



HAL
open science

Fluctuations et interactions en situation de nano-confinement anisotrope

Kévin Bougis

► **To cite this version:**

Kévin Bougis. Fluctuations et interactions en situation de nano-confinement anisotrope. Autre [cond-mat.other]. Université de Bordeaux; Universidade de São Paulo (Brésil), 2016. Français. NNT: 2016BORD0060 . tel-01467066

HAL Id: tel-01467066

<https://theses.hal.science/tel-01467066>

Submitted on 14 Feb 2017

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 EN COTUTELLE
présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
&
DE L'UNIVERSITÉ DE SÃO PAULO
Spécialité : Lasers, Matière, Nanosciences

FLUCTUATIONS ET INTERACTIONS EN
SITUATION DE NANO-CONFINEMENT
ANISOTROPE

BOUGIS Kévin

Soutenue publiquement le 28/11/2016 devant un jury composé de :

<i>Rapporteurs</i>	M. CONSTANTIN Doru	Univ. Paris-Sud
	M. LIGOURE Christian	Univ. Montpellier
<i>Présidente</i>	M ^{me} ZAKRI Cécile	Univ. de Bordeaux
<i>Directeur de thèse</i>	M ^{me} A. de OLIVEIRA Elisabeth	Univ. de São Paulo

Membres invités :

<i>Co-directeurs de thèse</i>	M. NALLET Frédéric	Univ. de Bordeaux
	M ^{me} NAVAILLES Laurence	Univ. de Bordeaux



Thèse réalisée au Centre de Recherche Paul Pascal, CNRS, UPR 8641
115 avenue du Dr Albert Schweitzer
33600 Pessac cedex, France

et à l' Instituto de Física da USP
Rua do Matão, n. 187
05508-090, São Paulo, Brasil

Web : <http://www.crpp-bordeaux.cnrs.fr/>

Web : <http://portal.if.usp.br/ifusp/>

Web : <https://www.u-bordeaux.fr/>

Sous la direction de Frédéric Nallet nallet@crpp-bordeaux.cnrs.fr
Elisabeth Andreoli de Oliveira andreoli@if.usp.br
Laurence Navailles navailles@crpp-bordeaux.cnrs.fr

Financement IdEx Bordeaux, Doctorat International

Résumé

La structure et les interactions qui stabilisent des empilements lamellaires lyotropes de bicouches lipidiques dans leur état fluide sont principalement étudiées par diffusion de rayons X aux petits angles. Les bicouches "poilues" (et dépourvues de charge électrique) sont composées d'un mélange en diverses proportions de lécithine, un phospholipide zwitterionique, et de Simulsol, un co-tensioactif éthoxylé non ionique similaire à un (court) copolymère dibloc. Ces empilements lamellaires sont utilisés comme matrices hôtes afin de confiner et d'encapsuler des nano-bâtonnets d'ADN qui s'auto-assemblent en différentes structures en fonction du confinement appliqué [26, 22]. L'objectif fixé est de comprendre l'origine des mécanismes qui sont responsables de la formation de ces assemblages supramoléculaires non régis par des interactions électrostatiques. Dans ce but, on s'intéresse aux mécanismes entropiques et interfaciaux qui sont reliés à l'élasticité membranaire et à des interactions plus spécifiques intervenant aux interfaces bicouche-bicouche ou ADN-bicouche. L'approche expérimentale consiste à modifier différents paramètres physico-chimiques de la matrice hôte tels que l'hydratation du système, la nature chimique du co-tensioactif (blocs hydrophobe ou hydrophile) et la teneur en co-tensioactif au sein de la membrane. Le co-tensioactif a ainsi un rôle clé pour modifier les deux mécanismes en perturbant notamment le caractère "lié" ou "non lié" des systèmes lamellaires en haute dilution. Un modèle thermodynamique est utilisé afin d'interpréter la décroissance exponentielle "classique" observée dans des profils de pression osmotique, lorsque l'hydratation est augmentée, sans faire appel à la force "d'hydratation" [122]. Une transition structurale est mise en évidence, à faible hydratation, entre deux phases lamellaires "liées". Le changement structural de la bicouche est discuté grâce à un couplage entre confinements latéral et vertical en analogie avec la fameuse transition "brosse-champignon" induit par un confinement latéral, pertinente pour de longs polymères linéaires greffés sur des surfaces rigides [10]. La caractérisation de la matrice lamellaire hôte autorise finalement une description des organisations des bâtonnets d'ADN qui semblent directement corrélées aux propriétés physiques des bicouches, ouvrant ainsi quelques perspectives pour leur encapsulation au sein "d'ogons".

Mots clés : phase lamellaire, diffusion de rayons X, transition de décrochage, interactions interfaciales, ADN, confinement, transition de phase.

**Interactions and fluctuations under
anisotropic nano-confinement
conditions**

Abstract

Structure and interactions stabilizing the lyotropic lamellar stack of mixed lipid bilayers in their fluid state are mainly investigated by means of small-angle X-ray scattering. The (electrically-neutral) "hairy" bilayers are composed of a mixture in various proportions of lecithin, a zwitterionic phospholipid (by itself and as a natural extract, already a mixture), and Simulsol, an ethoxylated non-ionic cosurfactant (with also some dispersity, owing to its industrial origin) similar to a (short) diblock copolymer. The lamellar stacks are used as hosts to confine and encapsulate DNA nanorod guests which self-organize into different structures depending on the confinement [26, 22]. The challenge here is to understand the mechanisms responsible for the formation of such supramolecular assemblies which are not based on electrostatic interactions. In this aim, we are interested in entropic and interfacial mechanisms, that is to say mechanisms related to membrane elasticity (and therefore, membrane fluctuations) and to specific interactions occurring at the bilayer-bilayer or bilayer-DNA interfaces. The experimental approach consists in varying different physical-chemical parameters of the host such as hydration of the system, chemical nature of cosurfactant (regarding both hydrophobic and hydrophilic blocks) and the cosurfactant content inside the lipid membrane. The cosurfactant added plays a key role in modifying both mechanisms, changing in particular the "bound" or "unbound" character of the water-swollen systems. A thermodynamic model is used for interpreting the "classical" exponential decay obtained in osmotic pressure profiles as a function of hydration, without resorting to "hydration forces" [122]. A structural transition between two different "bound" lamellar phases is brought out at low hydration. The bilayer structural changes are discussed as resulting from a coupling between lateral and vertical confinements, somehow in analogy with the so-called "brush-to-mushroom" transition induced by lateral confinement, relevant for long linear polymers grafted onto rigid surfaces [10]. The lamellar host characterization finally allows a description of the DNA nanorods organizations which seem to be directly correlated to the physical properties of the bilayers, opening some perspectives for the encapsulation inside "onions".

Keywords: lamellar phase, X-ray scattering, "unbinding" transition, interfacial interactions, DNA, confinement, phase transition.

