéristique de l'objet devient supérieure à la longueur d'onde, comme ici, alors la diffusion est dite « de Mie ». Dans ces deux types de

diffusion, l'objet est suffisamment gros devant la longueur d'onde pour le considérer constitué de plusieurs sources diffusant chacune de manière indépendante. Les ondes diffusées par chacun de ces points seront cohérentes et pourront donc interférer entre elles. La différence de marche entre deux ondes issues du même objet sera, en effet, à l'origine d'une diffusion additionnelle.



FIGURE 2.25 : Schéma de la diffusion par un point d'une particule et différence de marche δ L associée à deux rayons diffusés en interférence.

Les conditions intrinsèques à l'utilisation de ces deux lois sont toujours liées à l'aspect sphérique des objets, à leur caractère non-absorbant et à la valeur de leur indice de réfraction proche de 1. La diffusion de Mie voit son application dans la couleur blanche des nuages, formées de gouttelettes d'eau de taille caractéristique grande devant la longueur d'onde de la lumière issue du Soleil ⁶⁸.

Dans l'approximation de RGB et dans la diffusion de Mie, l'expression analytique de l'intensité diffusée est beaucoup plus complexe, du fait que la fonction présente plusieurs extrema à différents angles de diffusion. Cette dernière dépend d'un terme de contraste électronique (ρ_p - ρ_e), ainsi que de la probabilité que le faisceau rencontre un objet, liée à la fraction volumique en particule Φ_p et au volume d'une particule V_p . La présence de plusieurs sources de diffusion cohérentes impose alors d'introduire un paramètre qui prend en compte la forme de la particule. Il s'agit du facteur de forme, noté P(q). L'expression de l'intensité des rayons X diffusés, en fonction du vecteur d'onde de diffusion, est explicitée FIGURE 2.26, si les particules sont toujours indépendantes les unes des autres, comme dans un régime extrêmement dilué.

$$I(q) = \left(\rho_p - \rho_e\right)^2 \cdot \Phi_p \cdot V_p \cdot P(q)$$

FIGURE 2.26 : Expression de l'intensité diffusée I(q) en fonction du facteur de forme P(q) de l'objet diffusant.

Concrètement, le facteur de forme P(q) est lié à la géométrie de la particule, dont dépend la répartition des différentes sources de diffusion à l'intérieur de l'objet. Cette distribution des distances entre points diffusants peut être très symétrique, comme dans le cas d'un objet sphérique par exemple, ou bien très asymétrique, comme dans le cas d'un objet de géométrie quelconque. Par ailleurs, on peut définir deux régimes distincts pour l'évolution de l'intensité diffusée en fonction de q. Le régime de Guinier énonce qu'aux faibles vecteurs d'onde de diffusion, la fonction I(q)=f(q) présente une pente de $-Rg^2/3$ caractéristique du rayon de giration des objets. Aux grands vecteurs d'onde de diffusion, le régime de Porod énonce que I(q) évolue maintenant en l'inverse d'une puissance de q, caractéristique de la géométrie de l'objet. Par exemple, dans le cas d'une sphère, $I(q) \alpha q^{-4}$.

2.4.3.b) Diffraction X.

La diffraction est un phénomène reposant sur l'interaction entre un rayonnement et un système structuré, donc présentant une périodicité spatiale. La condition à respecter est que les ordres de grandeur de la périodicité au sein du système structuré et de la longueur d'onde du faisceau doivent être les mêmes. Il a été décrit dans la partie II.2. sur la microscopie à contraste de phase, que la diffraction d'un rayonnement lumineux est possible pour des systèmes structurés de taille micrométrique, en accord avec la résolution d'un microscope optique. Les rayons X étant également une onde électromagnétique, leur diffraction est aussi possible. Cependant, il s'agit ici d'une diffraction qui s'opère sur des systèmes structurés de taille caractéristique beaucoup plus faible, typiquement nanométriques. En accord avec la longueur d'onde caractéristique des RX, les structures pouvant être à l'origine du phénomène de diffraction X peuvent présenter une périodicité spatiale de 0.01 nm à 10 nm. Il s'agit donc essentiellement de structures à l'échelle moléculaire ou colloïdale.

La loi décrivant la relation entre la périodicité spatiale d du système, l'angle du faisceau diffracté θ et la longueur d'onde λ du rayonnement, est appelée la loi de Bragg. Il s'agit de la loi fondamentale du phénomène de diffraction. Celle-ci est exprimée FIGURE 2.27.

$$n.\lambda = 2.d.\sin(\theta)$$

FIGURE 2.27 : Expression de la loi de Bragg.

Concrètement, la loi de Bragg exprime que pour un rayonnement monochromatique de longueur d'onde λ donnée, la diffraction d'un réseau organisé de périodicité d provoquera une famille d'ondes diffractées d'angles θ_i . Au sein d'une famille d'ondes issues de la diffraction du même réseau, on trouve ainsi n ordres caractérisés par des multiples de sin(θ).



FIGURE 2.28 : Illustration de la loi de Bragg sous la forme d'une onde diffractée par un réseau de périodicité d.

La non-linéarité de la dépendance en θ justifie le fait qu'en diffraction X, on travaille souvent avec les vecteurs d'onde de diffusion, où chaque ordre apparaît aux multiples du vecteur d'onde du premier ordre. Par ailleurs, il est possible d'exprimer simplement le vecteur d'onde de diffusion q₀ du premier ordre de la diffraction X par une structure de périodicité d. Pour cela, on combine l'expression du vecteur d'onde de diffusion avec la loi de Bragg afin de faire disparaître la composante en θ . Ceci mène à l'expression suivante, très utilisée, par exemple, pour déterminer expérimentalement la périodicité des phases lamellaires. De plus, on constate également que plus un réseau présente une distance de répétition faible, plus le premier ordre de la diffraction d'un rayonnement de longueur d'onde λ donnée aura lieu aux grands angles. On exprime ainsi la relation FIGURE 2.29.

$$q_0 = \frac{2.\pi}{d}$$

FIGURE 2.29 : Relation entre le vecteur d'onde de diffusion obtenu au premier ordre et la périodicité d du réseau.

Si l'on considère un système structuré, chaque objet pris indépendamment va, bien sûr, diffuser le rayonnement X, en accord avec la diffusion de Mie comme décrit dans la partie précédente. Cependant, l'organisation périodique inter-objet va permettre au faisceau d'être diffracté en plus, en raison des interférences générées par les ondes cohérentes étant diffusées par chaque objet. Cette composante va donc avoir pour effet d'introduire un terme correctif en plus dans l'expression de l'intensité reçue par le détecteur à chaque vecteur d'onde de diffusion. Ce paramètre S(q), appelé « facteur de structure », intervient donc lorsque les particules sont en régime relativement concentré.

$$I(q) = (\rho_p - \rho_e)^2 \cdot \Phi_p \cdot V_p \cdot P(q) \cdot S(q)$$

FIGURE 2.30 : Expression de l'intensité diffusée I(q) en fonction du facteur de forme P(q) et du facteur de structure de l'objet diffusant si une organisation est présente.

Concrètement, le facteur de structure S(q) prend en compte des paramètres comme la périodicité spatiale du réseau, le nombre de couches empilées, ainsi que des aspects physiques comme la fluctuation thermique des différentes couches.

2.4.3.c) Configuration de l'appareillage et obtention du diffractogramme.

Il a été décrit précédemment que les phénomènes de diffusion et de diffraction permettaient aux objets diffusants d'envoyer les rayons X à différents angles caractéristiques de la structure de l'échantillon. Prenons l'exemple d'une structure de périodicité d. Une diffraction du rayonnement par cet empilement n'est possible que si l'angle suivant lequel le faisceau arrive sur l'objet est celui qui est prévu par la loi de Bragg, par exemple le premier ordre θ_0 . Il se trouve cependant, au sein de l'échantillon, différentes orientations de cet empilement de périodicité d. Si l'on en considère une seule parmi toutes les orientations permettant au faisceau incident d'arriver avec un angle θ_0 sur la structure, on constatera que la diffraction X générée ne pourra permettre au rayonnement que d'arriver sur le détecteur selon une unique direction, imposée par la réflexion du faisceau incident sur les couches périodiques. Il en résultera ainsi un unique point, à l'angle θ_0 caractéristique de la périodicité de l'objet. Dans un système où, *a priori*, coexiste l'ensemble des orientations possibles pour un empilement de périodicité d, la diffraction isotrope générée par chaque orientation où le faisceau arrive sur la structure suivant un angle θ_0 , va créer sur le détecteur une infinité de points sur le cercle d'angle θ_0 . Contrairement à la diffraction anisotrope d'une structure présentant une organisation préférentielle au sein de l'échantillon, la diffraction isotrope permet la formation d'un cercle entier, d'angle θ_0 caractéristique, sur le détecteur. En effet, on convient généralement qu'une telle diffraction permet d'envoyer les rayons X suivant un cône de révolution d'angle solide θ_0 . Du point de vue du détecteur, ce cône va apparaître sous la forme d'une coupe circulaire centrée au niveau du faisceau transmis, comme FIGURE 2.31.



FIGURE 2.31 : Représentation schématique de la diffusion isotrope et anisotrope, à un même angle de diffusion θ .

En raison des facteurs de forme et de structure des objets diffusants, on comprend que les angles suivant lesquels le détecteur va recevoir des rayons X va dépendre essentiellement des caractéristiques physiques du système, que celui-ci présente une périodicité ou non. Afin de pouvoir recueillir l'ensemble des informations issues de la diffusion X et de la diffraction X du système, les principaux facteurs limitants sont les dimensions du détecteur ainsi que sa résolution. De ce fait, on est obligé d'adapter la distance échantillon-détecteur à la gamme de vecteurs d'onde que l'on souhaite atteindre.

Pour obtenir des informations extraites du rayonnement diffusé/diffracté aux petits angles, on doit alors augmenter la distance échantillon-détecteur. Ceci va permettre au cône d'angle solide θ de pouvoir former, sur le détecteur, un cercle de diamètre suffisamment grand, et donc des vecteurs d'onde de diffusion suffisamment grands, pour pouvoir obtenir une image 2D de bonne résolution sur le détecteur. Les facteurs limitants sont ici l'éloignement du détecteur vis-à-vis de l'échantillon, ainsi que la diffusion parasite du rayonnement par les molécules présentes dans l'air sur l'ensemble du trajet jusqu'au détecteur. Cette configuration est appelée « Diffusion X aux petits angles » (« Small Angle X- ray Scattering », notée SAXS). Dans ce cas de figure, l'ensemble des rayons diffusés/diffractés à des angles supérieurs à l'angle limite imposé par la dimension du détecteur n'y sont pas visibles. Aux petits angles, on pourra recueillir des informations structurales de grande taille caractéristique, comme par exemple la périodicité issue de la diffraction d'une phase lamellaire, ou les caractéristiques physiques issues de la diffusion d'une bicouche de vésicule.

A l'inverse, si l'on veut obtenir des informations issues du rayonnement diffusé/diffracté aux grands angles, on doit alors diminuer la distance échantillon-détecteur. Ceci va ainsi permettre aux cônes d'angles solides θ relativement grands de pouvoir atteindre le détecteur. Puisqu'une distance échantillon-détecteur trop grande ne permettra pas au faisceau diffusé à un grand angle d'intercepter le détecteur, les facteurs limitants sont ici la proximité du détecteur vis-à-vis de l'échantillon, et la dimension du détecteur. Cette configuration est appelée « Diffusion X aux grands angles » (« Wide Angle X-ray Scattering », notée WAXS). Dans ce cas de figure, l'ensemble des rayons diffusés/diffractés aux plus petits angles sont également présents. Cependant, le fait que ces diffusions apparaissent sous la forme de signaux tous concentrés à des vecteurs d'onde très faibles, et donc proches du faisceau transmis, rend difficile l'exploitation des informations qui leur sont relatives, à défaut d'une bonne résolution. Aux grands angles, on pourra recueillir des informations structurales de faible taille caractéristique, comme par exemple la diffusion ou la diffraction des chaînes aliphatiques au sein d'une bicouche, nous renseignant ainsi sur leur état structuré (« gel ») ou fluide, ou bien la diffusion du réseau de molécules d'eau, se trouvant toutes à une distance moyenne les unes des autres. En effet, il est possible, expérimentalement, d'identifier simplement l'état physique de la bicouche. La répétition périodique des chaînes gel à très courte distance provoquera, en WAXS, une diffraction X mise en évidence par au moins un pic apparaissant aux grands vecteurs d'onde, typiquement vers 15 nm⁻¹. Dans le cas d'une bicouche fluide, et grâce à la même technique, on ne peut mettre en évidence qu'une bosse large, caractéristique de la diffusion d'une structure fluide, au même vecteur d'onde, caractéristique de la distance d'espacement moyenne entre les chaînes mais sans aucune périodicité, comme observé pour un capillaire d'eau.



FIGURE 2.32 : Représentation schématique de la diffusion aux grands angles (WAXS) et aux petits angles (SAXS).

Une fois l'acquisition finie, on obtient une image 2D du détecteur présentant, au niveau des régions les plus claires, un nombre maximal de photons X reçus. Afin de cumuler

102

suffisamment de signal pour obtenir une bonne statistique et un contraste maximal, l'acquisition d'un échantillon est, en général, lancée au moins pendant 10h, étant donné le fait que ceux-ci sont en régime dilué et diffusent relativement peu. La présence d'air sur le trajet du faisceau X, à l'origine d'une diffusion parasite, est également à éviter au maximum étant donné qu'elle provoque un faible contraste sur le détecteur 2D. Afin d'obtenir un signal interprétable et que l'on pourra ajuster à l'aide d'un modèle mathématique, il est nécessaire de n'attribuer qu'une unique valeur d'intensité pour chaque angle (ou vecteur d'onde de diffusion). Il s'agit donc de procéder à une intégration de l'intensité de chaque pixel du détecteur 2D en fonction de la distance au centre du détecteur. Cette étape est réalisée. On obtient donc une courbe I=f(q), appelée « diffractogramme ». Si cette opération n'est pas gênante dans le cas d'une diffusion isotrope, elle le devient dans le cas où les orientations préférentielles de l'objet provoquent une diffusion dans certaines directions seulement. En effet, l'intégration d'un tel signal provoque un effet de moyenne qui nivèle totalement l'intensité obtenue pour un angle de diffusion donné, et efface toute information mettant en évidence une quelconque anisotropie.

Une diffraction apparaît, sur le détecteur 2D, sous la forme d'une couronne d'épaisseur très fine, du fait qu'elle n'apparaisse que pour un angle précis. A l'opposé, une diffusion est un phénomène provoquant l'apparition, sur le détecteur 2D, d'un signal beaucoup plus large. Etant donné que la distance de répétition des objets n'est pas donnée précisément, comme dans le cas d'un système structuré, la diffusion est centrée autour d'un angle donné sur le détecteur 2D, mais apparaît sous la forme d'une couronne épaisse présentant un large étalement en termes d'angles de diffusion. Une fois l'intégration faite, on retrouve donc le facteur de structure sous la forme d'un ensemble de pics, dits « de Bragg », pour les vecteurs d'onde précis auxquels la diffraction est observée. Au contraire, le facteur de forme se retrouve sous la forme d'une bosse large. De manière générale, dans un diffractogramme, la largeur d'un signal est directement corrélée au niveau d'organisation d'une structure et à la possibilité de définir une distance de répétition précise et peu fluctuante, à plus ou moins longue distance.

2.4.3.d) Modèle d'ajustement.

Au sein de ce travail, une attention toute particulière va être apportée au facteur de forme. En effet, le système d'étude étant des lipides nucléotides, on s'attend à ce que les molécules s'auto-assemblent pour former localement une bicouche. C'est ce motif qui se trouve à la surface de chaque objet, et qui va donc constituer l'unité de base permettant la diffusion d'un rayonnement incident. En particulier, le facteur de forme de cette bicouche est important afin d'extraire des informations structurales sur le système étudié. Quelque soit la morphologie des objets en présence, si ceux-ci sont constitués d'une bicouche, alors le facteur de forme obtenu sur le diffractogramme sera caractéristique de cette dernière. De plus, si l'objet présente une répétition périodique de ce motif, alors les informations issues du facteur de structure nous permettrons de remonter à la distance périodique observée

dans le système (d), au nombre de bicouches empilées (N) et également à une indication sur l'élasticité de la bicouche à travers le paramètre de Caillé (η).

Afin d'obtenir ces informations structurales, nous utiliserons donc un modèle adéquat pour ajuster le facteur de forme caractéristique d'une bicouche. Il s'agit du modèle de Nallet et al ⁶⁹. Physiquement, ce modèle part du principe que, comme tout motif ou objet engendrant une diffusion, c'est la variation de densité électronique (et donc d'indice optique local) qui permet de générer la diffusion d'un faisceau incident. Concernant la bicouche, on construit une fonction mathématique en créneaux, modélisant la fluctuation de densité électronique au sein de la bicouche (FIGURE 2.33).



FIGURE 2.33 : Illustration du profil de densité électronique en créneau dans le modèle de Nallet appliqué à une bicouche.

Si, de plus, une organisation structurale est présente à partir de ce motif de base, des pics de Bragg sont présents en plus, et l'intensité diffusée s'obtient à partir du produit entre le facteur de forme et le facteur de structure. Le facteur de structure affecte l'allure du diffractogramme dans le sens où les pics de Bragg viennent s'additionner à la bosse relative au facteur de forme présente initialement. La résolution de ces pics est d'ailleurs importante dans la mesure où elle révèle le degré d'organisation au sein de la répétition périodique. L'expression analytique de l'intensité diffusée, grâce au modèle de Nallet, permet donc de prendre en compte aussi bien les caractéristiques géométriques de la bicouche, constituant l'élément de base à l'origine de la diffusion du rayonnement, que les caractéristiques structurales d'un éventuel empilement de ces bicouches ⁶⁹. D'un point de vue mathématique, ce modèle s'exprime à l'aide de la fonction décrite FIGURE 2.34.

$$P(q) = \frac{1}{q^4} \left[\sin(q \cdot (\delta_T + \delta_H)) - \frac{\sin(q \cdot (\delta_T + \delta_H)) \cdot \sin(q \cdot \delta_T)}{\sin(q \cdot \delta_T)} \right]^2$$

FIGURE 2.34 : Expression du facteur de forme d'une bicouche d'après le modèle de Nallet.

Dans le cas d'une absence de structure, on constate que la fonction présente trois paramètres libres afin de pouvoir ajuster au mieux le diffractogramme expérimental : q*, δ_H et δ_T . Le paramètre q* est lié au contraste électronique existant entre la tête polaire et la

queue apolaire de l'amphiphile. Il est facilement identifiable sur le diffractogramme, puisqu'il est donné par la position du minimum situé juste avant la bosse caractéristique du facteur de forme. Les paramètres δ_H et δ_T sont respectivement la longueur de la tête et de la queue d'un lipide au sein de la bicouche. En considérant $2\delta_H$, on obtient donc l'épaisseur hydrophile totale de la bicouche, et en considérant $2\delta_T$, on obtient donc l'épaisseur hydrophobe totale de la bicouche. A l'aide de ces paramètres ajustés, il est possible d'obtenir l'épaisseur totale de la bicouche, donnée par $2(\delta_H + \delta_T)$. Il est donc possible, à l'aide d'un tel modèle visant à ajuster le facteur de forme, de remonter aux propriétés structurales de l'élément constitutif des objets et responsable de la diffusion du rayonnement X : la bicouche lipidique. Ce modèle considère, cependant, que la densité électronique est la même pour les deux faces hydrophiles de la bicouche. Si celles-ci ne sont pas équivalentes, il est alors nécessaire d'apporter une correction pour le modèle précédent. Ce cas peut se présenter lorsque, par exemple, un objet est collé sur une seule des deux faces polaire de la bicouche. Cette dernière devient alors asymétrique. Oliveira et al.⁷⁰ a récemment décrit un modèle théorique basé sur des gaussiennes et qui introduit deux contrastes électroniques distincts. Le premier représente le contraste entre la partie hydrophile la plus fine, constituant donc l'épaisseur hydrophile de l'analogue symétrique de la bicouche, et la partie hydrophobe; tandis que le deuxième représente le contraste entre les deux parties hydrophiles, et permet donc de quantifier l'asymétrie de la bicouche. Qualitativement, le diffractogramme d'une bicouche asymétrique est caractérisé par une élévation de son minimum de facteur de forme, en q^{*}, par rapport à la ligne de base. En se basant sur cette approche, il est possible d'adapter le modèle de Nallet afin de permettre de décrire le facteur de forme d'une bicouche asymétrique à l'aide d'un profil électronique en créneaux, présentant donc une même longueur hydrophobe δ_T associée à un contraste électronique $\Delta \rho_T$ mais deux longueurs (δ_H et δ_{Ha}) et deux contrastes électroniques ($\Delta \rho_H$ et $\Delta \rho_{Ha}$) hydrophiles distincts.

$$P(q) = C + \frac{A}{q^4} \cdot \left[\left[\Delta \rho_H \left[\cos(q, \delta_T) - \cos(q, (\delta_H + \delta_T)) \right] \right]^2 + \Delta \rho_{Ha} \left[\cos(q, (\delta_{Ha} + \delta_T)) - \cos(q, \delta_T) \right]^2 + \left[\Delta \rho_H \left[\sin(q, (\delta_H + \delta_T)) - \sin(q, \delta_T) \right] + 2 \cdot \Delta \rho_T \sin(q, \delta_T) + \Delta \rho_{Ha} \left[\sin(q, (\delta_{Ha} + \delta_T)) - \sin(q, \delta_T) \right]^2 \right]$$

FIGURE 2.35 : Expression de l'intensité diffusée par une bicouche asymétrique, d'après le modèle de Nallet.

Lorsqu'un facteur de structure intervient en plus dans l'intensité diffusée, comme par exemple dans le cas de vésicules multilamellaires, il est alors nécessaire d'utiliser le modèle de Nallet dans son intégralité. On constate alors que plusieurs paramètres supplémentaires interviennent dans l'ajustement, notamment le paramètre de Caillé η permettant de décrire la flexibilité de l'empilement lamellaire, le nombre de couches empilées N, la résolution expérimentale δq directement corrélée à la largeur des pics à mi-hauteur et donc au degré

d'organisation de l'empilement, et la distance de périodicité d. Si les dites bicouches présentent une asymétrie, il est possible d'adapter le modèle ci-dessus, en considérant, par exemple, que l'ensemble des bicouches est asymétrique. Il ne suffit alors que de multiplier l'expression, FIGURE 2.35, du facteur de forme pour une bicouche symétrique par le facteur de structure habituel. On peut cependant imaginer différents cas intermédiaires, plus complexes à décrire de manière analytique, où la bicouche extérieure uniquement serait asymétrique alors que les couches internes de la vésicule multilamellaire seraient symétriques. Cette dernière possibilité sera celle utilisée dans le cas de l'analyse des complexes formés par l'association des objets avec des polynucléotides. Nous ne détaillerons pas ici les calculs qui ont été réalisés par Nallet et Bougis.

2.5 Spectrométrie ultraviolet/visible (UV/VIS).

2.5.1. Origine de l'absorption UV/vis d'une molécule.

2.5.1.a) Transitions électroniques d'une molécule.

Une molécule présente différents niveaux énergétiques discrets. La courbe d'énergie potentielle permet d'afficher les différents états énergétiques autorisés pouvant être occupés par les électrons de la molécule. Spontanément, celle-ci va cependant adopter l'état lui conférant une énergie potentielle minimale.





A partir de l'état fondamental ou de tout autre niveau excité, il faut fournir un quantum d'énergie suffisamment grand afin de permettre aux électrons de franchir le gap énergétique et de passer sur un niveau énergétique supérieur. Typiquement, une telle variation de l'énergie électronique à l'état fondamental a ainsi lieu pour des rayonnements

dans le domaine ultraviolet (UV) ou visible (vis). La spectroscopie moléculaire UV/vis étudie l'absorption des rayonnements présents dans cette gamme de longueur d'onde afin d'extraire des informations sur le système étudié.

2.5.1.b) Effet de la délocalisation d'électrons π sur l'absorbance UV/vis d'une molécule organique.

En termes d'applications, si la spectroscopie UV/vis peut servir de technique de choix pour réaliser le dosage d'une espèce absorbant dans cette gamme de longueurs d'onde à l'aide de la loi de Beer-Lambert, elle peut également renseigner des informations plus globales sur la molécule, comme l'état de conjugaison de son système π . En effet, une double liaison, qu'elle soit délocalisée ou non, absorbe dans le domaine UV. Ceci peut s'expliquer par la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ observée lorsque l'on fournit au système un rayonnement suffisamment énergétique. Ceci a pour effet de franchir le gap observé dans le diagramme d'orbitales moléculaires entre l'orbitale moléculaire de type π et celle de type π^* . La délocalisation a cependant un effet sur la longueur d'onde exacte à laquelle le composé est susceptible d'absorber. Plus le système π présente un étalement important au sein de la structure moléculaire, plus la longueur d'onde maximale d'absorbance va être importante et le rayonnement absorbé va être peu énergétique, en raison du rapprochement des orbitales molécules π et π^* les plus proches. ¹³

2.5.2. Montage de spectroscopie UV/vis.

Le montage utilisé est un spectromètre UV/vis Unicam UV4-100.



FIGURE 2.37 : Schéma de principe d'un spectromètre UV/visible en configuration double faisceau.

Afin de mesurer l'absorbance UV/vis d'un échantillon, il est tout d'abord nécessaire de produire le rayonnement incident. La lampe utilisée varie suivant la gamme de longueurs d'onde à atteindre. Pour un rayonnement de longueur d'onde supérieure à 400 nm, c'est la

¹³ http://www.unice.fr/cdiec/cours/introduction/apprendre/intro_07.htm
lampe au tungstène qui fournit un faisceau dans l'UV proche et dans le visible. Pour un rayonnement de longueur d'onde inférieure à 400 nm, c'est la lampe au deutérium qui fournit un faisceau dans l'UV plus lointain. Le rayonnement traverse ensuite un monochromateur afin de ne sélectionner qu'un rayon de longueur d'onde donnée. Après avoir traversé deux diaphragmes ayant pour rôle de former un faisceau parallèle, celui-ci est ensuite divisé en deux faisceaux d'intensités égales à l'aide d'un système diviseur de faisceau, tel qu'un miroir incliné semi-réfléchissant. Le spectromètre UV est donc un montage à double faisceau. Les deux rayonnements générés vont chacun traverser, en parallèle, une cuve en quartz semi-micro de dimensions 4 mm x 10 mm. Les cuves peuvent être en plastique ou en quartz, l'avantage du quartz est, cependant, qu'il n'absorbe pas dans le domaine UV. Dans l'appareil, la première cuve disposée contient l'échantillon à mesurer, tandis que la deuxième contient le tampon HEPES, dans lequel l'échantillon est préparé, et constitue donc la cuve de référence. La cuve « échantillon » est positionnée sur un passeur, ce qui permet, lorsqu'il y a plusieurs cuves à analyser, d'effectuer les mesures les unes après les autres. Au contraire, la cuve « référence » est toujours présente et traversée par le faisceau de référence. Par la suite, les deux rayonnements transmis atteignent chacun une cellule photoélectrique assurant le rôle de détecteur, éventuellement précédée d'un amplificateur. La détection de l'absorbance est sensible à 0.01 près. De plus, il est important de conserver une absorbance totale inférieure à une valeur de 1.5 afin que le système de détection ne sature pas. Si les mesures d'absorbance doivent être suffisamment précises pour, par exemple, construire une droite d'étalonnage, alors il est préférable de mesurer des absorbances inférieures à une valeur de 1. En effet, dans ces conditions, l'absorbance et la concentration restent parfaitement linéaires. A la fin, l'intensité lumineuse détectée pour chaque faisceau est donc convertie en signal électrique.

Ce processus est dit « dispersif », c'est-à-dire que cette opération est répétée pour chaque longueur d'onde. Le détecteur enregistre ainsi un point relatif à chaque absorbance de l'échantillon, au fur et à mesure que le monochromateur parcourt, pas à pas, une gamme de longueurs d'onde entrée par l'utilisateur.

2.5.3. Principe général de la spectroscopie UV/vis.

2.5.3.a) Absorption UV/vis d'un échantillon.

Lorsque l'on mesure l'absorption d'un échantillon en spectrométrie UV/vis, les deux grandeurs expérimentales importantes sont l'intensité du faisceau incident, notée I_0 , et l'intensité du faisceau transmis, noté I. Le ratio entre ces deux paramètres porte le nom de transmittance, notée T.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

FIGURE 2.38 : Expression de la transmittance T d'un échantillon.

Physiquement, cette grandeur augmente d'autant plus que l'échantillon laisse passer le faisceau. Il s'agit donc d'une mesure de la fraction de l'intensité incidente qui est effectivement transmise à travers l'échantillon. Au contraire, il est également possible de mesurer une absorbance, notée A, et également appelée densité optique, notée D.O. Puisque cette grandeur repose sur le phénomène exactement contraire, on peut alors l'exprimer, à partir de la transmittance, comme précisé FIGURE 2.39.

$$A = -\log(T) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

FIGURE 2.39 : Expression de l'absorbance A d'un échantillon et relation avec la transmittance T.

L'absorbance représente, elle, la fraction de l'intensité incidente qui est effectivement absorbée par l'échantillon. Pour bien démontrer que les deux phénomènes d'absorbance et de transmission sont antagonistes, on peut vérifier simplement que la somme des deux grandeurs permet de retrouver 1, c'est-à-dire l'intégralité de l'intensité du faisceau incident.

Un aspect intéressant de l'absorbance d'un composé est qu'elle est linéaire avec sa concentration en solution. La loi qui donne cette relation est la loi de Beer-Lambert, exprimée FIGURE 2.40.

$$A_{(\lambda)} = \varepsilon_{(\lambda)}. l. C$$

FIGURE 2.40 : Expression de la loi de Beer-Lambert.

On constate qu'en plus d'augmenter de manière linéaire avec la concentration C, l'absorbance A mesurée augmente de la même manière avec la longueur du trajet optique l dans la cuve, ainsi qu'avec un coefficient ε , appelé « coefficient d'extinction molaire ». En accord avec la loi de Beer-Lambert, ce coefficient représente l'absorbance mesurée pour un composé à une concentration de 1 mol/L et dans une cuve de largeur 1 cm. Il s'agit donc d'un paramètre caractéristique du composé considéré, et qui varie également en fonction de la longueur d'onde de travail.

Cette longueur d'onde de travail ne se choisit d'ailleurs pas de manière aléatoire. Il est nécessaire de réaliser une mesure de l'absorbance sur une large gamme de longueurs d'onde, afin de constater la longueur d'onde à laquelle l'échantillon absorbe le plus de rayonnement dans le spectre d'absorption. A cette longueur d'onde de travail, une incertitude sur l'absorbance constituera une erreur minimale, étant donné que l'absorbance mesurée est maximale.

2.5.3.b) Phénomènes parasites vis-à-vis de l'absorbance.

L'absorbance est directement reliée au défaut d'intensité transmise devant l'intensité incidente. En réalité, l'absorption du composé n'est pas le seul phénomène pouvant expliquer une diminution du ratio I/I₀. Il en existe au moins deux autres : la diffusion et la réflexion de l'échantillon.

La présence d'objets susceptibles de diffuser le rayonnement, de manière significative, est préjudiciable. Il pourra s'agir de la diffusion de Rayleigh ou de Mie, en fonction de l'ordre de grandeur de la taille des objets devant celle du faisceau incident dans la gamme UV/vis. Si la diffusion devient trop importante, essentiellement si l'échantillon présente, à l'œil, une turbidité ou un aspect laiteux, la diffusion de Mie va provoquer la « perte » de rayons incidents qui seront envoyés dans toutes les directions de l'espace, mais pas nécessairement vers le détecteur. Ce phénomène sera à l'origine d'une diminution du ratio apparent I/I₀.

Un autre phénomène pouvant poser problème, surtout pour les substrats solides, est la réflexion du rayonnement. Ce processus ayant lieu, de manière significative, essentiellement pour les surfaces solides du type métal, on ne le considérera pas dans notre cas. En revanche, il peut bien sûr être aussi à l'origine d'une diminution du ratio apparent I/I_0 .

L'ensemble de ces phénomènes peuvent être qualifiés de « parasites » quant à la mesure de l'absorbance UV/vis, du fait qu'ils provoquent une diminution du signal transmis, sans pour autant être liés à l'absorption du rayonnement par le composé d'intérêt. Si ceux-ci ont des raisons d'exister dans le cas d'une mesure, on définit une absorbance « réelle », soustraite de toute autre contribution non voulue.

Absorbance = 1 - Transmittance - Réflectance - Diffusion

Figure 2.41 : Calcul de l'absorbance « réelle » d'un échantillon, vis-à-vis des phénomènes parasites.

2.6 Spectrométrie infrarouge (IR).

2.6.1. Origine de l'absorption IR d'une molécule.

Il a, précédemment, été décrit la présence de niveaux énergétiques au sein de la courbe d'énergie potentielle de la molécule. Si celle-ci reçoit un quantum d'énergie suffisamment important, celui-ci peut ainsi exciter les électrons externes afin de faire passer la molécule dans un état d'énergie supérieure. Pour chaque niveau énergétique, il existe cependant une structure fine constituée de sous-niveaux d'énergie, appelés « états vibrationnels » de la molécule. Chaque état vibrationnel contient même une structure hyperfine constituée de sous-sous-niveaux d'énergie, appelés « états rotationnels » de la molécule. Ces derniers ne vont pas nous intéresser ici, mais ils peuvent être mis en évidence en spectroscopie à très haute résolution.





FIGURE 2.42 : Allure de la courbe de Morse caractéristique d'un niveau énergétique moléculaire, accompagnée des sous-niveaux d'énergie vibrationnels (v) et rotationnels (J).

Ces états correspondent à différents modes de vibrations décrits par les noyaux de la molécule, la rendant ainsi plus ou moins stable. Lorsque la molécule passe dans un état excité, elle va spontanément se désexciter, suivant différents processus potentiels, afin de pouvoir se placer sur le niveau d'énergie vibrationnelle le plus bas et de présenter une stabilité maximale. Ce mécanisme a été succinctement abordé dans le cadre de la spectroscopie de fluorescence (voir CH.1). Les transitions, entre deux niveaux vibrationnels, au sein du même état énergétique d'une molécule présentent un gap d'énergie beaucoup plus faible que pour une transition électronique effectuée suite à l'absorption d'un rayonnement UV/vis. Ce gap correspond à l'absorption d'un photon de la gamme infrarouge (IR) proche ou IR moyen, et aboutit à un mode de vibration caractéristique de la molécule.

Parmi les modes de vibration couramment trouvés au sein des molécules, on rencontre très fréquemment la vibration d'élongation, dont les fréquences caractéristiques sont, en général, facilement identifiables pour plusieurs liaisons usuelles. La fréquence de ce type de vibration peut être estimée à l'aide d'un modèle simple : la loi de Hooke. Celle-ci modélise la liaison comme un ressort portant, en chacune de ses extrémités, une masse correspondant aux deux atomes liés. On caractérise donc ce système mécanique par sa masse réduite μ et sa constante de raideur k, analogue à la force de la liaison interatomique. La fréquence d'excitation de cet oscillateur harmonique, à laquelle celui-ci va spontanément vibrer autour de sa position d'équilibre, sera analogue à la fréquence de vibration détectée en spectroscopie IR pour cette liaison.



FIGURE 2.43 : Modèle de Hooke présentant la liaison covalente comme un ressort de caractéristiques (k, μ).

L'intérêt particulier de cette technique est donc que, du fait que les constantes caractéristiques des oscillateurs présents dans la molécule soient également caractéristiques des liaisons covalentes considérées, il est alors possible de mettre en évidence la présence d'une ou plusieurs liaisons ou groupes fonctionnels au sein d'une espèce chimique inconnue. De même, pour les liaisons sensibles à l'environnement chimique ou physique, il est possible, dans certaines conditions, de détecter un shift du signal caractéristique de certaines de leurs vibrations. Ceci constitue donc une preuve d'une légère modification de leur état de stabilité ou du milieu dans lequel elles se trouvent, par exemple lorsqu'elles sont amenées à former de nouvelles interactions faibles, ou au contraire à en détruire.



2.6.2. Montage de spectroscopie IR.

FIGURE 2.44 : Schéma de principe d'un spectromètre IR à Transformée de Fourier (FT-IR) fonctionnant en mode « Réflexion Totale Atténuée » (ATR).

Le spectromètre utilisé est un spectromètre IR Nicolet 6700 à transformée de Fourier (FT-IR) de Thermo Scientific. L'appareillage dispose également de la technologie ATR (« Attenuated Total Reflectance »). Contrairement à la spectroscopie UV détaillée précédemment, la spectroscopie IR nécessite l'acquisition de l'absorbance, par l'échantillon, d'un nombre relativement important de longueurs d'onde afin de parcourir l'ensemble de la gamme requise. Pour faire face à cette contrainte, la technologie « FT-IR » permet, à l'aide d'un procédé plus rapide mais moins intuitif, d'envoyer un faisceau incident polychromatique composé de l'ensemble des radiations monochromatiques d'intérêt, et de remonter ainsi aux mêmes informations.

La production d'un tel faisceau polychromatique (de 2.5 à 20 µm, soit de 500 à 4000 cm⁻¹) est effectuée à l'aide d'une source de lumière à bande large. Afin de pouvoir remonter à l'absorbance liée à chaque longueur d'onde, il est nécessaire de générer un ensemble de faisceaux polychromatiques, de les envoyer sur l'échantillon et d'en étudier sa réponse. C'est pourquoi un système optique du type interféromètre Michelson se trouve sur le trajet

optique du faisceau polychromatique. Suivant la position du miroir mobile, déplacé par un moteur, un rayon de longueur d'onde donnée, au sein du faisceau polychromatique, va être bloqué en raison du phénomène d'interférences. Puis, dès que le miroir mobile continuera à se déplacer le long de son axe, ce rayon sera à nouveau transmis, puis, de manière périodique, bloqué, puis transmis,... Il devient donc possible, en jouant simplement avec la position du miroir au sein du Michelson, de bloquer simultanément différentes radiations contenues dans le faisceau polychromatique. Ceci va donc permettre de mesurer la réponse de l'échantillon face à un faisceau d'où sont successivement présentes et absentes certaines radiations monochromatiques sélectionnées tour à tour.

Le faisceau polychromatique issu du Michelson arrive ensuite sur le cristal, suivant un certain angle d'incidence. Directement sur la surface de ce cristal, l'échantillon a été déposé en très petite quantité. Il peut s'agir d'une goutte d'environ 5 µL si celui-ci est liquide, ou d'une pointe de spatule si celui-ci est solide. Afin de maintenir cet échantillon en place et de le presser entre deux surfaces, une pointe métallique est vissée sur le cristal jusqu'à atteindre la butée signifiant le contact entre les deux dispositifs. Dans ces conditions, à partir du moment où le faisceau intercepte la surface du cristal, il effectue différentes réflexions successives sur les deux surfaces horizontales du cristal, basse et haute, du fait que celui-ci possède un indice de réfraction supérieur à celui de tout échantillon classique. Il s'agit là de la technique dite « ATR », puisque l'ensemble du rayonnement est réfléchi dans le cristal, au cours de son trajet. Dans ce cas de figure, à chaque réflexion sur le dioptre supérieur, une onde dite « évanescente » est générée. Celle-ci parcourt une fine couche d'échantillon (typiquement de 0.5 à 2 μm), directement en contact avec le cristal. Le point caractéristique de cette onde est qu'elle décroit exponentiellement au fur et à mesure où l'on s'éloigne du dioptre, tout en s'enfonçant au cœur de la couche d'échantillon, mais surtout d'autant plus rapidement que l'échantillon absorbe fortement le rayonnement IR. Ainsi, il est possible de remonter à une absorbance apparente pour chaque faisceau polychromatique envoyé sur l'échantillon, par l'intermédiaire de l'onde évanescente. L'intérêt particulier de cette technique est qu'il n'est pas nécessaire de modifier l'échantillon en vue de l'analyser, comme par exemple dans une pastille de KBr, mais on peut effectuer directement la mesure sur l'échantillon brut ¹⁴.