Flutuações e interações em situação de nano-confinamento anisotrópico

Resumo

A estrutura e as interações, que estabilizam os empilhamentos lamelares liotrópicos das membranas lipídicas em seu estado fluido, são estudadas principalmente por espalhamento de raios-x a baixos ângulos. As membranas “peludas” (eletricamente neutras) são compostas de uma mistura em diversas proporções de lecitina, um fosfolipídio zwitteriônico, e de simulsol, um cotensoativo etoxilado não iônico similar a um copolímero dibloco (curto). Esses empilhamentos lamelares são utilizados como matrizes hospedeiras, com o intuito de confinar e de encapsular nanobastões de DNA que se auto organizam em diferentes estruturas, em função do confinamento aplicado [26, 22]. O objetivo fixado é de compreender a origem dos mecanismos responsáveis pela formação dessas organizações supramoleculares, não regidas pelas interações eletrostáticas. Dessa forma, nos interessamos aos mecanismos entrópicos e interfaciais, que são ligados à elasticidade membranar e às interações mais específicas que intervêm nas interfaces membrana-membrana ou DNA-membrana. A abordagem experimental consiste em modificar os diferentes parâmetros físico-químicos da matriz hospedeira, como a hidratação do sistema, a natureza química do cotensoativo (blocos hidrofóbicos e/ou hidrofílicos) e a proporção de cotensoativo no interior da membrana. O cotensoativo tem então uma função chave para modificar os dois mecanismos, perturbando o estado “ligado” ou “não-ligado” em sistemas lamelares altamente diluídos. Um modelo termodinâmico é utilizado para interpretar o decréscimo exponencial “clássico” observado para os perfis de pressão osmótica, quando se aumenta a hidratação, sem utilizar a “força de hidratação” [122]. Uma transição estrutural é evidenciada, à baixa hidratação, entre duas fases lamelares “ligadas”. A mudança estrutural da membrana é discutida graças ao acoplamento entre confinamento lateral e vertical, em analogia à conhecida transição “escova-cogumelo” induzida pelo confinamento lateral, relevante para longos polímeros lineares funcionalizados em superfícies rígidas [10]. A caracterização da matriz lamelar hospedeira permite, finalmente, uma descrição das organizações dos bastões de DNA que parecem diretamente correlacionados com as propriedades físicas das membranas, deixando, então, algumas perspectivas para sua encapsulação no interior de estruturas semelhantes a “cebolas”.

Palavras-chave: fase lamelar, espalhamento de raios-X, transição de desligamento, interações interfaciais, DNA, confinamento, transição de fase.

Remerciements

Ce projet de thèse s'est effectué sous la cotutelle des Universités de Bordeaux (France) et de São Paulo (Brésil). Plus particulièrement, ce projet s'est effectué, d'une part, au centre de recherche Paul-Pascal (CRPP) au sein de l'équipe « Matière Molle Structure et Dynamique » (M2SD) et d'autre part, à l'Institut de Physique de l'Université de São Paulo au sein de l'équipe « Grupo de Fluidos Complexos » (GFCx). Au vu de cette collaboration internationale, le nombre de personnes qui ont contribué directement ou indirectement à l'achèvement de cette thèse est nécessairement important. Je tiens donc à tous les en remercier.

Je remercie l'initiative d'excellence de l'Université de Bordeaux (IdEx) pour le financement de sa bourse doctorale « Doctorat international IdEx Bordeaux 2013 » qui a permis non seulement de financer cette thèse mais aussi de donner une grande souplesse à l'environnement de ce projet. Je remercie également l'entreprise SEPPIC qui, dans le cadre d'une collaboration, nous a fourni gracieusement les co-tensioactifs Simulsol, de nature chimique distincte, permettant ainsi d'enrichir pleinement l'étude physico-chimique de nos systèmes. Je remercie aussi le CNRS qui m'a accueilli au sein du CRPP pour effectuer la majeure partie de ces travaux.

Plus précisément, j'aimerais remercier de manière concrète certaines personnes à travers ces quelques pages. Tout d'abord, je remercie Doru Constantin et Christian Ligoure qui ont accepté de lire ces nombreuses pages de manuscrit et d'évaluer mon travail de thèse à travers leur rapport et leurs questions. Ils ont su apporter un regard critique pertinent et bienveillant à l'ensemble de ce travail. De mon point de vue, il est important d'être confronté à une telle démarche scientifique afin d'en retenir une vraie satisfaction personnelle. Je remercie également Cécile Zakri pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, malgré une promotion de thésards importante, et pour sa personnalité accueillante et bienveillante. Je remercie, de plus, Philippe Richetti et Cécile Zakri qui m'ont accueilli successivement au sein de leur laboratoire durant ma thèse.

Je remercie bien respectueusement mes trois directeurs de thèse Elisabeth Andreoli de Oliveira, Laurence Navailles et Frédéric Nallet. Je remercie aussi Kévin Bougis qui a su démontrer une grande motivation pour réussir à supporter ses trois directeurs durant ces trois années et j'espère qu'ils lui pardonneront ce trait d'humour déficient et totalement infondé. Au cours de cette longue période de thèse, c'est avec beaucoup de chance que

j'ai découvert une « seconde famille » et il me faudrait réécrire un second manuscrit, ce que rassurez-vous je ne ferai pas, pour détailler les qualités humaines, scientifiques et pédagogiques dont ils font preuve au quotidien. Je remercie Elisabeth pour s'être impliquée fortement dans mon accueil au Brésil dans les meilleures conditions au cours de ces trois années et dans mon travail de thèse, notamment par ses nombreuses idées apportées lors de nos discussions, et je sais qu'elle aurait aimé y participer encore davantage. Je la remercie d'autant plus pour ses conseils, son optimisme naturel, sa personnalité chaleureuse et bienveillante à mon égard et pour m'avoir fait découvrir la vie et la culture brésilienne qui resteront des souvenirs gravés dans ma mémoire. Je remercie Laurence pour son investissement fort dans le cadre de cette thèse, du montage du projet jusqu'à son terme. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir accordé sa confiance sur ce projet depuis mon arrivée en stage de deuxième année de master et d'autant plus pour avoir toléré les réunions de bureau excessives. Elle possède un certain talent et surtout l'intelligence pour instaurer une bonne ambiance constructive de travail afin de favoriser les échanges scientifiques et l'apprentissage des étudiants ce qui apparaît comme nécessaire pour enrichir la qualité du travail individuel et du travail commun. Je crois qu'une personne grandit dès lors qu'elle apprend via des réflexions personnelles ou qu'elle s'inspire des qualités des personnes qui l'entourent : je peux dire que Laurence m'a fait grandir durant cette période de thèse et je la remercie grandement. Je remercie Frédéric pour avoir fait avancer ce projet à pas de géant par ses interventions directes ou tout simplement par ce que j'ai pu apprendre grâce à lui. En plus d'être un humoriste humble, il incarne le scientifique dont chacun devrait s'inspirer tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Il sera toujours pour moi une référence incontestable et je sais que ce sentiment semble partagé par tous ceux qui ont eu le privilège de le côtoyer.

Pour leur contribution à l'ensemble de ce travail présenté, je remercie Nadia Ziane, Julien Peyencet et Vincent Sénéchal (mon cocobureau). Pour leur contribution, leur aide et pour avoir réussi à me supporter en travaillant directement avec moi, je remercie Jules Sauveroché (le 1^{er} fan des Wilsons), Rafael Leite Rubim (mon binome de toujours), Simon Von-Pine (mon irremplaçable stagiaire au sens propre comme au figuré) et Cécile Gouzon (ma stagiaire préférée).

Je remercie Isabelle Ly pour son aide et sa formation apportées sur les techniques de cryofracture et de microscopie électronique à transmission ainsi que pour sa gentillesse reconnue au sein du laboratoire. Je remercie Annie Février pour m'avoir agréablement accueilli au laboratoire, pour m'avoir formée à diverses techniques qui m'étaient alors inconnues, pour avoir été elle-même outrageusement exploitée et payée uniquement à coups de merci et de plaisanteries, et pour avoir continué d'apporter son aide et sa gentillesse tout au long de ces années jusqu'à mon pot de thèse. Je remercie Monsieur Ahmed Bentalb, mon quatrième directeur de thèse, pour sa formation complète à la technique de diffusion de rayons X, pour son altruisme naturel et pour tout simplement la personne d'exception qu'il incarne.

Je remercie Cédric Gaillard de la plateforme BIBS à l'Inra de Nantes pour les expériences de cryo-TEM qu'il a menées sur nos systèmes. Je remercie Cristiano Luis Pinto de Oliveira de l'Université de São Paulo, pour son aide sur la modélisation de la diffusion de rayons X des phases lamellaires, pour les séminaires qu'il m'a invité à présenter lors de mes séjours, et pour nos discussions enrichissantes.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion d'effectuer des missions d'enseignement sur trois années à l'école ENSEIRB-MATMECA et j'aimerais remercier Thomas Brunet, pour sa disponibilité et son aide, Olivier Caty et Pierre Lubin, pour m'avoir intégré au sein de leur équipe d'enseignement, Christophe Bacon, pour son aide sur les expériences de travaux pratiques, et Sébastien Guisset pour nos discussions amicales.

Lors de mes séjours au sein de l'équipe GFCx, j'ai eu l'occasion d'être aidé administrativement ou expérimentalement par certaines personnes que je remercie : Renata Matsumoto, Arnaldo Gomes Oliveira Filho, Dennys Reis, Tarsis Mendes Germano. Au sein du CRPP, je remercie les personnes au sein de la direction, des services bâtiment, gestion et informatique, de l'atelier mécanique et des cellules chimie & instrumentation. Plus particulièrement, je remercie Nadine Laffargue, Corinne Amengual, Jean-Luc Laborde, Béatrice Dupin (toujours là pour te faire gagner), Caroline Legrand (toujours là pour venir t'embêter), Emmanuelle Hamon et Nathalie Touzé, pour sa folie légendaire et toutes ses autres qualités. Au sein du groupe M2SD, j'aimerais aussi remercier plus particulièrement Annie Colin, Hassan Saadaoui et Carlos Drummond.

Lors de mes trois séjours au Brésil, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes qui m'ont fait découvrir une culture brésilienne si chaleureuse et si amicale. Je remercie Cássio Alves, Vini, André, Sun Yang, Eraldo Sales, Dayana Domingos, mes colocataires lors de ma seconde année de thèse et plus spécifiquement Jorgivan Dias et Erike Cazaroto. Pour leur amitié, je remercie Emerson Rodrigo Teixeira da Silva, Barbara Bianca Gerbelli (et sa famille) & Pedro Leonidas Oseliero Filho, pour m'avoir accueilli parmi eux en troisième année #GOT, Vivian Vieira, Talita Fujimoto & Thiago Fraga, Rafael Serafim & Renata Bicev. Je remercie d'autant plus mon couple favori Rafael Leite Rubim & Nathassia Dresselt ainsi que leur famille respective pour leur générosité et pour m'avoir accueilli si chaleureusement.

Je remercie les personnes avec lesquelles j'ai passé de bons moments lors de ces trois années passées en grande partie au CRPP : Kévin Zimny, Martin Depardieu, Birte Riechers, Eva Koumoussi, Yu Wang, Alan Luna, Manu Mercé, Jonathan Idier, Rémy Robertson, Armand Roucher, Deniz Pekin, Sophie Bernadet, Elodie Roussarie, Aurélie Vigne (ma panda physicienne...et biologiste?), les meilleurs cocobureaux Pierre-Etienne Rouet, Vincent Sénéchal et leurs poissons rouges/noirs, Florian Aubrit, Marie-Charlotte Tatry, Artem Kovalenko & Hélène Parant, Antoine Robert, mes jolis mariés Bosi Mao & Anthony Ranson, Laura Chacon, Mayada Selmi, Deise Maria, Marília Gabriela Cabral, Thamires Moreira, Kévin Ehrhardt (mon colocataire du mois), Nadia Ziane, Maxime Thivolle, Michael Ramin, Mounir Benkoulouche, Amarande Robine, Thomas Missègue, la promotion

2013 avec Katerina Kampiotti, Laura Alvarez Frances, Pauline Anaclet & son loulou Thibault Innocent, Marion Baillot, Marie Haddou et Laure Boucard.

Les professeurs ont un impact majeur sur nos choix d'orientation, et je tiens à remercier ici ceux qui ont aidé à guider certains de mes choix jusqu'à ce doctorat : José Canelas (au lycée, par sa pédagogie et sa personnalité il m'a donné goût à la physique-chimie), Marie-Agnès Bachelot (en première année d'université, par sa façon d'enseigner et sa disponibilité envers l'ensemble de ses élèves, elle m'a rassuré sur mon choix de rejoindre l'Université au détriment de la classe préparatoire) et par leur qualité en tant que professeurs à l'université, Rodolf Boisgard, Julien Burgin et Bertrand Dauphole. Bien que depuis tout petit j'aie gardé cette impression qu'entreprendre des études était important, je remercie aussi Clémence Faugère qui est la raison principale pour laquelle j'ai entrepris cette thèse.

Parce qu'ils ont participé à embellir la fameuse année de rédaction, par leurs rires et leurs personnalités, je remercie la SuperTeamStagiaire : Lucie Theillier, Margarida Abrantes Barros, Cécile Gouzon et Simon Von-Pine.

Parce que je tiens particulièrement à eux, je remercie aussi Alexis de la Cotte, Pierre Fauché & sa future femme Florianne Courdurier, l'inévitable, l'incontournable, l'inéluctable *Margot Stasse* & Jérémie Valerian and the unicorn or just unique Mélodie Auriol. Je remercie mes cobureaux successifs Eric Schoentgen (j'en profite aussi pour remercier Gildas B. Premel) et Rafael Leite Rubim (et sa merveilleuse femme Nathassia Dresselt). Je suis conscient de la chance que j'ai eu de partager mon bureau avec les meilleurs, à tous les niveaux, et je les remercie sincèrement.

Parce que les années de fac ont été longues, je remercie les personnes qui m'ont marqué par leur personnalité et leur amitié et qui, pour certaines, m'ont suivi jusqu'à la fin de ce doctorat : Erwan Capitaine, Mokrane Hadj Bachir, Ludovic Quintard, Morgane Gandil, Quentin d'Acremont, Jean-Baptiste Perraud, David Rivière, Anais-Coline Machado, Antoine Deblais, Olivier Périé, Yussuf Karakaya, Jean-Baptiste Rabat, Max Oms, Morgan Vachon, Loic Merceron et Emilie Anonier-Frix.

Je remercie aussi mes amis les plus proches qui me soutiennent/supportent depuis le lycée ou le collège : Alexandre Leborgne & sa future femme Adeline Lemas, Sébastien Tarissa, Maud Bastiment, Pierre-Jean Fournié, Jean-Baptiste Cibois, Pauline Courrège & Thomas Odriozola, Quentin Roumanet, Romain Dao & Coralie Devaux (alias ma petite Dinde).

Enfin, après cette longue liste, je remercie toute ma famille et tous les amis de la famille pour leur soutien et leur amour. Je remercie ceux qui me sont bien entendu essentiels car ils sont ceux qui me connaissent le mieux : ma mère, mon père, mon frère, ma sœur, ma grand-mère, ma marraine et mon parrain.

« There is no word for "thank you" in Dothraki. »

(Jorah Mormont)

Table des matières

Résumé	i
Abstract	v
Resumo	ix
Remerciements	xi
Table des matières	xv
Table des figures	xxi
Liste des tableaux	xxvii
Introduction générale	1
État de l'Art & Matériels et Méthodes	5
1 Introduction	7
1.1 Molécules amphiphiles et leurs auto-assemblages	7
1.1.1 Définition d'une molécule amphiphile	7
1.1.2 Auto-assemblage en différentes structures	8
1.1.3 Micelles cylindriques	10
1.1.4 Bicouches	11
1.1.4.1 Phase lamellaire	12
1.1.4.2 Vésicules	12
1.2 Thermodynamique de la bicouche	13
1.2.1 Interactions latérales	13
1.2.1.1 Interactions intra-bicouche	13
1.2.1.2 Surfaces « décorées » de polymères	15