Au bout d'un certain nombre de réflexions, le faisceau sort du cristal pour rejoindre le détecteur. Celui-ci réalise une transformée de Fourier, qui justifie l'appellation « FT-IR » de ce type de spectroscopie. Cette opération mathématique a pour objectif de séparer la contribution de l'absorbance mesurée pour chaque longueur d'onde. Grâce à ce traitement, il est possible de remonter à un spectre, tout comme dans le processus dispersif de la spectroscopie UV/vis. L'intérêt expérimental est évident, ce fonctionnement évite d'envoyer un rayonnement monochromatique, longueur d'onde par longueur d'onde, ce qui conférerait à l'analyse une perte de temps, et probablement une perte de résolution en raison de la limitation du nombre de mesures.

¹⁴ http://www.nicoletcz.cz/userfiles/file/Aplikace/Introduction%20ATR%20SpectraTech.pdf

L'appareillage réalise une série de 16 acquisitions par défaut, dont le nombre peut être modifié, afin d'affiner la résolution du spectre au fur et à mesure des itérations. Le spectre final est représenté sur le logiciel d'acquisition Omnic. On réalisera, en général, un spectre à partir de 100 acquisitions. Afin d'obtenir un spectre ne dépendant que de l'échantillon d'intérêt, on réalise tout d'abord un spectre de l'air, si l'on travaille avec un échantillon solide, ou du tampon, si l'on travaille avec un échantillon en solution. La mesure de ce « background » nous permet de retirer du spectre expérimental la composante due aux espèces indésirables comme le solvant. La limite majeure liée à cette utilisation est le fait que, pour les échantillons liquides, suivant l'interaction que les molécules de solvant présentent pour les espèces chimiques à analyser, le spectre final peut éventuellement présenter un signal résiduel relatif au solvant.

2.6.3. Principe général de la spectroscopie IR.

Tout comme en spectrométrie UV/vis, il est possible d'effectuer une acquisition en mode « transmittance » ou « absorbance ». Dans le premier type de représentation, les signaux sont vers le bas, puisque l'absorption d'un rayonnement par l'échantillon engendre une diminution du signal transmis par celui-ci. A l'inverse, en mode « absorbance », les signaux sont vers le haut, puisqu'on représente l'absorbance réelle de l'échantillon à chacune des longueurs d'onde.

A l'inverse de la spectroscopie UV/vis, cette technique est souvent utilisée pour réaliser une analyse qualitative de la composition d'un échantillon. En mode de vibration normal, chaque pic est attribué à un mode de vibration d'une liaison particulière. Il serait éventuellement possible d'effectuer un dosage quantitatif de la concentration en une espèce dissoute à l'aide de l'intensité du pic à une longueur d'onde donnée. En revanche, pour cela, il faudrait éviter au maximum l'évaporation rapide de la goutte d'échantillon déposée sur le cristal d'ATR, due à son très faible volume. De plus, l'appareillage nécessite une résolution importante pour pouvoir mener à bien des études quantitatives.

Concernant la forme du pic, et comme précisé dans le paragraphe sur l'origine de l'absorption IR d'une molécule, si la résolution de l'appareillage est suffisamment importante, on pourrait distinguer la structure hyperfine de chaque pic, résultant des transitions rotationnelles au sein de chaque niveau d'énergie vibrationnelle.

Enfin, concernant la largeur d'un pic de vibration, celle-ci est généralement attachée à la dispersion en fréquences de vibration de la liaison considérée. Si toutes les liaisons A-B d'un échantillon vibrent exactement à la même fréquence, parce que celles-ci ne sont, par exemple, que très peu sensibles à leur environnement chimique, le pic résultant sera très fin. Plus la liaison est sensible à différents facteurs, plus sa vibration va avoir lieu sur une gamme de fréquences étalée, et plus le signal résultant sera large. Par exemple, on reconnaît généralement que le pic relatif à la vibration d'élongation de la liaison O-H est très large. En effet, la présence de liaisons hydrogènes intermoléculaires et le caractère labile du proton permettent à cette liaison de vibrer à une fréquence qui dépend légèrement de son environnement chimique.

2.7 Calorimétrie à titration isotherme (ITC).

2.7.1. Grandeurs d'état associées à la formation d'une liaison.

2.7.1.a) Enthalpie.

L'enthalpie H est une grandeur d'état homogène à une énergie et donc exprimée en Joules (J). Elle a été créée pour répondre au besoin d'une variable pouvant quantifier l'énergie totale d'un système, ou en d'autres termes, l'énergie nécessaire pour créer le système. En alternative à l'énergie libre, qui ne sert qu'à quantifier l'énergie totale moléculaire d'un système, il fallait également ajouter l'énergie due au travail des forces de pression. Ainsi, son équation d'état permet de mettre en évidence le fait qu'elle est constituée de deux termes : un premier terme d'énergie libre U, caractérisant l'énergie cinétique moléculaire du système, et un deuxième terme lié à la pression P et au volume V, caractérisant le travail que le système doit exercer pour occuper un volume V.

H = U + P.V

FIGURE 2.45 : Définition de la grandeur d'état « enthalpie ».

En vertu du premier principe de la thermodynamique, et si les processus étudiés sont monobares et que l'on travaille donc à pression P constante, on peut affirmer que la variation de l'enthalpie d'un système est équivalente à la chaleur échangée au cours de ce même processus.

$$U = W + Q$$
$$H_{(P=Cte)} = Q$$

FIGURE 2.46 : Equation 1 : Enoncé du premier principe de la thermodynamique. Equation 2 : Expression de l'enthalpie d'un système dans le cas d'une transformation monobare.

Cette grandeur est donc à la base du domaine de la calorimétrie, et une mesure de la chaleur impliquée au cours d'un échange au sein d'un système calorifugé suffit à déduire la variation d'enthalpie des sous-systèmes engagés.

2.7.1.b) Entropie.

L'entropie S est une grandeur d'état homogène à une énergie par température et donc exprimée en Joules par Kelvin (J/K). Physiquement, elle caractérise le désordre d'un système à l'échelle moléculaire. Le premier principe implique qu'une variation d'énergie interne au cours d'un processus équivaut à deux termes d'échange (travail et chaleur) au sein du système, et donc postule un bilan énergétique nul entre le système et l'extérieur. Cependant, rien ne permet de connaître dans quel sens il peut évoluer spontanément. Le rôle du second principe est donc d'énoncer qu'une transformation s'accompagne toujours d'une création d'entropie, et donc d'une augmentation du désordre. En raison de ce principe, les processus réversibles sont les seuls à présenter une création nulle d'entropie, mais aucun processus spontané ne s'accompagne d'une diminution globale d'entropie. De ce fait, la spécificité de l'entropie est que, contrairement aux autres fonctions d'état comme l'enthalpie, l'entropie est une grandeur non conservative.

$$dS = dS_{r\acute{e}v} + dS_{cr\acute{e}\acute{e}} = rac{\delta Q}{T} + dS_{cr\acute{e}\acute{e}} \ge 0$$

FIGURE 2.47 : Enoncé du second principe de la thermodynamique.

2.7.1.c) Enthalpie libre.

L'enthalpie libre est une grandeur d'état dont le rôle est de quantifier la spontanéité d'un processus chimique. Cette spontanéité se base sur le fait qu'un système cherche à rendre son énergie minimale afin de gagner en stabilité. Pour ce faire, il faut donc considérer, d'une part, un terme enthalpique représentant l'énergie contenue dans le système et dont la variation doit être la plus négative possible, et d'autre part, un terme entropique représentant le désordre du système et dont la variation doit être la plus positive possible. Gibbs a donc défini un paramètre appelé « enthalpie libre » ou « énergie libre de Gibbs » prenant en compte ces deux aspects pour caractériser la spontanéité d'un processus.

G = H - T.S

FIGURE 2.48 : Définition de la grandeur d'état « enthalpie libre ».

Ainsi, afin de déterminer dans quel sens va spontanément évoluer un système chimique, il faut donc considérer le sens dans lequel la variation d'enthalpie libre est négative. Sur la base de l'enthalpie libre standard de réaction d'un équilibre chimique, il est donc possible de remonter à sa constante d'équilibre par une loi directe. Ceci montre bien que l'énergie libre de Gibbs est un critère d'évolution spontanée pour un système chimique.

$$\Delta_r G = \Delta_r G^\circ + R. T. \ln (Q)$$
$$\Delta_r G^\circ = -R. T. \ln (K^\circ)$$

FIGURE 2.49 : Equation 1 : Critère d'évolution spontanée d'un système chimique. Equation 2 : Enoncé de la loi d'action de masse pour un système à l'équilibre thermodynamique (Δ_r G=0, Q=K°)

Un processus chimique spontané peut aussi bien être largement gouverné par l'enthalpie (Δ H<<0) que par l'entropie (Δ S>>0). A titre d'exemple, la formation d'une liaison covalente entre deux atomes est caractérisée par une variation enthalpique négative et favorable. Par ailleurs, la variation entropique est légèrement défavorable puisqu'en liant deux atomes ensemble, on tend vers un système plus organisé. Globalement, si ce processus reste spontané dans certaines conditions, c'est qu'il est gouverné par l'enthalpie. On peut aussi s'intéresser au cas du changement d'état d'un corps pur, par exemple un glaçon laissé à température ambiante et qui fond lorsqu'il atteint 0°C. Afin d'effectuer ce changement d'état, le système doit s'accompagner d'une absorption de chaleur, qui constitue donc une variation enthalpique positive. Pour compenser cet effet défavorable, on constate que le système à l'état liquide est beaucoup plus désordonné qu'à l'état solide. Cette transition s'accompagne donc également d'une variation positive d'entropie.

2.7.2. Présentation de l'appareillage.

2.7.2.a) Montage de Calorimétrie à Titration Isotherme (ITC).

Afin de mesurer les propriétés thermodynamiques d'une interaction entre deux espèces à l'aide d'une mesure de la chaleur impliquée dans l'évènement, une technique de choix est la Calorimétrie à Titration Isotherme (« Isothermal Titration Calorimetry », notée ITC). L'appareillage consiste en un bloc dans lequel se trouvent deux cellules : la première dite « échantillon » et la deuxième dite « référence ». La cellule « échantillon », de volume global 280 μ L, est constituée d'une base cylindrique présentant, vers le haut, un col légèrement évasé. La cellule « référence » contient de l'eau, et est également de forme cylindrique et de volume 280 μ L. L'ensemble des deux cellules se trouve placé dans une enceinte calorifugée assurant le caractère adiabatique de tout phénomène agissant au sein de la cellule échantillon. Même si le volume total à placer dans les cellules est de 280 μ L, les volumes de travail autour desquels sont effectivement placés les enceintes calorifugées sont seulement de 200 μ L. Le caractère adiabatique des processus mis en jeu au sein de l'appareillage ne concerne donc que la partie inférieure des cellules. Chaque cellule possède des éléments de chauffage permettant d'atteindre une consigne en température lancée par l'utilisateur.

A l'intérieur de la cellule « échantillon », sera placée une seringue de 50 μ L de capacité, solidaire des cellules et mobile autour d'un axe central. Elle possède quatre

positions : une position dite « lavage » et dans laquelle on laisse également la seringue lorsque l'appareil ne fonctionne pas, une position dite « remplissage », une position dite « repos » et une position dans laquelle on peut placer la seringue dans la cellule « échantillon » en vue d'une expérience. Le remplissage de la seringue est automatisé à l'aide d'un piston qui est commandé par un moteur situé dans l'axe central. Pour ce faire, un Eppendorf de volume 250 µL contenant le liquide à injecter est disposé en position « remplissage ». Un tuyau souple amovible se branche directement sur la seringue, pour toute opération de lavage ou de remplissage, afin de permettre la circulation automatique de solvants de rinçage. Le circuit de rinçage est constitué de petits flacons d'eau distillée et de méthanol auxquels peuvent être reliés la seringue, mais aussi la cellule « échantillon », afin d'être rincés grâce à un programme automatisé de lavage. Pour la cellule « échantillon », un outil de lavage est disposé dans la cellule afin d'assurer la circulation des solvants. Au cours du programme automatisé de lavage, l'ensemble des solvants est rejeté dans une poubelle après passage dans la cellule de travail et dans la seringue. Le programme de lavage termine par un séchage de la seringue.



FIGURE 2.50 : Schéma d'un appareillage de Calorimétrie à Titration Isotherme (ITC).

2.7.2.b) Déroulement d'une expérience d'ITC.

Au début d'une expérience d'ITC, la cellule « échantillon », préalablement nettoyée, est remplie jusqu'au début de sa partie évasée, avec 280 µL d'échantillon dégazé contenant le récepteur qui va intervenir au cours de l'interaction. Une fois la cellule « échantillon » remplie, une consigne en température est lancée. La régulation thermique concerne les deux cellules, et une stabilisation thermique est attendue avant de procéder à l'étape suivante. Pour ce faire, les éléments de chauffage portent chacune des deux cellules à la température entre les deux enceintes, à laquelle on associe une puissance différentielle DP. Cette grandeur est initialement fixée à une certaine valeur, différente de 0, à atteindre en début d'expérience. En réponse à un DP différent de la valeur de référence, le système de régulation fournit à la cellule « échantillon » un apport ou une perte de chaleur, afin de compenser l'écart thermique mesuré par rapport à la cellule de référence.

de l'expérience, la cellule « échantillon » verra sa température régulée au cours des différents phénomènes physico-chimiques ayant lieu dans la cellule « échantillon ».

Dans la seringue de 50 μ L, 40 μ L d'échantillon contenant le ligand qui va intervenir au cours de l'interaction sont aspirés. Une fois remplie, la seringue doit être délicatement placée dans la cellule « échantillon » déjà remplie au préalable. Le positionnement de cette seringue va légèrement perturber l'équilibre thermique atteint par la cellule « échantillon ». Aussi, est-il nécessaire d'attendre à nouveau que l'équilibre thermique soit atteint avant de pouvoir lancer l'expérience. Lorsque le signal du DP est à nouveau redevenu stable à la valeur de référence demandée par le système de régulation, on peut alors commencer l'expérience. A partir du moment où celle-ci débute, l'embout de la seringue, présentant une forme de pale, entre en rotation en étant entraîné par un rotor. De ce fait, il peut agiter continuellement le contenu de la cellule au cours de l'expérience, et ceci à une vitesse réglable.

Tout comme une technique de titrage classique, l'ITC consiste en l'injection d'une espèce B, dite « ligand » et placée dans la seringue, dans une espèce A, dite « récepteur » et placée dans la cellule. On désignera l'expérience en question par le nom « A x B », ou « B dans A ». L'expérience permet de réaliser différentes injections successives, de volume et position dans le temps programmés, du contenu de la seringue dans le contenu de la cellule, à l'aide du piston motorisé présent dans la seringue. De plus, le système de détection permet de réaliser un suivi de ces injections, à l'aide de la mesure de la puissance impliquée dans la régulation thermique de la température de la cellule « échantillon », par rapport à la cellule « référence » où rien ne se passe. Cette puissance impliquée par l'appareillage est ainsi directement corrélée à la chaleur impliquée dans les phénomènes physico-chimiques en jeu suite à chaque injection.

A la fin de l'expérience, la cellule et la seringue sont lavés en les reliant au système de rinçage. Enfin, la cellule est laissée sous eau, afin d'empêcher les quelques molécules résiduelles de se déposer sur la couche interne de ses parois. La seringue, elle, est laissée sèche dans son étui, en position « lavage ».

2.7.2.c) Protocoles standards.

Il y a deux types de protocoles utilisés pour des expériences d'ITC. Ceux-ci seront désignés, par la suite, sous les noms de protocoles « court » et « long ». De manière générale, à l'ITC, l'eau utilisée est de l'eau distillée fraîchement dégazée, afin d'éviter au maximum la présence de (micro-)bulles d'air, pouvant poser problème pour la détection de la chaleur au sein de la cellule d'ITC.

Avant et après chaque expérience d'intérêt, on réalise un « blanc court ». En début de journée, il s'agit d'une expérience tampon x tampon ; en fin de journée, il s'agit d'une expérience eau x eau. Ces protocoles sont destinés à vérifier la propreté de la cellule « échantillon » et de la seringue. Tout pic supplémentaire aux pics d'injections prévus, ou toute anormalité liée à l'intensité des pics d'injections, permettront de conclure que

l'appareillage n'est pas suffisamment propre pour lancer une expérience d'intérêt. En théorie, une injection d'eau dans de l'eau (ou bien de tampon dans du tampon) est à l'origine d'un très faible signal, même si les deux espèces sont identiques. Celui-ci est lié à l'enthalpie de mélange. On pourra trouver, FIGURE 2.51, les caractéristiques du protocole « court ».

Injections	Volume (µL)	Durée (s)	Intervalle (s)				
1	0,5	1,0	120				
2 - 8	4,0	8,0	120				
Température cellule (°C)		25					
Puissance initiale (μcal/s)	6						
Délai initial (s)	120						
Vitesse agitation (tr/min)	750						

FIGURE 2.51 : Paramètres du protocole dit « court ».

Une expérience dite « longue » consiste en l'injection d'un acide nucléique dans une dispersion d'auto-assemblages de nucléolipides. Elle peut aussi caractériser un « blanc long », nécessaire pour réaliser le traitement des signaux à l'aide d'une soustraction. Dans ce cas, il peut s'agir soit d'une expérience tampon x acide nucléique, ou bien d'une expérience lipide x tampon. Lorsque l'on réalise un protocole « long », les échantillons d'acide nucléique et de lipides nucléotides sont systématiquement dégazés, à l'aide d'une station de dégazage de TA Instruments, pendant 10 min sous une pression de 330 mm Hg, soit environ 0.45 bar. Cette opération est importante afin d'éliminer la présence de bulles d'air. De plus, afin de ne considérer que l'interaction entre un acide nucléique et une population d'objets autoassemblés de taille relativement monodisperse et sans gros agrégats, la dispersion de 1500 μ L fraîchement formulée est centrifugée pendant une certaine durée, dépendant du système. Ensuite, 1200 μ L de surnageant sont prélevés et mis à l'écart dans un autre tube. C'est cet échantillon qui servira aux différentes expériences successives d'ITC. On pourra trouver, FIGURE 2.52, les caractéristiques du protocole « long ».

Injections	Volume (μL)	Durée (s)	Intervalle (s)			
1	0,5	1,0	250			
2 - 18	2,0	4,0	250			
Température cellule (°C)	25					
Puissance initiale (μcal/s)	6					
Délai initial (s)	500					
Vitesse agitation (tr/min)	750					

FIGURE 2.52 : Paramètres du protocole dit « long ».

2.7.3. Traitement des thermogrammes.

2.7.3.a) Sens physique du thermogramme brut.

Au fur et à mesure que les injections se poursuivent, un graphe est tracé en temps réel par le système d'acquisition. Il s'agit d'un thermogramme représentant la puissance impliquée par le système de régulation pour compenser l'écart thermique observé entre la cellule « échantillon » et la cellule de référence suite à chaque injection, en fonction du temps. Il faut cependant rester méfiant avec les interprétations directes de ce graphe. S'il est évident que la présence de pics d'injections de forte intensité signifie qu'il y a une interaction en jeu dans la cellule, l'absence de signal sur le thermogramme ne suffit pas à conclure qu'aucune interaction peut éventuellement être dû à plusieurs phénomènes physico-chimiques. Ainsi, il est possible que, dans ce cas, la puissance impliquée par la régulation thermique soit globalement nulle, en raison du fait qu'il existe une contribution exothermique et une contribution endothermique impliquant les mêmes chaleurs. De manière générale, cependant, on peut estimer que l'intensité des pics d'injection nous donne une estimation, en première approximation, de l'intensité de l'interaction mise en

jeu. Un pic vers le bas signifie un phénomène exothermique, mettant en évidence la présence d'une interaction bien définie et localisée, à l'image d'une liaison covalente. On considère généralement qu'il s'agit d'un phénomène purement enthalpique. Un pic vers le haut signifie un phénomène endothermique, mettant en évidence la présence d'une interaction mal définie ou répartie sur différents atomes. On considère généralement qu'il s'agit d'un phénomène par l'entropie, par exemple par la réorganisation spatiale des molécules ou par un partage d'un ligand entre plusieurs récepteurs.

On s'attend à ce que la ligne de base soit relativement stable autour du DP de référence fixé par l'expérimentateur. Un écart non négligeable entre le DP observé et la consigne révélera que la cellule « échantillon » est probablement sale. En effet, les éléments de chauffage et le détecteur n'opérant que sur les parois de la cellule « échantillon », si des molécules ou impuretés ont été déposées sous forme de couche sur ces parois, suite à un lavage trop rapide, ceci a des chances d'influer sur l'exactitude du DP effectivement mesuré. De même, il est possible d'imaginer que la cellule de référence puisse également être polluée.

Si l'on s'intéresse à la forme d'un pic d'injection en particulier, on observe, premièrement, une variation rapide du DP liée à la compensation thermique des évènements que celle-ci génère. Deuxièmement, on observe un retour plus ou moins lent du DP à sa valeur normale correspondant à la ligne de base. La décroissance peut servir à nous renseigner sur la cinétique des évènements mis en jeu. En effet, plus celle-ci est lente, plus les phénomènes physico-chimiques vont probablement durer dans le temps, prolongeant ainsi l'échange de chaleur caractéristique des interactions générées.

2.7.3.b) Traitement et intégration du thermogramme brut.

Les puissances observées jusqu'à maintenant caractérisent les chaleurs échangées lorsque l'injection d'une solution d'acide nucléique est injectée dans une dispersion d'objets auto-assemblés de lipides nucléotides. Ce que l'on veut observer, afin de procéder aux interprétations, est uniquement la chaleur relative à l'interaction entre l'acide nucléique et les auto-assemblages. Pour éliminer toute autre contribution présente dans le thermogramme brut, il est donc nécessaire de réaliser plusieurs expériences, dans les mêmes conditions et avec le même protocole « long ». En effet, les interactions pouvant également être à l'origine d'un échange de chaleur auquel on ne s'intéresse pas ici, sont les suivantes : tampon x acide nucléique, lipide x tampon et tampon x tampon. L'ensemble de ces trois interactions est également présent lorsque l'on effectue une telle injection. Nous allons donc, au préalable, réaliser une soustraction du thermogramme brut par les thermogrammes de chaque blanc « long ». Ainsi, le thermogramme, dit « soustrait », ne présente que les chaleurs relatives au phénomène d'intérêt.

Afin d'aller plus loin dans les interprétations relatives au thermogramme brut, il est nécessaire d'obtenir une chaleur caractéristique des phénomènes générés à la suite de chaque injection. Pour ce faire, il s'agit de passer d'une puissance, exprimée en J.s⁻¹, à une enthalpie, exprimée en J et donc indépendante du temps. Mathématiquement, il faut donc intégrer l'ensemble du signal relatif à une injection, afin d'en déduire la chaleur échangée tout au cours du processus. L'intégration de l'ensemble du thermogramme implique une intégration successive de chaque pic d'injection. Pour cette opération, il faut sélectionner des bornes d'intégration. La borne inférieure est automatiquement fixée à l'instant où débute l'injection. La borne supérieure peut se déplacer manuellement, soit à un instant qui précède tout juste le début de l'injection suivante, soit à un instant où l'on juge arbitrairement que tout échange de chaleur est achevé du fait que le DP est revenu à sa valeur initiale et donc au niveau de la ligne de base. La courbe obtenue, à la suite de l'intégration, est appelée « courbe de Wiseman ».

2.7.3.c) Sens physique de la courbe de Wiseman.

La courbe dite « de Wiseman » est systématiquement tracée pour une expérience d'ITC. Celle-ci permet de représenter l'enthalpie, et donc la chaleur, en fonction du ratio molaire.⁷¹

Le ratio molaire est obtenu en divisant, à un instant t donné, la concentration en ligand injecté par la concentration en récepteur présent, dans le milieu de volume V instantané. Plus les injections avancent et plus le ratio molaire augmente. Ainsi, cette courbe devient totalement décorrélée du temps. On est donc capable d'observer directement l'évolution de la chaleur d'interaction en fonction des différentes injections réalisées. Cependant, ici aussi, il faut avoir conscience que la chaleur mesurée n'est que la somme des différentes contributions éventuellement présentes.

Si l'on s'intéresse à la forme typique d'une telle courbe enthalpique, on peut imaginer l'interaction idéale entre une macromolécule ne présentant qu'un seul type de sites potentiels de fixation et un ligand de petite taille. Dans ces conditions, pour les premières injections, une addition de ligand dans un tel système va dégager une grande quantité d'énergie, dont on peut directement déduire l'enthalpie molaire d'interaction macromolécule-ligand, dans la mesure où tous les sites seront encore considérés comme vacants. Plus les injections avancent, plus la chaleur impliquée dans le phénomène d'interaction diminue peu à peu puisque les macromolécules commencent à devenir saturées. Ainsi, l'injection d'une quantité donnée de ligand dans le système ne va pas être à l'origine d'un échange de chaleur aussi important que pendant les premières injections. Aussi, plus les injections se prolongent, plus la chaleur mesurée tend vers 0, puisqu'à un moment, l'ensemble des sites est saturé et l'injection de ligands n'est plus à l'origine d'aucune interaction. La courbe de Wiseman obtenue pour un tel système simple est donc une forme typique de sigmoïde, FIGURE 2.53.



FIGURE 2.53 : Courbe de Wiseman typique d'un signal « simple » en forme de sigmoïde.

On peut maintenant s'intéresser à l'effet de la concentration initiale du récepteur dans la cellule et du ligand dans la seringue. Pour étudier cette évolution, on définit le paramètre de Brandt, noté c. Celui-ci est calculé en effectuant le ratio de la concentration en acide nucléique dans la seringue sur la concentration initiale en lipide nucléotide dans la cellule. Ainsi, plus c est élevé, plus on injecte un ligand concentré dans la cellule. Au contraire, plus c est faible, plus le récepteur est concentré devant le ligand. Suivant la valeur du paramètre de Brandt, on peut observer une évolution de la forme sigmoïdale de la courbe de Wiseman.





L'observation que l'on peut en faire est que plus le paramètre c augmente plus la pente visible est importante. En effet, la valeur de c a un effet direct sur la gamme de ratios molaires accessibles. Son augmentation va déplacer la gamme de ratios molaires vers les grandes valeurs, et vice-versa. Ainsi, pour des valeurs de c extrêmement grandes, on tend donc vers un signal visible de type « créneau » puisque pour la majeure partie de la gamme

¹⁵ http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/21116/ch01.html

des ratios molaires accessibles, l'équivalence sera déjà passée et les sites accessibles déjà saturés depuis longtemps. Afin obtenir une courbe optimale, on part généralement d'un paramètre de Brandt de 10. On affine ensuite, si besoin, la valeur de c afin de modifier légèrement la courbe, s'il s'avère plus intéressant d'observer une forme plus globale du signal en déplaçant la gamme de ratios molaires vers la gauche ou vers la droite.

2.7.3.d) Modèles utilisés pour l'ajustement de la courbe de Wiseman.

Une fois la courbe de Wiseman obtenue avec un paramètre de Brandt optimal permettant d'obtenir une courbe révélatrice de l'interaction générée entre les espèces chimiques, il faut maintenant choisir un modèle mathématique pour ajuster celle-ci. Physiquement, l'interaction mise en jeu est régie par deux lois : la loi de conservation de la matière, permettant d'établir un bilan des différentes espèces, complexées ou non, présentes dans la cellule, et la loi d'action de masse (FIGURE 2.49, EQUATION 2), permettant de définir la constante d'équilibre K_a de formation globale de chaque complexe.

$$[M]_{T} = [M] + [ML] + [ML_{2}] + \dots = [M] + \sum_{i} [ML_{i}]$$
$$[L]_{T} = [L] + n. \Theta. [M]_{T}$$
$$K_{a} = \frac{[ML_{n}]}{[M]. [L]^{n}} = \frac{\Theta}{(1 - \Theta). [L]}$$

FIGURE 2.55 : Equations 1 et 2 : Lois de conservation de la matière appliquée à une espèce M complexante et au ligand L. On ne considère ici la formation d'aucun dimère de M. Le paramètre O représente la fraction des sites réellement occupés. Le paramètre n représente le nombre total de sites. Equation 3 : Expression de la constante de formation globale de [ML_n], appelée « constante d'association ».

L'ensemble de ces lois suffit à définir un modèle « sur mesure », en fonction du nombre de sites différents disponibles sur le récepteur, et des différentes espèces que l'on pense pouvoir former.

Le modèle le plus simple est celui qui a été présenté plus haut. Il s'agit du modèle dit « à 1 jeu de sites identiques ». On part du principe qu'il n'existe qu'un seul type de sites sur le récepteur, sur lequel peuvent venir se fixer les ligands, avec des constantes thermodynamiques données dépendant de ce type de site. Dans ces conditions, une combinaison des deux équations ci-dessus permet d'exprimer une équation du second degré en Θ , la fraction des sites occupés par le ligand. A l'aide de sa solution, FIGURE 2.56, on définit la chaleur totale échangée par le système pour une fraction totale de sites occupés Θ .

$$Q = n. \Theta. [M]_{totale} \Delta H. V_0$$

$$Q = \frac{n \cdot [M]_{totale} \cdot \Delta H \cdot V_0}{2} \cdot \left[1 + \frac{[L]_T}{n \cdot [M]_T} + \frac{1}{n \cdot K_a \cdot [M]_T} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_T}{n \cdot [M]_T} + \frac{1}{n \cdot K_a \cdot [M]_T} \right)^2 - \frac{4 \cdot [L]_T}{n \cdot [M]_T}} \right]$$

FIGURE 2.56 : Expression de la chaleur totale Q associée au volume actif V_0 de la cellule pour une saturation des sites de fraction Θ . ΔH représente la chaleur molaire de fixation du ligand L, dans le cas où un seul type de sites de fixation indépendants est considéré sur l'espèce complexante M.

On constate qu'en dépit de la simplicité du modèle, l'expression de celui-ci est relativement complexe. C'est pourquoi ce modèle sera le seul pour lequel on développera ici son expression analytique. De par sa forme, la fonction correspondante ne peut permettre de ne générer qu'une courbe sigmoïdale. Les différents paramètres à ajuster dans l'ajustement sont, ici, au nombre de trois. Il y a l'enthalpie molaire d'interaction ΔH , la constante d'association K_a (liée à la constante de dissociation $K_d=1/K_a$) et la stœchiométrie n. D'un point de vue qualitatif, l'enthalpie mesurée pour le palier initial constituant le début de la sigmoïde peut être associé au ΔH pour l'interaction macromolécule-ligand. La constante d'association K_a étant liée au déplacement de l'équilibre entre les espèces indépendantes et complexées, on peut la relier à la pente de la sigmoïde au niveau de son équivalence. En effet, plus la pente est grande, plus une quantité donnée de ligand injecté va parvenir à saturer rapidement les sites de fixation disponibles. Enfin, la stœchiométrie n peut être associée au nombre de sites disponibles, et donc au nombre de ligand pouvant être accueillis, sur chaque récepteur. Elle peut donc être estimée à l'aide de la position de l'équivalence, correspondant au point d'inflexion de la sigmoïde. Plus l'équivalence est visible à un ratio molaire élevé, plus le nombre de ligands nécessaires pour saturer totalement un récepteur sera grand. L'ensemble de ces trois paramètres suffit à caractériser thermodynamiquement l'interaction entre le ligand et l'unique type de site présent sur le récepteur, comme indiqué FIGURE 2.57.



FIGURE 2.57 : Ajustement de la courbe de Wiseman typique d'un signal « simple », en forme de sigmoïde, par un modèle à 1 jeu de site. Lecture des paramètres d'ajustement ΔH , K_a , n.

Au cas où l'ajustement à l'aide de ce modèle simple se révèle infructueuse, il est nécessaire de passer à un modèle plus complexe. Une méconnaissance des caractéristiques de l'interaction empêche de choisir un modèle sur des arguments physiques. En revanche, le fait que l'ajustement réalisé à l'aide d'un modèle simple ne se révèle pas acceptable permet de supposer qu'il faut passer à un modèle plus complexe.

On trouve un modèle similaire appelé modèle à « 2 jeux de sites indépendants ». Comme l'indique le nom, et sur la base du modèle développé précédemment, ce modèle est à utiliser dans le cas où le récepteur présente deux sites distincts, sur lesquels un ligand peut venir se fixer avec deux jeux de paramètres thermodynamiques distincts. Ces deux sites sont aussi indépendants, c'est-à-dire que la fixation d'un ligand sur le premier site ne modifie pas les constantes relatives à la fixation d'un ligand sur le deuxième site. Les paramètres d'ajustement pour ce type de modèle sont de six : un ΔH , un K_a et un n sont ici définis pour chaque type de sites. En raison du nombre plus élevé de paramètres à ajuster, on comprend que la courbe résultante ne sera pas nécessairement de forme sigmoïdale, mais pourra présenter une large variété de tendances, suivant les valeurs prises par chaque paramètre.

D'autres modèles encore plus complexes existent, et qui nécessitent des précautions particulières. En effet, il s'agit des ajustements dits « à fixation séquentielle ». Il faut, au préalable, fixer un nombre de types de sites différents. On part, tout d'abord, du nombre le plus faible possible, c'est-à-dire deux. La particularité, ici, est que ce type de modèle caractérise la fixation sur des sites non indépendants. En effet, la fixation d'un ligand sur un premier type de sites va être nécessaire pour qu'un ligand puisse venir se fixer sur un deuxième type de sites, et ainsi de suite. Il n'est donc pas imaginable de considérer le deuxième jeu de paramètres thermodynamiques, alors que le premier type de sites n'a pas encore été occupé sur le récepteur. On se trouve donc avec des espèces du type A, AB, AB₂, AB₃, ... avec chaque ligand B sur un type de site différent du récepteur. Ce type de modèle se trouve donc particulièrement adapté pour les systèmes de type protéines, qui présentent parfois un site de fixation qui n'est accessible que si un premier site de fixation a déjà été occupé. En termes de paramètres, ce modèle exclut la présence de stœchiométries. Chaque jeu de paramètres ne contient alors qu'un ΔH et un K_a. Ici encore, le nombre de paramètres impliqués dans le modèle augmente rapidement avec le nombre de types de sites entrés au préalable. Il est donc nécessaire d'être certain que l'ajustement avec les modèles les plus simples se révèle infructueux avant de passer à de tels modèles.

Une dernière remarque qui peut être faite concerne l'entropie molaire de l'interaction. Elle n'intervient pas dans les paramètres de l'ajustement dans la mesure où une connaissance de l'enthalpie molaire et de la constante d'association suffit, à l'aide de la loi d'action de masse, à la calculer. De plus, il faut être conscient que même sur la base des différents paramètres thermodynamiques issus de l'ajustement, on se trouve probablement systématiquement en présence d'une somme de plusieurs contributions. Cette technique est donc particulièrement utile pour rentrer dans des considérations thermodynamiques sur le mode d'injection impliquée, mais sur la base du thermogramme seul, il est difficile de séparer les différentes contributions présentes pour chaque injection. Il est donc nécessaire de corréler ces résultats en ayant recours à des techniques complémentaires.

_____ **128**

Chapitre 3

Morphologie et structure.

3.1 Auto-assemblages de nucléolipides.

La stratégie employée au cours de ce travail sera de caractériser, tout d'abord, les propriétés d'auto-assemblage des lipides nucléotides « seuls » en milieu aqueux. Le comportement de ces espèces sera investigué du point de vue de la morphologie, par diffusion dynamique de la lumière (DLS), puis du point de vue de la structure des objets supramoléculaires formés spontanément en solution, par diffraction des rayons X aux petits (SAXS) et aux grands angles (WAXS). Afin de faire ressortir quelques effets intéressants, on choisira un système de référence que l'on présentera dans un premier temps, puis ensuite quelques couples de nucléolipides seront étudiés afin de démontrer le rôle de différentes caractéristiques moléculaires sur les propriétés physiques des auto-assemblages caractérisés.

3.1.1. Auto-assemblage du diC14dT.

3.1.1.a) Morphologie.

Le premier système qui sera présenté ici est un système de référence déjà étudié auparavant ⁵⁰. Tout comme les auteurs, nous mettons en évidence la formation spontanée d'objets par diffusion dynamique de la lumière (DLS).



	50°	90°	130°
d (nm)	100	28	18
β	0.8	1	1

FIGURE 3.1 : Graphe : Fonctions d'auto-corrélation du diC14dT (1 mM) à 50° (points rouges), 90° (points bleus) et 130° (points verts), accompagnées de leurs ajustements respectifs. Tableau : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement.

Aux angles de diffusion de 90° et 130°, les courbes d'auto-corrélation obtenues FIGURE 3.1 parviennent à être ajustées convenablement à l'aide d'un modèle à monoexponentielle, ce qui atteste d'une très faible polydispersité. A un angle de 50°, la plus lente décroissance justifie le recours à une exponentielle étirée. Cependant, le faible coefficient d'étirement β permet de confirmer la faible polydispersité, puisque même à un angle de diffusion où l'on favorise la contribution de diffusion des gros objets, le diamètre hydrodynamique caractéristique extrait de l'ajustement reste relativement proche de la taille moyenne obtenue à un angle de 90°. On peut, dès lors, vérifier que les ajustements utilisés ne permettent de décrire qu'une population parfaitement monodisperse, de taille caractéristique donnée. Or, même pour un système de polydispersité particulièrement faible comme le diC14dT, il est important de souligner la polydispersité intrinsèque à ce type d'auto-assemblages lipidiques. C'est pourquoi un ajustement effectué à partir d'un modèle « idéal » ne permettra souvent pas à la fonction d'auto-corrélation d'être ajustée de manière parfaite aux temps longs, où la diffusion des plus gros objets opère encore. En dépit de cet aspect, les ajustements présentés dans ce travail permettent tout de même de rendre compte de l'ordre de grandeur de la taille moyenne d'une population d'objets diffusant à chaque angle de diffusion.

La théorie aboutissant à la modélisation de la fonction d'auto-corrélation par une telle exponentielle se base sur l'hypothèse que les objets sont totalement indépendants les uns des autres, et modélisés par des sphères. Afin de s'assurer d'être dans ces conditions, il est donc nécessaire de se placer en régime dilué. Cependant, on peut s'intéresser spécifiquement à l'effet d'une dilution sur le diamètre des objets présents dans ce système. Nous avons donc étudié, par diffusion dynamique de la lumière, la variation de la taille caractéristique extraite de l'ajustement à 90°, au cours de plusieurs dilutions successives d'une dispersion de diC14dT à 10 mM dans l'HEPES. L'angle de diffusion de 90° a été choisi afin de tenir compte autant de la contribution des gros objets que de celle des petits objets, et par conséquent de donner une valeur moyenne caractéristique de l'ensemble de la population.

	10 mM	5 mM	2.5 mM	1.25 mM
d (nm)	24	26	29	25
β	1	1	1	1



FIGURE 3.2 : Tableau : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement, au cours de dilutions successives d'une dispersion de diC14dT à 10 mM. Graphe : Evolution du diamètre hydrodynamique des objets en fonction de la concentration molaire en lipide.