1.2.2	Description élastique	18
1.2.2.1	Elasticité de la bicouche	18
1.2.2.2	Effet élastique de polymères greffés sur une membrane . . .	19
1.2.3	Etats de la bicouche	21
1.3	Interactions inter-bicouches de l'empilement lamellaire	23
1.3.1	Elasticité de l'empilement lamellaire	23
1.3.2	Interactions de van der Waals entre bicouches	25
1.3.3	Interactions électrostatiques entre deux plaques chargées	27
1.3.4	Interactions stériques répulsives entre des surfaces décorées de polymères	29
1.3.5	Ondulations d' Helfrich	30
1.3.6	Phases lamellaires « liées » ou « non liées »	32
1.4	Encapsulation de bâtonnets d'ADN entre des lamelles	34
1.4.1	L'acide désoxyribonucléique	34
1.4.1.1	Quelques propriétés générales	34
1.4.1.2	Les phases liquides cristallines de bâtonnets d'ADN en solution aqueuse	36
1.4.2	Confinement d'ADN dans des phases lipidiques cationiques	37
1.4.3	Confinement d'ADN dans des phases lipidiques non ionique	40
2	Matériels et Méthodes	45
2.1	Préparation des échantillons	45
2.1.1	Préparation des membranes lipidiques	45
2.1.2	Préparation de l'ADN	48
2.1.3	Préparation des échantillons dits « ternaires »	50
2.1.4	Préparation d'ognons	50
2.1.4.1	Cisaillement et dispersion	50
2.1.4.2	Extrusion	51
2.2	Observation microscopiques	51
2.2.1	Microscopie optique à lumière polarisée	51
2.2.2	Microscopie en épifluorescence	52
2.2.3	Cryofracture et microscopie électronique à transmission	52
2.2.4	Cryo-microscopie électronique	53
2.3	Diffusion dynamique de la lumière	53
2.3.1	Instrument utilisé	54
2.3.2	Modélisation	54
2.4	Diffusion de rayons X	56
2.4.1	Dispositifs utilisés	56
2.4.1.1	Nanostar	56
2.4.1.2	Anode	57
2.4.2	Modèle d'ajustement de diffractogrammes	58

L'empilement lamellaire de bicouches lipidiques	63
3 Stabilisation d'empilements lamellaires de bicouches lipidiques : effets du confinement et effets stériques	65
3.1 Mise en évidence du confinement de la bicouche	65
3.1.1 L'état « non lié » : exemple des bicouches composées de Simulsol [Ac. O, n=6]	66
3.1.2 L'état « lié » : exemple des bicouches composées de Lécithine	70
3.1.3 Transition de décrochage : bicouches composées d'un mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac.O, n=6]	74
3.1.4 Régimes d'hydratation dilué et intermédiaire : transition de phase entre un empilement lamellaire « concentré » et un empilement lamellaire « dilué »	75
3.1.4.1 Contrôle du confinement lamellaire par l'hydratation du système et par la densité de greffage	75
3.1.4.2 La structure électronique de la bicouche	80
3.1.5 Régime peu hydraté : transition de phase entre du Simulsol hydraté et un empilement lamellaire	85
3.1.5.1 Transition de phase entre du Simulsol hydraté et l'état « non lié » des bicouches de Simulsol [Ac. O, n=6]	85
3.1.5.2 Transition de phase entre du Simulsol hydraté et un empilement lamellaire « concentré » pour des bicouches mixtes	86
3.2 Thermodynamique des bicouches lipidiques empilées fluctuantes	87
3.2.1 Interactions essentiellement d'origine stérique : les ondulations d'Helfrich	87
3.2.2 Deux empilements lamellaires aux propriétés élastiques distinctes	88
3.2.3 Modélisation thermodynamique d'empilements de bicouches mixtes	91
3.2.4 Fluctuations de membranes composées de Lécithine	93
3.3 Conclusion	97
4 Physico-chimie de l'empilement lamellaire	99
4.1 Effet de l'insaturation au sein de la bicouche	99
4.1.1 Etat de phase de la bicouche	100
4.1.2 Faible densité de greffage en co-tensioactif	101
4.1.2.1 Membranes avec du Simulsol [Ac. S, n=6]	101
4.1.2.2 Membranes avec du Simulsol [Ac. S, n=15]	104
4.1.3 Haute densité de greffage en co-tensioactifs	106
4.1.3.1 Membranes avec du Simulsol [Ac. S, n=6]	106
4.1.3.2 Membranes avec du Simulsol [Ac. S, n=15]	107
4.2 Effet de la longueur de la chaîne aliphatique	109
4.2.1 Membranes avec du Simulsol [Ac. L, n=6]	109

4.2.2	Membranes avec du Simulsol [Ac. L, n=15]	112
4.3	Effet de la longueur hydrophile sur des membranes fluides	115
4.3.1	Faible densité de greffage en co-tensioactifs	115
4.3.2	Haute densité de greffage en co-tensioactifs	116
4.3.3	Bicouches de tensioactifs apparentés à des copolymères diblocs . . .	119
4.4	Conclusion	122

Encapsulation d'ADN & Création de Vecteurs 127

5	Des nano-bâtonnets d'ADN structurés et confinés via des mécanismes entropiques et interfaciaux dans un empilement lamellaire lipidique	129
5.1	Les organisations de bâtonnets d'ADN au sein d'une phase aqueuse	130
5.1.1	Le diagramme de phase	130
5.1.2	La phase cholestérique	132
5.1.3	La phase hexagonale	132
5.1.4	La phase orthorhombique	134
5.2	Les confinements vertical et latéral des membranes régissent les différentes organisations de l'ADN au sein de la phase lamellaire	134
5.2.1	Les principales organisations de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique	137
5.2.2	La coexistence entre l'organisation nématique de bâtonnets d'ADN et l'organisation isotrope au sein d'empilements lamellaires	139
5.2.3	L'organisation nématique au sein de l'empilement lamellaire de bicouches	143
5.2.4	La transition nématique-hexagonale au sein de la phase lamellaire .	146
5.2.5	La structure hexagonale inverse de lipides neutres pour organiser l'ADN	148
5.3	Effet des interactions interfaciales stériques stabilisant les structures d'ADN	151
5.3.1	Effet de la densité de greffage en Simulsol à la surface de la bicouche	152
5.3.1.1	Membranes de Simulsol [Ac. O, n=6]	152
5.3.1.2	Membranes de composition 56(L)/44(S)	156
5.3.1.3	Membranes de composition 70(L)/30(S)	159
5.3.1.4	Membranes de composition 95(L)/5(S)	161
5.3.1.5	Membranes de Lécithine	163
5.3.2	Effet de la longueur de la chaîne éthoxylée du co-tensioactif	167
5.3.2.1	Membranes composées de Lécithine et Simulsol [Ac. O, n=10]	167
5.4	L'organisation des molécules d'ADN soumise aux différents régimes de confinement des membranes	170
5.5	Conclusion	172

6	De l'empilement lamellaire de bicouches aux oignons dispersés	175
6.1	Cisaillement de phases lamellaires	176
6.1.1	Pâte cisailée multilamellaire	176
6.1.2	Effet du cisaillement sur les propriétés structurales et élastiques des bicouches empilées	178
6.2	La thermodynamique de l'empilement lamellaire initial induit des propriétés physiques spécifiques des oignons dispersés au maximum à 15%	178
6.2.1	Multilamellarité vésiculaire et densité de greffage membranaire	180
6.2.1.1	Vésicules multilamellaires	180
6.2.1.2	Vésicules uni-lamellaires	183
6.2.1.3	Contrôle de la pression osmotique	185
6.2.2	Influence des régimes d'hydratation de la phase lamellaire initiale sur le diamètre hydrodynamique des vésicules	185
6.3	Contrôle de la stabilité et de la géométrie des oignons	192
6.3.1	Etude cinétique	192
6.3.2	Méthode de l'extrusion	192
6.4	Conclusion	196
	Conclusion générale et perspectives	197

Annexes **201**

A	Substantial abstract in english	203
A.1	Introduction	203
A.1.1	Motivation and goals	203
A.1.2	"Bound" or "unbound" lamellar phases	204
A.2	Materials and Methods	206
A.2.1	Samples preparation	206
A.2.2	Microscopic observations	207
A.2.3	X-ray scattering	207
A.2.4	Nallet model	208
A.3	Interfacial effects in complexes DNA-lipid bilayers-water	209
A.4	Interfacial mechanisms in a lamellar matrix of lipid bilayers	211
A.4.1	Highly hydrated domain : "Unbinding" transition	212
A.4.1.1	Description in terms of Vertical and Lateral confinements	212
A.4.1.2	"Unbound" state	214
A.4.1.3	"Bound" state	215
A.4.2	Poorly hydrated domain : Lamellar-Lamellar transition	216
A.4.2.1	Phase coexistence	216

TABLE DES MATIÈRES

A.4.2.2	Molecular reorganization	217
A.5	Interfacial mechanisms : comparison between the lamellar matrix and the complexes	219
A.5.1	Nematic-Hexagonal transition	219
A.5.2	Organizations & Confinements	220
A.6	Conclusion	222

Bibliographie		225
----------------------	--	------------

Table des figures

1.1.1	Description simplifiée d'une molécule amphiphile.	8
1.1.2	Description géométrique d'une molécule amphiphile via la conservation du volume.	9
1.1.3	Exemples d'auto-assemblages de systèmes lyotropes.	10
1.1.4	Micelles cylindriques organisées suivant une symétrie hexagonale (2D) selon un paramètre de maille α	11
1.1.5	Représentation d'une phase lamellaire de bicouches.	12
1.1.6	Représentation schématique (vue en coupe) des différentes variétés de vésicules dispersées dans un solvant.	14
1.2.1	Les différentes conformations de polymères.	17
1.2.2	Illustration de la structure de bicouches.	22
1.3.1	Représentation schématique des différents états de contrainte d'un smectique A lyotrope d'épaisseur de membrane δ et de périodicité d'empilement d	24
1.4.1	Phases anisotropes de l'ADN.	38
1.4.2	Représentation des deux organisations hexagonales lipidiques encapsulant l'ADN.	39
1.4.3	Organisations de l'ADN au sein d'un empilement de bicouches.	41
1.4.4	Synthèse de principaux résultats de l'étude des complexes lipidiques électriquement neutres confinant de l'ADN.	42
2.1.1	Les molécules amphiphiles utilisées dans la composition des bicouches. . .	47
2.1.2	Les différentes étapes de la préparation de l'ADN.	49
2.3.1	Exemple de courbe d'auto-corrélation de l'intensité de diffusion de la lumière.	55
2.4.1	Variation du facteur de structure \tilde{S} avec (a) le paramètre de Caillé η et (b) le nombre de bicouches corrélées N pour différents vecteurs d'onde de diffusion q	59
2.4.2	Représentation schématique du facteur de forme de la bicouche décrit par le modèle de Nallet.	60

2.4.3	Variation du facteur de forme P selon les épaisseurs hydrophile δ_H et hydrophobe δ_T et le rapport des contrastes de densité électronique $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$	61
3.1.1	Hydratation d'empilements lamellaires de bicouches, composées exclusivement de Simulsol [Ac. O, n=6], analysée par diffusion de rayons X.	66
3.1.2	Confinements vertical et latéral mis en évidence pour des empilements de membranes de Simulsol [Ac. O, n=6].	67
3.1.3	Évolution des différentes épaisseurs décrivant la bicouche de Simulsol [Ac. O, n=6], par contraste de densité électronique via le modèle de Nallet (voir Section 2.4.2), avec le confinement appliqué.	69
3.1.4	Gonflement lamellaire des bicouches de Lécithine.	70
3.1.5	Etude du confinement des bicouches de Lécithine.	71
3.1.6	Évolution des différentes épaisseurs qui caractérisent les bicouches de Lécithine.	73
3.1.7	Lois de gonflement lamellaire de bicouches empilées de compositions distinctes par leur teneur molaire en Simulsol [Ac.O, n=6].	74
3.1.8	Couplage entre un confinement latéral, représenté par une aire moléculaire à l'interface eau-bicouche Σ , et un confinement vertical, illustré par une périodicité lamellaire d pour différentes densités de greffage en co-tensioactif.	76
3.1.9	Représentation schématique et à l'échelle des effets de confinements vertical (axe z) et latéral (plan \perp), de l'hydratation et de la densité de greffage en co-tensioactif polymérique sur l'empilement lamellaire « dilué ».	78
3.1.10	Évolution des confinements critiques, indiquant des transitions de phase ou de régime d'hydratation, avec la densité de greffage en co-tensioactif polymérique.	79
3.1.11	Comportement de la membrane face au confinement vertical appliqué.	80
3.1.12	Analyse de la déformation de la bicouche obtenue par contraste de densité électronique.	81
3.1.13	Propriétés communes à chaque composition de bicouches issues de l'analyse par contraste de densité électronique (voir Section 2.4.2).	83
3.1.14	Diffractogrammes d'une phase de Simulsol [Ac. O, n=6] hydraté à différentes concentrations avant la transition en phase lamellaire.	85
3.1.15	Mise en évidence de la transition de phase entre du Simulsol [Ac. O, n=6] hydraté et un empilement lamellaire « concentré » pour des bicouches mixtes.	86
3.2.1	Ondulations d'Helfrich décrites à l'aide du paramètre de Caillé.	88
3.2.2	Propriétés élastiques des empilements lamellaires « dilués » et « concentrés » pour les compositions de membrane mixtes.	89
3.2.3	Modélisation d'empilements de bicouches par une description thermodynamique de l'énergie libre d'excès f_{exc} du système.	92

3.2.4	Décomposition spinodale mise en évidence par le modèle thermodynamique employé.	94
3.2.5	Limite du modèle thermodynamique pour décrire les bicouches empilées de Lécithine.	95
4.1.1	Etat cristallisé de bicouches mixtes.	100
4.1.2	Cristallisation de la bicouche pour de longs co-tensioactifs saturés introduits dans sa composition.	102
4.1.3	Effet de la composition hydrophobe de co-tensioactifs courts greffés sur des bicouches empilées en faible concentration.	103
4.1.4	Effet de la composition hydrophobe de longs co-tensioactifs polymériques greffés à la membrane en faible concentration.	105
4.1.5	Lois de dilution de bicouches empilées composées de mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac. S, n=6].	106
4.1.6	Transition dans le gonflement lamellaire de bicouches empilées constituées de Lécithine et d'une forte concentration de longs co-tensioactifs.	108
4.2.1	Caractérisation d'empilements lamellaires composés d'un mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac. L, n=6].	111
4.2.2	Coexistence de phases, entre un empilement lamellaire « concentré » et un empilement lamellaire « dilué », mise en évidence pour des bicouches constituées de Lécithine et de longs co-tensioactifs polymériques de composition hydrophobe distincte.	113
4.2.3	Mise en évidence des confinements appliqués aux empilements de bicouches composées d'un mélange de Lécithine et de longs co-tensioactifs de composition hydrophobe distincte.	114
4.3.1	Effet de la longueur de chaînes éthoxylées sur le gonflement lamellaire pour des bicouches fluides constituées par du co-tensioactif en faible concentration.	117
4.3.2	Effet de la longueur de chaînes éthoxylées sur le gonflement lamellaire pour des bicouches fluides constituées par du co-tensioactif en haute concentration.	118
4.3.3	Effet de la longueur de chaînes éthoxylées sur le gonflement lamellaire pour des bicouches fluides constituées uniquement de tensioactifs polymériques.	121
4.4.1	Synthèse des résultats obtenus par variation de la physico-chimie des membranes.	123
5.1.1	Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN en solution aqueuse.	131
5.1.2	Caractérisation expérimentale de la phase cholestérique d'ADN.	133
5.1.3	Caractérisation expérimentale de la phase hexagonale d'ADN.	135
5.1.4	Caractérisation par diffusion de rayons X de la phase supposée orthorhombique d'ADN.	136