Les concentrations inférieures à 1 mM n'ont pas pu être étudiées, en raison d'un signal mesuré trop faible. On constate FIGURE 3.2, tout d'abord, qu'à un angle de diffusion de 90°, l'ensemble des courbes d'auto-corrélation peut être ajustée avec un modèle à mono-exponentielle, tout comme l'échantillon précédent à 1 mM. L'ensemble des diamètres hydrodynamiques qui en ont été extraits peut donc être associé à une population monodisperse « idéale » à chaque angle de diffusion. La qualité des ajustements, identique à l'ajustement présenté précédemment pour l'échantillon à 1 mM, permet de confirmer que le modèle utilisé reste valable, dans le cas des très petits objets formés par le diC14dT, quelque soit la concentration en nucléolipide, et ce, jusqu'à une concentration relativement élevée de 10 mM. D'autre part, la dilution ne semble induire aucun gonflement des objets, puisque le diamètre hydrodynamique reste constant à 27 ±3 nm et ne semble présenter aucune tendance franche en fonction d'une évolution de la concentration. Ceci va nous permettre de postuler que les objets restent inchangés dans une gamme de concentrations allant de 1 à 10 mM.

3.1.1.b) Structure.

Maintenant que la morphologie des objets formés spontanément par le diC14dT est connue, il peut être intéressant d'étudier leur structure. Pour ce faire, une dispersion de diC14dT à 5 mM est étudiée en diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) au Nanostar à d_{éch-dét} = 650 mm (configuration dite « moyens angles »), ainsi qu'en diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS) à l'anode tournante à d_{éch-dét} = 155 mm, afin d'étudier l'organisation des lipides au sein des objets supramoléculaires. La structure des objets formés par le diC14dT ayant déjà été élucidée dans la littérature⁵⁰ à l'aide d'un montage de diffusion X suffisamment puissant (Synchrotron SOLEIL, Saclay), l'objectif est de confirmer

ces résultats à l'aide des montages de diffraction X présents au laboratoire afin de mettre en évidence, éventuellement, les limites de notre approche expérimentale sur ce type de dispositif de laboratoire.

En raison d'un rapport signal/bruit trop faible pour obtenir un diffractogramme de qualité satisfaisante au bout d'une durée d'acquisition de 12h, un protocole de concentration a été mis en place. Ceci nous permettra ainsi de conserver la morphologie et la structure des objets présents dans la formulation initiale, tout en évitant d'avoir à reformuler un nouvel échantillon plus concentré. Il faudra, bien entendu, vérifier que la structure des objets reste la même tout au long du protocole de concentration, afin d'éviter une transition dans le diagramme de phases de l'amphiphile. On place ainsi un échantillon formulé à 5 mM dans un tube à filtre Amicon Ultra-4 de Millipore présentant une membrane poreuse (30 KDa). L'échantillon est ensuite centrifugé à 4300 tr/min, et on relève, toutes les 5 min, le volume du filtrat. Lorsque le volume du concentrat a été approximativement divisé par 10, on stoppe la procédure et on vérifie si le rapport signal/bruit est suffisant en spectroscopie IR (voir CH.4). Pour le diC14dT, la droite d'étalonnage (voir CH.5) nous permet également de remonter à une concentration de 43 mM en lipide nucléotide. La structure des objets présents au sein du concentrat est étudiée, de même que celle des objets présents dans la formulation initiale à 5 mM avant le processus de concentration.



FIGURE 3.3 : Superposition des diffractogrammes SAXS du diC14dT (Nanostar, d=650 mm, t_{acq}=12h) obtenus pour la dispersion initiale à 5 mM (points gris), ainsi que pour la dispersion concentrée à 43 mM (points noirs).

L'allure du diffractogramme présenté FIGURE 3.3 ci-dessus est classique pour ce type de système. Aux petits angles, l'intensité reçue en tout point du détecteur bidimensionnel est essentiellement modélisée par un facteur de forme caractéristique du motif diffusant. Dans le diffractogramme intégré, celui-ci est détectable sous la forme d'une bosse relativement large aux petits angles. De plus, l'absence de pic de Bragg suggère que les objets ne présentent pas d'organisation à grande distance. Comme déjà montré pour le diC14dT ⁵⁰ et comme souvent dans le cas des auto-assemblages lipidiques, on s'attend à des objets de type vésicules unilamellaires, et dont le motif de base expliquant la diffusion est la bicouche lipidique. Un ajustement par le modèle de Nallet est donc réalisé FIGURE 3.4.



δн (Å)	δτ (Å)	d _m =2.(δ _H +δ _T) (Å)	Δρτ/Δρι	q* (Å⁻¹)
11.4	11.3	45.4	-0.35	0.073

FIGURE 3.4 : Diffractogramme : Ajustement par le modèle de Nallet du diffractogramme SAXS du diC14dT concentré à 43 mM (Nanostar, d=650 mm, t_{acq} =12h). Tableau : Paramètres d'ajustements.

La qualité de l'ajustement par le modèle de Nallet semble indiquer la présence d'un facteur de forme de bicouche. L'ensemble de ces résultats corrélés permet de confirmer la formation spontanée de vésicules unilamellaires, comme montré dans l'article cité précédemment. De plus, les paramètres d'ajustement tirés du modèle utilisé nous donnent des informations structurales sur la bicouche présente au sein des vésicules. Ces valeurs seront conservées en tant que valeurs de référence pour les systèmes développés par la suite. On peut néanmoins noter une épaisseur totale de la bicouche de 45.4 Å, ainsi que le fait que la taille de la tête polaire du diC14dT au sein de la bicouche semble équivalente à la taille de sa partie hydrophobe.

En présence d'auto-assemblages de type vésicules unilamellaires, il est nécessaire, afin de caractériser totalement le système, de déterminer l'état des chaînes aliphatiques dans la bicouche. Pour répondre à cette question, une étude par diffusion X aux grands angles a été menée sur la dispersion concentrée à 43 mM.



FIGURE 3.5 : Superposition des diffractogrammes WAXS du diC14dT concentré à 43 mM (points gris) et de l'HEPES (points bleus) (Anode tournante, d=155 mm, t_{acq} =4h).

Puisque la soustraction du diffractogramme par celui du tampon n'est pas convaincante pour certains systèmes, on présentera alors, parallèlement, FIGURE 3.5, les diffractogrammes aux grands angles de l'échantillon et de l'eau. De manière qualitative, le diffractogramme obtenu ne présente aucun pic mais révèle une bosse large vers 1.45 Å⁻¹ absente dans celui du tampon. Le maximum vers 2 Å⁻¹ correspondant au signal de l'eau. Nous pouvons donc conclure que les chaînes confinées dans l'espace hydrophobe de la bicouche sont sous forme fluide.

3.1.2. Effet du nombre de chaînes : auto-assemblage du C14dT.

3.1.2.a) Morphologie.

Etudions maintenant l'analogue du diC14dT à une seule chaîne aliphatique : le C14dT. Une dispersion à 5 mM de C14dT apparaît sous la forme d'un échantillon laiteux. Cette turbidité est à mettre en relation avec la formation éventuelle de gros objets diffusant le rayonnement lumineux. Leur sédimentation s'opère d'ailleurs très rapidement, pour former un culot visible au bout de quelques heures seulement. Une observation en microscopie optique à lumière polarisée laisse apparaître les auto-assemblages comme des objets très anisotropes de type fibres, sur la FIGURE 3.6.



FIGURE 3.6 : Cliché de microscopie optique à lumière polarisée du C14dT. Barre = 200 µm.

La population d'objets visible en microscopie optique est extrêmement polydisperse, et leur longueur caractéristique semble aller de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres. Etant donné le rapport d'aspect particulièrement important pour ces autoassemblages, il est à penser que leur structure interne est, elle aussi, fortement anisotrope. Pour confirmer ce point, l'échantillon est observé en position polariseur et analyseur croisés. Il faut noter que sur les deux clichés suivants, les fibres ont été soniquées à l'aide de l'ultrasonicateur Bioruptor[®]. En raison de leur morphologie, celles-ci se prêtent particulièrement à une rupture induite par un mécanisme de cavitation, grâce à la sonication. Ce procédé présente deux conséquences directes. D'une part, la polydispersité apparente diminue, en même temps que la taille des objets supramoléculaires, et ceci d'autant plus que la durée et que la puissance de la sonication sont grandes. D'autre part, ceci semble casser le réseau formé de grandes fibres, afin de favoriser l'apparition de petits agrégats, facilement dispersables, formés de fibres plus courtes.





FIGURE 3.7 : Clichés 1 et 2 : Microscopie optique à lumière polarisée des fibres de C14dT soniquées, respectivement en positions analyseur et polariseur « décroisés », puis « croisés ». Barre = 200 μ m. Cliché 3 : Microscopie optique à contraste de phase des fibres de C14dT soniquées. Barre = 100 μ m.

On observe, en position analyseur et polariseur croisés, sur la FIGURE 3.7, une biréfringence caractéristique d'une structure organisée. Ceci s'observe davantage dans les régions où des fibres agrégées sont présentes.

3.1.2.b) Structure.

Afin d'élucider l'origine de l'anisotropie apparente des fibres de C14dT, une étude structurale approfondie est menée. Une dispersion de C14dT à 5 mM est étudiée en diffusion des rayons X aux moyens angles (MAXS) au Nanostar à d_{éch-dét} = 100 mm (configuration dite « grands angles ») pour obtenir un maximum d'informations sur la structure. Afin d'obtenir un rapport signal/bruit optimal, on choisit d'étudier la diffusion X du culot formé par la sédimentation, où la concentration locale en fibres est maximale.



FIGURE 3.8 : Diffractogramme MAXS du culot formé par les fibres de C14dT (Nanostar, d=100 mm, t_{acq} =8h). Les flèches noires indiquent les 4 ordres d'une famille de pics de Bragg périodiques.

On constate, FIGURE 3.8, la présence d'une structure quasi-cristalline avec une forêt de pics de Bragg. Un détail remarquable est la présence des 4 ordres d'une famille de pics à q₀, 2q₀, 3q₀, 4q₀, indiquant ainsi une périodicité spatiale de 34,7 Å. Par comparaison avec un article de la littérature⁴² ayant étudié l'analogue du monocaténaire en C16 : le C16dT, on s'attend à trouver, dans ce diffractogramme, la signature en diffraction X d'une maille cristalline particulière. La maille suggérée par les auteurs étant une maille orthorhombique, on part donc de cette hypothèse afin de réaliser l'indexation manuelle des différents pics de Bragg prévus par la diffraction X d'une telle structure. Pour cela, on décrit l'ensemble des familles de plans présents hypothétiquement dans la fibre par les indices de Miller associés. A l'aide de quelques pics de Bragg judicieusement choisis, les paramètres de maille hypothétiques sont calculés. Enfin, l'ensemble des positions des pics de Bragg est généré, dans l'hypothèse des paramètres de maille déterminés précédemment. On présente, FIGURE 3.9, l'indexation finale obtenue, ainsi que la superposition entre le diffractogramme expérimental et les positions prévues par la diffraction X de chaque famille de plans, dans l'hypothèse d'une maille orthorhombique.

h	k	I	q (Å⁻¹)	h	k		q (Å-1)
0	0	1	0.181	0	1	2	0.565
1	0	0	0.351	1	1	1	0.590
0	0	2	0.362	1	0	3	0.657
1	0	1	0.401	1	1	2	0.672
0	1	0	0.433	0	1	3	0.695
0	1	1	0.470	2	0	0	0.702
1	0	2	0.513	0	0	4	0.725
0	0	3	0.544	2	0	1	0.732
1	1	0	0.558	1	1	3	0.787



FIGURE 3.9 : Tableau : Indexation du diffractogramme dans l'hypothèse d'une maille orthorhombique et des paramètres de mailles a=17.9 Å, b=14.3 Å, c=34.7 Å. Diffractogramme : Superposition du diffractogramme MAXS des fibres de C14dT (Nanostar, d=100 mm, t_{acq} =8h) et des positions des pics de Bragg prévus par l'indexation.

Les premiers pics les plus intenses sont également ceux qui coïncident le plus avec la simulation. C'est également ceux qui servent à déduire les paramètres de maille. Dans cette hypothèse, on constate que l'indexation du reste des pics de Bragg est relativement satisfaisante, même si, ici encore, la prévision de la position des pics est d'autant plus juste que l'intensité de ces pics est grande et que ces pics sont bien résolus. Aux plus grands angles, la résolution du diffractogramme ne permet pas d'indexation précise. On conserve donc les paramètres de maille utilisés pour la simulation, et on peut alors prétendre que les fibres de C14dT sont constituées d'un réseau orthorhombique, à l'origine de l'aspect quasicristallin des objets et de leur forte anisotropie observée en microscopie optique à lumière polarisée.

Les paramètres de maille déterminés par l'indexation sont les suivants : a=17.9 Å, b=14.3 Å et c=34.7 Å. On suppose que le paramètre c de la maille est formé de la bicouche unitaire ainsi que de l'épaisseur d'eau présente entre deux bicouches. En effet, celui-ci constitue le plus grand côté de la maille cristalline et la famille de plans (001), qui provoque donc l'apparition du premier pic de Bragg (au vecteur d'onde de diffusion le plus faible), constitue donc la répétition périodique des bicouches selon l'axe c normal à celles-ci. La maille orthorhombique étant une maille cristalline droite, les deux autres axes a et b doivent appartenir au plan de la bicouche. Ils constituent deux directions selon lesquelles on observe également deux périodicités distinctes, matérialisées par les familles de plans (100) et (010). On fait alors l'hypothèse que ces périodicités sont expliquées par l'organisation bidimensionnelle des têtes polaires sur la surface de la bicouche. De manière générale, l'organisation tridimensionnelle de cette structure imposée par le raisonnement précédent implique que les chaînes doivent nécessairement être sous forme gel au sein des bicouches. Pour le vérifier, on effectue une étude par diffusion X aux grands angles sur le même échantillon de fibres de C14dT, au niveau du culot.



FIGURE 3.10 : Diffractogramme WAXS du culot formé par les fibres de C14dT (Anode tournante, d=155 mm, $t_{acg}=4h$).

Les pics caractéristiques de la FIGURE 3.10, ici au nombre de deux, observés vers 1.3 Å⁻¹ permettent de confirmer l'organisation des chaînes dans l'espace hydrophobe des bicouches. L'ensemble de ce raisonnement nous amène à imaginer une structure hypothétique interne pour les fibres de C14dT. Celles-ci seraient ainsi formées de bicouches planes hydratées, présentant un empilement périodique.

Par ailleurs, l'hydratation de ces bicouches semble relativement modérée étant donné la faible périodicité lamellaire calculée (c=34.7 Å). Ainsi, leur confinement relatif pourrait expliquer l'anisotropie de cette organisation, ainsi que son caractère quasi-cristallin. Cependant, étant donné que l'on ne connaît pas avec précision l'épaisseur d'une bicouche de C14dT au sein des fibres, il est difficile de prévoir avec certitude la structure exacte de cet empilement. Ainsi, il est possible d'imaginer un angle d'inclinaison non nul pour les chaînes aliphatiques des lipides, ainsi qu'un éventuel enchevêtrement permettant probablement d'expliquer la faible périodicité lamellaire évoquée. Le schéma de la FIGURE 3.11 synthétise la structure hypothétique à laquelle le raisonnement précédent permet d'aboutir.



FIGURE 3.11 : Schéma hypothétique de la structure interne d'une fibre de C14dT, basé sur l'indexation du diffractogramme par un réseau orthorhombique.

3.1.2.c) Etude en température.

Un aspect intéressant de ce système repose sur son comportement en température. Il a été montré que le diffractogramme X présenté dans le paragraphe précédent ne restait pas inchangé au cours d'un cycle de chauffe. Le montage utilisé consiste en un four, commandé par un élément de chauffage de type Peltier, dans lequel est placé le capillaire à analyser. On réalise une rampe de chauffe de 0.5°C/min, à partir de la température ambiante et jusqu'à 85°C, avec un pas de 5°C jusqu'à 50°C, puis un pas de 2°C jusqu'à la température finale. A chaque nouvelle température imposée par la consigne, on laisse l'échantillon s'équilibrer pendant 30 min, puis une acquisition de 2h est effectuée sur l'anode tournante, à une distance échantillon-détecteur de d_{éch-dét} = 407 mm. On sera ainsi en mesure de supposer qu'à chaque température d'analyse, l'échantillon est à l'équilibre thermodynamique, sauf dans le cas d'éventuels phénomènes de cinétique très lente. A partir de 80°C, la turbidité de l'échantillon disparaît, et il n'est plus possible d'observer de fibres en microscopie optique. De plus, à partir de cette même température de transition, l'ensemble des pics de Bragg disparaît, en diffusion X, pour ne laisser apparaître qu'une bosse simple, caractéristique d'un facteur de forme de bicouche. Afin de pouvoir essayer de l'ajuster à l'aide du modèle de Nallet, une analyse SAXS au Nanostar à d_{éch-dét} = 650 mm (configuration MA) est effectuée afin d'obtenir un rapport signal/bruit optimal.

La même étude en température que celle réalisée précédemment, a également été faite en WAXS à l'anode tournante à $d_{ech-dét} = 155$ mm. Celle-ci permet d'observer, à partir de 80°C, la disparition totale des 2 pics vers 1.3 Å⁻¹.



FIGURE 3.12 : Diffractogramme 1 : Ajustement par le modèle de Nallet du diffractogramme SAXS du C14dT à 85°C à 5 mM (Nanostar, d=650 mm, t_{acq} =12h). Diffractogramme 2 : Diffractogramme WAXS du C14dT à 85°C et à 25°C à 5 mM (Anode tournante, d=155 mm, t_{acq} =4h). Tableau : Paramètres d'ajustement.

L'ajustement relativement satisfaisant du diffractogramme SAXS par le modèle de Nallet, sur la FIGURE 3.12, permet d'affirmer que le système C14dT présente une transition de type fibres/vésicules unilamellaires à une température de l'ordre de 80°C. Les vésicules sont, par ailleurs, caractérisées par un état fluide des chaînes aliphatiques au sein de la bicouche, tout comme les vésicules de diC14dT. On peut ainsi affirmer qu'à partir de 80°C, les fibres perdent toute organisation, que ce soit au sein de la bicouche, mais aussi au sein de l'empilement périodique entre les bicouches, lorsque la transition vers les vésicules s'opère. Concernant les paramètres d'ajustement, on constate que l'épaisseur de la bicouche diminue de 6 Å lorsque l'on passe des vésicules de diC14dT aux vésicules de C14dT à chaud. Cet effet pourrait être expliqué par la réduction du nombre de chaînes, rendant ainsi moins importantes les fluctuations thermiques en jeu au sein de l'espace hydrophobe de la bicouche, et permettant donc à la bicouche d'apparaître légèrement plus compacte. De manière similaire à la rampe de chauffe pour étudier la transition fibres/vésicules, une rampe de refroidissement a également été effectuée afin d'observer si ce processus était réversible. A partir de 85°C, et suivant les mêmes caractéristiques de rampe que pour la chauffe, on observe la réapparition du facteur de structure à partir de 58°C. A cette température, et pour toute température inférieure à celle-ci, on constate que les pics de Bragg réapparus sont à l'identique de ceux observés pour les fibres de C14dT à température ambiante. Une forte hystérèse est présente et semble indiquer que le passage fibres/vésicules s'effectue de manière probablement plus favorable que le passage vésicules/fibres. On peut, par ailleurs, prélever un échantillon de C14dT ayant subi une transition fibres/vésicules, puis un refroidissement en-deçà de sa température de transition, afin de l'observer en microscopie optique. Quelques heures après le refroidissement, on effectue l'observation FIGURE 3.13.



FIGURE 3.13 : Cliché de microscopie optique à lumière polarisée des fibres de C14dT réapparaissant après une chauffe au-delà de la température de transition. Barre = 200 μm.

On constate, FIGURE 3.13, qu'après un passage au-delà de 80°C, le phénomène de retour vers l'état « fibres » fait intervenir un mécanisme de nucléation autour de certaines zones d'où apparaissent les fibres. La cinétique de cette transition vers les vésicules, et à plus forte raison du retour vers les fibres, implique un mécanisme complexe qui ne sera pas étudié spécifiquement ici.

Enfin, le diamètre hydrodynamique des vésicules de C14dT a également été estimé, à 85°C, en DLS.

	50°	90°	130°
d (nm)	140	300	600
β	0.85	0.7	0.6

FIGURE 3.14 : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits des courbes d'auto-corrélation du C14dT à 85°C (5 mM) à 50°, 90° et 130°, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement.

Concernant les valeurs des diamètres hydrodynamiques des vésicules de C14dT à chaud, FIGURE 3.14, obtenues à chaque angle de diffusion, on peut remarquer que l'évolution n'est pas celle attendue en théorie. En effet, si les petits objets diffusent de manière relativement similaire aux petits et aux grands angles de diffusion, les gros objets, en revanche, ont tendance à présenter une contribution de diffusion plus importante aux petits angles qu'aux grands angles, ce qui n'est pas vérifié ici. La tendance observée dans le tableau ci-dessus doit certainement être associée au protocole utilisé pour réaliser la mesure. Lorsque la température de l'échantillon a atteint 85°C, le tube a été plongé dans la cuve de décaline à 25°C afin d'effectuer les mesures d'auto-corrélation, tout d'abord à 50°, puis à 90°, puis enfin à 130°. Comme montré auparavant, la transition vésicules/fibres est probablement complexe dans les deux sens où elle s'effectue. Il est alors difficile d'estimer le temps nécessaire aux vésicules pour retourner vers l'état fibres lors d'un passage non contrôlé de la température de 85°C à 25°C. Même si, à la fin des mesures de DLS, la turbidité de l'échantillon n'était pas réapparue, il est envisageable qu'à l'échelle colloïdale, les objets ne soient plus présents en tant que vésicules seules, mais aient déjà commencé à s'associer, selon un mécanisme de nucléation, afin de tendre vers une morphologie de type fibres. Ce retour vers l'état « fibre » s'opérant suivant une cinétique indéterminée, l'état du système à chaque instant dépend probablement fortement des conditions précises de refroidissement. On pourra donc considérer que les mesures effectuées à 90°, et à plus forte raison à 130°, sont faussées du fait que le système n'est pas étudié à l'équilibre thermodynamique.

3.1.3. Effet de la longueur des chaînes : auto-assemblage du diC16dT.

3.1.3.a) Morphologie.

Afin d'étudier l'effet de la longueur des chaînes sur les assemblages supramoléculaires formés par un bicaténaire tel que le diC14dT, nous caractérisons ensuite le système en C16 : le diC16dT. Comme pour le système de référence, la morphologie des objets est tout d'abord étudiée par DLS. Les courbes d'auto-corrélation étant très similaires à celles du diC14dT, autant au niveau du signal que du type de modèle utilisé et de la qualité de l'ajustement, on ne présentera, FIGURE 3.15, que les paramètres issus des ajustements.

	50°	90°	130°
d (nm)	370	280	230
β	0.8	0.8	0.8

FIGURE	3.15	: Valeurs	des	diamètres	hydrodynamiques	moyens	extraits	des	courbes	d'auto-corrélation	ı du
diC16d	T (1 ml	И) à 50°, 9	90° е	t 130°, et d	es coefficients d'éti	rement u	tilisés po	ur ch	naque aju	istement.	

La première chose notable, FIGURE 3.15, est que la taille caractéristique des objets est nettement plus grande, typiquement d'un ordre de grandeur supérieur, que pour le système de référence. La présence d'objets de taille moyenne plus grande, ici, explique l'écart plus important à une population idéale monodisperse que dans le cas du diC14dT. Cet argument permet de justifier la nécessité du recours à un modèle à exponentielle étirée, quelque soit l'angle de diffusion. Cependant, la valeur du coefficient d'étirement reste relativement grande, et constante quelque soit l'angle de diffusion considéré. De plus, la dispersion en taille ne semble pas très étalée de part et d'autre du diamètre moyen tiré de l'ajustement à 90°. Ces deux faits permettent d'affirmer que la polydispersité de ce système reste tout aussi faible et comparable à celle du diC14dT, en dépit de diamètres hydrodynamiques cependant nettement plus grands.

3.1.3.b) Structure.

Afin de déterminer en détail la structure des auto-assemblages formés spontanément par le diC16dT, des études par diffusion X aux petits angles et aux grands angles sont effectuées.



FIGURE 3.16 : Diffractogramme 1 : Ajustement par le modèle de Nallet du diffractogramme SAXS du diC16dT concentré à 37 mM (Nanostar, d=650 mm, t_{acq} =12h). Diffractogramme 2 : Diffractogramme WAXS du diC16dT concentré à 37 mM (Anode tournante, d=155 mm, t_{acq} =4h). Tableau : Paramètres d'ajustement.

Hormis la bosse du facteur de forme de bicouche remarquable sur le diffractogramme SAXS obtenu FIGURE 3.16, on peut constater deux ruptures de pentes bien nettes situées sur la remontée aux petits angles. Pour savoir si il s'agit d'un effet indésirable lié, par exemple, à la diffusion générée par le bord du beamstop, on pointe la deuxième rupture de pente pour constater que le vecteur d'onde de diffusion qui lui est associé est le double de celui auquel est présent la première rupture. Il s'agit donc probablement de deux ordres d'une structure périodique, de type lamellaire, le troisième serait alors situé au niveau du minimum d'intensité, d'où le fait qu'il ne soit pas visible. Il convient alors d'ajuster
ce diffractogramme par le modèle de Nallet complet, en incluant le facteur de structure au facteur de forme habituel. L'ajustement est particulièrement convainquant, ce qui justifie l'utilisation d'un facteur de structure et permet d'affirmer que la dispersion de diC16dT est constituée de vésicules multilamellaires. De plus, une spécificité de ce système par rapport au diC14dT consiste en l'état gel des chaînes confinées dans l'espace hydrophobe des bicouches. En effet, le diffractogramme WAXS présente un pic bien défini vers 1,5 Å⁻¹, caractéristique d'une distance périodique de répétition inter-chaînes au sein de la bicouche. Ce dernier point permet de préciser que les vésicules multilamellaires de diC16dT sont constituées de bicouches gel où les chaînes aliphatiques sont figées et présentent un ordre à courte distance bidimensionnel. La perte de fluidité de la bicouche permet certainement d'expliquer pourquoi les vésicules deviennent beaucoup plus grandes et multilamellaires lorsque l'on passe du diC14dT au diC16dT. Ce changement de structure interne de la bicouche engendre une forte modification des interactions entre bicouche. Il est possible de faire l'hypothèse que le caractère gel de la bicouche renforce la rigidité de celle-ci et favorise donc des interactions attractives entre les bicouches qui permettent de stabiliser le caractère multilamellaire de l'assemblage.

Les paramètres issus du facteur de structure permettent d'estimer la périodicité entre les bicouches à 218 Å. Ceci correspond donc à des vésicules multilamellaires très gonflées. De plus, un empilement d'environ 10 bicouches est prévu par l'ajustement au sein d'un objet. Un diamètre total d'environ 400 nm peut être estimé, en bon accord avec l'ordre de grandeur mesuré par DLS.

Concernant les paramètres issus du facteur de forme, on constate, pour l'épaisseur hydrophile constituée par les têtes polaires, une diminution de 11,4 Å à 9,5 Å lorsque l'on compare le diC14dT avec le diC16dT. Cet écart peut être expliqué par la diminution de l'aire disponible par tête polaire lorsque l'on passe d'un très petit objet, caractérisé par une bicouche de forte courbure spontanée, à un objet plus grand, constitué de bicouches de courbure moins importante. Une contraction des têtes polaires lorsque l'on passe du système diC16dT est donc attendue.

De plus, alors que la bicouche constituant les vésicules de diC14dT était caractérisée par une épaisseur totale de 45 Å, les vésicules multilamellaires de diC16dT présentent une épaisseur totale de 40 Å. Cette diminution d'épaisseur, visible aussi sur le paramètre δ_T , et ayant pourtant lieu alors que la longueur des chaînes augmente, doit être mise en relation avec l'état gel des chaînes. Cette conformation passe par un plus grand nombre d'interactions entre chaînes aliphatiques, voire même par un enchevêtrement éventuel, mais permet aussi à la bicouche d'être davantage compacte. De manière générale, la transition gel/fluide est un phénomène couramment décrit dans la littérature pour les membranes lipidiques. Il est aussi connu qu'une réduction de la longueur des chaînes d'un lipide va favoriser une plus grande fluidité, via les fluctuations thermiques des parties hydrophobes. En revanche, une augmentation de la taille des chaînes va augmenter les interactions de Van der Waals qu'une chaîne pourra former avec ses voisines, et va donc tendre à favoriser une structure figée et organisée. Il est donc logique de considérer qu'à température ambiante, le passage d'un lipide bicaténaire en C14 vers un lipide bicaténaire

en C16 s'accompagne d'un passage d'une bicouche fluide plus épaisse à une bicouche gel plus compacte.

3.1.4. Effet de la contrainte de la tête polaire : auto-assemblage du diC16LNA-T.

3.1.4.a) Morphologie.

L'ensemble des systèmes étudiés auparavant possède une tête polaire sans contrainte de rotation, par exemple entre la base azotée et le sucre, ou bien entre le nucléoside tout entier et le groupement phosphate, en raison de la présence de liaisons covalentes simples. Afin d'étudier l'effet d'une diminution de ce degré de liberté sur la morphologie et la structure des auto-assemblages, il peut être intéressant de figer la tête polaire dans une orientation bien précise. La morphologie des objets est, tout d'abord, étudiée par DLS.

	50°	90°	130°
d (nm)	310	180	150
β	0.9	0.9	0.9

FIGURE 3.17 : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits des courbes d'auto-corrélation du diC16LNA-T (1 mM) à 50°, 90° et 130°, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement.

On constate, FIGURE 3.17, que le diC16LNA-T forme spontanément des objets supramoléculaires de plus faible taille que le diC16dT. Par ailleurs, la dispersion en taille reste très faible, tout comme le confirme le coefficient d'étirement utilisé, quelque soit l'angle de diffusion, qui reste très proche de 1. La polydispersité de ce système est donc très faible ici aussi. Afin de justifier la diminution de la taille moyenne des objets, qui passe de 280 nm à 180 nm lorsque l'on bloque la libre rotation de la tête polaire, on peut faire appel à des arguments de gêne stérique. Lorsque la tête polaire est libre de rotation, elle peut alors se placer dans la conformation lui assurant une stabilité optimale et minimisant ainsi les contacts défavorables tout en lui permettant éventuellement de construire de nouvelles interactions faibles stabilisatrices intermoléculaires. Si l'on bloque la tête polaire, en plus de la gêne stérique induite par l'ajout d'un groupe méthylène sur le sucre, on peut aisément imaginer que la tête va se trouver contrainte dans une orientation donnée qui ne sera probablement pas la plus optimale en accord avec son environnement chimique. De ce fait, et pour compenser cette perte de liberté, elle va nécessiter une plus grande aire par tête polaire sur la bicouche des objets supramoléculaires. La conséquence directe est que la courbure spontanée de la membrane va augmenter par rapport au diC16dT, ce qui va s'accompagner d'une diminution du diamètre hydrodynamique moyen des objets.

3.1.4.b) Structure.

Nous avons vu que la structure du diC16dT consistait en une répétition périodique de bicouches gel relativement compactes, de 40 Å d'épaisseur pour chaque bicouche. Il est maintenant possible d'essayer d'évaluer l'effet d'une contrainte de la tête polaire sur la structure des objets spontanément formés.



FIGURE 3.18 : Diffractogramme 1 : Ajustement par le modèle de Nallet du diffractogramme SAXS du diC16LNA-T concentré à 47 mM (Nanostar, d=650 mm, t_{acq} =12h). Diffractogramme 2 : Diffractogramme WAXS du diC16LNA-T concentré à 47 mM (Anode tournante, d=155 mm, t_{acq} =4h). Tableau : Paramètres d'ajustement.

Le diffractogramme SAXS, FIGURE 3.18, peut être ajusté à l'aide du modèle de Nallet, en n'utilisant qu'un facteur de forme. En effet, contrairement au diC16dT, aucune rupture de pente et aucun pic de Bragg n'est décelable au sein du signal. Nous sommes donc en présence de vésicules unilamellaires, tout comme le diC14dT. Etant donné que nous considérons des parties hydrophobes de même longueur que pour le di16dT, il n'est pas étonnant de constater que le diffractogramme WAXS nous renseigne sur l'état gel de la bicouche, en raison du même pic intense observé vers 1,5 Å⁻¹.

Un paramètre dont il peut être intéressant de commenter l'évolution entre le système diC16dT et le système diC16LNA-T est l'épaisseur hydrophobe de la bicouche liée au paramètre δ_T . La bicouche gel du diC16dT présentait un δ_T de 10,5 Å, tandis que celle du diC16LNA-T présente un δ_T de 8,6 Å. Il est possible que cette diminution puisse être expliquée par le fait que l'on passe d'un système multilamellaire à un système unilamellaire. Un empilement multilamellaire de bicouches est caractérisé par sa flexibilité, via les fluctuations thermiques, sous la forme du paramètre de Caillé. De manière générale, la présence de plusieurs bicouches confinées leur confère une certaine élasticité, du fait des interactions observées entre bicouches reposant essentiellement sur des mécanismes entropiques. Si l'on considère une bicouche particulière de cet empilement, les interactions

qu'elle va subir de part et d'autre vont provoquer un léger gonflement de son espace hydrophobe. Par comparaison, pour un même état gel, une bicouche prise seule va paraître plus compacte.

3.1.5. Effet de la nature de la tête polaire : auto-assemblages du diC14dA, du C14dA et du diC16LNA-A.

3.1.5.a) Morphologie.

Afin d'étudier l'effet de la nature de la tête polaire sur les différents types d'autoassemblages décrits jusqu'à maintenant, les dispersions de quelques dérivés de l'adénine ont également été caractérisés. On peut trouver, FIGURE 3.19, les courbes d'auto-corrélations obtenues en DLS pour le diC14dA. La spécificité de ce système, par rapport aux dérivés de la thymine présentés précédemment est la plus grande polydispersité apparente rendant difficile l'ajustement de l'ensemble de la fonction d'auto-corrélation par un modèle à exponentielle étirée, notamment aux temps longs où l'on constate systématiquement la marque d'objets beaucoup plus gros que ceux de la population décrite par le modèle. Afin de faciliter les interprétations futures, on conserve ce type de modèle pour l'ajustement plutôt que de faire appel à un modèle à bi-exponentielles, sans avoir, pour autant, d'arguments physiques pour considérer la présence de deux populations distinctes. Ici, seule la première partie de la décroissance sera ajustée, ce qui nous permettra de faire des considérations morphologiques seulement sur les plus petits objets de la population. De manière générale, il est primordial de garder en tête que la notion de polydispersité est inhérente à ce type de système, comme on pourra plus facilement le constater sur les lipides à base d'adénine.



	50°	90°	130°
d (nm)	390	220	140
β	0.75	0.7	0.72

FIGURE 3.19 : Graphe : Fonctions d'auto-corrélation du diC14dA (1 mM) à 50° (points rouges), 90° (points bleus) et 130° (points verts), accompagnées de leurs ajustements respectifs. Tableau : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement.

Comme précisé ci-dessus, en ne tenant compte que de la population décrite par le modèle, et donc permettant uniquement de décrire l'ensemble des objets les plus petits, on constate, FIGURE 3.19, que le facteur d'étirement est tout de même relativement faible. La taille moyenne extraite des ajustements reste du même ordre de grandeur que celle des systèmes décrits précédemment, mais on constate cependant une polydispersité beaucoup plus marquée.

La comparaison intéressante à faire pour le diC14dA se fait avec l'analogue de la thymine : le diC14dT. Les diamètres hydrodynamiques sont doublés lorsque l'on passe d'un système à l'autre, et la polydispersité semble également augmenter de manière conséquente.

Nous pouvons également nous intéresser au C14dA, l'analogue monocaténaire présenté précédemment. Il est important de préciser que, en dépit de la modification de la nature de la tête polaire de l'amphiphile, les caractéristiques générales du système restent globalement comparables. En revanche, afin de montrer l'effet de la nature de la base azotée sur les objets supramoléculaires formés, seules les différences notables seront soulevées. La seule variation étonnante entre les deux systèmes est que les fibres de C14dA n'apparaissent pas spontanément. Il est nécessaire, pour cela, de provoquer la nucléation par un phénomène de refroidissement brusque, tout comme on pourrait le faire dans une étape de recristallisation en synthèse organique. Concrètement, après sa formulation à 35°C, l'échantillon est placé au réfrigérateur à 5°C, pendant une nuit, afin de permettre aux fibres de C14dA de commencer à apparaître. Ceci renforce le caractère quasi-cristallin des auto-assemblages formés par les monocaténaires. Hormis ce point, les fibres du C14dT et du C14dA sont, en tout point, similaires du point de vue de leur morphologie.

Par ailleurs, tout comme le C14dT, le C14dA présente un comportement original en température. Une transition de morphologie est également observable, poussant les fibres à évoluer à partir de 56°C. Le changement de structure des objets, de part et d'autre de la température de transition, sera investigué dans le paragraphe suivant. Ici, nous nous intéressons simplement à la morphologie des objets formés à chaud et étudiés par DLS.

	50°	90°	130°
d (nm)	580	780	1700
β	0.85	0.75	0.6

FIGURE 3.20 : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits des courbes d'auto-corrélation du C14dA à 70°C (5 mM) à 50°, 90° et 130°, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement.

On constate, ici encore, FIGURE 3.20, une grande polydispersité du point de vue de l'allure des courbes d'auto-corrélation, très similaires à celles obtenues pour le diC14dA. Par ailleurs, les valeurs caractéristiques des coefficients d'étirement suffisent à montrer une large dispersion en taille des objets formés par le C14dA, à une température supérieure à 56°C. Il est important de préciser qu'ici aussi l'évolution du diamètre hydrodynamique n'est pas en accord avec la théorie. La cinétique de réapparition des fibres étant probablement similaire à celle observée pour le C14dT, on ne peut pas assurer l'absence totale de fibres, ou en tout cas d'un début de nucléation, pour les mesures effectuées à 90° et à 130°.

Enfin, en dépit des valeurs probablement erronées à 90° et 130°, on peut tout de même être en mesure de comparer les tailles caractéristiques, à 50°, des objets formés à chaud pour le C14dT et pour le C14dA. Les objets présentent une taille typique de 140 nm pour le C14dT à chaud, à comparer avec une taille typique de 440 nm pour le C14dA à chaud. Ceci semble souligner, comme dans le cas de la comparaison diC14dT/diC14dA, que les auto-assemblages des lipides dérivés de l'adénine semblent, en moyenne, de plus grande taille.

Un dernier système que l'on peut caractériser est le diC16LNA-A. Tout comme les deux systèmes précédents à base d'adénine, on remarque une très forte polydispersité sur la base des courbes d'auto-corrélation, aux trois angles de diffusion étudiés. Ces dernières peuvent donc être également considérées comme similaires à celles présentées pour le diC14dA.

	50°	90°	130°
d (nm)	440	220	160
β	0.75	0.7	0.6

FIGURE 3.21 : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits des courbes d'auto-corrélation du diC16LNA-A (1 mM) à 50°, 90° et 130°, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement.

Suite à la caractérisation par DLS du diC16LNA-A, on constate, FIGURE 3.21, qu'ici aussi, les facteurs d'étirement utilisés sont relativement faibles. Pourtant, du point de vue des diamètres hydrodynamiques extraits des différents ajustements, les objets formés ont l'air de présenter une taille caractéristique comparable à la majeure partie des dérivés de la thymine. On insistera sur le fait que la polydispersité semble vraiment marquée, quelque soit le système, pourvu que celui-ci arbore un motif adénine. Les arguments à avancer pour démontrer ce point sont les allures respectives des ajustements, qui parviennent tant bien que mal à ajuster les courbes expérimentales aux temps relativement courts, ainsi que les valeurs nécessairement faibles des coefficients d'étirement pour permettre un ajustement acceptable.

La comparaison entre le diC16LNA-T et le diC16LNA-A doit se faire, comme pour les systèmes développés précédemment, en considérant seulement les plus petits objets de la population pour le diC16LNA-A. Les auto-assemblages observés sont, ici aussi, plus gros que

ceux du dérivé LNA-T. Cependant, la variation n'est pas aussi brutale que pour les systèmes diC14dA et C14dA à chaud. En effet, le diamètre hydrodynamique moyen passe de 180 nm à seulement 220 nm. Si l'on compare les tailles caractéristiques des plus gros objets de la population, davantage marqués aux petits angles de diffusion, on constate que le diamètre moyen des objets contribuant à la diffusion à 50° tourne autour de 440 nm pour le diC16LNA-A contre 310 nm pour le diC16LNA-T. Cet effet est encore plus marqué si l'on se rappelle que l'ajustement de la fonction d'auto-corrélation du diC16LNA-A à 50°C ne prend pas en compte l'ensemble de la population, mais laisse de côté les objets les plus gros. Il faut donc s'attendre à une contribution réelle bien plus grande des gros objets à un angle de 50°C.

Pour les trois systèmes, diC14dA, C14dA à chaud et diC16LNA-A, dont la morphologie a été explicitée ci-dessus, il reste difficile d'amener des éléments de réponse suffisants pour justifier l'évolution entre les analogues T et A, sur la base seule de la taille des têtes polaires respectives. En effet, comme il le sera montré dans le CH.4, un facteur essentiel pour la compréhension des propriétés physiques des auto-assemblages formés spontanément sont les interactions faibles existant entre les différentes têtes polaires au sein de l'objet. Ainsi, la substitution d'une base azotée par sa forme complémentaire modifie, certes, les caractéristiques physiques de l'amphiphile, comme par exemple la taille de sa tête polaire, mais également ses propriétés physico-chimiques, en jouant sur les interactions intermoléculaires qu'il peut mettre en place.

3.1.5.b) Structure.

Après avoir exposé les propriétés morphologiques des lipides dérivés de l'adénine, ainsi que leur comparaison avec les analogues dérivés de la thymine, nous allons suivre le même type de raisonnement concernant la caractérisation des propriétés structurales.



δ _Η (Å)	δ _τ (Å)	d _m =2.(δ _H +δ _T) (Å)	Δρτ/Δρι	q* (Å⁻¹)
13.6	10.6	48.4	-0.42511	0.077

FIGURE 3.22 : Diffractogramme 1 : Ajustement par le modèle de Nallet du diffractogramme SAXS du diC14dA concentré à 30 mM (Nanostar, d=650 mm, t_{acq} =12h). Diffractogramme 2 : Superposition des diffractogrammes WAXS du diC14dA concentré à 30 mM (points gris) et de l'HEPES (points bleus) (Anode tournante, d=155 mm, t_{acq} =4h). Tableau : Paramètres d'ajustement.

Le système diC14dA présente un facteur de forme bien défini sur son diffractogramme SAXS, FIGURE 3.22. Ce dernier peut, tout comme l'analogue diC14dT, être ajusté à l'aide du modèle de Nallet n'incluant que le facteur de forme. Il s'agit donc, ici aussi, d'objets de type vésicules unilamellaires. De plus, le diffractogramme WAXS précise que, aux grands angles, le diC14dA est similaire à son analogue dT, puisque la bicouche formée reste fluide, comme le met en évidence la bosse large observée, comme pour le diC14dT, vers 1.45 Å.

Un point facilement identifiable est que l'épaisseur hydrophobe de la bicouche reste inchangée entre les deux systèmes. Ceci peut être expliqué par le fait que les deux analogues forment des vésicules unilamellaires à partir d'une bicouche fluide. De plus, il est possible de justifier le passage d'une valeur de δ_H de 11.4 Å pour le diC14dT à 13.6 Å pour le diC14dA, par le fait que le groupement adénine soit plus volumineux que le groupement thymine.



FIGURE 3.23 : Diffractogramme 1 : Diffractogramme MAXS du culot formé par les fibres de C14dA (Nanostar, d=100 mm, $t_{acq}=8h$). Les flèches noires indiquent les 3 ordres d'une famille de pics de Bragg périodiques. Diffractogramme 2 : Diffractogramme WAXS du culot formé par les fibres de C14dA (Anode tournante, d=155 mm, $t_{acq}=4h$).

En ce qui concerne le dérivé adénine des monocaténaires, les fibres de C14dA obtenues présentent une structure légèrement différente de celle des fibres de C14dT. En effet, le seul point remarquable dans le diffractogramme SAXS, FIGURE 3.23, est la présence de 3 ordres caractéristiques d'un empilement périodique. En revanche, contrairement au C14dT dont les fibres étaient construites sur la base d'une maille orthorhombique, aucune

signature facile à indexer n'est visible en diffraction X, même si quelques autres pics de Bragg sont observés. De plus, le diffractogramme WAXS nous permet de confirmer l'état gel des chaînes, et donc de supposer la présence d'une organisation quasi-cristalline également pour les fibres C14dA. Nous nous sommes alors référés au même article que celui décrivant les propriétés structurales du C16dT ⁴². En effet, celui-ci évoque également le cas de l'analogue C16dA. Les auteurs précisent que la maille selon laquelle s'organisent les lipides au sein des auto-assemblages est de type triclinique. La maille triclinique étant une maille totalement quelconque, présentant trois paramètres de maille distincts (a≠b≠c), comme dans le cas d'une maille orthorhombique, mais également trois angles quelconques ($\alpha \neq \beta \neq \gamma$) eux aussi, il n'existe aucun diffractogramme typique pour ce type de réseau cristallin. Cet argument, ainsi que le rapport signal/bruit beaucoup plus médiocre que celui du diffractogramme obtenu pour les fibres de C14dT, permet d'expliquer pourquoi aucune indexation n'a pu être réalisée dans ce cas.

Par ailleurs, le caractère thermotrope, déjà présenté dans le paragraphe précédent traitant de la morphologie de ce système, nous pousse à réaliser une étude structurale plus approfondie sur les objets supramoléculaires formés à chaud pour le C14dA.



FIGURE 3.24 : Diffractogramme 1 : Ajustement par le modèle de Nallet du diffractogramme SAXS du C14dA à 70°C à 5 mM (Nanostar, d=650 mm, t_{acq} =12h). Diffractogramme 2 : Diffractogramme WAXS du C14dA à 5 mM (Anode tournante, d=155 mm, t_{acq} =4h). Tableau : Paramètres d'ajustement.

Le facteur de forme présent dans le diffractogramme SAXS, FIGURE 3.24, pouvant être ajusté à l'aide du modèle de Nallet, il s'agit, ici aussi, d'une transition en température de type fibres / vésicules unilamellaires. Par ailleurs, l'analyse aux grands angles permet également de souligner le caractère fluide de la bicouche formée au sein des objets du C14dA. De ce point de vue, et hormis la structure des fibres, les deux systèmes monocaténaires paraissent donc relativement similaires. Il s'agit maintenant d'appliquer le même type de considérations quant à la variation observée entre les paramètres structuraux des vésicules de C14dT à chaud et ceux des vésicules de C14dA à chaud. On retrouve le fait que l'épaisseur δ_H soit plus élevée dans le cas du dérivé de l'adénine que dans le cas de l'analogue en thymine, puisque l'on passe de 9.8 Å à 11.6 Å. Ceci peut être expliqué en avançant le même type de raisonnement que pour les comparaisons précédentes, à savoir le fait que le groupement adénine est plus volumineux que le groupement thymine, ce qui justifie cette augmentation typique de 2 Å dans le cas C14dT/C14dA, tout comme dans le cas diC14dT/diC14dA.

Il a été montré précédemment que le diC16LNA-A présentait, tout comme les autres dérivés de l'adénine, des objets supramoléculaires de taille caractéristique relativement différente du diC16LNA-T. Il peut être intéressant, tout comme pour les systèmes précédents, de comparer les propriétés structurales des auto-assemblages formés par ces deux analogues.



FIGURE 3.25 : Diffractogramme 1 : Ajustement par le modèle de Nallet du diffractogramme SAXS du diC16LNA-A concentré à 28 mM (Nanostar, d=650 mm, t_{acq} =12h). Diffractogramme 2 : Superposition des diffractogrammes WAXS du diC16LNA-A concentré à 28 mM (points gris) et de l'HEPES (points bleus) (Anode tournante, d=155 mm, t_{acq} =4h). Tableau : Paramètres d'ajustement.

La forme caractéristique du diffractogramme SAXS obtenu pour le diC16LNA-A, FIGURE 3.25, nous apprend qu'il s'agit bien, ici aussi, d'un facteur de forme seul. Celui-ci peut, d'ailleurs, être ajusté de manière satisfaisante par le modèle de Nallet. On remarque qu'ici la bosse classique observée pour le facteur de forme s'accompagne d'une deuxième bosse, de plus faible amplitude. Cette dernière est inhérente à l'expression du facteur de forme, et même si celle-ci ne s'observe que rarement sur les diffractogrammes aux moyens angles, faute d'une résolution suffisante, elle a tout de même un sens physique et est prise en compte par le modèle d'ajustement. Le diffractogramme WAXS nous apprend, en raison notamment des multiples pics observés, que la bicouche du diC16LNA-A présente un ordre bidimensionnel dans la bicouche différent de celui observé pour les vésicules de diC16LNA-T. Sans pour autant proposer une symétrie particulière, nous pouvons assurer que la bicouche du diC16LNA-A est cristallisée alors que celle du diC16LNA-T était sous forme gel.

Comme dans les cas précédents, on peut noter la forte augmentation du paramètre δ_H lorsque l'on passe de 12.5 Å pour le diC16LNA-T à 16.6 Å pour le diC16LNA-A. Cette variation peut à nouveau être justifiée par la taille du groupement adénine.

3.1.6. Bilan intermédiaire.

De manière générale, il est relativement aisé de comparer les propriétés morphologiques et structurales des systèmes dits « seuls », c'est-à-dire constitués uniquement des auto-assemblages d'un lipide nucléotide donné. Il a été montré qu'une modification du nombre de chaînes entraînait une forte variation de la morphologie de l'assemblage en accord avec la théorie d'Israelachvili. Par ailleurs, une variation de la longueur des chaînes entraîne une modification de l'état des parties hydrophobes de la bicouche à température ambiante, en jouant sur la température de transition gel/fluide, déjà bien décrite dans la littérature. Nous avons également mis en évidence l'effet que pouvait avoir une contrainte sur la liberté de rotation de la tête polaire quant au changement de taille des auto-assemblages, lié à une variation de l'aire occupée par tête polaire sur le plan de la bicouche, qui induit la formation d'objets de plus grande taille. Enfin, la nature de la tête polaire de l'amphiphile a également été étudiée. La seule tendance observée de manière systématique entre les dérivés A et les dérivés T consiste en une augmentation de l'épaisseur δ_H de la tête polaire. Cette observation reste logique dans la mesure où le motif adénine est plus volumineux que le motif thymine. Cependant, la comparaison entre les propriétés d'auto-assemblage des analogues A et T basée uniquement sur des considérations purement géométriques reste relativement sommaire. Pour comprendre de manière plus approfondie les mécanismes à la base du phénomène d'auto-assemblage des lipides nucléotides, il est nécessaire d'inclure la notion d'interactions faibles comme il le sera alors développé dans le CH.4. Les amphiphiles ne seront plus simplement considérés comme des simples briques de base, dont les propriétés géométriques permettent de justifier leurs propriétés d'auto-assemblages, mais comme des espèces chimiques aux propriétés physico-chimiques originales et capable d'engager des interactions faibles, éventuellement spécifiques et pouvant expliquer les propriétés morphologiques et structurales des objets supramoléculaires déjà caractérisés par ailleurs.

3.2 Complexes auto-assemblages/acide nucléique.

Dans la partie qui suit, nous introduisons un acide nucléique dans le système afin d'étudier différentes interactions avec les objets supramoléculaires. Pour chacun des lipides nucléiques reportés dans la partie précédente, nous avons choisi d'étudier l'ajout de l'acide nucléique complémentaire ou non. Afin de pouvoir corréler l'ensemble des résultats obtenus par les différentes techniques, l'étude sera systématiquement réalisée sur l'échantillon obtenu à la fin de l'expérience de calorimétrie réalisée par ITC (Isothermal Titration Calorimetry, ITC). L'ajout de l'acide nucléique se fait grâce à la technique de calorimétrie par titration isotherme, dont le protocole et l'utilité seront détaillés au cours du CH.5. Dans cette partie, on comparera, selon le même type de raisonnement que celui employé dans la partie précédente, la morphologie et la structure de différents couples de complexes choisis, afin de faire ressortir l'effet de différents paramètres sur les propriétés physiques des assemblages.

3.2.1. Complexes diC14dT/polyA et diC14dA/polyU.

3.2.1.a) Morphologie.

Tout comme pour les résultats exposés précédemment, nous commençons par détailler deux systèmes de référence similaires, l'un concernant un dérivé de la thymine et l'autre concernant l'analogue de l'adénine. Il s'agit des complexes issus des bicaténaires en C14 et de l'acide nucléique complémentaire. Présentons, tout d'abord, FIGURE 3.26, les résultats de DLS relatifs à la morphologie de ces agrégats.

	50°	90°	130°
d (nm)	3200	700	420
β	0.6	0.65	0.7

	50°	90°	130°
d (nm)	2200	2200	2200
β	0.77	0.63	0.53

FIGURE 3.26 : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits des courbes d'auto-corrélation du complexe diC14dT/polyA (Tableau 1) et du complexe diC14dA/polyU (Tableau 2) à 50°, 90° et 130°, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement.

Concernant le complexe formé par le diC14dT avec le brin d'acide nucléique complémentaire (polyA), on constate, FIGURE 3.26, que la taille des objets est typiquement multipliée par 25 lorsque l'on passe du système « seul » au système « avec acide nucléique ». Ce constat se fait, cependant, sur les diamètres hydrodynamiques tirés des ajustements à 90° et 130°. Pour les tailles moyennes extraites à 50°, on constate que la population comprend également des objets encore plus gros, une fois l'acide nucléique ajouté. De plus, bien que les courbes d'auto-corrélation doivent être, ici, systématiquement ajustées à l'aide d'une exponentielle étirée alors que celles-ci ont été, en général, ajustées à l'aide d'un modèle à monoexponentielle simple pour le système « seul », les coefficients d'étirement sont très faibles puisqu'ils se trouvent, ici, autour de 0.65. Ces résultats

permettent d'aller dans le sens d'une augmentation nette de la polydispersité des complexes par rapport au système « seul » et bien entendu d'une forte augmentation du diamètre moyen des complexes par rapport aux systèmes seuls, mettant en évidence une modification du système liée à l'interaction entre les deux partenaires.

Concernant le complexe formé par le diC14dA avec le brin d'acide nucléique complémentaire, on note un point remarquable : l'ensemble des diamètres hydrodynamiques tirés des ajustements aux trois angles de diffusion ont la même valeur, typiquement 12 fois plus grande que les tailles caractéristiques du système « seul » à 90° et 130°. Les valeurs utilisées pour le coefficient d'étirement sont, en moyenne, tout aussi faibles que pour le complexe diC14dT/polyA. Il faut donc conclure ici sur la formation d'objets supramoléculaires de grande taille, probablement en raison de l'apparition d'interactions faibles avec le partenaire.

3.2.1.b) Structure.

Les résultats sur la morphologie des complexes ne tenant compte que d'une augmentation de la taille globale des objets diffusant, il peut maintenant être intéressant de quantifier l'effet d'un ajout d'acide nucléique sur les propriétés structurales de l'objet récepteur, pour les deux mêmes systèmes de référence. Pour les analyses par diffusion X, le même protocole de concentration que celui décrit dans la partie précédente a été réalisé, dans les mêmes conditions que pour le système « seul » analogue, afin de rendre le rapport signal/bruit du diffractogramme obtenu optimal. Afin de s'assurer que ce protocole de concentration n'allait pas modifier la structure du système étudié par diffraction X, nous avons pris soin de rediluer l'échantillon afin de vérifier, par DLS, que les résultats étaient identiques avant et après le protocole de concentration.

De manière générale, l'interaction entre l'auto-assemblage et l'acide nucléique impose que le facteur de forme généré sur le diffractogramme caractérisera une bicouche dite « asymétrique ». Comme expliqué dans le CH.2, une conséquence sera l'augmentation de l'intensité diffusée au niveau du « creux » du facteur de forme. De manière qualitative, plus le décalage entre l'intensité lue au niveau de ce minimum local et la ligne de base est grand, plus la bicouche sera considérée asymétrique. De manière quantitative, les interprétations porteront sur l'écart entre la valeur du δ_H asymétrique (noté δ_{Ha}) et la valeur du δ_H symétrique. De la même manière, le modèle de Nallet pour bicouche asymétrique comporte, en plus du rapport de contrastes électroniques habituel, décrivant la partie externe de la bicouche, un rapport de contrastes électroniques visant à quantifier l'asymétrie de la bicouche en comparant les contrastes de la tête polaire liée à l'acide nucléique et à l'origine de l'asymétrie et celle de la tête polaire libre et décrite habituellement.



FIGURE 3.27 : Ajustements par le modèle de Nallet (adapté pour une bicouche asymétrique) du diffractogramme SAXS du diC14dT/polyA concentré (Diffractogramme 1) et du diC14dA/polyU concentré (Diffractogramme 3) (Nanostar, d=650 mm, t_{acq} =12h). Diffractogrammes WAXS du diC14dT/polyA concentré (Diffractogramme 2) et du diC14dA/polyU concentré (Diffractogramme 4) (Anode tournante, d=155 mm, t_{acq} =4h). Paramètres d'ajustement pour le diC14dT/polyA (Tableau 1) et pour le diC14dA/polyU (Tableau 2).

L'analyse du complexe diC14dT/polyA montre l'existence d'une bicouche asymétrique dans le système. Les valeurs extraites de l'ajustement, FIGURE 3.27, mettent en évidence une assymétrie ($\delta_{Ha} - \delta_{H}$) égale à +5.2 Å. Cette augmentation indique que l'épaisseur de la tête appartenant à la surface externe de la bicouche, d'après le modèle de Nallet adapté aux bicouches asymétriques, est augmentée par rapport au système seul. De plus, même si les vésicules de diC14dT restent unilamellaires suite à un ajout de polyA, l'acide nucléique induit une transition fluide/gel, à en juger par le diffractogramme WAXS, et la diminution du paramètre δ_T . En corrélant ces résultats à la discussion précédente sur la morphologie du complexe, on peut probablement affirmer la présence d'une interaction entre le diC14dT et le polyA *via* le feuillet externe de la bicouche de la vésicule. Les vésicules unilamellaires du diC14dT sont donc décorées par le polyA sur leur surface externe.

Pour ce qui est du complexe diC14dA/polyU, on remarque tout de suite la présence supplémentaire d'un facteur de structure sur le diffractogramme obtenu en SAXS. Celui-ci indique que le polyU est à l'origine d'une transition vésicules unilamellaires du diC14dA vers une structure organisée en vésicules multilamellaires de périodicité 62 Å pour le complexe. De plus, le diffractogramme WAXS montre que le polyU associé au diC14dA provoque un changement de conformation des chaînes aliphatiques qui sont à l'état cristallisé au sein du complexe, comme l'atteste également la très forte diminution du paramètre δ_T . De façon plus surprenante, les paramètres issus de l'ajustement montrent une très forte asymétrie de la bicouche (δ_{Ha} - δ_{H}) égale à -11.9 Å. Contrairement au système précédent, la valeur négative observée dans ce cas nous indique que l'augmentation de l'épaisseur de la bicouche se trouve sur la partie interne de la bicouche externe alors que la partie externe est très faiblement modifiée. Ce résultat nous amène à proposer un mécanisme de formation par complexation des acides nucléiques entre les bicouches pour former une vésicule multilamellaire confinée (d = 62 Å) et « saturée » par du polyU à l'intérieur du complexe. Cette réorganisation du système est sans doute liée à une forte interaction entre le diC14dA et le poly U conduisant à une transition vers un système multilamellaire. Le grand nombre de couches suggéré par le résultat de l'ajustement (N=21) peut être corrélé au résultat de DLS qui indique des complexes de très grand diamètre.

3.2.2. Effet de la spécificité de l'acide nucléique : complexes diC14dT/polyU et diC14dA/polyA.

3.2.2.a) Morphologie.

De la même manière que les complexes formés à partir d'entités complémentaires ont été étudiés, regardons, FIGURE 3.28, en DLS, ce qu'il en est de la morphologie des deux auto-assemblages de référence auxquels ont été ajoutés un acide nucléique de même base azotée. Ceci va nous permettre de mettre en évidence l'effet de la spécificité de l'acide nucléique sur les propriétés des complexes formés, par rapport aux résultats de la souspartie précédente.

	50°	90°	130°
d (nm)	500	230	150
β	0.75	0.7	0.75

	50°	90°	130°
d (nm)	6800	3000	4500
β	0.5	0.43	0.33

FIGURE 3.28 : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits des courbes d'auto-corrélation du complexe diC14dT/polyU (Tableau 1) et du complexe diC14dA/polyA (Tableau 2) à 50°, 90° et 130°, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement.

Concernant le complexe diC14dT/polyU, l'augmentation de la taille caractéristique par rapport aux systèmes « seuls » laisse attendre à la formation d'une interaction entre le diC14dT et le polyU.

Concernant le complexe diC14dA/polyA, le cas est assez différent. Tout d'abord, on remarque, FIGURE 3.28, la présence d'objets extrêmement gros, de l'ordre du micromètre. De plus, l'évolution du diamètre hydrodynamique extrait des ajustements en fonction de l'angle de diffusion n'a pas de sens physique. Ceci peut probablement s'expliquer par le fait que le système diffusant soit constitué d'objets beaucoup trop gros pour qu'ils puissent correspondre convenablement aux hypothèses prérequises du modèle d'ajustement, à savoir des objets diffusant indépendants les uns des autres et assimilés à des sphères. Cependant, les tailles présentes dans le tableau nous renseignent sur l'ordre de grandeur des complexes, typiquement 20 fois plus gros que les auto-assemblages du système « seul ». De plus, comme on pouvait s'y attendre, la polydispersité a augmenté par rapport au diC14dA. Tout comme pour le complexe diC14dT/polyU, les résultats de DLS semblent donc montrer la présence d'une interaction aboutissant à la formation de très gros objets, dont l'inadéquation du modèle d'ajustement rend impossible la détermination précise du diamètre hydrodynamique.

3.2.2.b) Structure.

Comme dans les sous-parties précédentes, on étudie maintenant les propriétés structurales des complexes. Ceci nous permettra de comparer les deux types de complexes, formés par les bicaténaires en C14, avec l'acide nucléique respectivement complémentaire et de même base azotée, afin de pouvoir conclure sur la spécificité de l'interaction.



FIGURE 3.29 : Ajustements par le modèle de Nallet (adapté pour une bicouche asymétrique) du diffractogramme SAXS du diC14dT/polyU concentré (Diffractogramme 1en haut à gauche) et du diC14dA/polyA concentré (Diffractogramme 3 en bas à gauche) (Nanostar, d=650 mm, $t_{acq}=12h$). Diffractogrammes WAXS du diC14dT/polyU concentré (Diffractogramme 2en haut à droite) et du diC14dA/polyA concentré (Diffractogramme 4 en bas à droite) (Anode tournante, d=155 mm, $t_{acq}=4h$). Paramètres d'ajustement pour le diC14dT/polyU (Tableau 1) et pour le diC14dA/polyA (Tableau 2).

Sur le diffractogramme SAXS du complexe diC14dT/polyU, FIGURE 3.29, on observe, comme pour le diC14dT seul, un facteur de forme unique. Pour le complexe, le facteur de forme doit être ajusté à l'aide du modèle de Nallet pour une bicouche asymétrique, mettant ainsi en évidence une interaction entre le diC14dT et le polyU. L'asymétrie ($\delta_{Ha} - \delta_{H}$) est égale à 6.4 Å soit du même ordre de grandeur que celle observée pour le complexe complémentaire diC14dT/polyA. Le mécanisme de formation semble être identique avec le polyU fixé sur la partie externe de la vésicule. Par ailleurs, le diffractogramme WAXS

présente un pic caractéristique d'une bicouche fluide, tout comme celui des vésicules unilamellaires en présence avant l'addition de polyU. Contrairement à l'interaction entre le diC14dT/polyA qui induisait un changement de l'organisation de la bicouche (fluide/gel), l'interaction diC14dT/polyU ne modifie pas l'organisation bidimensionnelle de la bicouche.

En diffusion X, on constate, FIGURE 3.29, que les vésicules unilamellaires de diC14dA gagnent un facteur de structure lorsqu'on y ajoute l'acide nucléique non complémentaire, le polyA. En ajustant par le modèle de Nallet, on apprend que l'organisation lamellaire est très confinée, puisque la périodicité est de l'ordre de 56 Å pour une bicouche d'épaisseur totale égale à 51.7 Å. Comme pour le système diC14dA/polyU, l'asymétrie ($\delta_{Ha} - \delta_H$) présente une valeur négative et égale à -7.9 Å. Elle apparait toutefois moins forte que dans le cas du système complémentaire. L'analyse du diffractogramme aux grands angles ne permet pas de conclure de façon définitive. Si l'allure du diffractogramme est majoritairement de type fluide, il est à noté des pics de faibles intensités qui pourraient être la preuve d'une transition de l'ordre de la bicouche. L'ensemble de ces résultats nous permet tout de même d'assurer que l'interaction diC14dA/polyU. La valeur négative de l'asymétrie nous permet de type roposer le même mécanisme de formation des complexes par « encapsulation » de l'acide nucléique.

On réunit maintenant l'ensemble des preuves expérimentales afin de dresser un bilan de la spécificité des auto-assemblages pour les acides nucléiques. Sur les critères de morphologie et de structure, une interaction est observée dans tous les cas, et ce, quelque soit le lipide nucléotide considéré. De plus, les complexes formés semblent de plus grande taille avec l'acide nucléique complémentaire, d'après les études par diffusion dynamique de la lumière, et l'interaction semble également plus forte dans ce cas, par comparaison de l'asymétrie des bicouches obtenue par l'ajustement des diffractogramme de diffusion X. On peut également confirmer que l'interaction vésicule/acide nucléique n'est pas symétrique, comme peuvent l'attester les valeurs différentes de l'épaisseur hydrophile asymétrique relatives aux systèmes A-U et T-A. De plus, on vérifie systématiquement la présence d'une transition fluide/gel dans le cas où l'on forme les complexes complémentaires. Ce confinement plus important peut également se retrouver à travers une tendance générale concernant le paramètre δ_{T} . En effet, lorsqu'on réalise l'interaction avec l'acide nucléique complémentaire, la valeur obtenue pour l'épaisseur hydrophobe diminue par rapport à la vésicule du système « seul » lorsque l'interaction est réalisée avec le polynucléotide complémentaire. Enfin, il est important d'insister sur les fortes modifications structurales en jeu lorsque l'adénine est présente dans le système « seul ». En effet, quelque soit la nature du partenaire utilisé, on observe systématiquement une transition unilamellaire/multilamellaire dans la formation des complexes A-U et A-A. Le mécanisme de formation des complexes semble donc être différent si l'adénine se trouve ou pas sur l'assemblage supramoléculaire. Dans ce cas, les vésicules multilamellaires peuvent se former par complexation d'un empilement lamellaire bicouche, acide nucléique, eau. Dans le cas des assemblages portant la thymine, le complexe se forme par « simple » adhésion de l'acide nucléique sur la monocouche externe de la vésicule, n'engendrant pas de transition de phase. La stabilisation du système lamellaire pouvant être induite par des interactions attractives plus importantes entre les bicouches de lipides nucléotides de type dA décorées par des acides nucléiques. Pour étudier de façon plus rigoureuse l'équilibre entre les forces attractives et répulsives entre les bicouches, il serait donc souhaitable d'étudier directement la phase lamellaire afin de remonter à l'équation d'état du système.

3.2.3. Effets du caractère multilamellaire et de l'état gel de la bicouche : complexe diC16dT/polyA, complexe diC16dT/poly U.

3.2.3.a) Morphologie.

Après avoir évalué l'effet de la spécificité de l'acide nucléique sur l'interaction mise en place avec les auto-assemblages, nous nous intéressons désormais à l'effet que pourrait présenter la longueur des chaînes d'un bicaténaire sur l'interaction mise en évidence entre les deux espèces. L'interaction sera toujours identifiée à l'aide de la comparaison des propriétés morphologiques et structurales des complexes avec le système dit « seul ».

	50°	90°	130°
d (nm)	1500	1300	1300
β	0.7	0.8	0.7

	50°	90°	130°
d (nm)	6200	900	1600
β	0.9	0.75	0.8

FIGURE 3.30 : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits des courbes d'auto-corrélation du complexe diC16dT/polyA (Tableau 1) et du complexe diC16dA/polyU (Tableau 2) à 50°, 90° et 130°, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement.

Pour le complexe diC16dT/polyA, on note, FIGURE 3.30, des diamètres hydrodynamiques relativement importants, de l'ordre du micromètre, et similaires quelque soit l'angle de diffusion. Les coefficients d'étirement utilisés valent tous environ 0.75, même si la polydispersité semble large en raison des tailles caractéristiques plutôt importantes en comparaison des autres complexes. De plus, en comparant avec le diC16dT seul, on constate que les objets sont typiquement 5 fois plus gros, ce qui laisse imaginer une interaction entre les deux espèces. Ceci dit, on peut, dès lors, remarquer que le rapport entre les diamètres caractéristiques des complexes et des vésicules associées seules est relativement faible par rapport aux autres systèmes.

Concernant le deuxième complexe diC16dT/polyU, on remarque, FIGURE 3.30, ici aussi, une forte évolution des diamètres hydrodynamiques en fonction de l'angle de diffusion. En raison de la taille extrêmement grande de certains objets, que l'on peut mettre en évidence à 50°, le problème de l'adéquation du modèle d'ajustement se pose également, tout comme dans le cas du diC14dA/polyA. Ceci implique que, devant la taille très importante de certains objets, les tailles caractéristiques des objets présentant la plus grande contribution de diffusion à 90° et 130° paraissent similaires. En dépit d'une polydispersité apparemment grande, les valeurs utilisées pour le coefficient d'étirement restent raisonnables. On compare ensuite les tailles caractéristiques du diC16dT seul et du complexe à 90° et 130° uniquement, afin d'éliminer les plus gros objets de la population pour lesquels la validité du modèle d'ajustement est remise en cause. On constate alors que les complexes de diC16dT/polyU présentent un diamètre hydrodynamique 5 fois plus grand que celui du diC16dT seul, tout comme pour le complexe diC16dT/polyA, ce qui, de la même manière, laisse attendre une interaction entre les deux espèces. On rappelle que ces considérations sont basées sur des ordres de grandeur et n'ont donc pas vocation à constituer un argument purement quantitatif.

Les deux complexes du diC16dT semblent relativement peu différents en termes de morphologie. En effet, les tailles sont centrées autour du micromètre mais présentent une dispersion très importante menant à la présence d'objets de plusieurs microns. Par ailleurs, les coefficients d'étirement utilisés ne sont pas vraiment faibles par rapport à d'autres systèmes développés auparavant, ce qui indique une relative adéquation du modèle d'ajustement utilisé dans une gamme relative de tailles caractéristiques.

D'un point de vue morphologique, l'interaction entre des vésicules formées par un même analogue de la thymine et un acide nucléique donné semble dépendre du type de vésicules utilisé. Dans le cas du diC14dT, la taille très faible des vésicules et l'état fluide des chaînes conférait des propriétés morphologiques particulières aux complexes, typiquement une taille et une polydispersité modérées. Dans le cas du diC16dT, les vésicules présentes dans le système « seul » sont déjà beaucoup plus grandes et la bicouche est sous forme gel. On constate qu'en effet, une fois les complexes formés avec un acide nucléique, les tailles moyennes sont également plus grandes. De plus, la polydispersité semble augmenter également puisque l'on forme spontanément des objets dépassant le micromètre dans les deux complexes du diC16dT.

3.2.3.b) Structure.

Etudions maintenant la structure des deux types de complexes formés à partir du diC16dT.



δ _H (Å)	δ _{Ha} (Å)	δ _τ (Å)	d _m (Å)	Δρτ/Δρι	$\Delta ho_{ m H a} / \Delta ho_{ m H}$
18.7	11.1	6.2	42.2	-1.3	3.6
d (Å)	η	δq (Å ⁻¹)	N		
201	0.82	0.00463	2		



δ _н (A)	δ _{на} (А)	δ _τ (A)	d _m (A)	Δρτ/Δρι	Δho н а/ Δho н
10.7		9.9	41.2	-0.16	
d (Å)	η	δq (Å ⁻¹)	N		
196	0.21	0.00755	10		

FIGURE 3.31 : Ajustements par le modèle de Nallet (adapté pour une bicouche asymétrique) du diffractogramme SAXS du diC16dT/polyA concentré (Diffractogramme 1) et du diC16dT/polyU concentré (Diffractogramme 3) (Nanostar, d=650 mm, t_{acq} =12h). Diffractogrammes WAXS du diC16dT/polyA concentré (Diffractogramme 2) et du diC16dT/polyU concentré (Diffractogramme 4) (Anode tournante, d=155 mm, t_{acq} =4h). Paramètres d'ajustement pour le diC16dT/polyA (Tableau 1) et pour le diC16dT/polyU (Tableau 2).

Le diffractogramme SAXS du diC16dT/polyA, FIGURE 3.31, laisse apparaître une rupture de pente sur la remontée aux petits angles, ainsi qu'un épaulement aux très petits angles, qu'il est possible d'ajuster avec un facteur de structure. Le modèle de Nallet prévoit une organisation de 230 Å de périodicité au sein des complexes. De par la qualité de

l'ajustement, on peut affirmer que les complexes supramoléculaires formés sont multilamellaires et asymétriques. Comme dans le cas du diC14dT, l'asymétrie reste modérée et ($\delta_{Ha} - \delta_{H}$) égale à 7.6 Å. Enfin, une information importante est que la bicouche reste sous forme gel, d'après le diffractogramme WAXS. L'interaction et la formation du complexe n'induit pas de changement d'organisation de la bicouche.

Quant au deuxième complexe diC16dT/polyU, FIGURE 3.31, le diffractogramme SAXS présente également un signal qui peut être ajusté à l'aide du modèle de Nallet incluant un facteur de forme et un facteur de structure. La spécificité, ici, est qu'il s'agit du seul système qui ne nécessite pas le modèle d'ajustement adapté aux bicouches asymétriques. La périodicité issue de l'ajustement vaut 196 Å et est donc comparable à celle obtenue pour le complexe précédent. De plus, lorsque l'on considère les paramètres issus de l'ajustement, on constate qu'ils sont extrêmement proches de ceux des vésicules diC16dT seules, même si on peut remarquer l'effet systématique d'une diminution du paramètre δ_T à l'issue de l'addition du polynucléotide. Le nombre de couche (N = 10) reste équivalent à celui du système seul. Enfin, il est important de préciser qu'ici aussi, la bicouche conserve son état gel. L'ensemble de ces résultats tendent à conclure qu'il n'y a pas d'interaction entre le diC16dT et le polyU.

En résumé, les deux complexes du diC16dT sont très proches, en termes de structure, du système diC16dT « seul ». L'asymétrie du complexe diC16dT/polyA est faible lorsque l'on regarde le diffractogramme et l'écart entre les paramètres δ_H et δ_{Ha} . Aucune asymétrie n'est observée pour le complexe diC16dT/polyU.

La seule preuve potentielle d'une interaction entre les deux espèces serait la légère diminution du paramètre δ_T entre le système « seul » et le complexe, que l'on associe hypothétiquement à la signature d'une adhésion vésicule/acide nucléique. Pourtant, du point de vue de la morphologie, on constate une augmentation, certes faible par rapport aux autres systèmes mais néanmoins d'un facteur 5, de la taille des objets en présence, par rapport au système « seul ». Concernant ce dernier point, ici aussi les deux types de complexes ne diffèrent pas en termes de diamètres caractéristiques. A la lumière de l'ensemble de ces éléments, on peut affirmer qu'il n'existe qu'une très faible interaction impliquant le diC16dT, que ce soit avec son acide nucléique complémentaire ou bien avec son acide nucléigue de même base azotée. En conséguence, par comparaison directe de ces résultats avec les premiers résultats obtenus pour les complexes formés par le diC14dT, on constate un effet frappant de la longueur des chaînes. On associe cette variation à l'état fluide ou gel de la bicouche, dont la conformation fluide permet de former une interaction intermoléculaire avec un partenaire, tout en maintenant la spécificité, tandis que la conformation gel empêche la mise en place d'une interaction forte, et masque donc tout effet de spécificité avec un partenaire.

3.2.4. Effet de la contrainte de la tête polaire et de l'état gel de la bicouche : complexes diC16LNA-T/polyA, diC16LNA-T/polyU, diC16LNA-A/polyU et diC16LNA-A/polyA.

3.2.4.a) Morphologie.

Le dernier facteur dont on souhaite montrer l'effet est, comme pour la partie précédente, une contrainte de la tête polaire. Il s'agit donc, dans un premier temps, de comparer les propriétés morphologiques des deux complexes du diC16LNA-T avec les deux complexes du diC16dT.

	50°	90°	130°
d (nm)	340	250	340
β	0.95	0.95	0.95

	50°	90°	130°
d (nm)	400	320	320
β	0.9	0.9	0.9

	50°	90°	130°
d (nm)	340	290	290
β	0.9	0.9	0.9

	50°	90°	130°
d (nm)	1400	160	270
β	0.9	0.9	0.9

FIGURE 3.32 : Valeurs des diamètres hydrodynamiques moyens extraits des courbes d'auto-corrélation du complexe diC16LNA-T/polyA (Tableau 1), du complexe diC16LNA-T/polyU (Tableau 2), du complexe diC16LNA-A/polyU (Tableau 3) et du complexe diC16LNA-A/polyA (Tableau 4) à 50°, 90° et 130°, et des coefficients d'étirement utilisés pour chaque ajustement.

L'ensemble des quatre complexes formés à partir des LNA présente des caractéristiques étonnamment similaires, tout comme le diC16LNA-T et le diC16LNA-A présentaient en termes de tailles caractéristiques, FIGURE 3.32. Le diC16LNA-T/polyA et le diC16LNA-A/polyU affichent des diamètres hydrodynamiques moyens d'environ 300 nm avec une dispersion très faible en taille. Le diC16LNA-T/polyU présente un diamètre

hydrodynamique moyen de 350 nm avec la même faible dispersion suivant les angles de diffusion. Seule exception, le diC16LNA-A/polyA présente des très gros objets de l'ordre du micromètre, dont la contribution ressort davantage à 50°. Contrairement aux systèmes précédents dont nous avons mis en évidence la présence de gros agrégats micrométriques, il ne s'agit ici que d'une partie de la population, étant donné qu'à 90° et 130°, les tailles moyennes redeviennent beaucoup plus petites. De plus, l'écart important entre les diamètres hydrodynamiques déterminés à 50°, puis à 90° et 130° font qu'ici aussi, l'évolution n'est pas logique en fonction de l'angle. Du fait de la non-adéquation des plus gros objets avec le modèle d'ajustement à 50°, il est difficile de décrire une tendance globale du diamètre caractéristique avec l'angle de diffusion. On considérera donc une population centrée sur une taille d'environ 220 nm. Par ailleurs, l'ensemble des quatre systèmes présente des valeurs de coefficients d'étirement particulièrement proches de 1. Ceci semble aller de pair avec les faibles tailles caractéristiques des objets présents au sein des quatre populations. Quelque soit le type de complexe considéré, puisque les ordres de grandeurs sont tous les mêmes, on pourra considérer que les complexes font entre 1.5 et 2 fois la taille des objets du système associé « seul ».