5.2.1	Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine (23%) et de Simulsol [Ac. O, n=6] (77%).	138
5.2.2	Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées à 77% de Simulsol [Ac. O, n=6].	140
5.2.3	Caractérisation expérimentale de la phase L_{α}^I .	142
5.2.4	Caractérisation expérimentale de la phase L_{α}^N .	145
5.2.5	Caractérisation expérimentale de la phase L_{α}^H .	147
5.2.6	Caractérisation expérimentale de la phase H_{II}^C .	149
5.2.7	Structure hexagonale de micelles lipidiques inverses contenant de l'ADN caractérisée par microscopie.	151
5.3.1	Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de tensioactifs Simulsol [Ac. O, n=6].	153
5.3.2	Caractérisation par diffusion de rayons X de systèmes ternaires Simulsol [Ac. O, n=6]-ADN-eau.	154
5.3.3	Caractérisation par microscopie de systèmes Simulsol [Ac. O, n=6]-ADN-eau.	155
5.3.4	Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine (56%) et de Simulsol [Ac. O, n=6] (44%).	157
5.3.5	Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées à 44% de Simulsol [Ac. O, n=6].	158
5.3.6	Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine et de 30% de Simulsol [Ac. O, n=6].	160
5.3.7	Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées à 30% de Simulsol [Ac. O, n=6].	161
5.3.8	Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine et de 5% de Simulsol [Ac. O, n=6].	162
5.3.9	Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées à 5% de Simulsol [Ac. O, n=6].	163
5.3.10	Exemple de caractérisation par diffusion de rayons X de domaine multiphasique.	164
5.3.11	Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine.	165
5.3.12	Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées de Lécithine.	166
5.3.13	Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine et de 30% de Simulsol [Ac. O, n=10].	168
5.3.14	Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées à 30% de Simulsol [Ac. O, n=10].	169
5.4.1	Diagramme de phases général caractérisé par les confinements vertical et latéral.	171

6.1.1	Caractérisation expérimentale de la pâte cisailée multilamellaire.	177
6.1.2	Etude des propriétés structurales et élastiques de la pâte cisailée.	179
6.1.3	Etude des propriétés de la bicouche de la pâte cisailée par contraste de densité électronique.	179
6.2.1	Caractérisation par diffusion de rayons X des oignons multilamellaires après dispersion.	180
6.2.2	Détermination expérimentale du caractère multilamellaire des oignons. . .	181
6.2.3	Etude des propriétés élastiques des oignons dispersés multilamellaires. . .	183
6.2.4	Effet du régime d'hydratation de l'empilement lamellaire sur la distance inter-membranaire au sein des oignons multilamellaires.	184
6.2.5	Caractérisations expérimentales des oignons unilamellaires dispersés. . .	186
6.2.6	Effet du contrôle de la pression osmotique sur la distance inter-membranaire au sein d'oignons multilamellaires dispersés.	187
6.2.7	Effet du régime d'hydratation de l'empilement lamellaire sur les tailles des oignons dispersés.	189
6.2.8	Effet de la composition membranaire sur la taille des oignons dispersés. . .	191
6.3.1	Etude de la stabilité des oignons dispersés au cours du temps.	193
6.3.2	Contrôle de la taille des oignons par la méthode d'extrusion.	194
A.1	DNA organizations inside a lamellar stack of bilayers.	204
A.1	Amphiphilic molecules used in the bilayers composition.	207
A.2	Schematic representation of the bilayer form factor described by Nallet's model.	209
A.1	Effect of Simulsol content on the complexes phase diagram.	211
A.1	Unbinding transition brought out by the vertical and lateral confinements applied on bilayers lamellar stack composed of different Simulsol [Ac. O, n=6] molar content.	213
A.2	Lateral and vertical confinements controlled by a coupling between the hydration and the cosurfactant grafting density.	214
A.3	Thermodynamic description of the lamellar unbound state.	215
A.4	Thermodynamic description of the lamellar bound state.	216
A.5	Lamellar-lamellar phase transition.	217
A.6	Deformation of the membrane against the confinement.	218
A.1	Nematic-hexagonal phase transition in complexes induced by the lamellar-lamellar transition in the host.	220
A.2	Comparison of confinements applied on the bilayers between the lamellar host and the complexes with DNA.	221

Liste des tableaux

1.4.1	Propriétés physiques de l'ADN dans les conditions physiologiques.	35
1.4.2	Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN (50 nm) en solution tampon d'acétate d'ammonium à 0.25 M.	37
2.1.1	Propriétés des différentes molécules.	46
2.1.2	Compositions des différentes membranes de Lécithine et de Simulsol. . . .	48

Introduction générale

Cadre général et objectifs

La formation d'une planète débute dès lors qu'un nuage, constitué de poussières et de gaz, orbite autour d'une proto-étoile. Par interaction gravitationnelle avec la proto-étoile et par collision entre chaque grain de poussière, une accréation a lieu et entraîne la formation d'objets, à l'aspect globalement sphérique, d'une taille de l'ordre du millier de kilomètres ($rayon = 6371 \text{ km}$ pour la Terre) au bout d'un temps d'équilibre qui se mesure en millions d'années. Le processus de formation d'une telle planète s'apparente alors à un mécanisme d'auto-assemblage des grains de poussières.

À une échelle de taille un milliard de fois plus petite, un phénomène similaire d'auto-assemblage est observé en présence de molécules amphiphiles au sein d'une solution. Ces molécules forment alors des objets de taille nanométrique sous la forme de micelles, de bicouches, de vésicules ou d'organisations plus complexes. Parmi ces molécules, on retrouve la catégorie des tensioactifs, qui sont utilisés principalement dans les domaines de la cosmétologie et de la pharmacologie, ou bien des molécules « naturelles » comme certains lipides ou certaines protéines. Les lipides et les protéines sont majoritairement connus comme principaux constituants de la membrane cellulaire. Ils sont présents, par exemple, dans la composition de la myéline qui est une membrane multilamellaire. Celle-ci isole électriquement les fibres nerveuses appelées axones, à l'image d'une gaine de fils électriques, et augmente la vitesse de conduction de l'influx nerveux [35]. Lorsque cet auto-assemblage est altéré par les conditions physico-chimiques et qu'une rupture de la structure a lieu, il est le marqueur de maladies dégénératives du système nerveux comme les maladies d'Alzheimer et de sclérose en plaques.

La compréhension des interactions au sein d'une structure périodique de bicouches multilamellaires apparaît alors essentielle, d'un point de vue médical ou biologique, mais représente aussi une motivation pour des applications telles que la création de biosenseurs [123, 103, 61, 130] ou de liposomes, utiles pour la vectorisation [95, 62, 130]. Les propriétés locales, c'est-à-dire à l'échelle de la bicouche, ou les propriétés globales de l'empilement peuvent être alors façonnées par un mélange des lipides avec, par exemple, des tensioactifs ou des polymères amphiphiles. Un aspect particulier de la bicouche est, par ailleurs, distingué lorsqu'elle ne présente pas d'organisation particulière dans son plan. Elle est

considérée être dans un état « fluide ». Ainsi, l'empilement de telles bicouches possède une symétrie de phase smectique A et est qualifiée de phase lamellaire L_α .

L'étude fondamentale des mécanismes responsables de la stabilité de ces structures lipidiques, lamellaires et auto-assemblées a été le sujet de nombreuses investigations expérimentales et théoriques. Les « forces d'hydratation » [76], les interactions d'ondulation des membranes [49] et l'attraction de van der Waals [104] s'imposent alors comme des concepts centraux pour expliquer la formation de systèmes lamellaires de bicouches non chargées qui, par conséquent, ne dépendent pas d'interactions électrostatiques. Diverses techniques expérimentales sont alors employées telles que l'appareil à force de surface (SFA) [119], la diffusion dynamique de la lumière (DLS) [101], les mesures de pression osmotique [75, 76, 109], la diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) [127] et en incidence rasante (grazing-incidence SAXS) [129].