En résumé, et afin d'estimer l'effet du blocage de la tête polaire sur la morphologie des complexes formés, il peut être intéressant de comparer les tailles caractéristiques des complexes du diC16LNA-T et du diC16dT. On constate, tout d'abord, que l'association des auto-assemblages du diC16dT avec un acide nucléique quelconque forme des objets 5 fois plus gros que ne l'étaient les vésicules seules, tandis que le rapport n'est que de 1.5 à 2 pour le système diC16dTLNA-T, alors que les tailles des deux systèmes initiaux étaient globalement comparables. On pourrait donc attacher cette tendance à la structure « LNA » et à la contrainte d'orientation de la tête polaire. De plus, si le système diC16LNA-T, tout comme le système diC16dT, forme des complexes qui ne se différencient pas fondamentalement par leurs tailles caractéristiques respectives, ce qui semble montrer le manque de spécificité des bicaténaires en C16 pour un acide nucléique partenaire, les deux systèmes varient de manière très forte lorsqu'on les compare entre eux.

3.2.4.b) Structure.

Comme dans les parties précédentes, nous allons investiguer la différence de morphologie observée entre les complexes des LNA entre eux, puis avec les complexes du diC16dT, du point de vue de la structure, à l'aide d'études en diffusion X.





δ _Η (Å)	δ _{на} (Å)	δ _τ (Å)	d _m (Å)	Δρτ/Δρι	Δho н а/ Δho н
19.9	19.6	4.5	48.5	-0.73	1.33
d (Å)	η	δq (Å ⁻¹)	N		
232	0.25	0.00342	2		

FIGURE 3.33 : Ajustements par le modèle de Nallet (adapté pour une bicouche asymétrique) du diffractogramme SAXS du diC16LNA-T/polyA concentré (Diffractogramme 1), du diC16LNA-T/polyU (Diffractogramme 3), du diC16LNA-A/polyU (Diffractogramme 5) et du diC16LNA-A/polyA concentré (Diffractogramme 7) (Nanostar, d=650 mm, t_{acq}=12h). Diffractogrammes WAXS du diC16LNA-T/polyA concentré (Diffractogramme 2), du diC16LNA-T/polyU (Diffractogramme 4), du diC16LNA-A/polyU (Diffractogramme 6) et du diC16LNA-A/polyA concentré (Diffractogramme 8) (Anode tournante, d=155 mm, t_{acq}=4h). Paramètres d'ajustement pour le diC16LNA-T/polyA (Tableau 1), pour le diC16LNA-T/polyU (Tableau 2), pour le diC16LNA-A/polyU (Tableau 3) et pour le diC16LNA-A/polyA (Tableau 4).

Si l'on procède à des interprétations générales de l'ensemble des quatre systèmes sur la base de la FIGURE 3.33, il est important de préciser que la totalité a pu être ajustée par le modèle de Nallet. On tire donc un certain nombre de paramètres caractéristiques d'une bicouche asymétrique, comme observé directement sur l'allure des diffractogrammes.

La première remarque que l'on peut faire, concernant les tendances nettes présentes chez l'ensemble des quatre complexes, est l'apparition d'un facteur de structure pour les deux complexes du diC16LNA-A, avec une organisation lamellaire de 196 Å pour le complexe diC16LNA-A/polyU et de 236 Å pour le complexe diC16LNA-A/polyA. Ni la morphologie, ni la structure des vésicules de diC16LNA-A seules n'étant fondamentalement différentes de celles du diC16LNA-T seules, on doit donc attacher cette tendance à la nature chimique de la tête polaire, comme dans le cas des diC14. L'évolution observée auparavant pour le paramètre δ_T se révèle confirmée ici aussi, ce qui permet d'affirmer que cette diminution est un effet systématique lorsque l'on ajoute un partenaire d'interaction. Cette variation est ainsi susceptible de nous renseigner sur l'efficacité de l'interaction, au même titre que la comparaison des paramètres δ_H et δ_{Ha} . La comparaison de l'asymétrie dans les différents cas montre une efficacité d'interaction plus grande pour le diC16LNA-A en comparaison de son homologue diC16LNA-T. L'interaction est d'autant plus forte qu'elle se fait dans le système complémentaire entre le diC16LNA-A et le poly U.

On note également qu'une organisation structurale de type lamellaire apparaît avec l'ajout d'un acide nucléique (polyA ou polyU) dans le cas du diC16LNA-A. L'asymétrie est égale à (δ_{Ha} - δ_{H}) = -11.7 Å dans le cas du système complémentaire et à (δ_{Ha} - δ_{H}) égale à -0.3 Å dans le cas du complexe non complémentaire. Comme dans le cas du diC14dA, nous pouvons proposer un mécanisme de formation fondé sur la formation d'un système multilamellaire avec « encapsulation » de l'acide nucléique. Afin de juger le rôle de la contrainte de la tête polaire pour les diC16LNA-T, il est intéressant d'effectuer un bilan sur les propriétés structurales des complexes du diC16LNA-T par rapport aux complexes du diC16dT. Les deux complexes du diC16dT voient un facteur de structure apparaître, contrairement aux deux complexes du diC16LNA-T. De plus, par rapport aux complexes du diC16dT où il avait été conclu qu'une très faible interaction, voire aucune interaction décelable, apparaissait, le diC16LNA-T semble présenter une affinité relativement bonne pour un acide nucléique, à plus forte raison pour son complémentaire polyA. La variation de ces propriétés entre le système diC16 et le système diC16LNA prouve que le fait de bloquer la tête polaire semble favoriser les interactions supramoléculaires spécifiques qui peuvent être formées avec un partenaire. Enfin, il est intéressant de noter que chaque complexe formé à partir d'un lipide nucléotide dérivé de l'adénine forme une structure multilamellaire après interaction avec l'acide complémentaire ou non complémentaire. Toutefois, les études structurales mettent clairement en évidence deux types de structures différentes qui semblent dépendre de la fluidité de la membrane du système supramoléculaire. En effet, dans le cas des complexes formés à partir du diC14dA, pour lequel la bicouche est dans un état fluide, un complexe très confiné est formé avec une périodicité lamellaire de l'ordre de 6 nm. Dans le cas des systèmes formés à partir du diC16LNA-A, pour lequel la bicouche est dans un état gel ou cristallisé, la structure multilamellaire présente alors une périodicité de l'ordre de 20 nm

3.3 Conclusion générale :

Le tableau FIGURE 3.34 permet de résumer les résultats obtenus sur l'étude des propriétés morphologiques et structurales des lipides nucléotides étudiés dans ce travail. Tout d'abord, nous avons montré que la nature chimique des molécules amphiphiles oriente la formation de différentes morphologies de type fibre ou vésicule en fonction du caractère mono ou bicaténaire respectivement. La longueur de la chaine influence l'organisation bidimensionnelle de la bicouche avec, comme déjà énoncé dans la littérature, des états gels pour des longues chaines et des états fluides pour des courtes chaines. A longueur de chaine équivalente, le blocage de la partie polaire permet de renforcer l'organisation dans la bicouche. La morphologie et la structure des complexes formés par l'ajout d'un acide

nucléique complémentaire ou non a également été étudié. De façon remarquable, nous avons pu mettre en évidence l'asymétrie de la bicouche lors de la formation du complexe par l'utilisation d'un modèle approprié et développé par Nallet et al. L'analyse des paramètres issus de l'ajustement nous a permis de proposer deux mécanismes de formation des complexes en fonction de la nature chimique du nucléolipide. Dans le cas des nucléolipides avec la base azotée adénine, les complexes sont systématiquement de symétrie multilamellaire avec un mécanisme de complexation permettant l'encapsulation du polynucléotide complémentaire ou non. Nous faisons l'hypothèse que la périodicité de ces complexes dépend de la compétition entre les interactions attractives et répulsives mises en jeu entre les bicouches décorées par les polynucléotides. Ces interactions sont susceptibles de stabiliser un caractère multilamellaire confiné lorsque les interactions attractives sont fortes (cas du diC14dA/polyU et diC14dA/polyA) ou un caractère multilamellaire dilué lorsque les interactions attractives entre bicouches sont plus faibles (cas du diC16LNA-A/polyU et diC16LNA-A/polyA). Afin de confirmer cette hypothèse, une étude des propriétés des bicouches dans la phase lamellaire devrait être réalisée. Dans le cas des nucléolipides avec la base azotée thymine, les interactions permettent la formation de vésicules décorées par les polynucléotides sur la monocouche externe de la bicouche. De façon générale, les interactions entre bases azotées complémentaires sont plus fortes qu'entre même bases azotées. Toutefois, il est important de noter que ces résultats indiquent clairement que les interactions ne sont pas « symétriques » dans le sens que dA/polyU sera différent de dT/polyA.

Molécule	DLS	WAXS			δΗ	δHas	δτ	Δ	Ν
diC16-LNA-A	220 nm	К	ULV		16.6		12.5		
	290 nm	К	MLV	Poly <mark>U</mark>	22.8	11.1	6.7	-11.7	3fix
	160 nm	Lβ	MLV	Poly A	19.9	19.6	4.5	-0.3	2
diC16-LNA- <mark>T</mark>	ULV	Lβ	200 nm		12.5		8.6		
	250 nm	Lβ	ULV	Poly A	14.3	15.9	6.7	1.6	
	320 nm	Lβ	ULV	Poly <mark>U</mark>	7.8	12.5	10	4.7	
diC14dA	ULV	Lα	220 nm		13.6		10.6		
	2 µm	К	MLV	Poly <mark>U</mark>	26.4	14.5	3.1	-11.9	21
	3 µm	Lα Κ?	MLV	Poly A	17.7	9.8	9.1	-7.9	10
diC14dT	30 nm	Lα	ULV		11.4		11.3		
	230 nm	La	ULV	Poly <mark>U</mark>	10.7	17.1	9.6	6.4	
	700 nm	Lβ	ULV	Poly A	13.5	18.7	8.5	5.2	
diC16dT	300 nm	Lβ	MLV		9.5		10.5		10
	1.3 μm	Lβ	MLV	Poly A	11.1	18.7	6.2	7.6	2
	900 µm	Lβ	MLV	Poly <mark>U</mark>	10.7	Х	9.9	0	10

FIGURE 3.34 : Tableau récapitulatif des morphologies, structures et paramètres structuraux issus des ajustements, mis en évidence pour chaque type de système.

Chapitre 4

Caractérisation des interactions faibles.

4.1 Interactions intermoléculaires au sein de l'objet.

La stratégie employée dans ce chapitre va être d'investiguer les interactions faibles en jeu, tout d'abord, dans les systèmes auto-assemblés dits « seuls », puis ensuite au sein des complexes supramoléculaires avec l'acide nucléique. Tout d'abord, nous allons nous intéresser à la mise en évidence d'interactions faibles, essentiellement des interactions hydrogène et du π - π stacking, par des méthodes spectroscopiques, respectivement IR et UV. L'intérêt est double. Cela permettra, d'une part, de confirmer les hypothèses émises dans le chapitre précédent sur l'origine de la morphologie et de la structure des objets, mais également de comprendre le mécanisme de formation et l'existence de différents types d'interactions faibles, suivant des paramètres relatifs à l'amphiphile (nature chimique), mais aussi suivant l'auto-assemblage dans son ensemble.

4.1.1. Auto-assemblage du diC14dT.

4.1.1.a) Interaction hydrogène.

Comme dans le chapitre précédent traitant de la morphologie et de la structure des différents auto-assemblages formés spontanément par les lipides nucléotides étudiés, nous partons ici d'un système de référence afin de présenter le protocole utilisé pour déduire la présence d'interactions faibles par des techniques spectroscopiques. Il s'agit du même système de référence que dans le CH.3, le diC14dT. Avant de l'analyser par spectroscopie IR pour en déduire la présence ou non d'une interaction hydrogène, il est nécessaire d'obtenir un spectre IR de référence qui servira de base pour l'ensemble des dérivés de la thymine. Nous présentons ci-dessous le spectre IR du nucléotide associé, la thymidine. Afin d'obtenir un rapport signal/bruit suffisant, la solution a été formulée à une concentration de 30 mM, suffisamment élevée pour l'analyse.



FIGURE 4.1 : Spectre IR de la thymidine à 30 mM

Il est possible de constater, FIGURE 4.1, la présence des deux pics attendus dans la région 1550-1800 cm⁻¹ pour la vibration d'élongation de la liaison covalente C=O, mais l'absence de tout autre pic. Ceci indique donc que la thymidine n'implique aucun de ses groupements carbonyles dans une interaction hydrogène. Etant donné que la formation d'une liaison hydrogène via un motif thymine passe nécessairement par au moins un de ses deux carbonyles, ce résultat nous confirme donc que le nucléotide seul en solution ne forme aucune liaison hydrogène intermoléculaire. De plus, les fréquences de vibration précises des deux pics relatifs à la vibration d'élongation de C=O⁽²⁾ et de C=O⁽⁴⁾, respectivement 1696 cm⁻¹ et 1665 cm⁻¹, nous seront utiles pour repérer la présence de ces deux mêmes pics dans l'ensemble des systèmes étudiés. En théorie, aucune variation forte de ces fréquences de vibration n'est attendue en raison du fait qu'elles sont caractéristiques de la liaison covalente dans l'environnement chimique particulier de la molécule. Cependant, on peut s'attendre à ce que l'environnement supramoléculaire puisse éventuellement expliquer un léger décalage de quelques cm⁻¹ dans certains cas.

Le nucléolipide de référence, le diC14dT, est maintenant étudié par spectroscopie IR afin de détecter la présence éventuelle d'une interaction hydrogène au sein de son autoassemblage. Comme pour la technique de diffusion des rayons X, on constate qu'une dispersion classique à 5 mM est à l'origine d'un signal de trop faible intensité pour pouvoir traiter convenablement le spectre obtenu. Nous appliquons alors sur la dispersion originale le même traitement par centrifugation sur membrane, que décrit dans le chapitre précédent. Les rapports signal/bruit des échantillons avant et après centrifugation sont présentés FIGURE 4.2.



FIGURE 4.2 : Spectres IR du diC14dT obtenu pour la dispersion initiale à 5 mM (points noirs), ainsi que pour la dispersion concentrée à 43 mM (points gris). Ligne continue = 1737.5 cm⁻¹.

En raison du fait qu'il a été montré que la structure des objets supramoléculaires reste la même avant et après le protocole de concentration, nous avons considéré que celuici ne modifiait pas le type d'objets spontanément formés dans l'échantillon initial. On constate, bien entendu, FIGURE 4.2, que le protocole en question permet d'améliorer largement le rapport signal/bruit obtenu et donc la qualité des interprétations que nous pouvons faire du spectre IR sur la présence d'interactions hydrogène éventuelles.

Dans le cas du diC14dT, on observe un épaulement repéré par la ligne continue à 1737.5 cm⁻¹, caractéristique de la présence de la liaison C=O⁽²⁾ sous un autre état que l'état libre déjà repéré par le pic à 1696 cm⁻¹. Comme expliqué dans le CH.2, il s'agit d'un état lié par l'intermédiaire d'une interaction hydrogène. Ce spectre permet donc de démontrer, par comparaison avec le nucléotide seul associé, que les vésicules de diC14dT présentent une liaison hydrogène intermoléculaire de type T-T. De plus, de manière qualitative, cette interaction paraît relativement forte du fait de l'intensité de cet épaulement. Il faut rester prudent lorsque de telles considérations sont faites, mais elles peuvent, si elles restent qualitatives, permettre de comparer l'ordre de grandeur de l'interaction hydrogène formée au sein de plusieurs auto-assemblages.

4.1.1.b) Interaction π - π stacking

Il est possible également, comme présenté dans le CH.2, de mettre en évidence par spectroscopie UV la présence éventuelle d'interactions de type π - π stacking. Pour cela, il est nécessaire de se placer dans le domaine de linéarité de l'appareillage, afin de pouvoir appliquer la loi de Beer-Lambert et obtenir des spectres d'absorbance non saturés. Nous partons donc d'une solution de thymidine initialement à 1 mM, et différentes dilutions successives sont réalisées, suivies d'une mesure d'absorbance UV pour chaque

concentration, à la longueur d'onde d'absorbance maximale de 264 nm, caractéristique de la thymine et de l'adénine.



FIGURE 4.3 : Droite d'étalonnage de la thymidine par spectroscopie UV à 264 nm.

A partir de 0.15 mM, la courbe Absorbance=f(Concentration) de la FIGURE 4.3 devient linéaire et on trouve, par application de la loi de Beer-Lambert dans ce domaine, un coefficient d'extinction molaire de 7.76 L.mmol⁻¹.cm⁻¹. Afin de se placer à une concentration effective permettant à l'absorbance mesurée d'être nécessairement dans ce domaine de linéarité, nous fixons comme concentration à atteindre pour chaque dilution une valeur de 0.1 mM. Ainsi, on pourra affirmer que l'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration, si on effectue l'analyse sur une solution idéale. A cette concentration, nous mesurons l'absorbance relative au diC14dT et à la thymidine.



FIGURE 4.4 : Spectres UV du diC14dT (carrés bleus) et de la thymidine (triangles verts) dilués à 0.1 mM.

On observe, FIGURE 4.4, qu'aucune différence notable n'est à déclarer entre l'absorbance du nucléotide et l'absorbance des vésicules de diC14dT. Comme détaillé dans le CH.2, on stipule que le seul motif susceptible d'absorber le rayonnement UV à cette longueur d'onde de 264 nm est la base azotée. Ainsi, le fait que la thymidine et que les vésicules de diC14dT aient la même valeur d'absorbance à cette longueur d'onde implique qu'aucune interaction de type π - π stacking n'est présente au sein des auto-assemblages.

4.1.2. Effet du nombre de chaînes : auto-assemblage du C14dT.

4.1.2.a) Interaction hydrogène.

Il a déjà été montré que le C14dT s'auto-assemblait pour former des objets de type fibres, quasi-cristallins et très anisotropes. On s'attend donc à observer la présence d'interactions faibles relativement fortes au sein de ces objets supramoléculaires, en accord avec la structure quasi-cristalline et peu hydratée observée dans les études antérieures. Afin d'optimiser le rapport signal/bruit, on effectue les analyses IR sur le culot formé par les fibres de C14dT. Tout comme dans le CH.3, on suppose que, du fait que les fibres sédimentent naturellement pour donner un culot constitué des mêmes fibres et observable en microscopie optique, il s'agit des mêmes objets que ceux qui sont présents dans la dispersion initiale. Il ne suffit, d'ailleurs, que d'agiter le culot et le surnageant afin de remettre les fibres en suspension.



FIGURE 4.5 : Spectre 1 : Spectres IR du culot formé par une dispersion de fibres de C14dT dans l'HEPES (points noirs), ainsi que du culot formé par une dispersion de fibres de C14dT dans D₂O (points gris). Ligne continue = 1720 cm^{-1} . Spectre 2 : Spectres IR du culot formé par les fibres de C14dT (points noirs), ainsi que des vésicules de C14dT à 85°C à 5 mM (points gris). Ligne continue = 1720 cm^{-1} .

Sur la courbe en points noirs du spectre 1 de la FIGURE 4.5, on peut observer le spectre IR caractéristique des fibres de C14dT. Le caractère très intense du troisième pic à 1720 cm⁻¹ nous renseigne sur la force de l'interaction hydrogène T-T présente au sein des fibres, comme attendu vis-à-vis du caractère quasi-cristallin des objets. De plus, la valeur de

la fréquence de la vibration d'élongation, plus faible que celle du système de référence diC14dT, nous renseigne sur la stabilité plus importante de cette liaison, témoignant probablement du caractère plus organisé de la structure. Par ailleurs, la résolution particulièrement élevée du signal obtenu nous permet d'aller légèrement plus loin dans l'interprétation du spectre IR. En effet, on peut observer la présence, entre les pics principaux à 1696 cm⁻¹ et 1665 cm⁻¹, de deux pics secondaires présents sous la forme de légers épaulements à, respectivement, 1712 cm⁻¹ et 1681 cm⁻¹. Il s'agit probablement d'interactions hydrogène de type C=O^{.....}H₂O. Pour le mettre en évidence, on formule un échantillon identique au précédent dans l'eau lourde D₂O. Etant donné que la fréquence de vibration d'élongation repérée précisément dépend de la masse réduite caractéristique des deux atomes de la liaison, comme présenté dans le CH.2 avec le modèle de Hooke, mais également de son environnement chimique, on s'attend à ce qu'une modification de la masse de l'hydrogène, présent dans la molécule d'eau et interagissant avec le lipide, modifie également la fréquence de la vibration d'élongation observée. Cette hypothèse est vérifiée à l'aide de la courbe grise obtenue, où l'on observe une structure relativement similaire à celle du spectre noir et où l'on retrouve la présence des trois pics principaux du C14dT. De plus, on observe que tout épaulement a disparu en faveur d'un quatrième pic apparu vers 1635 cm⁻¹, ce qui atteste d'un décalage des pics impliquant une interaction hydrogène avec les molécules d'eau.

La même étude par IR est effectuée sur les vésicules de C14dT à 85°C. La technique de spectroscopie IR ne permettant pas de travailler en température, la température effective de l'échantillon reste relativement approximative durant le temps d'acquisition. Cependant, la rapidité de l'analyse IR et la présence de l'hystérèse permet d'assurer que l'acquisition a été effectuée sur les vésicules et non pas sur les fibres issues du retour à la température ambiante. Sur le spectre 2, l'absence du pic clairement marqué à 1720 cm⁻¹ dans le cas des fibres nous montre que les vésicules de C14dT à chaud ne présentent aucune interaction hydrogène intermoléculaire. Il peut paraître logique d'observer une diminution, voire une disparition, de l'intensité de l'interaction hydrogène, du fait que l'on passe d'une structure quasi-cristalline et donc très organisée à une structure beaucoup plus « molle » observée uniquement à haute température. Ce travail en température rend difficile la comparaison directe des spectres IR des vésicules de C14dT et des vésicules diC14dT, dont seulement le diamètre caractéristique, et donc le rayon de courbure, varie.

4.1.2.b) Interaction $\pi - \pi$ stacking.

Le système C14dT ayant montré la présence d'une forte interaction hydrogène dans les objets de type fibres observés à froid, du fait probablement de la structure très organisée en présence, il peut être intéressant d'observer si une interaction aromatique est également présente, par la même comparaison qu'effectuée précédemment avec la thymidine.



FIGURE 4.6 : Spectres UV des fibres de C14dT (carrés bleus), des vésicules de C14dT à 85°C (cercles rouges) et de la thymidine (triangles verts) dilués à 0.1 mM.

L'effet hypochrome observé, FIGURE 4.6, entre le spectre UV de la thymidine et celui des fibres de C14dT, effectués à la même concentration, nous renseigne sur l'existence d'une interaction de type π - π stacking entre les têtes polaires au sein des fibres de C14dT, en dépit d'une aromaticité pourtant relativement faible du groupement thymine. Ceci confirme qu'une structure fortement organisée comme celle des fibres favorise également l'apparition d'interactions faibles comme le π - π stacking.

Par ailleurs, la même étude a été menée sur les vésicules de C14dT à 85°C. On constate une augmentation de l'effet hypochrome entre l'état « fibres » à froid et l'état « vésicules » à chaud. Ceci montre donc que les interactions π augmentent lors de la transition de phases en température. L'augmentation de température favorise la disparition des liaisons hydrogènes et induit la formation des vésicules. Comme nous l'avons montré au CH.3, la bicouche de ces vésicules est dans un état fluide ce qui autorise des degrés de liberté de rotation supplémentaires pour la tête polaire. Dans ces conditions, les interactions de type π - π sont favorisées car un plus grand nombre d'orientation peut être exploré. De manière générale, l'analyse du système C14dT indique que les interactions faibles de type liaisons hydrogène sont très intenses au sein des fibres, probablement en raison du confinement des bicouches et de leur faible hydratation. Celles-ci disparaissent d'ailleurs au-delà de la température de transition, dans la morphologie « vésicule » observée à chaud. De plus, la structure des fibres permet également d'observer un π - π stacking non négligeable entre les têtes polaires. Ce dernier point peut être expliqué par la courbure spontanée nulle, rendant favorable l'approche parallèle des bases azotées entre elles. Enfin, l'augmentation de l'intensité du π - π stacking peut être expliquée par l'existence de l'état fluide de la bicouche dans la conformation vésicule à haute température.
4.1.3. Effet de la longueur des chaînes : auto-assemblage du diC16dT.

4.1.3.a) Interaction hydrogène.

Afin d'étudier l'effet de la longueur des chaînes, il s'agit maintenant d'étudier les interactions faibles présentent dans le système diC16dT. Ce critère étant un paramètre moléculaire, les résultats qui seront mis en évidence pourront, de manière plus directe, être reliés à la multilamellarité des auto-assemblages ou à l'état de la bicouche, comme soulevé dans le chapitre précédent par comparaison avec le système diC14dT. En effet, comme nous avons déjà montré dans le CH.3, il s'agit des deux différences majeures entre le diC14dT et le diC16dT liées à l'augmentation de la longueur des chaînes du bicaténaire.



FIGURE 4.7 : Spectre IR du diC16dT concentré à 37 mM. Ligne continue = 1737.5 cm⁻¹.

Le spectre IR de la FIGURE 4.7 présente un épaulement important qui témoigne de la présence d'une interaction hydrogène T-T relativement forte. Celui-ci est situé à 1737.5 cm⁻¹, tout comme le système de référence diC14dT. On suppose donc qu'il s'agit d'une fréquence de vibration typique de la liaison C=O⁽²⁾ liée par une liaison hydrogène intermoléculaire au sein d'un objet supramoléculaire de type vésicule. De manière qualitative, on peut estimer que cette interaction hydrogène est plus forte que dans les vésicules de diC14dT, mais moins intense que dans les fibres de C14dT. Les vésicules de diC16dT étant constituées d'une bicouche gel caractéristique d'une structure figée, elles présentent des interactions hydrogène intermoléculaires plus importantes. Cependant, les fibres de C14dT, du fait de leur structure quasi-cristalline orthorhombique, ont la structure la plus adaptée à la formation d'interactions faibles intenses de type liaisons hydrogènes.

4.1.3.b) Interaction $\pi - \pi$ stacking.

Il est maintenant intéressant de se demander si une telle structure multilamellaire à bicouche gel ne favorise que la formation d'interactions hydrogène, ou également la formation d'interactions de type π - π stacking.



FIGURE 4.8 : Spectres UV du diC16dT (carrés bleus) et de la thymidine (triangles verts) dilués à 0.1 mM.

Par spectroscopie UV, on constate sur la FIGURE 4.8 qu'aucun empilement π n'est détectable au sein des auto-assemblages du diC16dT.

4.1.4. Effet de la contrainte de la tête polaire et état gel de la bicouche : auto-assemblage du diC16LNA-T.

4.1.4.a) Interaction hydrogène.

Intéressons-nous désormais à l'effet d'une contrainte de la tête polaire des amphiphiles avec la structure moléculaire de type LNA, déjà étudiée dans le CH.3. Nous avons précédemment montré que, comme le système diC16dT, les objets supramoléculaires formés spontanément sont des vésicules formées d'une bicouche gel en raison de la longueur des chaînes aliphatiques. Cependant, dans le cas du diC16LNA-T, les vésicules sont unilamellaires.



FIGURE 4.9 : Spectre IR du diC16LNA-T concentré à 47 mM. Ligne continue = 1737.5 cm⁻¹.

Du fait de la présence du même type d'épaulement à 1737.5 cm⁻¹, on peut être en mesure de conclure de la présence d'interactions hydrogène au sein des vésicules de diC16LNA-T. Cependant, l'intensité du pic ne semble pas importante, ce qui nous amène à postuler l'existence d'interactions hydrogène plus faibles au sein de ce système. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que comme énoncé précédemment, les liaisons hydrogènes sont des liaisons fortement directionnelles. Dans le cas du diC16LNA-T, le blocage de la tête polaire rend sans aucun doute difficile l'orientation précise des têtes polaires et par conséquent la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires.

Il est également possible de comparer le système diC16LNA-T avec le système diC14dT de référence, afin de soulever l'effet de l'état gel de la bicouche sur les interactions hydrogène en présence dans les auto-assemblages. L'absence de différence significative entre les deux spectres IR nous amène à penser que la configuration gel/fluide de la bicouche n'a aucun impact direct sur les interactions hydrogène en jeu dans ces systèmes, qui sont évidemment médiées par les têtes polaires uniquement.

4.1.4.b) Interaction $\pi - \pi$ stacking.



FIGURE 4.10 : Spectres UV du diC16LNA-T (carrés bleus) et de la thymidine (triangles verts) dilués à 0.1 mM.

Le spectre UV de la FIGURE 4.10 indique que l'on favorise ici la présence d'interactions de type π - π stacking. Le premier argument est l'effet hypochrome nettement visible entre le spectre UV du diC16LNA-T et de la thymidine. Le deuxième argument, également signe d'une augmentation des interactions aromatiques en présence et visible dans certains cas, est un « red-shift », ou déplacement du maximum d'absorption vers les hautes longueurs d'onde. Ceci peut être expliqué par l'augmentation de l'étendue du système π , menant ainsi à un rayonnement absorbé de longueur d'onde plus importante. On confirme donc, à l'aide de ce spectre UV, le fait que le blocage de la tête polaire du diC16dT mène à la formation d'interactions π - π tête-tête plus importantes au sein d'une bicouche.

4.1.5. Effet de la nature de la tête polaire : auto-assemblages du diC14dA, du C14dA et du diC16LNA-A.

4.1.5.a) Interaction hydrogène.

Après avoir étudié l'ensemble des systèmes dérivés de la thymine, il s'agit maintenant d'étudier les analogues dérivés de l'adénine afin de conclure sur l'effet de la nature de la tête polaire sur les interactions faibles intermoléculaires décelées au sein des objets supramoléculaires. Tout comme pour les dérivés « T », il est important d'étudier, au préalable, le spectre IR du nucléotide de base afin de conclure sur l'existence éventuelle d'interactions hydrogène dans l'ensemble des systèmes suivants. On présente donc, FIGURE 4.11, le spectre IR de l'adénosine.



FIGURE 4.11 : Spectre IR de l'adénosine à 30 mM. Ligne continue = 1648 cm⁻¹.

On remarque, FIGURE 4.11, la présence des trois pics caractéristiques de l'adénine dans la région 1550-1700 cm⁻¹. On s'intéresse en particulier à la fréquence de vibration du premier pic, qui est également le plus intense. Il s'agit de la vibration de cisaillement du groupe NH₂ qui apparaît, ici, à 1648 cm⁻¹. Puisque le nucléotide forme une solution, contrairement aux dispersions formées par les lipides nucléotides étudiés, on s'assure ici de l'absence d'interactions de type A-A. La fréquence de vibration la plus basse pour ce pic particulier sera donc de 1648 cm⁻¹, et tout shift vers les hautes fréquences sera le signe de l'apparition d'une interaction hydrogène. Etudions, tout d'abord, l'analogue du système de référence présentant le motif adénine.



FIGURE 4.12 : Spectre IR du diC14dA concentré à 30 mM. Ligne continue= 1650 cm⁻¹. Ligne pointillée= 1648 cm⁻¹.

Sur la FIGURE 4.12, ce dernier système présente, par rapport à la ligne pointillée marquant la fréquence de vibration de cisaillement de l'adénosine, un très léger shift vers

184

les hautes fréquences avec une vibration de cisaillement du diC14dA de 1650 cm⁻¹. On vérifie donc la présence d'une interaction hydrogène intermoléculaire pour les vésicules du diC14dA. Si il est possible, de manière qualitative, de comparer l'intensité des interactions hydrogène présentes au sein de plusieurs auto-assemblages de dérivés de la thymine, ou de plusieurs auto-assemblages de dérivés de l'adénine, il est difficile de comparer l'intensité relative d'une interaction hydrogène présente dans un auto-assemblage d'un dérivé « T » avec celle présente dans un auto-assemblage d'un dérivé « A », pour le simple fait que la méthode de détermination n'est pas la même. Il s'agit ici de comparer l'intensité d'un pic dans un cas, avec l'importance du shift d'un pic dans l'autre cas. On supposera donc, ici, qu'il existe une interaction hydrogène, bien qu'elle soit extrêmement faible et probablement plus faible que celle existant au sein des vésicules du diC14dT.

Observons maintenant ce qu'il en est pour le système monocaténaire du C14dA, formant des fibres similaires à celles du C14dT.



FIGURE 4.13 : Spectre 1 : Spectres IR du culot formé par une dispersion de fibres de C14dA dans l'HEPES (points noirs), ainsi que du culot formé par une dispersion de fibres de C14dA dans D_2O (points gris). Ligne continue = 1657 cm⁻¹. Ligne pointillée = 1648 cm⁻¹. Spectre 2 : Spectres IR du culot formé par les fibres de C14dA (points noirs), ainsi que des vésicules de C14dA à 70°C à 5 mM (points gris). Lignes continues = 1657 cm⁻¹ et 1649 cm⁻¹. Ligne pointillée = 1648 cm⁻¹.

Dans le spectre 1 de la FIGURE 4.13, on observe que la courbe noire représentant le spectre IR des fibres du C14dA présente une fréquence de cisaillement de 1657 cm⁻¹. Celle-ci constitue donc un shift très important de 9 cm⁻¹ par rapport au nucléotide, signe d'interactions hydrogène très importantes au sein des fibres du C14dA. On avance le même type d'argument que pour les fibres du C14dT, à savoir que l'organisation particulièrement confinée des bicouches et quasi-cristalline de l'ensemble favorise les interactions hydrogène. Cependant, à plus forte raison ici que pour le système précédent, il devient très difficile de comparer l'intensité des interactions hydrogène présentes dans les fibres du C14dA avec celles présentes dans les fibres du C14dT, du fait qu'elles semblent très importantes dans les deux systèmes analogues. Tout comme le C14dT, on formule un échantillon à la même concentration mais dans l'eau lourde D₂O. Le phénomène qui en suit est particulièrement

intéressant. L'allure du spectre IR du C14dA provient du fait, comme détaillé dans le CH.2, que les différentes liaisons sont similaires et appartiennent à un même système π délocalisé. Ces conditions imposent que les liaisons ne vibrent plus dans un mode classique dit « normal », mais un pic correspond à la contribution de différentes liaisons. En revanche, la deutération du groupement NH₂, où les deux protons sont relativement labiles donc échangeables, modifie la conjugaison des vibrations de chaque liaison de la tête polaire et confère au spectre IR une allure différente dans la région 1550-1700 cm⁻¹. En effet, la masse relative du deutérium étant différente de celle des hydrogènes, la fréquence de cisaillement attendue pour le groupe ND₂ sera supérieur à celle attendue pour le groupe NH₂, comme vérifié ici, en dépit du fait que le pic en question dépasse maintenant la fréquence de 1700 cm⁻¹.

Lorsque l'on chauffe les fibres du C14dA au-delà de la température de transition, la modification du spectre IR de la FIGURE 4.13 montre que, comme pour l'analogue de la thymine, les interactions hydrogène importantes en jeu au sein des fibres disparaissent totalement pour donner des vésicules où est absente toute interaction hydrogène. Cette disparition peut s'expliquer du fait qu'à haute température, avec l'agitation thermique, les liaisons hydrogènes directionnelles sont plus difficiles à faire. La spécificité de ce système à chaud par rapport aux autres systèmes, et les précautions expérimentales nécessaires à prendre expliqueront, cependant, que les monocaténaires à chaud seront laissés de côté pour l'étude des interactions faibles au sein des complexes avec l'acide nucléique.

L'étude des interactions hydrogène au sein du dernier système, le diC16LNA-A autoassemblé, est maintenant effectuée.



FIGURE 4.14 : Spectre IR du diC16LNA-A concentré à 28 mM. Ligne continue = 1657 cm⁻¹. Ligne pointillée = 1648 cm⁻¹.

Ici encore, on observe, FIGURE 4.14, le même shift important de 9 cm⁻¹ du pic relatif à la vibration de cisaillement, que pour le système des fibres du C14dA, lorsque l'on passe de

186

l'adénosine vers les objets formés par le diC16LNA-A. Ce résultat met en évidence la présence d'une forte interaction hydrogène au sein de ce système, qui semble même équivalente à celle observée au sein des fibres du C14dA.

4.1.5.b) Interaction $\pi - \pi$ stacking.

Tout comme les dérivés de la thymine, nous étudions maintenant le π - π stacking présent au sein des auto-assemblages de l'adénine. Pour cela, la même droite d'étalonnage est réalisée, à l'aide de mesures d'absorbances UV de différentes dilutions d'une solution d'adénosine à 1 mM.



FIGURE 4.15 : Droite d'étalonnage de l'adénosine par spectroscopie UV à 264 nm.

A partir de 0.08 mM, la courbe Absorbance=f(Concentration) de la FIGURE 4.15 devient linéaire et on trouve, par application de la loi de Beer-Lambert dans ce domaine, un coefficient d'extinction molaire de 12.97 L.mmol⁻¹.cm⁻¹. Afin de se placer à une concentration effective permettant à l'absorbance mesurée d'être nécessairement dans ce domaine de linéarité, nous fixons comme concentration à atteindre pour chaque dilution une valeur de 0.05 mM. Ainsi, on pourra affirmer que l'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration, si on effectue l'analyse sur une solution idéale. A cette concentration, nous mesurons l'absorbance relative au diC14dA et à l'adénosine.



FIGURE 4.16 : Spectres UV du diC14dA (carrés bleus) et de l'adénosine (triangles verts) dilués à 0.05 mM.

On observe ainsi, FIGURE 4.16, un π - π stacking relativement important au sein des vésicules unilamellaires de diC14dA. Ceci peut s'expliquer par l'aromaticité importante de l'adénine par rapport à la thymine, et par le caractère non directif de l'interaction π par rapport à l'interaction hydrogène, ne nécessitant ainsi aucune courbure spontanée particulière pour la bicouche portant les motifs adénine. Par ailleurs, et par comparaison avec le système du diC14dT, ce résultat nous confirme la propension des systèmes à base d'adénine à former des agrégats à l'aide d'interactions faibles de type π - π stacking.

Par une comparaison similaire au système C14dT, nous en venons maintenant à nous demander si une telle différence peut également s'observer pour l'analogue C14dA, en raison de l'aromaticité plus importante du C14dA.



FIGURE 4.17 : Spectres UV des fibres de C14dA (carrés bleus), des vésicules de C14dA à 70°C (cercles rouges) et de l'adénosine (triangles verts) dilués à 0.05 mM.

On constate, FIGURE 4.17, ici aussi, qu'une interaction de type π - π stacking est présente de manière non négligeable. A titre de comparaison et de manière semiqualitative, on peut l'estimer similaire à celle présente au sein des fibres de C14dT. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en dépit de l'aromaticité relativement faible du groupe thymine, la structure particulièrement confinée et organisée des fibres provoque, quelque soit la nature chimique particulière de la tête polaire de l'amphiphile ou la maille cristalline en présence au sein du motif de répétition, une interaction aromatique relativement importante au sein de la bicouche et entre les bicouches. En revanche, au-delà de la température de transition, et contrairement aux vésicules du C14dT à chaud, on constate que les vésicules de C14dA à chaud présentent un π - π stacking plus faible, comme le montre la diminution de l'effet hypochrome entre l'état « fibres » et l'état « vésicules ». De manière générale, nous pourrons simplement retenir que ceci accentue l'effet de la nature chimique de la tête polaire sur les interactions aromatiques en jeu au sein des auto-assemblages, et démontre l'impossibilité de séparer totalement les composantes liées à l'interaction hydrogène et au π - π stacking au sein de ce type de systèmes.

On effectue, enfin, la même étude sur le dernier dérivé, le diC16LNA-A afin de mesurer les interactions de type π - π stacking en jeu dans ce système.



FIGURE 4.18 : Spectres UV du diC16LNA-A (carrés bleus) et de l'adénosine (triangles verts) dilués à 0.05 mM.

On constate, sur la FIGURE 4.18, que l'empilement π présent au sein de ce système est particulièrement important. Ceci confirme nos hypothèses étant donné qu'il s'agit d'un dérivé de l'adénine, que l'on sait favoriser ce type d' interactions A-A reposant sur un empilement π , et qu'en plus, l'orientation de la tête polaire se retrouve, ici, bloquée en raison de la structure de type LNA. L'impossibilité de comparer quantitativement les systèmes diC14dA et diC16LNA-A, sur la base du π - π stacking, ne nous permet pas de conclure sur l'effet de la fluidité de la membrane.

4.1.6. Bilan intermédiaire.

L'ensemble des systèmes auto-assemblés « seuls » constitue une base suffisante pour commencer à faire quelques interprétations générales sur les tendances des lipides nucléotides en termes d'interactions faibles intermoléculaires. Il s'agit aussi, ici, d'y corréler les hypothèses émises dans le bilan du CH.3 sur la morphologie et la structure des objets formés spontanément.

Les études réalisées ont permis de mettre en évidence, sans ambigüité, le potentiel des lipides nucléotides à former des interactions intermoléculaires entre les têtes polaires dans les assemblages supramoléculaires. Les résultats sont résumés dans le tableau cidessous. Comme nous l'avons indiqué précédemment, nous ne sommes pas en mesure de quantifier les interactions à partir des études de spectroscopies IR et UV mais une étude comparative entre les différents systèmes permet de les classer en termes de force d'interaction. Ainsi, il apparait de façon remarquable une forte corrélation entre la force des interactions intermoléculaires et l'organisation bidimensionnelle de la bicouche. Plus les interactions sont nombreuses et plus l'ordre dans la bicouche est important (K>L_β>l_α). Les systèmes fortement organisés présentent préférentiellement des interactions hydrogènes, plus directionnelles que les interactions de type empilement π . L'adénine, plus fortement aromatique par rapport à la thymine, favorise les interactions de type empilement π . Enfin, les systèmes bloqués (type LNA) favorisent fortement l'existence d'interactions faibles de type liaison hydrogène.

Lipide nucléotide	Morphologie	Structure de la bicouche	Interaction π	Interactions hydrogènes
C14dT	Fibre	К	++	++++
C14dA	Fibre	К	++	++++
diC16-LNA-A	Vésicules unilamellaires	К	++	++++
diC16-LNA-T	Vésicules unilamellaires	Lβ	+	++
diC16-dT	Vésicules multilamellaires	Lβ	0	+++
diC14-dA	Vésicules unilamellaires	Lα	++	+
diC14-dT	Vésicules unilamellaires	Lα	0	++
C14dT (haute température)	Vésicules unilamellaires	Lα	+++	0
C14dA (haute température)	Vésicules unilamellaires	Lα	+	0

FIGURE 4.19 : Tableau récapitulatif des morphologies et structures mises en évidence pour chaque type de système, ainsi que des différentes interactions faibles caractérisées.

4.2 Interactions intermoléculaires au sein du

complexe.

Nous avons mis en évidence l'existence d'interactions faibles intermoléculaires, hydrogène et π - π stacking, au sein des auto-assemblages « seuls ». La formation et l'existence de celles-ci semblent corrélées à certains paramètres moléculaires, tels que la nature chimique de la tête polaire, la longueur des chaines aliphatiques mais également à un certain nombre de paramètres liés à l'objet supramoléculaire, tels que le niveau d'organisation au sein de la bicouche.

Dans cette deuxième partie, il s'agit d'investiguer les interactions faibles responsables de la formation des complexes entre les auto-assemblages « seuls » et les différents acides nucléiques. Pour les distinguer plus facilement des interactions étudiées précédemment, nous les appellerons par la suite les interactions supramoléculaires.

4.2.1. Complexes diC14dT/polyA et diC14dA/polyU.

4.2.1.a) Interaction hydrogène.

De manière similaire au chapitre précédent, il s'agit de présenter, tout d'abord, les interactions faibles formées au sein des deux complexes de références, constitués des deux bicaténaires en C14 et de leur acide nucléique complémentaire. Concernant, tout d'abord, l'interaction hydrogène, on s'attend *a priori* à ce que celle-ci présente une spécificité vis-à-vis du partenaire. Cependant, comme déjà énoncé, le problème est plus complexe qu'il n'y paraît du fait des interactions faibles intermoléculaires déjà présentes au sein des auto-assemblages.



FIGURE 4.20 : Spectre 1 : Spectres IR du diC14dT/polyA concentré (points gris) et du diC14dT concentré (points noirs). Ligne continue = 1737.5 cm⁻¹. Spectre 2 : Spectres IR du diC14dA/polyU concentré (points gris) et du diC14dA concentré (points noirs). Ligne continue = 1654 cm⁻¹. Ligne pointillée = 1650 cm⁻¹.

Il est possible de constater à nouveau, FIGURE 4.20, qu'une interaction hydrogène est déjà présente sous la forme d'un épaulement à 1737.5 cm⁻¹, sur la courbe en points noirs du spectre 1 relative aux vésicules du diC14dT. L'ajout du monobrin complémentaire de polyA ne modifie pas de manière drastique la forme du signal obtenu. Cependant, si l'on regarde les intensités relatives de l'épaulement par rapport au deuxième pic présent à 1696 cm⁻¹, respectivement sur la courbe en points noirs, puis sur la courbe en points gris, on constate qu'il est plus important sur la courbe en points gris qui correspond au complexe. L'augmentation apparente de l'intensité du troisième pic présent à 1665 cm⁻¹ vient du fait que le spectre IR relatif au polyA vient, lui aussi, se superposer à celui relatif au diC14dT. Ainsi, bien que l'origine de l'épaulement soit difficile à attribuer précisément à l'interaction hydrogène présente initialement dans l'auto-assemblage ou bien à la nouvelle interaction hydrogène mise en place avec l'acide nucléique, nous pouvons constater, de manière qualitative, une augmentation de l'interaction hydrogène en présence.

Sur le spectre 2 de la FIGURE 4.20, relatif au système diC14dA/polyU, il est difficile de pointer précisément la position du pic d'intérêt dans la courbe en points gris relative au complexe, repérée par la ligne pointillée. On peut cependant constater qu'un déplacement, d'au moins 4 cm⁻¹, est présent entre la courbe noire du diC14dA seul et celle du complexe supramoléculaire. Ceci est révélateur de la présence d'une interaction hydrogène plus forte que celle présente précédemment dans le système « seul ». On constate qu'il est plus aisé de repérer la présence d'une nouvelle interaction, mise en évidence par une interaction hydrogène globalement mesurée plus forte, dans les systèmes dérivés de l'adénine que dans les systèmes dérivés de la thymine.

4.2.1.b) Interaction π - π stacking.

Observons maintenant si les deux complexes déjà étudiés sont également expliqués par une interaction de type π - π stacking. Pour l'étude de cette interaction au sein d'un complexe, la stratégie est légèrement différente. En effet, on ne va pas comparer l'absorbance UV du complexe avec celle du nucléotide associé. On admet, comme déjà montré dans la première partie de ce chapitre, qu'il existe déjà un empilement π au sein des auto-assemblages seuls. Ce que l'on souhaite mesurer est la contribution du π - π stacking supplémentaire, induit par l'addition de l'acide nucléique. Il s'agit donc de comparer la somme des absorbances de l'auto-assemblage et de l'acide nucléique, prises séparément et dans les mêmes concentrations qu'au sein du complexe, avec l'absorbance du complexe. Tout effet hypochrome entre les deux courbes sera révélateur d'un π - π stacking entre les deux espèces. On précise qu'il a, auparavant, été montré qu'aucun des deux acides nucléiques, pris seul, ne présentait de π - π stacking à une concentration similaire.



FIGURE 4.21 : Spectre 1 (gauche) : Spectres UV du diC14dT/polyA (carrés bleus) et de la somme des absorbances du diC14dT et du polyA (triangles verts). Spectre 2 (droite): Spectres UV du diC14dA/polyU (carrés bleus) et de la somme des absorbances du diC14dA et du polyU (triangles verts).

On constate sur la FIGURE 4.21, que ce soit sur le spectre 1 ou sur le spectre 2, qu'aucun des deux complexes ne forme de nouveau π - π stacking par rapport à celui déjà présent au sein de l'auto-assemblage. Ainsi, les deux bicaténaires en C14 semblent former des complexes hautement spécifiques, en accord avec leur nature chimique complémentaires, et basés essentiellement sur l'interaction hydrogène et non sur le π - π stacking.

Cependant, il est possible de nuancer légèrement la méthode employée, en IR ou en UV, pour détecter la présence de nouvelles interactions faibles créées au sein des complexes auto-assemblage/acide nucléique. En effet, jusqu'à présent et pour toute la suite du travail, on suppose que lorsque l'interaction faible mesurée reste similaire avant et après l'ajout d'acide nucléique, on interprète cet effet comme une absence de nouvelle interaction éventuellement induite par le monobrin. Ceci dit, il serait tout à fait possible d'imaginer que certaines interactions faibles présentes au sein de l'auto-assemblage sont rompues pour former de nouvelles interactions faibles globalement identique avant et après l'addition du partenaire. Cependant, il est peu probable que ceci se produise régulièrement, quelque soit les combinaisons étudiées. En effet, si l'on remarque une absence de changement du signal, en IR ou en UV, et ce, pour plusieurs complexes étudiés, on pourra alors raisonnablement supposer que ceci relève du fait qu'aucune nouvelle interaction n'est mise en place dans le complexe.

4.2.2. Effet de la spécificité de l'acide nucléique : complexes diC14dT/polyU et diC14dA/polyA.

4.2.2.a) Interaction hydrogène.

Afin de mettre en évidence un effet de la spécificité de l'auto-assemblage pour un acide nucléique partenaire, il est nécessaire de comparer les interactions faibles qui semblent s'être formées au sein des complexes basés sur la complémentarité avec les interactions faibles mises en évidence au sein des complexes basés sur la même base azotée.



FIGURE 4.22 : Spectre 1 (gauche): Spectres IR du diC14dT/polyU concentré (points gris) et du diC14dT concentré (points noirs). Ligne continue = 1737.5 cm⁻¹. Spectre 2 (droite) : Spectres IR du diC14dA/polyA concentré (points gris) et du diC14dA concentré (points noirs). Ligne continue = 1652 cm⁻¹. Ligne pointillée = 1650 cm⁻¹.

Même si il a été énoncé plus haut que la méthode de détection d'une nouvelle interaction hydrogène est peu précise, il semble clair, FIGURE 4.22, qu'aucune interaction hydrogène notable ne semble s'être formée au sein du complexe entre le diC14dT et le polyU. Il est possible, cependant, qu'une très faible interaction hydrogène existe entre les deux espèces, mais celle-ci se retrouve confondue avec celle existant initialement dans l'auto-assemblage. Globalement, on constate que l'intensité de l'épaulement situé à 1737.5 cm⁻¹ diminue lorsque l'on passe de la courbe en points noirs à la courbe en points gris.

Dans le spectre 2 de la FIGURE 4.22, nous mettons en évidence un shift de 2 cm⁻¹ du pic relatif à la vibration de cisaillement, par rapport à la courbe noire relative à l'autoassemblage seul. Ceci montre la présence indéniable d'une nouvelle interaction faible qui semble s'être formée. Cependant, en mettant ce résultat en parallèle du résultat obtenu pour le complexe complémentaire diC14dA/polyU, on constate que l'interaction hydrogène formée ici semble moins intense dans le complexe diC14dA/polyA. L'ensemble de ces éléments constitue la preuve d'une spécificité de l'acide nucléique pour les auto-assemblages des deux bicaténaires en C14.

4.2.2.b) Interaction π - π stacking.

Il suffit maintenant de faire les mêmes interprétations pour le nouveau π - π stacking permettant éventuellement d'expliquer la formation des complexes non complémentaires diC14dT/polyU et diC14dA/polyA.



FIGURE 4.23 : Spectre 1 : Spectres UV du diC14dT/polyU (carrés bleus) et de la somme des absorbances du diC14dT et du polyU (triangles verts). Spectre 2 : Spectres UV du diC14dA/polyA (carrés bleus) et de la somme des absorbances du diC14dA et du polyA (triangles verts).

De la même manière que ces interprétations ont été effectuées pour les deux complexes complémentaires, on constate, FIGURE 4.23, une absence de π - π stacking au sein des complexes diC14dT/polyU et diC14dA/polyA. Ceci permet d'appuyer le fait que la reproductibilité de ce type de spectre UV caractéristique n'est pas liée à une compensation éventuelle d'une nouvelle interaction aromatique créée, mais bien une preuve d'une absence totale de π - π stacking entre les auto-assemblages des deux bicaténaires en C14 et l'acide nucléique ajouté, quelque soit leurs natures chimiques respectives.

L'ensemble de ces résultats est intéressant dans la mesure où l'on constate que la formation des complexes complémentaires du diC14dT et du diC14dA repose essentiellement sur une interaction hydrogène forte, tandis que la formation des complexes non complémentaires repose sur une interaction hydrogène dont l'intensité précise est difficile à mesurer, bien qu'elle soit probablement très faible, voire inexistante. Dans le cas des quatre complexes, aucun π - π stacking n'est détecté. Ces faits sont à mettre en relation avec la transition fluide/gel de la bicouche des vésicules, mise en évidence dans le CH.3 dans le cas des complexes complémentaires, que l'on avait supposée être le signe d'une interaction plus forte que dans le cas des complexes non complémentaires.

4.2.3. Effet de la forme de l'objet : complexe C14dT fibres/polyA, complexe C14dT vésicules/polyA, complexe C14dT fibres/polyU et complexe C14dT vésicules/polyU.

Les propriétés morphologiques et structurales particulières des monocaténaires ont été exposées dans le CH.3. Au vu de l'originalité de ce système par rapport au reste des lipides nucléotides étudiés, nous ne présenterons ici que les résultats de l'étude des interactions faibles entre le C14dT et les deux acides nucléiques. Cette sous-partie donnera ainsi un aperçu général des propriétés chimiques des lipides monocaténaires, sans cependant entrer dans les détails en présentant des effets de spécificité avec le C14dA.

Il est important de préciser que les complexes formés entre le C14dT et les acides nucléiques n'ont pas été formulés de la même manière que pour les autres systèmes. Il a été précisé que la totalité des complexes ont été prélevés à l'issue d'une expérience d'ITC, réalisant le mélange entre les deux espèces suivant un protocole bien défini et reproductible, comme il sera détaillé dans le prochain chapitre. Cependant, les quatre complexes étudiés dans cette sous-partie ont été réalisés par simple mélange manuel d'un culot de fibres du C14dT (éventuellement sous la forme de vésicules, et donc ayant déjà subi une transition de phase au-delà de la température de transition) et d'acide nucléique, selon un rapport molaire RM=3. Nous essayons, comme il le sera rappelé dans le CH.5, de nous placer dans un rapport molaire entre l'acide nucléique et les auto-assemblages d'environ 10, pour les besoins du protocole d'ITC. Ici, en plus du protocole de mélange qui diffère, ce rapport molaire est donc beaucoup plus faible, ce qui empêche les quatre spectres suivants d'être parfaitement comparables avec les autres spectres déjà présentés. Cependant, l'intérêt de cette sous-partie est simplement de montrer, d'un point de vue qualitatif, l'effet d'un ajout d'acide nucléique, complémentaire ou non, sur les spectres IR et UV typiques d'un monocaténaire auto-assemblé, tel que le C14dT.



FIGURE 4.24 : Spectre 1(gauche) : Spectres IR du C14dT(fibres)/polyA (points gris) et du culot formé par les fibres de C14dT (points noirs). Ligne continue = 1720 cm⁻¹. Spectre 2 (droite): Spectres IR du C14dT(vésicules à

85°C)/polyA concentré (points gris) et du culot formé par les fibres de C14dT (points noirs). Ligne continue = 1720 cm⁻¹.

Sur le spectre 1 de la FIGURE 4.24, nous étudions les interactions hydrogène présentes au sein du complexe formé par les fibres du C14dT et le polyA. La courbe en points noirs nous rappelle la forme typique du spectre IR des fibres du C14dT. Lorsque l'on passe à la courbe en points gris, on constate, comme pour le complexe diC14dT/polyA, une augmentation apparente de l'intensité relative du troisième pic situé à 1665 cm⁻¹, ainsi que l'apparition de deux petits pics aux plus basses fréquences de vibration, indiquant simplement une superposition avec le spectre IR du polyA. Concernant l'épaulement à 1720 cm⁻¹, on constate essentiellement que celui-ci est conservé. L'évolution de son intensité relative n'est cependant pas nette. Même si on a l'impression que celle-ci diminue, le pic est tout de même encore clairement détectable. On peut relier cette incertitude au fait que le spectre soit beaucoup trop intense pour détecter un quelconque effet fin, tel qu'une modification des interactions hydrogène en jeu dans le système.

détection des interactions hydrogène en jeu dans le complexe La C14dT(vésicules)/polyA est plus aisée étant donné le fait que le spectre IR des vésicules du C14dT à chaud, ici représenté par la courbe en points noirs sur le spectre 2 de la FIGURE 4.24, ne présente aucun épaulement à 1720 cm⁻¹. L'apparition d'un tel épaulement sera, ainsi, plus facile à déceler. Néanmoins, on ne remarque aucun épaulement pour les vésicules du C14dT à chaud, même après l'ajout du monobrin complémentaire de polyA. On remarque cependant, comme pour le spectre 1 de la FIGURE 4.24, la présence du signal relatif au polyA. Tout ceci confirme donc qu'il semblerait que le C14dT, sous forme de fibres (à froid) ou bien de vésicules (à chaud), ne puisse créer aucune interaction hydrogène avec le polyA, bien que celui-ci constitue son acide nucléique complémentaire. Concernant les complexes non complémentaires C14dT/polyU, formés à partir des fibres ou des vésicules à chaud, il est maintenant intéressant de déterminer si un quelconque effet de spécificité est observable en fonction de la nature de l'acide nucléique ajouté.



FIGURE 4.25 : Spectre 1 (gauche): Spectres IR du C14dT(fibres)/polyU (points gris) et du culot formé par les fibres de C14dT (points noirs). Ligne continue = 1720 cm⁻¹. Spectre 2 (droite): Spectres IR du C14dT(vésicules à 85°C)/polyU concentré (points gris) et du culot formé par les fibres de C14dT (points noirs). Ligne continue = 1720 cm⁻¹.

Sur le spectre 1 de la FIGURE 4.25, on peut constater par comparaison entre la courbe en points noirs et la courbe en points gris que l'addition de polyU aux fibres du C14dT permet de supprimer quasiment totalement l'interaction hydrogène mise en évidence par l'épaulement à 1720 cm⁻¹. Ce point nous permet donc de confirmer deux choses. D'une part, on peut désormais affirmer que le polyU n'interagit pas par une liaison hydrogène avec les fibres de C14dT. D'autre part, on peut confirmer que, par comparaison avec le signal IR obtenu pour le complexe entre les fibres de C14dT et le polyA, que l'épaulement encore visible qui avait été obtenu pour ce système était bien le signe de la formation d'interactions hydrogène.

Par ailleurs, on constate également sur le spectre 2 de la FIGURE 4.25, que même l'ajout de polyU aux vésicules de C14dT à chaud ne crée aucune interaction hydrogène. Ce résultat confirme donc que les vésicules de C14dT qui sont obtenues au-dessus de 80°C ne peuvent former aucune interaction hydrogène, quelque soit la nature chimique de l'acide nucléique ajouté.

Ainsi, il est possible de résumer l'étude des interactions faibles faite sur les complexes du C14dT à froid et à chaud par le fait que le seul complexe où la mise en évidence d'une interaction hydrogène a été faite est le complexe entre les fibres du C14dT et le polyA. Pour l'ensemble des autres complexes, c'est-à-dire le complexe non complémentaire des fibres du C14dT ainsi que les deux complexes obtenus à partir des vésicules du C14dT à chaud, aucune interaction hydrogène ne semble apparaître. Ces résultats sont, certes, obtenus sur des échantillons préparés à l'aide d'un protocole différent de celui des autres échantillons, mais les interprétations qui en sont déduites restent valables d'un point de vue qualitatif.

De plus, du fait de la mise en place tardive du protocole d'étude par UV, aucun résultat n'a été obtenu sur l'étude du π - π stacking au sein des complexes du C14dT.

4.2.4. Effet de la fluidité de la bicouche : complexe diC16dT/polyA, complexe diC16dT/poly U.

4.2.4.a) Interaction hydrogène.

Dans le chapitre précédent, il a été vu que le système diC16dT était à l'origine de vésicules constituées d'une bicouche fluide présentant d'intenses interactions hydrogène, mais aucun π - π stacking. Il est maintenant possible de caractériser les interactions faibles à l'origine de la formation des deux complexes supramoléculaires associés.



FIGURE 4.26 : Spectre 1(gauche) : Spectres IR du diC16dT/polyA concentré (points gris) et du diC16dT concentré (points noirs). Ligne continue = 1737.5 cm⁻¹. Spectre 2 (droite): Spectres IR du diC16dT/polyU concentré (points gris) et du diC16dT concentré (points noirs). Ligne continue = 1737.5 cm⁻¹.

La courbe en points gris du spectre 1 de la FIGURE 4.26 nous montre, par comparaison avec la courbe noire relative aux vésicules multilamellaires du diC16dT seul, qu'aucune modification notable du spectre n'est observée. Par comparaison, par exemple, avec la courbe du complexe diC14dT/polyA, où l'intensité relative de l'épaulement semble réellement augmenter par rapport à la courbe du diC14dT seul, ici l'épaulement à 1737,5 cm⁻¹ reste visible, mais son intensité reste similaire avant et après ajout du monobrin complémentaire.

Ceci reste également valable pour l'acide nucléique de même base azotée, puisque la courbe en points gris paraît totalement similaire à la courbe en points noirs servant de référence avant l'addition de l'acide nucléique. Il est donc permis d'affirmer que les vésicules multilamellaires de diC16dT ne présentent pas d'interaction hydrogène avec le polyU.

Ceci confirme les hypothèses émises suite aux résultats de morphologie et de structure, comme quoi aucune interaction importante n'apparaît avec un acide nucléique, que ce soit le polyA complémentaire ou le polyU de même base azotée.

4.2.4.b) Interaction π - π stacking.

Il reste maintenant à déterminer si on peut considérer que les vésicules multilamellaires du diC16dT sont à l'origine d'un empilement π avec les deux types d'acide nucléique.



FIGURE 4.27 : Spectre 1 (gauche): Spectres UV du diC16dT/polyA (carrés bleus) et de la somme des absorbances du diC16dT et du polyA (triangles verts). Spectre 2 (droite) : Spectres UV du diC16dT/polyU (carrés bleus) et de la somme des absorbances du diC16dT et du polyU (triangles verts).

En comparant les spectres UV des complexes du diC16dT sur la FIGURE 4.27, on constate que si l'assemblage du diC16dT/polyA présente un π - π stacking visible, il n'en est rien pour le complexe du diC16dT/polyU. Ceci signifie que le polyA peut se fixer sur les vésicules multilamellaires à l'aide d'un empilement π , faible mais présent quand même. Le faible effet hypochrome visible peut justifier pourquoi il avait été supposé, dans le CH.3, l'inexistence d'une interaction au sein des deux complexes du diC16dT mais le changement de la structure de la bicouche laissait supposer l'existence d'une interaction dans le cas du système complémentaire.

Aucune interaction hydrogène n'est formée par le diC16dT avec un partenaire, quelque soit sa nature chimique. On remarque cependant un effet hypochrome pour le complexe diC16dT/polyA, révélateur d'un π - π stacking entre les deux espèces. On peut donc affirmer que dans le cas du diC16dT/polyA, une faible interaction non spécifique est détectable, contrairement au cas du diC16dT/polyU, où aucune interaction faible ne semble être formée, que ce soit hydrogène ou π . En comparaison avec le système diC14dT, pour lequel la bicouche se trouve à l'état fluide, et avec des liaisons hydrogènes et d'empilement π comparables à celles du système seul diC16dT, il apparait clairement que les interactions entre les vésicules et le monobrin complémentaire sont largement favorisées lorsque la bicouche se trouve à l'état fluide. 4.2.5. Effet de la contrainte de la tête polaire : complexe diC16LNA-T/polyA, complexe diC16LNA-T/polyU, complexe diC16LNA-A/polyU, complexe diC16LNA-A/polyA.

4.2.5.a) Interaction hydrogène.

Le dernier type de système qu'il convient d'étudier, sur le plan des interactions faibles formées au sein des différents complexes sont les systèmes de type LNA. Il est, en effet, intéressant d'étudier l'effet de la contrainte de la tête polaire du fait que le blocage du sucre a initialement été introduit afin de favoriser des interactions faibles plus fortes avec un acide nucléique complémentaire.



FIGURE 4.28 : Spectre 1 (gauche): Spectres IR du diC16LNA-T/polyA concentré (points gris) et du diC16LNA-T concentré (points noirs). Ligne continue = 1737.5 cm⁻¹. Spectre 2 (droite): Spectres IR du diC16LNA-T/polyU concentré (points gris) et du diC16LNA-T concentré (points noirs). Ligne continue = 1737.5 cm⁻¹.

La courbe en points gris que l'on obtient pour le complexe diC16LNA-T/polyA, sur le spectre 1 de la FIGURE 4.28, est relativement bruitée et il paraît difficile d'identifier les deux ou trois pics caractéristiques de la tête thymine. Lorsque l'on pointe le pic qui apparaît vers 1655 cm⁻¹, on constate qu'il s'agit probablement d'un pic caractéristique du polyA. L'ensemble des pics d'intérêt de la thymine se situe donc dans le massif centré vers 1725 cm⁻¹. En connaissant les fréquences de vibration d'élongation des deux carbonyles à 1696 cm⁻¹ et 1665 cm⁻¹, on peut, en effet, pointer la présence des deux pics correspondant. En revanche, le pic le plus visible, présent vers 1730 cm⁻¹, mais mal défini à cause de la résolution, peut donc être associé à la présence d'une interaction hydrogène. En effet, aucun pic relatif au polyA n'est sensé apparaître dans cette zone du spectre. L'intensité de cet épaulement étant relativement importante, on considérera simplement qu'une forte interaction hydrogène existe entre les vésicules de diC16LNA-T et le polyA.

Sur le spectre 2 de la FIGURE 4.28, on constate, de manière plus franche, qu'un épaulement est également présent sur la courbe en points gris relative au complexe

diC16LNA-T/polyU. Etant donné que l'intensité relative de ce pic semble tout de même légèrement plus grande que sur la courbe noire représentant le spectre IR du diC16LNA-T seul, on peut affirmer, d'un point de vue qualitatif, que le complexe non complémentaire diC16LNA-T/polyU est également basé sur l'existence d'une interaction hydrogène. Celle-ci, cependant, semble moins intense que dans le cas du complexe complémentaire.

Il s'agit maintenant d'effectuer le même type d'analyse sur les deux complexes de l'analogue de l'adénine, le diC16LNA-A.



FIGURE 4.29 : Spectre 1 (gauche): Spectres IR du diC16LNA-A/polyU concentré (points gris) et du diC16LNA-A concentré (points noirs). Ligne continue = 1649 cm⁻¹. Ligne pointillée = 1657 cm⁻¹. Spectre 2 (droite): Spectres IR du diC16LNA-A/polyA concentré (points gris) et du diC16LNA-A concentré (points noirs). Ligne continue = 1651 cm⁻¹. Ligne pointillée = 1657 cm⁻¹.

On constate, sur les deux spectres de la FIGURE 4.29, un déplacement du pic relatif à la vibration de cisaillement d'intérêt, non pas vers les hautes fréquences, comme il est habituel de considérer comme preuve d'une interaction hydrogène, mais vers les plus faibles fréquences. De plus, le shift est relativement important, à savoir 8 cm⁻¹ dans le cas du diC16LNA-A/polyU et 6 cm⁻¹ dans le cas du diC16LNA-A/polyA. Les études par spectroscopie IR sur les complexes du diC16LNA-A ne peuvent donc pas permettre de converger afin de confirmer l'existence de liaisons hydrogènes mais la nette différence observée entre les spectres des systèmes « seul » et en interaction avec un acide nucléique complémentaire ou non permet toutefois de conclure dans le sens d'une interaction entre les différents partenaires et de la formation d'un complexe.

4.2.5.b) Interaction π - π stacking.

Effectuons maintenant la caractérisation des interactions de type π - π stacking pour les complexes du diC16LNA-T et du diC16LNA-A, afin de pouvoir quantifier la contribution mise en jeu avec l'acide nucléique complémentaire et de même base azotée.



FIGURE 4.30 : Spectre 1 (gauche): Spectres UV du diC16LNA-T/polyA (carrés bleus) et de la somme des absorbances du diC16LNA-T et du polyA (triangles verts). Spectre 2 (droite) : Spectres UV du diC16LNA-T/polyU (carrés bleus) et de la somme des absorbances du diC16LNA-T et du polyU (triangles verts).

Les résultats présentés sur les spectres UV 1 et 2 de la FIGURE 4.30 nous permettent d'affirmer que le complexe diC16LNA-T/polyA présente une forte interaction de type π - π stacking, comme le montre l'effet hypochrome visible sur le spectre 1. En revanche, le π - π stacking mis en évidence par le spectre 2 pour le complexe diC16LNA-T/polyU est très faible.



FIGURE 4.31 : Spectre 1 (gauche) : Spectres UV du diC16LNA-A/polyU (carrés bleus) et de la somme des absorbances du diC16LNA-A et du polyU (triangles verts). Spectre 2 (droite) : Spectres UV du diC16LNA-A/polyA (carrés bleus) et de la somme des absorbances du diC16LNA-A et du polyA (triangles verts).

Sur le spectre 1 de la FIGURE 4.31, un faible effet hypochrome est visible. Ceci nous montre que les vésicules de diC16LNA-A présentent une interaction de type π stacking avec

204

le monobrin complémentaire. Par ailleurs, le spectre 2 de la FIGURE 4.31 montre très clairement un remarquable effet hypochrome. Il s'agit du π - π stacking le plus intense qui ait été mis en évidence pour l'ensemble des complexes présentés jusqu'à maintenant. Il caractérise les complexes constitués des vésicules de diC16LNA-A et de polyA, même si les deux ne sont pas complémentaires. Le diC16LNA-A avait laissé attendre une interaction forte, sur la base des résultats structuraux, avec le polyU complémentaire. Cependant, la taille des agrégats formés, estimée par diffusion dynamique de la lumière, était largement supérieure lorsque l'interaction était réalisée avec le polyA, bien que l'interaction mise en évidence grâce aux résultats de diffusion X ne permette pas d'observer une adhésion effectivement forte entre les deux espèces. Nous en avons donc conclu que l'interaction observée pour le complexe diC16LNA-A/polyU reposait essentiellement sur une interaction spécifique, probablement une interaction hydrogène même si ce point n'a pas pu être confirmé par IR, et que l'interaction non spécifique, qui se présente donc sous la forme d'un π - π stacking particulièrement intense.

Afin de conclure cette partie, il est nécessaire de noter que les complexes formés par les lipides nucléotides de type LNA présentent des interactions importantes avec les polynucléotides complémentaires ou non complémentaires. L'étude que nous avons réalisée, par les techniques de spectroscopie UV et IR, ne permet toutefois pas de conclure avec certitude sur la nature des interactions mises en jeu dans les différents complexes. Une étude spécifique de ces différents systèmes serait nécessaire afin de lever les incertitudes qui subsistent, concernant par exemple, la nature des liaisons hydrogènes impliquées dans les complexes formés de diC16LNA-A.

Chapitre 5

Propriétés thermodynamiques des complexes.

La technique de calorimétrie à titration isotherme (ITC), comme présentée dans le CH.2, nous permet d'étudier les propriétés thermodynamiques de la formation des complexes, à partir du mélange de deux espèces au sein d'une cellule calorifugée. Les paramètres thermodynamiques issus des différents ajustements des données expérimentales peuvent nous renseigner sur des aspects aussi variés que la constante d'association, l'enthalpie molaire impliquée, ou bien la stoechiométrie du complexe en formation. Cette mesure est, cependant, une mesure globale basée sur la chaleur échangée au cours des processus induits par chaque injection. Nous avons vu dans les chapitres précédents que les mécanismes de formation des assemblages étaient variés, et parfois complexes, avec une succession d'interactions et de transitions de phase. L'objectif de cette partie est de déduire des expériences d'ITC les différents paramètres thermodynamiques associés à chacun des systèmes étudiés dans les chapitres précédent.

5.1 Monocaténaires : interactions des fibres.

Les premiers types de complexes que nous allons étudier sont ceux formés à partir des fibres des lipides monocaténaires à 25°C. Il a déjà été évoqué l'originalité de ce système, et la difficulté à détecter une quelconque interaction hydrogène, étant donné la présence d'interactions hydrogène intermoléculaires déjà très fortes au sein de l'objet seul. Il s'agit, maintenant d'estimer les paramètres thermodynamiques liés à la formation de ces complexes.

5.1.1. Interaction C14dT/polyA.

Le complexe étudié est le C14dT/polyA. Comme dans toute expérience d'ITC, la cellule calorifugée est maintenue à une température constante de 25°C, indépendamment des phénomènes en jeu au sein de la cellule. La régulation thermique nous permet donc d'obtenir un thermogramme brut. Afin de déduire toute contribution énergétique provenant

de la dilution des fibres de C14dT présentes dans la cellule ou de la dilution du polyA présent dans la seringue, il est nécessaire de soustraire à ce signal brut le signal correspondant à la somme des blancs à prendre en compte. Cependant, suivant les espèces utilisées, le signal est parfois négligeable, et sa soustraction n'aboutit donc qu'à un ajout de bruit supplémentaire sur le thermogramme soustrait. On ne fait donc intervenir un blanc de dilution que lorsque son thermogramme est suffisamment intense. Les blancs de dilution obtenus pour le polyA, à différentes concentrations initiales dans la seringue, ainsi que le blanc de dilution obtenu pour les fibres de C14dT à 1.5 mM, sont présentés FIGURE 5.1.



FIGURE 5.1 : Thermogramme 1 (gauche) : Thermogrammes ITC obtenus pour le blanc de dilution du polyA (hepes x polyA) à différentes concentrations, 15 mM (courbe noire), 30 mM (courbe bleue), 40 mM (courbe verte) et 60 mM (courbe rouge). Thermogramme 2 (droite): Thermogramme ITC obtenu pour le blanc de dilution des fibres de C14dT (C14dT x hepes) à 1.5 mM.

On constate que si le blanc obtenu pour la dilution des fibres de C14dT présente un signal négligeable, typiquement 0.1 μ cal/s, devant le bruit intrinsèque à la ligne de base, il n'en est pas de même pour les blancs de dilution du polyA. En effet, quelque soit la concentration, les pics d'injection relatifs à la dilution de l'oligonucléotide sont toujours nets devant la ligne de base. Ce dernier blanc peut donc, et doit donc, être utilisé afin d'effectuer une soustraction du thermogramme brut obtenu, contrairement au blanc relatif à la dilution des fibres de C14dT, qui peut donc être négligé en raison de son faible rapport signal/bruit.

Comme il sera montré plus tard, on observe que les blancs de dilution du polyA sont très intenses devant ceux du polyU, pour une même concentration. Ceci laisse donc penser que la dilution du polyA, lorsque celui-ci est trop concentré, s'accompagne de phénomènes physico-chimiques entraînant un échange de chaleur supérieur à l'enthalpie de mélange qui serait impliquée au cours d'une simple dilution. Thanassoulas et al. ont évoqué ⁶⁶ l'existence d'une dimérisation occasionnée par le polyA à haute concentration, et de toute évidence absente chez le polyU. Ce phénomène n'est pas sans rappeler la tendance de l'adénine, déjà observée au cours des deux précédents chapitres, à favoriser des agrégats basés essentiellement sur le π - π stacking. Le signal intense observé pour la dilution du polyA à concentration relativement élevée correspondrait donc à la chaleur échangée par la

dissociation des dimères A-A dans la cellule. En raison de l'existence de ce phénomène physico-chimique, il est donc préférable, dans la mesure du possible, d'éviter de travailler à trop forte concentration pour le polyA. En effet, bien que le thermogramme relatif à cette dilution soit effectivement soustrait du thermogramme brut, afin d'en retirer la contribution liée à un évènement physico-chimique autre que l'interaction entre les deux espèces d'intérêt, cette opération mathématique n'empêche phénomène pas le de dimérisation/dissociation d'avoir lieu. De fait, la présence potentielle de dimères au sein de la solution initiale de polyA, ainsi que leur dissociation dans la cellule au cours des différentes injections, est susceptible de modifier le signal d'intérêt obtenu finalement pour l'interaction C14dT/polyA. En dépit du fait que ces soustractions sont essentielles afin de ne considérer que la contribution d'un seul évènement physico-chimique, il est cependant nécessaire de conserver un regard critique sur le thermogramme soustrait obtenu, après le traitement mathématique effectué.

L'interaction entre les fibres de C14dT et le polyA est, à présent, mesurée par ITC. Il est important de préciser que les fibres de C14dT utilisées au cours de cette expérience ont été soniquées. Cette opération, particulièrement adaptée à la morphologie anisotrope des fibres, a déjà été présentée dans le CH.3. Bien que l'effet direct de ce procédé soit de raccourcir la longueur relative aux fibres, sans toutefois modifier leur structure, afin de diminuer la polydispersité de la population, l'interaction C14dT/polyA a, dès lors, été investiguée par ITC avec une dispersion de fibres à 1.5 mM, respectivement soniquées ou non soniquées.



FIGURE 5.2 : Thermogramme 1 (gauche): Thermogramme ITC obtenu pour l'interaction entre les fibres de C14dT soniquées à 1.5 mM et le polyA à 15 mM (C14dT x polyA), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration. Thermogramme 2 (droite): Superposition des thermogrammes ITC obtenus pour l'interaction entre les fibres de C14dT, respectivement soniquées (courbe rouge) ou non soniquées (courbe bleue), à 1.5 mM et le polyA à 15 mM (C14dT x polyA), ainsi que les courbes de Wiseman issues de leurs intégrations respectives.