Elargissant le potentiel de ces édifices supramoléculaires, ces structures sont utilisées en tant que matrice hôte modèle pour l'encapsulation et le confinement de macromolécules telles que l'acide désoxyribonucléique (ADN). À l'origine, ce sont des complexes constitués de lipides cationiques qui ont été privilégiés pour interagir électrostatiquement avec ces longs polyélectrolytes anioniques [117]. Ces systèmes auto-assemblés sont alors décrits expérimentalement [117, 65, 66] et théoriquement [47, 92]. Bien qu'ils présentent des avantages certains comme celui de pouvoir se lier électrostatiquement aux membranes de cellules spécifiques (lipofection) [68, 16], ils peuvent, malgré tout, présenter un degré de cytotoxicité *in vitro* causée par la présence de leurs charges positives [131, 25].

Mais de manière surprenante, il est possible aussi de confiner ces macromolécules, sans avoir recours aux interactions électrostatiques, au sein d'empilements lamellaires de bicouches lipidiques électriquement neutres, notamment dans un régime d'hydratation importante [116, 115]. Ces bicouches sont constituées principalement de Lécithine, un phospholipide zwitterionique, et d'une faible teneur en co-tensioactif non ionique, introduit de manière à diminuer la rigidité des membranes. Dans ce contexte, l'entropie prend alors un rôle prépondérant dans les mécanismes responsables du confinement de bâtonnets d'ADN au sein des couches aqueuses séparant chaque membrane de l'empilement lamellaire [20].

Poursuivant ces travaux pionniers, E. R. Teixeira da Silva entreprend, au cours de sa thèse, d'explorer le domaine plus confiné (moins hydraté) en effectuant une étude systématique du diagramme de phase de systèmes similaires. Un des principaux résultats obtenus est la mise en évidence d'un riche polymorphisme dans l'organisation que prennent les bâtonnets d'ADN confinés au sein de l'empilement de bicouches. Par augmentation de la concentration en ADN, différentes structures surviennent avec la succession résumée de l'organisation isotrope L_α^I , de l'agencement nématique L_α^N , de l'arrangement rectangulaire L_α^R et de la structure hexagonale L_α^H . Cependant, l'origine des mécanismes responsables de tels auto-assemblages concentrés demeure, en partie, non élucidée. Le travail de thèse présenté s'inscrit donc principalement dans une démarche de caractérisation des interactions régissant les auto-assemblages de ces complexes lipidiques contenant ou non des

macromolécules d'ADN.

Contributions

Différents mécanismes éventuels sont considérés tels que des mécanismes entropiques ou interfaciaux. En effet, l'ADN n'est pas confiné entre deux plaques rigides et, par conséquent, la membrane se doit d'avoir un rôle prédominant dans ces domaines d'hydratation peu élevée. La modification de l'élasticité membranaire est envisagée afin de varier les effets entropiques tandis qu'une modification des interactions spécifiques, à l'interface bicouche-bicouche ou bicouche-ADN, paraît intéressante pour varier les effets interfaciaux. Pour ce faire, le choix considéré est d'introduire un co-tensioactif, structurellement apparenté à un (petit) copolymère dibloc, au sein des membranes composées de lécithines.

Par variation de la nature chimique du co-tensioactif et de sa teneur au sein de la membrane, il est possible d'élargir le champ des interactions opérant au sein de l'empilement lamellaire, méthode débutée par nos partenaires brésiliens et s'avérant être prometteuse [42]. Ces interactions sont alors séparées d'une part, en composante verticale aux bicouches et, d'autre part, en composante latérale au plan des bicouches. À l'aide de techniques et de modélisation de la diffusion de rayons X aux petits angles couplées à des techniques de microscopies, le diagramme de phase, la fluidité membranaire, le confinement et la transition de « décrochage » de ces empilements lamellaires, au départ dépourvus de molécules d'ADN, sont étudiés. Cette approche permet alors une corrélation quantitative avec les empilements renfermant les différentes organisations de l'ADN. Une comparaison est notamment effectuée entre les confinements, qui délimitent les transitions de phases, et les propriétés structurales et élastiques des bicouches, qui dépendent, chacune, de l'hydratation du système et de la composition membranaire. Les interactions de type polymère, engendrées par les chaînes éthoxylées du co-tensioactif, révèlent leur part importante sur la stabilisation et le confinement de ces structures gouvernées par l'hydratation du système.

Organisation de la thèse

L'organisation du manuscrit s'établit sur six chapitres. Le premier chapitre décrit quelques généralités associées aux auto-assemblages de molécules amphiphiles. Un état de l'art de la description thermodynamique de la bicouche et de l'empilement lamellaire est, de plus, donné. Une synthèse bibliographique des complexes lipidiques, cationiques et neutres, confinant des macromolécules d'ADN est brièvement rapportée. Le second chapitre détaille la formulation des échantillons, les différentes techniques expérimentales utilisées ainsi que les modèles appliqués aux techniques de diffusion de la lumière. Ensemble, ces deux chapitres forment la 1^{re} partie.

Le troisième chapitre correspond à une analyse précise et détaillée d'un empilement lamellaire de bicouches sans ADN, composée de lécithine et d'un co-tensioactif choisi tout particulièrement, de nature chimique fixée. À l'aide de cette membrane modèle,

la thermodynamique, le confinement et la structure de l'empilement de bicouches sont caractérisés par variation de la teneur en co-tensioactif et de l'hydratation du système. Le quatrième chapitre correspond à une description physico-chimique de l'empilement lamellaire des bicouches. À partir de la méthode de caractérisation définie au chapitre précédent, les systèmes, qui se distinguent maintenant par une modification de la nature chimique du co-tensioactif, sont comparés par leur diagramme de phase, par l'état de phase de la bicouche et par la compétition entre les interactions verticales et latérales. La nature chimique du co-tensioactif diffère, d'un système à l'autre, par les longueurs des parties hydrophobe et hydrophile et par la présence éventuelle d'une insaturation au sein de la partie hydrophobe. Assez naturellement, une 2^e partie est constituée de la réunion de ces deux chapitres.

L'intérêt du cinquième chapitre, qui ouvre la 3^e et dernière partie, est porté sur la caractérisation des interactions intervenant entre les bâtonnets d'ADN et les membranes lipidiques. Les différentes organisations des bâtonnets d'ADN sont définies en termes de confinements vertical et latéral appliqués à la bicouche fluide. Les effets entropiques et interfaciaux sont alors discutés par comparaison avec l'empilement lamellaire sans ADN de la partie précédente. Enfin, le sixième chapitre permet une ouverture du projet sur la vectorisation, cette dernière pouvant s'effectuer au sein d'ognons formés par cisaillement de ces systèmes lamellaires. La taille des oignons et leur caractère multilamellaire sont décrits (revenant à l'utilisation d'un co-tensioactif unique) par un contrôle de la pression osmotique, de la composition membranaire et de l'hydratation du système.

État de l'Art & Matériels et Méthodes

« The perfect blossom is a rare thing. You could spend your life looking for one, and it would not be a wasted life. »

(Moritsugu Katsumoto)

Chapitre 1

Introduction

1.1 Molécules amphiphiles et leurs auto-assemblages

Notre étude se penche sur des systèmes, à l'échelle nanométrique, résultant de l'auto-assemblage de molécules amphiphiles en solution aqueuse. Une brève description de ces molécules, aux propriétés surprenantes, et de leurs auto-assemblages est présentée dans cette section introductive. L'attention est alors plus particulièrement centrée sur les complexes qui sont analysés au sein de cette thèse.