D'une part, on peut constater, sur le thermogramme 1 de la FIGURE 5.2, l'allure caractéristique du signal soustrait pour l'interaction mesurée entre les fibres soniquées de C14dT à 1.5 mM et le polyA à 15 mM. Comme énoncé dans le CH.2, on se place, par défaut, dans un rapport de concentrations entre l'acide nucléique et le lipide, appelé « paramètre de Brandt », d'environ 10. Il a déjà été constaté que cette valeur permettait à la courbe de Wiseman, issue de l'intégration du thermogramme soustrait, de présenter une allure représentative et de se placer dans une gamme optimale de ratios molaires pour ce type de système. Etant donné le signe de l'enthalpie impliquée dans les phénomènes relatifs à chaque injection, on peut affirmer que le thermogramme soustrait est caractéristique d'un phénomène physico-chimique globalement endothermique. De plus, même si les pics d'injection présentent une intensité modérée, d'environ 0.3 µcal/s, on constate que l'intégration permet de rendre compte d'un échange de chaleur important, typiquement de 100 à 300 cal/mol de polyA injecté, suite à chaque injection. Concernant l'allure générale de la courbe de Wiseman, la théorie impose que, quelque soit le mode d'interaction en jeu, si l'on prolonge suffisamment le nombre d'injections, l'enthalpie impliquée dans les phénomènes mesurés devrait tendre vers 0 en raison d'une saturation progressive des sites de fixation de l'objet. Ici, on peut raisonnablement s'attendre à une courbe en forme de cloche, avec un maximum situé manifestement vers un ratio molaire de 1.

D'autre part, le thermogramme 2 de la FIGURE 5.2 présente l'effet d'une sonication au Bioruptor[®] d'une dispersion de fibres de C14dT à 1.5 mM, du point de vue de l'interaction mesurée avec une solution de polyA à 15 mM. On retrouve le signal, en rouge, relatif aux fibres non soniquées et développé précédemment. Le thermogramme bleu décrit l'interaction observée pour les fibres non soniquées. De manière remarquable, on observe une inversion du signe de l'enthalpie impliquée dans le phénomène, qui met en évidence le fait que l'interaction devienne, ici, globalement exothermique. Par ailleurs, on constate également que la sonication des fibres semble augmenter légèrement le rapport signal/bruit du thermogramme soustrait. Cependant, les interprétations doivent plutôt être réalisées sur la base de la courbe de Wiseman que sur le thermogramme soustrait, étant donné que l'opération d'intégration permet de s'affranchir de la composante « temps ». En dépit d'une allure relativement différente pour les deux thermogrammes, on constate, sur les courbes de Wiseman comparées, une tendance relativement similaire, bien que les valeurs enthalpiques caractéristiques soient plus élevées dans le cas des fibres soniquées. Par ailleurs, la présence d'un minimum local pour la courbe bleue, observé à un ratio molaire de 1.3, n'est pas physique, si l'on considère une saturation progressive des sites disponibles sur l'auto-assemblage. On peut donc assimiler à du bruit l'évolution de la courbe bleue, relative aux fibres non soniquées, dans la deuxième moitié du graphe. L'ensemble de ces considérations, accompagné du fait qu'il ait déjà été montré qu'un processus de sonication ne modifiait en rien la structure des auto-assemblages formés, vient justifier la présence d'une telle étape de sonication préalablement à toute expérience d'ITC réalisée sur des fibres.

Afin d'effectuer des interprétations satisfaisantes sur la courbe de Wiseman relative à l'interaction entre les fibres soniquées du C14dT à 1.5 mM et le polyA à 15 mM, il est nécessaire d'effectuer un ajustement à l'aide du modèle le plus simple parmi ceux disponibles dans la base de données. Ceci permettra de minimiser le nombre de paramètres libres dans le modèle, rendant l'ajustement d'autant plus facile mathématiquement que ceux-ci sont nombreux, indépendamment de tout argument physique. Cependant, on constate que la présence éventuelle d'un maximum sur la courbe intégrée n'est pas nette. Il est donc nécessaire, afin d'obtenir un thermogramme dont la tendance est suffisamment définie, de se placer dans une gamme de ratios molaires plus étalée. Pour ce faire, on peut, au choix, diminuer la concentration de lipide dans la cellule, afin de diminuer le nombre de sites disponibles initialement, ou bien augmenter la concentration d'acide nucléique dans la seringue, afin d'augmenter la vitesse de la saturation des sites libres pour un même protocole expérimental. Le risque du premier choix est de diminuer, également, le rapport signal/bruit, qui sera alors trop faible pour conférer à la courbe intégrée une résolution suffisante. On opte donc pour la deuxième solution, en gardant en tête, comme déjà expliqué au début du chapitre, qu'il faudrait idéalement éviter d'utiliser une solution de polyA trop concentrée. L'interaction entre les fibres soniquées de C14dT à 1.5 mM et le polyA à 60 mM est alors mesurée. Rappelons qu'il n'a pas pu être vérifié avec certitude, dans le CH.4, si les fibres à structure orthorhombique du C14dT interagissaient avec le polyA grâce à une interaction hydrogène.



Type de modèle	Signe du signal	Jeu de paramètres 1			
		N1	Ka 1 (M ⁻¹)	ΔH_1 (cal/mol)	ΔS_1 (cal/mol/°C)
2 sites ind.	Endo	3.86	1.4 .10 ³	885	17
		Jeu de paramètres 2			
		N2	Ka 2 (M ⁻¹)	$\Delta {\sf H}_2$ (cal/mol)	$\Delta S_2(cal/mol/°C)$
		0.345	2.1 .10 ³	-7016	-8

FIGURE 5.3 : Thermogramme : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les fibres de C14dT soniquées à 1.5 mM et le polyA à 60 mM (C14dT x polyA), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration et son ajustement. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

Comme dans l'ensemble des thermogrammes qui seront présentés par la suite, trois signaux sont visibles sur la FIGURE 5.3. La courbe verte est le thermogramme brut, tel qu'il a été obtenu directement à la fin d'une mesure d'interaction par ITC. La courbe bleue est la somme des blancs de dilution, ou en tout cas de ceux qui sont conservés pour effectuer la soustraction. Enfin, la courbe rouge est le thermogramme soustrait sur lequel il convient d'effectuer une intégration pour obtenir la courbe de Wiseman à ajuster. L'intensité des pics d'injection visibles sur ce thermogramme, toujours globalement endothermique, est passée d'environ 0.3 µcal/s à des valeurs élevées allant jusqu'à 1 µcal/s, lorsque la concentration en polyA ajouté est passée de 15 mM à 60 mM. Ceci atteste d'une enthalpie échangée plus importante au cours des phénomènes impliqués dans chaque injection, lorsque la concentration en acide nucléique injecté est importante. On constate également que, sur la courbe brute à 60 mM, deux composantes sont présentes pour chaque pic d'injection : une composante exothermique très rapide, ainsi qu'une composante endothermique beaucoup plus lente. La soustraction par le blanc de dilution supprime néanmoins la composante exothermique afin de ne conserver qu'un signal endothermique pour le thermogramme soustrait.

Concernant les observations faites sur la courbe intégrée FIGURE 5.3, nous constatons qu'une moyenne de 4 analyses reproduites permet d'améliorer de façon considérable la résolution de la courbe de Wiseman. De plus, la modification du paramètre de Brandt, dont la valeur est passée de 10 à 40, permet effectivement d'étendre suffisamment la gamme de ratios molaires pour considérer l'ensemble de la forme en cloche du signal intégré. L'ajustement a été effectué à l'aide du modèle dit « à deux sites indépendants ». Il s'agit du modèle le plus simple pour lequel il a été possible de converger vers un jeu de paramètres permettant un ajustement convenable de la courbe de Wiseman.

Comme pour l'ensemble des systèmes étudiés par la suite à l'aide de la technique d'ITC, on constate que l'utilisation des différents modèles d'ajustement est à prendre avec précaution. Il a été précisé que, ne connaissant pas *a priori* le mode d'interaction entre les deux espèces, le choix d'un modèle ne peut donc pas porter sur des arguments physiques. La stratégie est donc de partir du modèle le plus simple, dit « à un site » et comportant un seul jeu de paramètres, puis, dans le cas où les différents ajustements à l'aide de ce modèle se révèlent infructueux, et ce, quelque soient les valeurs initiales entrées pour les paramètres

d'ajustement, on complexifie alors peu à peu le modèle en passant à un modèle plus complexe présentant davantage de paramètres d'ajustement. Lorsqu'un modèle permet de converger vers un jeu de paramètres aboutissant à un ajustement correct du signal intégré, on valide alors l'utilisation de ce modèle pour le système étudié. Cependant, il est nécessaire d'insister sur le fait que le comportement original, autant sur le plan morphologique et structural, qu'en termes de propriétés d'interactions, des systèmes de lipides nucléotides auto-assemblés en interaction avec un acide nucléique, impliquent que l'interaction mesurée ne saurait se réduire à un mode d'interaction donné. En effet, chaque modèle se base sur l'existence physique d'un certain nombre de sites, indépendants ou non, et qui permet donc de décrire une interaction bien particulière entre les deux espèces. La complexité de nos systèmes rend l'adéquation entre les modèles présents dans la base de données et nos résultats expérimentaux relativement limitée, du fait que l'interaction entre les auto-assemblages et les acides nucléiques n'a aucune raison de se limiter à un mode d'interaction précis, comme imposé dans les prérequis de l'utilisation de chaque modèle, aussi complexe soit-il.

Les comparaisons entre les paramètres issus de l'ajustement pour chaque système ne seront effectuées que dans la conclusion générale. Dès lors, il faut garder en tête que ces valeurs ont probablement une signification physique très limitée. Ce qui est important, en outre, est la comparaison des ordres de grandeurs d'un même paramètre, issu de différents modèles comparables, dans le cas de deux complexes analogues. Il est pour le moment difficile de faire un lien entre les paramètres thermodynamiques issus de l'ajustement et les interactions faibles mises en évidence pour ce même système dans le CH.4.

Un aspect intéressant à développer est l'adéquation des deux courbes intégrées FIGURE 5.4, obtenues respectivement avec une concentration initiale en polyA de 15 mM et de 60 mM.



FIGURE 5.4 : Superposition des courbes de Wiseman relatives à l'intégration des thermogrammes ITC de l'interaction entre les fibres de C14dT soniquées à 1.5 mM et, respectivement, le polyA à 15 mM (courbe bleue) ou le polyA à 60 mM (courbe noire).

Lorsqu'on les porte sur un même graphe, FIGURE 5.4, on constate que les valeurs d'enthalpie qui sont directement lisibles, et sensées, en théorie, être comparables, diffèrent de manière significative, typiquement du simple au double pour un même point particulier de la courbe en cloche. On retrouve tout de même la même tendance générale, et le fait qu'une augmentation du paramètre de Brandt permette, de façon qualitative, de se « déplacer » vers la gauche ou vers la droite de la courbe. Ceci confirme le fait que la chaleur échangée au cours du processus de mélange est fortement dépendante du protocole précis utilisé pour réaliser ce mélange. On constate donc à quel point le chemin de formulation suivi influe sur la thermodynamique du système en interaction, d'où l'intérêt de conserver un protocole standard (nombre d'injections, durée de la manipulation) pour l'ensemble des mesures d'ITC qui se veulent être strictement comparables. Le paramètre de Brandt sera, lui, systématiquement adapté en fonction de l'allure visible de la courbe de Wiseman et afin de permettre un ajustement aisé.

Un dernier aspect à développer sur ce système de référence est l'allure remarquable de la décroissance des pics d'injection au cours du temps, comme présenté FIGURE 5.5. En théorie, la relaxation du signal relatif à une injection signifie le retour vers l'équilibre, et donc vers la ligne de base. Toute valeur enthalpique qui diffère de la valeur standard prise au niveau de la ligne de base signifie qu'un phénomène physico-chimique est en cours au sein de la cellule, et occasionne donc un échange énergétique. Dans le cas de l'interaction entre les fibres soniquées de C14dT à 1.5 mM et le polyA à 60 mM, il semblerait que cette décroissance varie de manière notable en fonction du pic considéré.



FIGURE 5.5 : Ajustements de la décroissance exponentielle du 4° pic (courbe 1 à gauche) et du 13° pic (courbe 2 à droite) issus du thermogramme ITC obtenu pour l'interaction entre les fibres de C14dT soniquées à 1.5 mM et le polyA à 60 mM (C14dT x polyA).

La FIGURE 5.5 présente l'allure d'un pic caractéristique du début de l'analyse ITC, ici le 4^{ème} pic, et l'allure d'un pic caractéristique de la fin de l'analyse ITC, ici le 13^{ème} pic. Un zoom a été effectué sur chacun de ces signaux. La relaxation du signal est associée à une décroissance de type exponentielle. On constate alors que, bien que l'ITC soit une technique

de pointe destinée à apporter des informations sur la thermodynamique de la formation d'un complexe, il est également possible d'obtenir également des informations sur la cinétique des mécanismes en jeu. En ajustant chaque décroissance par une fonction du type f(x)=exp(-A.(x-x')), il est possible de considérer l'évolution du facteur multiplicatif A en fonction du temps. Ce facteur est, en réalité, homogène à l'inverse d'un temps et donc exprimé en s⁻¹. On exprime donc une constante de temps relative à la relaxation d'un pic par τ =1/A, avec τ exprimé en s, et exprimant un temps caractéristique du retour à l'équilibre de l'enthalpie impliquée dans la régulation thermique. Entre le 4^{ème} pic et le 13^{ème} pic, on constate que la constante de temps τ évolue de 17 s à 51 s, indiguant donc que la cinétique des phénomènes physico-chimiques en jeu dans l'interaction devient de plus en plus lente, typiquement 3 fois plus lente à la fin de l'analyse qu'elle ne l'était au début. Il est donc permis de penser que, étant donné la morphologie et la structure d'une fibre, l'interaction avec un monobrin d'acide nucléique est d'autant plus facilitée que le ratio molaire est faible et que la surface de la fibre est libre. Plus l'analyse se prolonge dans le temps, plus les sites disponibles sur la surface d'une fibre se retrouvent saturés, et plus la cinétique de l'interaction fibre/polyA devient donc lente.

5.1.2. Interaction C14dT/polyU.

Si l'on considère maintenant l'interaction analogue à celle présentée dans la souspartie précédente, mais avec l'acide nucléique non complémentaire, il est nécessaire d'introduire les blancs de dilution obtenus pour différentes concentrations de polyU.



FIGURE 5.6 : Thermogrammes ITC obtenus pour le blanc de dilution du polyU (hepes x polyU) à différentes concentrations, 15 mM (courbe noire), 30 mM (courbe bleue), 40 mM (courbe verte) et 60 mM (courbe rouge).

Le thermogramme FIGURE 5.6 présente les signaux obtenus par l'injection d'une solution de polyU, à différentes concentrations, dans la cellule d'HEPES. Sur la base du thermogramme 1 de la FIGURE 5.1, on constate un signal manifestement différent de celui obtenu pour la dilution du polyA. Le signal est, ici, endothermique, alors qu'il était exothermique dans le cas du polyA. De plus, la dilution du polyU aboutit à des pics d'injection beaucoup plus faibles que la dilution du polyA. Il est difficile d'estimer le facteur entre l'intensité des pics du polyA et du polyU, étant donné que, si le signal reste globalement constant pour le polyU, l'intensité apparente du signal du polyA évolue avec le temps. Cette évolution s'observe, à plus forte raison, à une concentration importante. On peut néanmoins, grâce aux signaux obtenus à faible concentration, estimer un rapport d'au moins 3 entre les pics d'injection du polyA et du polyU, à la même concentration. L'ensemble de ces points confirme l'absence probable de phénomènes ayant lieu lors de la dilution du polyU dans l'HEPES, tout comme la dissociation de dimères dans le cas du polyA. On observe, par ailleurs, que les pics d'injection du polyU à 15 mM sont tellement peu intenses devant le bruit intrinsèque à la ligne de base, que l'on peut négliger sa soustraction dans le cas d'une expérience impliquant le polyU à 15 mM.

La mesure de l'interaction entre les fibres soniquées de C14dT à 1.5 mM et le polyU à 60 mM est maintenant effectuée. On remarque que les conditions dans lesquelles on se place permettent au paramètre de Brandt de prendre la même valeur que dans le cas du complexe complémentaire précédemment étudié, ceci afin de pouvoir prétendre à une comparaison directe entre les deux analyses. Rappelons qu'il a été vérifié, dans le CH.4, que les fibres à structure orthorhombique du C14dT ne présentaient aucune interaction hydrogène avec le polyU.


Type de modèle	Signe du signal	Jeu de paramètres 1			
		N1	Ka 1 (M ⁻¹)	ΔH_1 (cal/mol)	ΔS_1 (cal/mol/°C)
2 sites séq.	Endo	/	1.7 .10 ³	95	15
		Jeu de paramètres 2			
		N2	Ka 2 (M-1)	ΔH_2 (cal/mol)	$\Delta S_2(cal/mol/°C)$
		/	1.3 .10 ¹	529	7

FIGURE 5.7 : Thermogramme : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les fibres de C14dT soniquées à 1.5 mM et le polyU à 60 mM (C14dT x polyU), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration et son ajustement. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

On constate, en premier lieu, FIGURE 5.7, que le thermogramme brut, et même le thermogramme soustrait, sont endothermiques. La forme des pics d'injection semble plus régulière que dans le cas de l'interaction C14dT/polyA, avec présence d'une seule composante endothermique. La courbe de Wiseman est aisément déduite de l'évolution des pics d'injection du thermogramme. On obtient une courbe intégrée présentant une simple décroissance vers 0, indiquant ainsi la saturation des sites de fixation disponibles sur les objets. Le modèle le plus simple ayant permis un ajustement satisfaisant est le modèle dit « à deux sites séquentiels », supposant ainsi que la fixation d'un ligand sur le deuxième site ne peut se faire que si le premier site est déjà occupé. Ainsi, les deux sites décrits par ce modèle sont bien distincts en termes de constantes thermodynamiques, mais les deux fixations successives sont donc dépendantes l'une de l'autre. Comme déjà précisé pour le système C14dT/polyA, il est cependant difficile d'attribuer à l'interaction C14dT/polyU un caractère séquentiel, en dépit de l'ajustement convenable réalisé à l'aide de ce type de modèle, étant donné l'adéquation relativement faible entre ces modèles décrivant une interaction idéale et l'interaction complexe mise en jeu au sein de nos systèmes. Cependant, on peut extraire de l'ajustement des ordres de grandeur, pour la constante d'association essentiellement, qu'il pourrait être utile de comparer avec ceux extraits du système complémentaire C14dT/polyA.

De manière générale, on constate cependant une cinétique beaucoup plus régulière dans le cas C14dT/polyU que dans le cas C14dT/polyA, en termes de relaxation du signal enthalpique. L'allure générale de la courbe de Wiseman paraît moins classique pour le complexe complémentaire, avec une forme en cloche, que pour le complexe non complémentaire, avec une simple décroissance. Ces deux aspects semblent indiquer la présence d'une interaction plus complexe entre le C14dT et le polyA, dont au moins une des composantes est absente dans le complexe C14dT/polyU. Par comparaison avec ce dernier système, on peut donc imaginer que la facilité d'approche du polyA semble varier suivant que l'objet présente peu de sites de fixation saturés, à faible ratio molaire, ou suivant que la surface des fibres est déjà partiellement recouverte, à plus fort ratio molaire. Par comparaison avec les résultats du CH.4, on comprend que la signature enthalpique particulière du complexe C14dT/polyA peut éventuellement être attachée à la présence d'une forte interaction hydrogène, contrairement au signal plus simple du complexe C14dT/polyU. Par ailleurs, il est intéressant de constater que lorsqu'une telle interaction spécifique est présente entre une fibre et le polynucléotide complémentaire, il semblerait nécessaire de faire appel à un modèle plus complexe, c'est-à-dire comportant davantage de paramètres d'ajustement que dans le complexe analogue non complémentaire. En dehors de ces considérations générales, il paraît difficile, pour le moment, de justifier l'utilisation de tels modèles d'ajustement, ainsi que de procéder à des interprétations sur la base des paramètres thermodynamiques issus des ajustements.

5.1.3. Interaction C14dA/polyU.

Après avoir comparé les mesures d'ITC effectuées sur les deux complexes formés à partir des fibres de C14dT, il est intéressant d'appliquer la même stratégie pour les fibres de C14dA. En effet, le CH.4 a soulevé l'existence d'interactions intermoléculaires au sein de l'objet, qui diffèrent suivant la structure des auto-assemblages et suivant la nature chimique des têtes polaires en présence. Par ailleurs, il a également été montré que les interactions intermoléculaires qui peuvent être créées avec un partenaire dépendent fortement de la compétition présente entre ces deux types d'interactions. Observons comment évolue la signature enthalpique de l'interaction formée par les fibres de C14dA, par rapport au cas de l'analogue avec la thymine déjà développé ci-dessus. Rappelons qu'il n'a pas pu être vérifié, dans le CH.4, si les fibres à structure triclinique du C14dA interagissaient avec le polyU. Le C14dA est ici à 1.5 mM et le polyU à 60 mM.



Type de modèle	Signo du signol	Jeu de paramètres 1				
	Signe du signai	N	К _а (М⁻¹)	$\Delta {\sf H}$ (cal/mol)	ΔS (cal/mol/°C)	
1 site	Endo	1.42	5.8 .10 ²	157	13	

FIGURE 5.8 : Thermogramme : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les fibres de C14dA soniquées à 1.5 mM et le polyU à 60 mM (C14dA x polyU), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration et son ajustement. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

Pour le complexe complémentaire C14dA/polyU, on remarque, FIGURE 5.8, un thermogramme très similaire à celui de l'interaction C14dT/polyU. La seule différence est que les pics d'injection sont légèrement moins intenses. On passe en effet d'un signal endothermique dont les pics débutent à une intensité de 0.3 µcal/s à un signal plus faiblement endothermique dont les pics débutent à une intensité de 0.15 µcal/s. Bien que l'intensité du signal ait globalement été divisée par 2, preuve que la contribution énergétique impliquée dans les interactions en jeu est plus faible dans ce dernier cas, indépendamment de la nature des interactions faibles présentes, on peut constater la même allure décroissante pour le thermogramme soustrait dans le cas des deux complexes. On en déduit, en outre, l'information que le polyU interagit avec les fibres du C14dA.

Cette allure est également reproduite lorsque l'on compare les deux courbes de Wiseman, présentant une tendance décroissante vers 0. La différence notable est que celleci a cependant l'air plus rapide dans le cas de l'interaction C14dA/polyU, étant donné que l'on atteint des valeurs d'enthalpie beaucoup plus proches de 0 à la fin de l'intervalle de ratios molaires, que dans le cas de l'interaction C14dT/polyU. On constate que, bien que similaire à celle du C14dT/polyU, la courbe intégrée du C14dA/polyU tend plus rapidement vers 0, pour une interaction formée avec des auto-assemblages de même type de morphologie. Ceci implique donc que la saturation des sites disponibles sur les fibres de C14dA survient de manière plus rapide que celle des sites disponibles sur les fibres de C14dT. Ce point permet donc de supposer que la constante d'équilibre de la formation du complexe C14dA/polyU est supérieure à celle du complexe C14dT/polyU. Ainsi, bien qu'il ait été difficile, à l'aide des méthodes de spectroscopie, de distinguer la formation des deux complexes C14dT/polyU et C14dA/polyU en termes d'interactions faibles, on constate donc ici que le complexe C14dA/polyU est probablement caractérisé par une constante d'association supérieure à celle du complexe C14dT/polyU, preuve d'une éventuelle interaction hydrogène spécifique assurant une stabilité optimale de l'assemblage dans le cas du complexe complémentaire.

5.1.4. Interaction C14dA/polyA.

Le dernier complexe à étudier, sur le plan des interactions mesurées par ITC, est le C14dA/polyA. Rappelons qu'il n'a pas pu être vérifié, dans le CH.4, si les fibres à structure triclinique du C14dA interagissaient avec le polyA. Le C14dA est ici à 1.5 mM et le polyA à 60 mM.



Type de modèle	Signo du signol	Jeu de paramètres 1				
	Signe du signai	N	К _а (М⁻¹)	$\Delta {\sf H}$ (cal/mol)	ΔS (cal/mol/°C)	
1 site	Endo	3.33	3.2 .10 ³	313	17	

FIGURE 5.9 : Thermogramme : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les fibres de C14dA soniquées à 1.5 mM et le polyA à 60 mM (C14dA x polyA), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration et son ajustement. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

Concernant le thermogramme soustrait, il est intéressant de constater, FIGURE 5.9, que contrairement aux trois autres complexes formés à partir des fibres, deux composantes sont visibles. Si le signal est globalement endothermique, en raison d'une composante qui prédomine largement la mesure globale aux faibles ratios molaires, on constate la disparition de cette contribution en faveur d'une contribution exothermique qui, elle, prédomine la mesure effectuée aux ratios molaires plus élevés. Cette tendance était également observée dans le thermogramme brut. Pour les premières injections, les pics sont particulièrement intenses, puisqu'ils partent d'une valeur de 0.8 µcal/s pour décroître ensuite peu à peu. Il est donc possible de déduire de résultat le fait que le polyA présente une interaction avec les fibres de C14dA.

La courbe de Wiseman, obtenue après intégration du signal, peut être assimilée à une décroissance de forme sigmoïdale relativement rapide vers 0. Il a été possible d'ajuster ce signal à l'aide du modèle le plus simple, dit « à un site ». En termes de valeurs enthalpiques, on retrouve une intensité très importante sur la courbe intégrée. En effet, les points expérimentaux partent d'une valeur de 300 cal/mol de polyA injecté.

5.2 Interactions complémentaires des vésicules.

5.2.1. Interaction diC14dT/polyA.

Après les complexes formés à partir des fibres, nous allons développer la mesure par ITC des interactions intermoléculaires dans le cas des complexes complémentaires des lipides nucléotides bicaténaires. Le premier système sera le complexe de référence diC14dT/polyA. Rappelons que les vésicules unilamellaires à bicouche fluide du diC14dT interagissent avec le polyA, pour former une structure à bicouche gel, essentiellement grâce à une interaction hydrogène. Le diC14dT est ici à 4 mM et le polyA à 40 mM.



Tupo do modèlo	Signe du signal	Jeu de paramètres 1				
Type de modele		N1	Ka 1 (M ⁻¹)	$\Delta { m H_1}$ (cal/mol)	ΔS_1 (cal/mol/°C)	
3 sites séq.	Endo	/	1.5 .10 ²	54	10	
		Jeu de paramètres 2				
		N2	K _{a 2} (M ⁻¹)	$\Delta { m H}_2$ (cal/mol)	ΔS_2 (cal/mol/°C)	
		/	1.0 .10 ³	181	14	
		Jeu de paramètres 3				
		N ₃	Ka 3 (M ⁻¹)	ΔH_3 (cal/mol)	ΔS_3 (cal/mol/°C)	
		/	6.7 .10 ²	-226	12	

FIGURE 5.10 : Thermogramme : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les vésicules de diC14dT à 4 mM et le polyA à 40 mM (diC14dT x polyA), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration et son ajustement. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

Les pics du thermogramme soustrait, FIGURE 5.10, semblent relativement intenses, typiquement de l'ordre de 0.4 µcal/s, mais sans évolution nette au cours du temps. De plus, celui-ci est de signe endothermique, ce qui suggère que, même si plusieurs types de contributions existent, l'interaction globale reste gouvernée par l'entropie ou par des interactions qui ne sont pas précisément localisées. De manière intéressante, on peut remarquer que le signal présent sur le thermogramme soustrait n'était pas présent dans le thermogramme brut. C'est donc la soustraction liée à la dilution des deux blancs, nécessaire à prendre en compte, qui est à l'origine de l'apparition du signal relatif à l'interaction étudiée.

Concernant la courbe de Wiseman du complexe diC14dT/polyA, FIGURE 5.10, on constate une allure relativement similaire à celle du complexe C14dT/polyA. En effet, la courbe présente une tendance en forme de cloche avec un maximum. Il est intéressant de noter que le maximum est ici situé à un ratio molaire de 0.3, alors que le maximum pour le C14dT/polyA est situé vers un ratio molaire de 3. L'ajustement a été réalisé à l'aide du modèle dit « à 3 sites séquentiels ». Il était donc nécessaire de faire appel à un modèle présentant encore plus de paramètres d'ajustement que dans le cas de la mesure du C14dT/polyA, ajusté à l'aide du modèle « à 2 sites indépendants », afin de pouvoir effectuer un ajustement satisfaisant. La forme particulière de la courbe laisse penser que le mécanisme complexe à l'origine de cette signature enthalpique globalement endothermique, repose sur la présence de deux contributions antagonistes. Dans la première partie de la courbe, c'est la contribution endothermique qui domine, puis dans la deuxième partie de la courbe, il semble que c'est plutôt la contribution exothermique qui domine, ce qui créé, dans une gamme intermédiaire de ratios molaires, la présence d'un maximum local.

5.2.2. Interaction diC14dA/polyU.

Intéressons-nous désormais au complexe complémentaire diC14dA/polyU, qui constituait également un complexe de référence dans les deux précédents chapitres.

Rappelons que les vésicules unilamellaires à bicouche fluide du diC14dA interagissent avec le polyU, pour former une structure à bicouche cristallisée, essentiellement grâce à une interaction hydrogène, dont l'intensité a été estimée forte. Ce mécanisme d'interaction est associé à l'existence d'une transition vésicule unilamellaire – vésicule multilamellaires. Le diC14dA est ici à 3 mM et le polyU à 30 mM.



FIGURE 5.11 : Thermogramme 1 : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les vésicules de diC14dA à 3 mM et le polyU à 30 mM (diC14dA x polyU), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration. Thermogramme 2 : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les vésicules de diC14dA à 1.25 mM et le polyU à 14.6 mM (diC14dA x polyU), ainsi que la courbe de Uiseman issue de son intégration.

Ce système constitue un exemple intéressant à développer. On constate qu'en dépit de la forte interaction hydrogène que l'on peut mettre en évidence dans le CH.4, le thermogramme soustrait, FIGURE 5.11, ne présente absolument aucun pic. De fait, on peut remarquer que les intensités des thermogrammes brut et relatif aux blancs s'annulent deux à deux. Si interaction hydrogène il y a, comme le spectre IR présenté lors du CH.4 le suggère, on avance alors l'hypothèse d'une compensation entre deux phénomènes en jeu au cours de la titration. Par exemple, il est possible que la signature enthalpique liée à l'interaction hydrogène soit compensée par un phénomène d'ordre entropique lié à la transition unilamellaire – multilamellaire. Afin de vérifier la reproductibilité de cette mesure sur une autre gamme de concentration, on se place dans les conditions de Patwa et al. ⁷² sur un système analogue, le diC16dA/polyU. Dans ces conditions, le diC14dA est à 1.25 mM et le polyU est à 14.6 mM. Le lipide nucléotide utilisé dans l'article étant différent, il est probablement imaginable que les vésicules formées soient constituées d'une bicouche gel, qui diffère alors du type de système étudié à présent. Cependant, le fait de se placer dans des conditions de concentration différentes, mais cependant à un paramètre de Brandt comparable afin de maintenir un parallèle entre les deux expériences, permet de vérifier si l'interaction mesurée entre les deux espèces est intrinsèquement nulle, ou si cet effet provient juste des conditions de concentration utilisées. On vérifie que le thermogramme soustrait ne présente toujours aucun pic. De plus, tout comme pour la première analyse d'ITC présentée, la courbe intégrée montre que la totalité des points expérimentaux sont centrés autour de 0, preuve d'une absence d'interaction mesurée. Le bruit additionnel par rapport à la première expérience, provient probablement du fait que la concentration en lipide dans la cellule ait été divisée par deux.

5.2.3. Interaction diC16dT/polyA.

Il s'agit maintenant d'étudier le complexe diC16dT/polyA. Il est intéressant d'insister sur le fait qu'il s'agit du seul auto-assemblage de ceux décrits dans le CH.3 qui, « seul », forme des vésicules multilamellaires. Rappelons que ces vésicules multilamellaires à bicouche gel interagissent avec le polyA, grâce à un empilement π d'intensité moyenne. Le diC16dT est ici à 3 mM et le polyA à 30 mM.

Le protocole expérimental a été légèrement modifié afin de gagner en durée d'analyse. En effet, pour un même nombre d'injections réalisées, nous avons diminué par 2 la durée totale pour une manipulation. Ceci a été possible du fait que, de manière générale et quelque soient les systèmes étudiés, la durée de relaxation du signal était toujours bien inférieure à la durée d'équilibre laissée entre deux injections successives. Pour confirmer la reproductibilité de ce nouveau protocole par rapport à l'ancien, une acquisition a été réalisée, successivement à l'aide des deux protocoles. Il a été montré, par la suite, que les courbes de Wiseman issues de l'intégration des deux thermogrammes étaient bien similaires. Ceci nous a permis de remplacer systématiquement l'ancien protocole par le nouveau, plus optimal en termes de durée d'expérience.



FIGURE 5.12 : Thermogrammes : Thermogrammes ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenus pour l'interaction entre les vésicules de diC16dT à 3 mM et le polyA, respectivement à 30 mM (thermogramme 1, à gauche) ou à 15 mM (thermogramme 2, à droite), (diC16dT x polyA), ainsi que les courbes de Wiseman issues de leurs intégrations respectives et leur ajustement éventuel. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

Sur le thermogramme correspondant à l'interaction diC16dT/polyA, FIGURE 5.12, on obtient un signal non négligeable, qui est constitué de pics d'injections de très grande intensité, typiquement 1.5 µcal/s pour les premières injections, ce qui constitue une valeur particulièrement importante en comparaison des autres systèmes étudiés. On observe que la courbe de Wiseman comporte des points expérimentaux relatifs à des valeurs enthalpiques très importantes par rapport aux systèmes abordés jusqu'à maintenant, typiquement jusqu'à 450 cal/mol de polyA injecté. Ceci ne signifie pas nécessairement que la formation du complexe est très spontanée. Cette information nous renseigne juste sur l'enthalpie caractéristique impliquée dans le phénomène physico-chimique en jeu. De plus, la tendance caractéristique de la courbe est, à nouveau, une décroissance apparemment simple, qui peut être ajustée par un modèle à 1 site afin de rendre compte de valeurs caractéristiques pour les paramètres thermodynamiques relatifs à la formation du complexe, dont on peut confirmer la valeur importante de l'enthalpie molaire de formation. Sur la courbe intégrée, si l'on considère les points de ratios molaires inférieurs à 1, on constate une

évolution anormale, qui, pourtant, apparaît même sur ce graphe obtenu à l'aide d'une moyenne de 4 analyses similaires. En effet, si l'on observe avec attention la tendance de la courbe intégrée autour du ratio molaire de 0.3, il est possible d'observer, pour une gamme de ratios molaires autour des faibles valeurs, la présence d'un maximum.

Afin de prouver son existence éventuelle, nous modifions le paramètre de Brandt, qui, ici, présentait une valeur de 10, pour lui attribuer une nouvelle valeur de 5. Dans ces nouvelles conditions, le diC16dT présente toujours une concentration de 3 mM, mais le polyA est maintenant à 15 mM. On peut ainsi explorer la première région de la courbe de Wiseman, située aux plus faibles ratios molaires. Cependant, probablement en raison d'une concentration de titrant devenue plus faible, on observe également la diminution du rapport signal/bruit. De la même manière, sur la courbe de Wiseman intégrée, on constate que la résolution n'est pas suffisante pour espérer effectuer un ajustement correct par un des modèles disponibles. Cependant, du point de vue qualitatif, on peut effectivement vérifier que le signal présente un maximum, situé à un ratio molaire de 0.4. Ainsi, on conclura que le système diC16dT/polyA, tout comme les systèmes diC14dT/polyA et C14dT/polyA, sont caractérisés par une courbe de Wiseman en forme de cloche, avec un maximum caractéristique.

5.2.4. Interaction diC16LNA-T/polyA.

Le dernier complexe complémentaire à base d'auto-assemblages de lipides nucléotides dérivés de la thymine est étudié. Il s'agit du diC16LNA-T/polyA. L'objectif est, ici, de confirmer les hypothèses précédentes, comme quoi les objets décorés par une tête thymine présentent une interaction avec le polyA, dont la courbe de Wiseman affiche une forme de cloche avec un maximum. Rappelons que les vésicules unilamellaires à bicouche gel du diC16LNA-T interagissent avec le polyA, grâce à une forte interaction hydrogène et à un empilement π intense. Le diC16LNA-T est ici à 5 mM et le polyA à 50 mM.



225

Type de modèle	Signe du signal	Jeu de paramètres 1				
		N1	Ka 1 (M ⁻¹)	ΔH_1 (cal/mol)	ΔS_1 (cal/mol/°C)	
2 sites ind.	Endo	0.0115	4.6 .10 ³	-333	19	
		Jeu de paramètres 2				
		N2	Ka 2 (M-1)	ΔH_2 (cal/mol)	ΔS_2 (cal/mol/°C)	
		0.913	1.6 .10 ²	423	10	

FIGURE 5.13 : Thermogrammes : Thermogrammes ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenus pour l'interaction entre les vésicules de diC16LNA-T à 5 mM et le polyA, respectivement à 50 mM (thermogramme 1) ou à 25 mM (thermogramme 2), (diC16LNA-T x polyA), ainsi que les courbes de Wiseman issues de leurs intégrations respectives et leur ajustement éventuel. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

Le thermogramme présente, FIGURE 5.13, un signal endothermique important, de l'ordre de 1 µcal/s pour les premières injections. L'intensité des pics d'injection décroît lentement au fil de l'acquisition. On peut remarquer que, tout comme pour le complexe C14dT/polyA, le thermogramme brut présente une composante endothermique prédominante aux faibles ratios molaires, et une composante exothermique aux ratios molaires élevés. La présence de cette contribution exothermique est annulée par la soustraction des blancs. Une fois l'intégration du thermogramme soustrait faite, on constate que la courbe de Wiseman présente une large décroissance qui tend lentement vers 0. En revanche, la présence du premier point expérimental suffit à remettre en question l'allure de la courbe qui doit apparaître sur l'ajustement. En effet, on constate que la même analyse ITC réalisée avec un paramètre de Brandt de 5, et donc une nouvelle concentration en polyA de 25 mM, permet à la courbe intégrée de faire ressortir la présence du maximum à un ratio molaire de 0.2. De manière intéressante, on constate que la contribution exothermique présente auparavant sur le thermogramme brut a ici disparu. Un ajustement a été réalisé, pour la courbe de Wiseman obtenue, à l'aide du modèle à 2 sites indépendants, et permet de donner un ordre de grandeur des paramètres thermodynamiques du système en interaction, indépendamment de la nature physique exacte des 2 sites en question.

En guise de conclusion intermédiaire pour les complexes complémentaires formés d'auto-assemblages « T » en interaction avec le polyA, on vérifie systématiquement la forme particulière de la courbe en cloche. Le maximum se situe, suivant le type de système considéré, à une valeur de ratio molaire différent, probablement caractéristique de la stoechiométrie du complexe et du nombre de ligands qu'un objet peut fixer. On rappelle, comme déjà énoncé plus haut, que pour ces systèmes, un mécanisme complexe à l'origine de cette signature globalement endothermique est certainement en jeu. L'évolution caractéristique de la courbe de Wiseman repose sur la présence de deux contributions antagonistes, simultanément endothermique qui domine pour les premières injections, puis peu à peu exothermique qui devient ensuite prépondérante. Il est possible d'attacher à l'interaction hydrogène, en jeu dans l'ensemble de ces systèmes, une signature exothermique, du fait qu'elle constitue une interaction faible bien localisée, et nécessite donc un dégagement de chaleur pour pouvoir se créer. Par ailleurs, suivant les types de systèmes considérés, on constate qu'un empilement π n'est pas toujours présent, bien qu'il

ait pu être à l'origine de la deuxième contribution endothermique. En revanche, les phénomènes endothermiques étant généralement ceux gouvernés par l'entropie, il est possible d'imaginer un certain nombre de mécanismes permettant de justifier cette large contribution endothermique, en jeu dès les premières injections. On pourra, par exemple, avancer la possibilité d'un relargage ou d'un échange des molécules d'eau adsorbées sur la surface des objets en interaction, et à l'origine d'une forte signature endothermique associée à des modifications d'organisation de la bicouche (L α vs L β) et des transitions vésicules unilamellaires vers vésicules multilamellaires . Les ajustements réalisés à partir des différents modèles disponibles (1, 2 ou 3 sites) ont été réalisés. Toutefois, il ne nous est pas possible de justifier physiquement l'utilisation de ces différents modèles et par conséquent, nous ne chercherons pas à discuter les valeurs des paramètres thermodynamiques issues de ces ajustements.

5.2.5. Interaction diC16LNA-A/polyU.

Le dernier complexe qui sera développé dans le cas des interactions complémentaires étudiées par ITC est le diC16LNA-A/polyU. Rappelons que les vésicules unilamellaires à bicouche cristallisée du diC16LNA-A interagissent avec le polyU pour former une structure multilamellaire, grâce à une potentielle interaction hydrogène, qui n'a pas été clairement mise en évidence, et à un empilement π relativement faible. Le diC16LNA-A est ici à 3.5 mM et le polyU à 35 mM.



FIGURE 5.14 : Thermogramme 1 (à gauche) : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les vésicules de diC16LNA-A à 3.5 mM et le polyU à 35 mM (diC16LNA-A x polyU), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration. Thermogramme 2 (à droite) : Superposition des blancs de dilution des vésicules de diC16LNA-A à 3.5 mM (diC16LNA-A x polyU), du polyU à 35 mM (hepes x polyU, courbe verte) et de la somme des deux blancs (courbe rouge), ainsi que la courbe de Wiseman issue de l'intégration du thermogramme obtenu pour la somme des deux blancs de dilution.

Le thermogramme 1 de la FIGURE 5.14 présente les résultats de l'interaction diC16LNA-A/polyU. On remarque que le thermogramme brut est totalement compensé par la somme des blancs alors que le thermogramme soustrait n'est pas nul pour autant. Il présente une légère contribution endothermique ainsi qu'une légère contribution exothermique. Si ces deux contributions relatives tendent à évoluer au fil des injections, ou si l'une domine, même légèrement l'autre, on serait en mesure de le constater sur la courbe intégrée. Or, la courbe de Wiseman obtenue présente la totalité des points expérimentaux autour de 0. Ceci signifie donc qu'il existe probablement une interaction entre les deux espèces, mais que l'ITC ne parvient pas à en extraire un signal qui puisse être ajusté afin d'en tirer des paramètres thermodynamiques typiques.

Cependant, par comparaison avec l'article de la littérature cité plus haut ⁷², on constate que cette interaction a déjà été détectée par les auteurs, grâce à la même technique d'ITC. Bien que les conditions de concentrations soient très comparables à celles utilisées ici, Patwa et al. parviennent à mesurer un signal non négligeable pour la formation du complexe diC16LNA-A/polyU. La courbe intégrée a pu être ajustée à l'aide d'un modèle à 2 sites, présentant sur la courbe de Wiseman, une tendance de type « double vague ». Afin de comprendre l'origine de ce phénomène, nous décomposons, sur le thermogramme 2 FIGURE 5.14, la somme des deux blancs utilisés pour la soustraction. La courbe bleue représente le thermogramme relatif au blanc de dilution du lipide, le vert est relatif au blanc de dilution de l'acide nucléique, tandis que le rouge représente la somme de ces deux blancs. La courbe de Wiseman représente le signal relatif à la somme des deux blancs qui a été intégrée. L'axe des abscisses ne constitue, dans ce cas, pas une réelle échelle de ratios molaires. En effet, on comprend que les blancs de dilution sont réalisés en mélangeant une espèce avec le tampon, auquel on ne peut attacher aucune concentration. De plus, ici, il s'agit de la somme de deux signaux différents que l'on a mathématiquement ajoutés. On constate cependant que la forme particulière en « double vague », rencontrée par les auteurs du papier précédent, provient de la somme des deux blancs et non pas de l'interaction diC16LNA-A/polyU. Afin d'aller plus loin dans la compréhension de ce phénomène, nous présentons, FIGURE 5.15, les courbes relatives aux deux blancs intégrés indépendamment.



FIGURE 5.15 : Signal 1 (à gauche): Courbe de Wiseman issue de l'intégration du thermogramme obtenu pour le blanc de dilution des vésicules de diC16LNA-A à 3.5 mM (diC16LNA-A x hepes). Signal 2 (à droite) : Courbe de Wiseman issue de l'intégration du thermogramme obtenu pour le blanc de dilution du polyU à 35 mM (hepes x polyU).

Il devient alors logique que, si l'intégration du blanc de dilution du polyU donne, conformément à toute attente, un signal quasiment nul, l'intégration du blanc de dilution du diC16LNA-A permet de retrouver la forme du signal en « double vague ». Il est difficile de comprendre pourquoi, avec exactitude, la dilution des vésicules unilamellaires du diC16LNA-A ne présentent pas un signal classique, constant au fil des injections. Toujours est-il qu'une interaction particulière semble exister entre le diC16LNA-A et l'HEPES qui est injecté au sein de la cellule, alors qu'il n'est sensé s'agir que d'une simple dilution d'une dispersion de vésicules. Il est donc probable que les auteurs de l'article cité plus haut aient réalisé l'ajustement et les interprétations sur la courbe de Wiseman issue du thermogramme brut, et non soustrait.

Dans notre cas, après toute soustraction, on constate que, comme pour l'interaction diC14dA/polyU, l'interaction diC16LNA-A/polyU ne présente aucune signature enthalpique. Bien que le complexe diC14dA/polyU ne présentait pas d'empilement π , les analyses IR semblaient, cependant, mettre en évidence la présence d'une liaison hydrogène relativement forte. Concernant le complexe diC16LNA-A/polyU, aucune liaison hydrogène n'a pu être mise en évidence, mais un léger π - π stacking a été détecté, dans le CH.4, par spectroscopie UV. De manière générale, dans le cas de ces deux complexes, la présence systématique d'interactions faibles n'est pas assurée, en revanche, on vérifie pour chacun des systèmes, la présence d'au moins une des deux interactions faibles. Il est donc probable que l'interaction entre les auto-assemblages de type « A » et l'oligonucléotide complémentaire, le polyU, existe réellement, comme soulevé au sein du CH3 par l'analyse des complexes réalisée par diffraction des rayons X aux petits angles. Il est, par ailleurs, nécessaire de ne pas oublier que la mesure de l'interaction faite au sein de la cellule ITC constitue une mesure globale de l'ensemble des phénomènes ayant lieu à la suite de chaque injection. Ainsi, il est tout à fait possible que deux composantes antagonistes soient présentes au sein du système. En revanche, l'intégration du signal, globalement nulle, rend impossible toute interprétation thermodynamique de ce type d'interaction.

5.3 Interactions non complémentaires des vésicules.

5.3.1. Interaction diC14dT/polyU.

Il s'agit maintenant d'investiguer les mêmes interactions, mesurées par ITC, mais au sein des complexes analogues non complémentaires. Ayant auparavant caractérisé les interactions intermoléculaires en jeu au sein des complexes, il sera donc possible de faire une corrélation, à l'aide des complémentaires et des non complémentaires, entre le type de contribution enthalpique et les signaux et ajustements obtenus par ITC.

Le premier complexe est le diC14dT/polyU, constituant l'analogue non complémentaire du complexe de référence formé par les vésicules du diC14dT. Rappelons

qu'il a été vérifié, dans le CH.4, que les vésicules unilamellaires à bicouche fluide du diC14dT formaient de faibles interactions hydrogènes avec le polyU.



Type de modèle	Signo du signol	Jeu de paramètres 1				
	Signe du signai	N	К _а (М⁻¹)	$\Delta {\sf H}$ (cal/mol)	$\Delta {\sf S}$ (cal/mol/°C)	
1 site	Exo	2.99	3.1 .10 ²	-26	11	

FIGURE 5.16 : Thermogramme : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les vésicules de diC14dT à 4 mM et le polyU à 40 mM (diC14dT x polyU), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration et son ajustement. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

Le thermogramme obtenu, FIGURE 5.16, pour une telle interaction est le premier à présenter un signal globalement exothermique. L'intensité des pics d'injection est relativement faible, typiquement -0.25 µcal/s pour les premiers pics, et on remarque une évolution décroissante de manière très lente vers 0. La courbe de Wiseman présente également cette tendance, et peut être ajustée à l'aide d'un modèle à 1 site. Ceci permet de rendre compte d'une valeur caractéristique pour la constante d'association du système. L'ajustement par le modèle à 1 site suppose que l'interaction est particulièrement simple, puisqu'elle peut être assimilée à une interaction « modèle », et nécessite donc peu de paramètres d'ajustement d'un point de vue mathématique. Comme présenté dans le CH.3, le complexe se forme dans ce cas sans modification de l'organisation de la bicouche ou transition de phase. Les mécanismes à l'origine d'une composante entropique sont donc fortement limités ce qui peut justifier l'absence de signal endothermique dans ce cas.

5.3.2. Interaction diC14dA/polyA.

Le deuxième complexe étudié dans cette partie est le diC14dA/polyA, qui constitue l'analogue non complémentaire du complexe de référence formé par les vésicules du diC14dA avec le PolyU. Rappelons qu'il a été vérifié, dans le CH.4, que les vésicules unilamellaires à bicouche fluide du diC14dA se formaient, avec le polyA, avec une faible interaction hydrogène, sans interaction π - π stacking et avec une transition vesicules unilamellaires véricules multilamellaire.



Type de modèle	Signe du signal	Jeu de paramètres 1				
Type de modele		N1	Ka 1 (M ⁻¹)	ΔH_1 (cal/mol)	ΔS_1 (cal/mol/°C)	
3 sites séq.	Endo	/	3.2 .10 ⁵	104	26	
		Jeu de paramètres 2				
		N2	Ka 2 (M ⁻¹)	$\Delta { m H}_2$ (cal/mol)	$\Delta S_2(cal/mol/°C)$	
		/	$1.4.10^4$	230	20	
		Jeu de paramètres 3				
		N ₃	K _{a 3} (M ⁻¹)	$\Delta { m H}_3$ (cal/mol)	ΔS_3 (cal/mol/°C)	
		/	5.7 .10 ⁴	-166	21	

FIGURE 5.17 : Thermogramme : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les vésicules de diC14dA à 3 mM et le polyA à 30 mM (diC14dA x polyA), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration et son ajustement. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

On constate, FIGURE 5.17, que, non seulement, l'ITC détecte une interaction diC14dA/polyA, à en juger par le thermogramme soustrait qui présente des pics d'injection très intenses, de l'ordre de 0.75 µcal/s pour les premières injections, mais en plus, la courbe de Wiseman présente des valeurs d'enthalpie relativement élevées, typiquement de l'ordre de 100 cal par mol de polyA injecté, ce qui insiste sur la présence d'un phénomène physico-chimique en jeu suite aux injections. De plus, la présence d'un maximum vers un ratio molaire de 0.7, rappelle les complexes de type auto-assemblages « T » / polyA, exposés dans la dernière partie.

Le signal endothermique relativement intense visible sur la courbe intégrée, FIGURE 5.17, viendrait d'une composante entropique, liée par exemple, à la réorganisation des molécules de solvant autour des espèces en interaction, ou bien à la formation d'assemblages, modifiant de manière drastique l'organisation des objets et exhibant une signature entropique importante, à l'origine d'un signal essentiellement endothermique (transition vésicules unilamellaires / vésicules multilamellaires).

5.3.3. Interaction diC16dT/polyU.

Il s'agit maintenant d'appliquer la même stratégie sur le complexe noncomplémentaire du diC16dT. Rappelons qu'il a été vérifié, dans le CH.4, que les vésicules multilamellaires à bicouche gel du diC16dT ne formaient probablement aucune interaction hydrogène avec le polyU. De plus, une absence de π - π stacking a également été montrée. Observons si, sur le modèle de l'interaction similaire diC14dT/polyU précédente, l'ITC permet de réaliser l'acquisition d'un signal de même type pour l'interaction diC16dT/polyU.



Type de modèle	Cigno du cignol	Jeu de paramètres 1				
	Signe du signai	N	К а (М⁻¹)	$\Delta {\sf H}$ (cal/mol)	ΔS (cal/mol/°C)	
1 site	Exo	0.974	2.6 .10 ²	-120	11	

FIGURE 5.18 : Thermogramme : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les vésicules de diC16dT à 3 mM et le polyU à 30 mM (diC16dT x polyU), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration et son ajustement. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

Tout comme le thermogramme obtenu pour le système diC14dT/polyU, on constate, FIGURE 5.18, un signal constitué d'une seule composante exothermique, que ce soit dans le thermogramme brut ou soustrait. L'intensité des pics d'injections paraît faible, typiquement 0.35 µcal/s pour les premières injections, et donc à peu près du même type que le système analogue diC14dT/polyU. De plus, bien que la structure des objets formés par le diC14dT et le diC16dT soit différente, on constate une allure également similaire pour la courbe de Wiseman intégrée. En effet, la lente décroissance des valeurs enthalpiques négatives pour tendre vers 0 n'est pas sans rappeler l'évolution de la courbe intégrée du diC14dT/polyU. De la même manière, il est possible d'ajuster la courbe correspondante par le modèle le plus simple, à 1 site, ce qui permet de confirmer l'utilisation de ce type de modèle lorsque l'allure du signal est la plus simple possible, typiquement en forme de sigmoïde ou d'une branche de sigmoïde comme ici. Comme pour le système non complémentaire diC14dT/polyU, l'absence de transition structurale du système permet de justifier l'existence d'une seule composante de type exothermique.

5.3.4. Interaction diC16LNA-T/polyU.

Investiguons maintenant la mesure par ITC du thermogramme de l'interaction diC16LNA-T/polyU. Il s'agit du dernier complexe non complémentaire formé à partir d'un auto-assemblage à base de thymine. Rappelons qu'il a pu être vérifié, dans le CH.4, que les vésicules unilamellaires à bicouche gel du diC16LNA-T formaient une interaction hydrogène forte avec le polyU. Aucun π - π stacking n'a été mis en évidence. Enfin, aucune transition structurale (réorganisation de la bicouche ou transition uni- vers multilamellaire) n'a été observée.



Type de modèle	Signo du signal	Jeu de paramètres 1				
	Signe du signal	Ν	Ka (M ⁻¹)	$\Delta {\sf H}$ (cal/mol)	ΔS (cal/mol/°C)	
1 site	Exo	1.29	1.3.10 ³	-12	14	

FIGURE 5.19 : Thermogramme : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les vésicules de diC16LNA-T à 5 mM et le polyU à 50 mM (diC16LNA-T x polyU), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration et son ajustement. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

On constate, FIGURE 5.19, l'existence de la composante exothermique, comme c'est le cas dans les deux complexes non complémentaires analogues étudiés ci-dessus. Cependant, ici, les pics d'injection sont d'intensité très faible, typiquement 0.05 µcal/s pour les faibles ratios molaires, comme peut également l'attester le faible rapport signal/bruit visible au niveau de la ligne de base. Une fois intégré, le signal présente des points expérimentaux à des valeurs enthalpiques également très faibles. En effet, avant le début de la décroissance vers 0, les premières valeurs sont situées à environ -10 cal/mol de polyU injecté. Concernant la tendance décroissante de la courbe de Wiseman vers 0, on peut réaliser un ajustement par le modèle simple à 1 site. Ceci permet d'insister sur le fait que, puisque très peu de paramètres d'ajustement sont nécessaires afin d'effectuer un ajustement convenable qui rend globalement compte de la tendance de la courbe intégrée, l'interaction diC16LNA-T/polyU, qui existe tout de même du fait que le signal soustrait soit non nul, est probablement simple à décrire.

Ainsi, tout comme les systèmes analogues du diC14dT/polyU et du diC16dT/polyU, il est intéressant de constater que le complexe diC16LNA-T/polyU présente, FIGURE 5.19, un signal soustrait exothermique. De manière générale pour ces systèmes, l'intensité des pics d'injection dépend du type de complexe considéré. Cependant, une constante est que le signal intégré est toujours relativement simple, et peut-être associé à une simple décroissance vers 0 assimilable à une branche de sigmoïde. Le recours systématique à un modèle à 1 site permet d'affirmer que l'interaction en jeu dans ces types de systèmes est « simple » à décrire. De plus, les CH.3 et CH.4 nous ont appris que dans ces 3 cas, il n'y a pas de réorganisation structurale du système lors de la formation du complexe. Cette observation permet d'expliquer l'absence d'une composante endothermique sur le signal ITC.

5.3.5. Interaction diC16LNA-A/polyA.

Le dernier système à être abordé est maintenant le diC16LNA-A/polyA. Il est important de se rappeler qu'un des points essentiels montrés par le CH.4 était que les vésicules unilamellaires à bicouche cristallisée du diC16LNA-A interagissait avec le polyA avec une éventuelle interaction hydrogène, qui n'a pas pu être mise en évidence, mais surtout avec un π - π stacking extrêmement intense. Pour ce type de système, permettant d'illustrer les complexes qui sont essentiellement formés sur la base d'un empilement π , il est intéressant d'observer la nature du thermogramme soustrait issu de la mesure, ainsi que de la courbe de Wiseman. Leurs allures respectives seront certainement utiles au bilan qui sera dressé, dans la conclusion générale, du lien entre la caractérisation des interactions faibles et l'analyse du signal acquis par la technique d'ITC.



Type de modèle	Signe du signal	Jeu de paramètres 1				
		N1	Ka 1 (M ⁻¹)	ΔH_1 (cal/mol)	ΔS_1 (cal/mol/°C)	
2 sites ind.	Endo	0.169	4.8 .10 ³	142	20	
		Jeu de paramètres 2				
		N2	Ka 2 (M ⁻¹)	$\Delta {\sf H}_2$ (cal/mol)	ΔS_2 (cal/mol/°C)	
		2.61	1.8 .10 ²	286	10	

FIGURE 5.20 : Thermogramme : Thermogramme ITC (brut : courbe verte, somme des blancs : courbe bleue, soustrait : courbe rouge) obtenu pour l'interaction entre les vésicules de diC16LNA-A à 3.5 mM et le polyA à 35 mM (diC16LNA-A x polyA), ainsi que la courbe de Wiseman issue de son intégration et son ajustement. Tableau : Paramètres issus de l'ajustement.

Les thermogrammes brut et soustrait présentent, FIGURE 5.20, un signal très intense et endothermique. A titre d'exemple, la courbe rouge présente des pics d'injections de l'ordre de 1 µcal/s, pour les premières injections, même si l'intensité des pics ne subit pas d'évolution radicale au cours de l'acquisition. On retrouve ce point lorsque l'on observe la courbe de Wiseman intégrée, qui présente une forme caractéristique en cloche, comme il a déjà été observé chez les complexes complémentaires C14dT/polyA, diC14dT/polyA, diC16dT/polyA et diC16LNA-T/polyA. Les valeurs élevées de la courbe intégrée nous renseignent sur le fait que l'interaction diC16LNA-A/polyA implique un échange énergétique important, de l'ordre de 160 cal/mol de polyA injecté, pour les premières injections. On constate, en plus, que la lente décroissance vers 0 et que les valeurs enthalpiques élevées vont impliquer que les injections induisent toujours la création de phénomènes physico-chimiques entre les vésicules de diC16LNA-A et le polyA, et ce, même à la fin de l'acquisition. Ce signal caractéristique, présentant un maximum, a été ajusté à l'aide d'un modèle à 2 sites indépendants, comme déjà observé pour certaines courbes de Wiseman présentant la même allure « en cloche ».

5.4 Conclusion générale.

De manière générale, un point essentiel du travail effectué dans le CH.5 repose sur le fait que les interactions mesurées en ITC résultent d'une mesure globale de la chaleur impliquée dans l'ensemble des évènements physico-chimiques conjoints à chaque injection. En conséquence, la mesure d'un signal nul ne signifie pas nécessairement une absence d'interaction.

Afin d'aller plus loin dans l'interprétation des signaux relatifs à chaque système, il faut distinguer les phénomènes enthalpiques, qui constituent une interaction bien définie et localisée, tels que les interactions hydrogène, des phénomènes entropiques, qui représentent des mécanismes d'interaction plus globaux, pouvant inclure un groupement entier, comme par exemple le π - π stacking. Les mécanismes entropiques incluent également l'ensemble des phénomènes faisant intervenir des réorganisations, des modifications structurales, ou même le relargage de molécules d'eau adsorbées sur la surface d'objets

colloïdaux. Il est connu qu'une interaction bien localisée, tout comme l'ensemble des liaisons covalentes, nécessite une libération de chaleur afin d'être formée. Il s'agit donc d'un mécanisme exothermique. En revanche, tous les phénomènes impliquant davantage des évènements à l'origine d'une modification de l'entropie du système sont, en règle générale, caractérisés par un captage de chaleur. La liste des mécanismes d'origine entropique ne saurait être dressée de manière exhaustive. Il existe, en effet, un bon nombre d'évènements pourtant associés à la formation d'une interaction, mais dont l'échange et la réorganisation simultanée des molécules de solvant, par exemple, rend le processus globalement entropique plutôt qu'enthalpique.

Parmi l'ensemble des courbes intégrées dans le cas des systèmes étudiés, trois cas généraux sont à distinguer. Premièrement, on trouve le cas d'une courbe de Wiseman présentant une tendance caractéristique en forme de cloche. Cette allure exhibe la présence d'un maximum, à un ratio molaire qui dépend du type de système considéré, et montre des points expérimentaux à des enthalpies caractéristiques pouvant monter à des valeurs particulièrement importantes, comme pour les complexes diC16dT/polyA, diC16LNA-T/polyA et diC14dA/polyA. L'ensemble des complexes formés avec le polyA (dA/polyA et dT/polyA) présentent une courbe en forme de cloche. D'après la caractérisation des interactions, dans le CH.4, permettant d'expliquer la cohésion de ces complexes, il paraît difficile de justifier un lien entre ces systèmes. Les différentes liaisons faibles identifiées dans le CHAP.4 pourraient constituer la contribution exothermique à l'origine du signal. Par ailleurs, il semble exister, avec ce type de système, une importance très forte de la contribution entropique. L'origine peut être multiple, mais le fait que le signal soit systématiquement endothermique montre que cet effet domine les phénomènes enthalpiques. Comme avancé précédemment, il pourrait s'agir d'un relargage des molécules de solvant, ou d'une réorganisation partielle ou globale du système sous la forme d'une réorganisation de la bicouche ou d'une transition de phase vésicules unilamellaires vers vésicules multilamellaires comme cela a été démontré pour l'ensemble de ces complexes dans le CH.3.

Par comparaison avec ce type de système, on observe le cas où les complexes présentent une signature enthalpique relativement faible sur la courbe intégrée, typiquement pas plus que -50 cal/mol d'injectant. Le signal semble alors systématiquement exothermique. Il s'agit essentiellement des systèmes non complémentaires entre des lipides dT et le polyU: diC14dT/polyU, diC16dT/polyU et diC16LNA-T/polyU. L'interaction faible mise en jeu semble relativement modérée du point de vue de la spectroscopie. D'autre part, pour l'ensemble de ces systèmes, il a pu être démontré dans le CH.3 que les mécanismes de formation n'étaient pas associés à des changements structuraux. Ainsi, le signal, déjà faiblement exothermique en raison de la présence d'une interaction faible avec le partenaire, ne verra donc pas l'enthalpie de ses points expérimentaux augmenter, en raison d'une absence d'une composante entropique. Dans ce cas, et contrairement aux cas précédents mettant en évidence des courbes en forme de cloche, les mécanismes de formation semblent être gouvernés par l'enthalpie. On observe aussi que dans ces cas, l'ajustement peut être réalisé de manière aisée à l'aide d'un modèle simple, tel que le modèle à 1 site. Il apparait raisonnable, dans ce cas simple, de commenter la valeur de la constante d'association. Comme attendue, elle est faible et de l'ordre de 10² M⁻¹ pour les 3 systèmes concernés.

Enfin, le troisième cas observé concerne les complexes complémentaires dA/polyU. De manière générale, dans le cas de ces systèmes, la courbe de Wiseman ne présente aucun signal. Les résultats obtenus dans les chapitres 3 et 4 nous ont pourtant montré la présence systématique d'interactions faibles et de fortes réorganisations structurales. Il s'agit en effet des deux mécanismes de formation les plus compliqués avec une succession d'étapes permettant la formation de vésicules multilamellaires concentrées en polyU par des interactions fortes entre les bicouches décorées. Comme indiqué à plusieurs reprises, Il est nécessaire de ne pas oublier que la mesure de l'interaction faite au sein de la cellule ITC constitue une mesure globale de l'ensemble des phénomènes ayant lieu à la suite de chaque injection. Ainsi, il est tout à fait possible que plusieurs composantes antagonistes soient présentes au sein du système. En revanche, l'intégration du signal, globalement nulle, rend impossible toute interprétation thermodynamique de ce type de complexes.

Conclusion

L'étude des propriétés morphologiques et structurales nous a permis de montrer que la nature chimique des molécules amphiphiles oriente la formation de différentes morphologies de type fibre ou vésicule (uni ou multilamellaires) en fonction du caractère mono ou bicaténaire respectivement. De façon attendue et déjà décrite dans la littérature, la longueur de la chaine influence l'organisation bidimensionnelle de la bicouche avec des états gels pour des longues chaines et des états fluides pour des courtes chaines. A longueur de chaine équivalente, le blocage de la partie polaire permet de renforcer l'organisation dans la bicouche. La morphologie et la structure des complexes formés par l'ajout d'un acide nucléique complémentaire ou non ont également été étudiées. De façon remarquable, nous avons pu mettre en évidence l'asymétrie de la bicouche lors de la formation du complexe par l'utilisation d'un modèle approprié et développé par Nallet et al dans le cadre de cette étude. L'analyse des paramètres issus de l'ajustement nous a permis de proposer deux mécanismes de formation des complexes en fonction de la nature chimique du nucléolipide. Dans le cas des nucléolipides avec la base azotée adénine, les complexes sont systématiquement de symétrie multilamellaire avec un mécanisme de complexation permettant l'encapsulation du polynucléotide complémentaire ou non. Nous avons fait l'hypothèse que la périodicité de ces complexes dépend de la compétition entre les interactions attractives et répulsives mises en jeu entre les bicouches décorées par les polynucléotides. Ces interactions sont susceptibles de stabiliser un caractère multilamellaire confiné lorsque les interactions attractives sont fortes ou un caractère multilamellaire dilué lorsque les interactions attractives entre bicouches sont plus faibles. Afin de confirmer cette hypothèse, une étude des propriétés des bicouches dans la phase lamellaire devrait être réalisée. Dans le cas des nucléolipides avec la base azotée thymine, les interactions permettent la formation de vésicules décorées par les polynucléotides sur la monocouche externe de la bicouche. De façon générale, les interactions entre bases azotées complémentaires sont plus fortes qu'entre même bases azotées. Toutefois, il est important de noter que ces résultats indiquent clairement que les interactions ne sont pas « symétriques ».

Les études réalisées par spectroscopies infra rouge et UV ont permis de mettre en évidence, sans ambigüité, le fort potentiel des lipides nucléotides à former des interactions intermoléculaires entre les têtes polaires dans les assemblages supramoléculaires au sein même de la bicouche. Nous n'avons pas été en mesure de quantifier les interactions mais une étude comparative entre les différents systèmes permet de les classer en termes de force d'interaction. Ainsi, il apparait de façon remarquable une forte corrélation entre la force des interactions intermoléculaires et l'organisation bidimensionnelle de la bicouche. Plus les interactions sont nombreuses et plus l'ordre dans la bicouche est important $(K>L_{\beta}>I_{\alpha})$. Les systèmes fortement organisés présentent préférentiellement des interactions hydrogènes, plus directionnelles que les interactions de type empilement π . L'adénine, plus fortement aromatique par rapport à la thymine, favorise les interactions de type empilement π . Enfin, les systèmes bloqués (type LNA) favorisent fortement l'existence d'interactions faibles de type liaison hydrogène.

Des interactions « supramoléculaires » entre l'objet et l'acide nucléique ont également été mise en évidence. Dans la grande majorité des cas, ces interactions reposent sur des liaisons hydrogènes. Elles apparaissent d'autant plus fortes qu'il s'agit de l'interaction complémentaires. Enfin, le système bloqué, apparait le plus efficace pour former des interactions faibles avec le polynucléotide.

Les études des propriétés thermodynamiques nous ont permis de mettre en évidence trois cas généraux correspondant à trois courbes de Wiseman caractéristiques. De façon surprenante, le signal est nul pour les complexes complémentaires dA/polyU alors qu'il a été établi sans ambigüité une forte interaction entre les objets et les acides nucléiques complémentaires. Ce résultat met en évidence la limite de la technique ITC pour l'analyse des systèmes complexes dans lesquels un nombre important de composantes enthalpiques et entropiques existent dans le mécanisme de formation. La mesure de l'interaction faite au sein de la cellule ITC constitue une mesure globale de l'ensemble des phénomènes ayant lieu à la suite de chaque injection. Ainsi, il est tout à fait possible que plusieurs composantes antagonistes soient présentes au sein du système. En revanche, l'intégration du signal, globalement nulle, rend impossible toute interprétation thermodynamique de ce type de complexes. Un second cas apparait pour l'ensemble des complexes impliqués avec le polyA. Le signal est alors globalement de type endothermique avec une forme de courbe Wiseman complexe en forme de cloche. Il n'a pas été possible de proposer un modèle physiquement acceptable afin d'extraire les paramètres thermodynamiques. Toutefois, les composantes entropiques (endothermiques) et liées à de fortes réorganisation du système (molécules de solvant, bicouche, transition) dominent largement les composantes enthalpiques liées à la présence des interactions faibles supramoléculaires de type liaison hydrogène. Enfin, un troisième cas correspond aux systèmes non complémentaires formés par les lipides portant une base thymine. Un signal global exothermique vient dans ces cas confirmer l'existence de liaisons hydrogènes et l'absence de fortes composantes entropiques confirmant que le mécanisme de formation n'engendre pas de réorganisation structurales du système. Dans ce cas, il est alors possible d'utiliser un modèle simple afin d'extraire les paramètres thermodynamiques du système.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de mieux comprendre les propriétés de ces systèmes complexes et a mis en évidence la nécessité de coupler les différentes études afin d'être en mesure de proposer des mécanismes de formation pertinents. La technique de diffraction des rayons X aux petits angles c'est avérée une technique importante et nous avons pu proposer un modèle permettant l'analyse quantitative des systèmes. Le modèle de la bicouche asymétrique, développé dans le cadre de cette thèse, nous semble être un outil performant pour mettre en évidence la formation de complexes mettant en jeu l'interaction

entre des bicouches et des partenaires susceptibles de s'associer à cette bicouche. Il serait intéressant de poursuivre ce travail en testant différents systèmes. Les limitations de la technique d'ITC ont été décrites. Il apparait que les systèmes mettant en jeu un mécanisme de formation très complexes ne peuvent pas être décrits « simplement » par les modèles disponibles aujourd'hui. Certaines questions scientifiques restent ouvertes et demanderaient des études complémentaires. La force des interactions entre les bicouches décorées par les brins de polynucléotides pourrait être mesurée par l'étude de la phase lamellaire. Ces études pourraient apporter des éléments nouveaux pour comprendre pourquoi il est possible de former des systèmes multilamellaires très concentrés (périodicité lamellaire de l'ordre de 6nm) ou très dilués (périodicité lamellaire de l'ordre de 20nm). L'ouverture, par choc osmotique, des vésicules portant la base adénine reste une hypothèse. Il pourrait être intéressant de réaliser des expériences à l'interface air-eau afin de mesurer la pression de surface obtenue par les différents lipides nucléotides.

Bibliographie.

- ² F. Hofmeister, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 24, 247-260, 1888
- ³ C. Tanford, Science, 200 (4375), 1012-1018, 1978
- ⁴ E. Sackmann, Handbook of Biological Physics, 1 (5), 213-303, 1995
- ⁵ J.N. Israelachvili et al., J. Chem. Soc. Faraday Trans 2, 72, 1525-1568, 1976
- ⁶ J.N. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces, New York Academic Press, 1992
- ⁷ L.S. Romsted, Surfactant Science and Technology, Retrospects and Prospects, CRC Press, 2014
- ⁸ O. Lehmann, Über flissende Krystalle, Zeitschrift für Physikalische Chemie, 4, 462-472, 1889
- ⁹ P.G. de Gennes, J. Prost, The Physics of Liquid Crystals, Clarendon, Oxford, 1993
- ¹⁰ Y. Kagawa, T. Hatakeyama, Journal of Sound and Vibration, 53 (4), 1977
- ¹¹ Y. Haseba, Advanced Materials, 17 (19), 2311-2315, 2005
- ¹² G. Annoscia, Encyclopédie thématique « Encyclopaedia Universalis », Promotion Presse Mediasat., 2004
- ¹³ F. Crick, J. Watson, Nature, 171, 737, 1953
- ¹⁴ C. Fonseca Guerra et al., J. Am. Chem. Soc., 122 (17), 4117-4128, 2000
- ¹⁵ A. Müller et al., J. Am. Chem. Soc., 124 (48), 14486-14494, 2002
- ¹⁶ M. Fathalla et al., Chem. Soc. Rev., 38, 1608-1620, 2009
- ¹⁷ L. Moreau et al., J. Am. Chem. Soc., 130 (44), 14454-14455, 2008
- ¹⁸ J. Sponer et al., J. Biomol. Struct. Dyn., 17, Suppl 1, 1-24, 2000
- ¹⁹ C. Dagneaux et al., Biochemistry, 34 (45), 14815-14818, 1995
- ²⁰ G. Zandomeneghi et al., Helvetica Chimica Acta, 84 (12), 3710-3725, 2001
- ²¹ J. Duchesne, Advances in Chemical Physics, Structure & Properties of Biomolecules, CH.12, 445-446
- ²² C.S. Peng et al., J. Am. Chem. Soc., 133 (39), 15650-15660, 2011
- ²³ F.S. Parker, Applications of Infrared, Raman and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry, CH.9, 356, 1983
- ²⁴ V. Allain et al., Nucleic Acids Research, 40 (5), 1891-1903, 2012
- ²⁵ H. Rosemeyer, Review, Chemistry & Biodiversity, Vol. 2, 2005
- ²⁶ P. Barthélémy, C. R. Chimie, 12 (1-2), 171-179, 2009
- ²⁷ P. Chabaud et al., Bioconjug. Chem., 17 (2), 466-472, 2006
- ²⁸ P.L. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 (21), 7413-7417, 1987
- ²⁹ H.W. Yang et al., Org. Biomol. Chem., 9 (1), 291-296, 2011
- ³⁰ C. Ceballos et al., Bioconjug. Chem., 20 (2), 193-196, 2009
- ³¹ F. Cuomo et al., Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, 82 (2), 277-282, 2011
- ³² L. Moreau et al., Mol. BioSyst., 1 (3), 260-264, 2005
- ³³ C. Ceballos et al., Bioconjug. Chem., 21 (6), 1062-1069, 2010
- ³⁴ Y. Perrie et al., Journal of Liposome, 1-11, 2009
- ³⁵ M. Morille et al., Biomaterials, 29 (24-25), 3477-3496, 2008
- ³⁶ W. Li, F.C. Jr. Szoka, Pharm. Res., 24 (3), 438-449, 2007
- ³⁷ J. Rädler et al., Langmuir, 14 (23), 6620-6624, 1998
- ³⁸ D. Berti et al., J. Phys. Chem. B, 111 (40), 11734-11744, 2007
- ³⁹ D. Berti et al., J. Phys. Chem. B, 103 (10), 1738-1745, 1999
- ⁴⁰ D. Berti et al., Langmuir, 13 (13), 3438-3444, 1997
- ⁴¹ B. Desbat et al., Langmuir, 28 (17), 6816-6825, 2012
- ⁴² N. Campins et al., New J. Chem., 31, 1928-1934, 2007
- ⁴³ M. Banchelli et al., Angew. Chem. Int. Ed., 46 (17), 3070-3073, 2007
- ⁴⁴ F. Baldelli Bombelli et al., J. Phys. Chem. B, 108 (42), 16427-16434, 2004
- ⁴⁵ F. Baldelli Bombelli et al., J. Phys. Chem. B, 110 (35), 17627-17637, 2006
- ⁴⁶ P. Baglioni, D. Berti, Current Opinion in Colloid and Interface Science, 8 (1), 55-61, 2003
- ⁴⁷ H. Yanagawa et al., J. Am. Chem. Soc., 111 (13), 4567-4570, 1989
- ⁴⁸ D. Berti et al., J. Phys. Chem. B, 102 (1), 303-308, 1998
- ⁴⁹ D. Berti et al., Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects, 167 (1-2), 95-103, 2000

¹ H.R. Christen, Chemie, Sauerländer, 1984

- ⁵⁰ G. Tonelli et al., Langmuir, 29 (18), 5547-5555, 2013
- ⁵¹ K.K. Jensen et al., Biochemistry, 36 (16), 5072-5077, 1997
- ⁵² P.C. Dave et al., Biophys. J., 89 (4), 2434-2442, 2005
- 53 W.B. Turnbull, A.H. Daranas, J. Am. Chem. Soc., 125 (48), 14859-14886, 2003
- ⁵⁴ M.J. Todd, J. Gomez, Analytical Biochemistry, 296 (2), 179-187, 2001
- ⁵⁵ N.J. Buurma, I. Haq, Methods, 42 (2), 162-172, 2007
- ⁵⁶ N. Varghese et al., Chem. Phys. Chem., 10 (1), 206-210, 2009
- ⁵⁷ E. Pozharski, R.C. MacDonald, Biophysical Journal, 85 (6), 3969-3978, 2003
- ⁵⁸ E. Feitosa et al., Chemistry and Physics of Lipids, 105 (2), 201-213, 2000
- ⁵⁹ M.T. Kennedy et al., Biophys. J., 78, 1620-1633, 2000
- 60 B.A. Lobo et al., Arch. Biochem. Biophys., 386, 95-105, 2001
- ⁶¹ V. Pector et al., J. Biol. Chem., 275, 29533-29538, 2000
- ⁶² E. Pozharski, R.C. MacDonald, Biophysical. Journal, 83 (1), 556-565, 2002
- 63 C.H. Spink, J.B. Chaires, J. Am. Chem. Soc., 119, 10920-10928, 1997
- ⁶⁴ R. Zantl et al., J. Phys. Chem. B, 103, 10300-10310, 1999
- ⁶⁵ A.L. Feig, Methods in Enzymol., 468 (19), 409-422, 2009
- ⁶⁶ A. Thanassoulas et al., J. Phys. Chem. B, 118 (24), 6570, 2014
- ⁶⁷ S. Khiati et al., Bioconjug. Chem., 20 (9), 1765-1772, 2009
- ⁶⁸ E. Kissa, Surfactant Science Series, Vol.84, Dispersions : Caracterization, Testing and Measurement
- ⁶⁹ F. Nallet et al., J. Phys. II France, 3, 487-502, 1993
- ⁷⁰ C.L.P. Oliveira et al., J. Appl. Cryst., 45, 1278-1286, 2012
- ⁷¹ T. Wiseman et al., Analytical Biochemistry, 179 (1), 131-137, 1989
- ⁷² A. Patwa et al., Org. Biomol. Chem., 11, 7108-7112, 2013