1.1.1 Définition d'une molécule amphiphile

Bien qu'elle soit commune, la molécule d'eau présente d'étonnantes propriétés pour interagir avec son environnement. Cette molécule polaire, pouvant établir des liaisons hydrogènes (liaisons orientées), présente une coordination tétraédrique. Cela lui permet une grande variété d'associations comme c'est le cas pour le carbone que l'on retrouve sous la forme de chaînes moléculaires (polymères, protéines), de composés cycliques, ou bien encore sous la forme de cristaux à deux ou trois dimensions (feuillets de graphène, graphite, diamant). Ainsi, la molécule d'eau interagit fortement avec ses analogues, mais elle interagit également avec d'autres molécules polaires via des interactions électrostatiques dipôle-dipôle (qu'ils soient induits ou permanents) ou bien dipôle-ions, dès lors que ces dites molécules s'ionisent en solution. Même si les interactions liées à la polarité des molécules sont privilégiées dans ces énumérations, la molécule d'eau peut néanmoins interagir avec des molécules non polaires si des liaisons hydrogènes sont possibles. Toutes ces molécules présentant ces « affinités » avec l'eau sont alors caractérisées comme étant « hydrophiles ». Maintenant, si l'eau est mise en commun avec des molécules ne présentant aucune de ces « affinités », elle va tendre à vouloir rester entourée par d'autres molécules d'eau (interactions attractives plus intenses). Il en résulte alors un regroupement de ces molécules, appelées « hydrophobes », entre elles et autour duquel les molécules d'eau

vont s'assembler. Les chaînes hydrocarbonées sont, à titre d'exemple, considérées comme hydrophobes.

Certaines molécules, que l'on nomme amphiphiles, présentent ces deux caractéristiques simultanément et se définissent, pour la plupart, en deux parties distinctes comme représentées sur la Figure 1.1.1 : une partie hydrophile de longueur δ_H , communément qualifiée de « tête » et interagissant de manière intense avec l'eau, et l'autre partie hydrophobe de longueur δ_T , qualifiée quant à elle de « queue », et préférant alors « éviter » les molécules d'eau. Grâce à cette particularité, ces molécules présentent d'originales propriétés d'auto-assemblage en solution aqueuse.

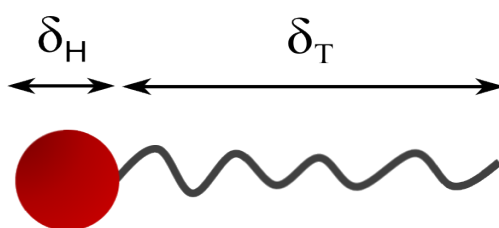


Figure 1.1.1 – Description simplifiée d'une molécule amphiphile. La tête (« head ») polaire de la molécule s'étend sur une longueur δ_H et la queue (« tail ») hydrocarbonée sur une longueur δ_T .

Différents types de molécules amphiphiles peuvent être listés, présentant des morphologies distinctes, libérant des charges ou non en solution, et utilisés pour diverses applications. Les tensioactifs, par exemple, sont des molécules amphiphiles utilisées afin de modifier la tension superficielle à l'interface entre deux milieux qu'elle soit liquide-liquide, liquide-gaz ou liquide-solide. Parmi les molécules amphiphiles à structure des plus « classiques », on peut citer les copolymères à blocs qui sont constitués d'un assemblage d'au moins deux motifs de répétition (deux monomères distincts) où l'un possède des propriétés hydrophiles tandis que l'autre est hydrophobe. Enfin, à l'état naturel, on retrouve des molécules aux fonctions indispensables telles que les lipides présents dans la composition des membranes cellulaires par exemple, ou bien des macromolécules telles que certaines protéines.

1.1.2 Auto-assemblage en différentes structures

Les différences d'interactions entre les parties hydrophile et hydrophobe avec les molécules d'eau donnent naissance à deux « forces opposées », idée proposée par Charles Tanford vers 1980. Ces deux forces tendent à définir une aire moyenne interfaciale a par molécule en contact avec la phase aqueuse. En effet, l'attraction entre les parties hydrophobes, plus intense que l'interaction partie hydrophobe-molécule d'eau, induit une association entre les molécules amphiphiles, tandis que la répulsion hydrophile, qui est électrostatique ou stérique, a pour conséquence d'augmenter la surface de contact avec

la phase aqueuse. Il en résulte que ces molécules amphiphiles, de longueur $l = \delta_H + \delta_T$, auto-assemblées en solution peuvent se définir géométriquement, voir Figure 1.1.2, en faisant appel à la conservation du volume moléculaire v supposé invariant :

$$v = a * l = \text{constante} \quad (1.1.1)$$

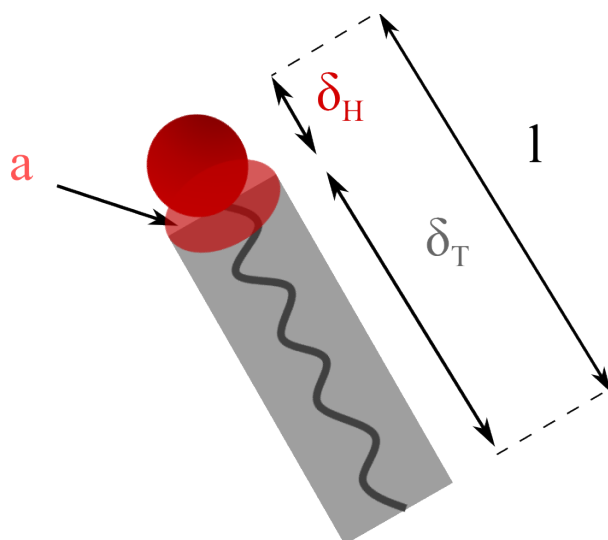


Figure 1.1.2 – Description géométrique d'une molécule amphiphile via la conservation du volume. La molécule décrit une surface moyenne a d'interaction avec le solvant et s'étend sur une longueur moyenne l .

Cette définition géométrique se veut proche du concept de « packing parameter », ou paramètre d'empilement, introduit par Israelachvili [59, 60] pour différencier les molécules, dont les chaînes hydrocarbonées demeurent fluides, par leurs contraintes géométriques une fois auto-assemblées en solution. Cet auto-assemblage, selon une structure donnée, n'est en rien aléatoire et dépend de la nature chimique de la (ou des) molécule(s) et des conditions physico-chimiques du système telles que la température, le potentiel hydrogène (pH), la concentration, la force ionique et la salinité de la solution. La structure obtenue à l'état d'équilibre est alors régie par les interactions entre ces molécules :

- la gêne stérique qui varie selon les longueurs hydrophile et hydrophobe, le nombre de chaînes hydrocarbonées et la présence d'insaturations ;
- les interactions électrostatiques s'il y a présence de charges en solution pour des molécules ioniques, cationiques, catanioniques (s'il y a combinaison ou mélange) et zwitterioniques (présence de charges positive et négative au sein de la molécule).

Les molécules associées selon un assemblage bien défini peuvent donc se transformer d'une structure à une autre lorsque les conditions de la solution sont modifiées ; comme il est illustré Figure 1.1.3 pour un système lyotrope lorsque la concentration en tensioactifs

varie. Ainsi, lorsque le confinement du système augmente, des micelles sphériques (Figure 1.1.3, a) se transforment en une phase de micelles cylindriques (Figure 1.1.3, b). Celles-ci peuvent donner alors naissance, lorsque la quantité de solvant diminue, à une phase éponge ou bien directement à une phase contenant des bicouches étendues voire sous forme empilée (Figure 1.1.3, c). Si la concentration augmente davantage, l'auto-assemblage finit par se modifier en structures inversées (Figure 1.1.3, d et e). Les structures présentées ici ne sont que quelques exemples simples de mésophases où chaque domaine délimitant une unique phase est séparée par un domaine dit biphasique.

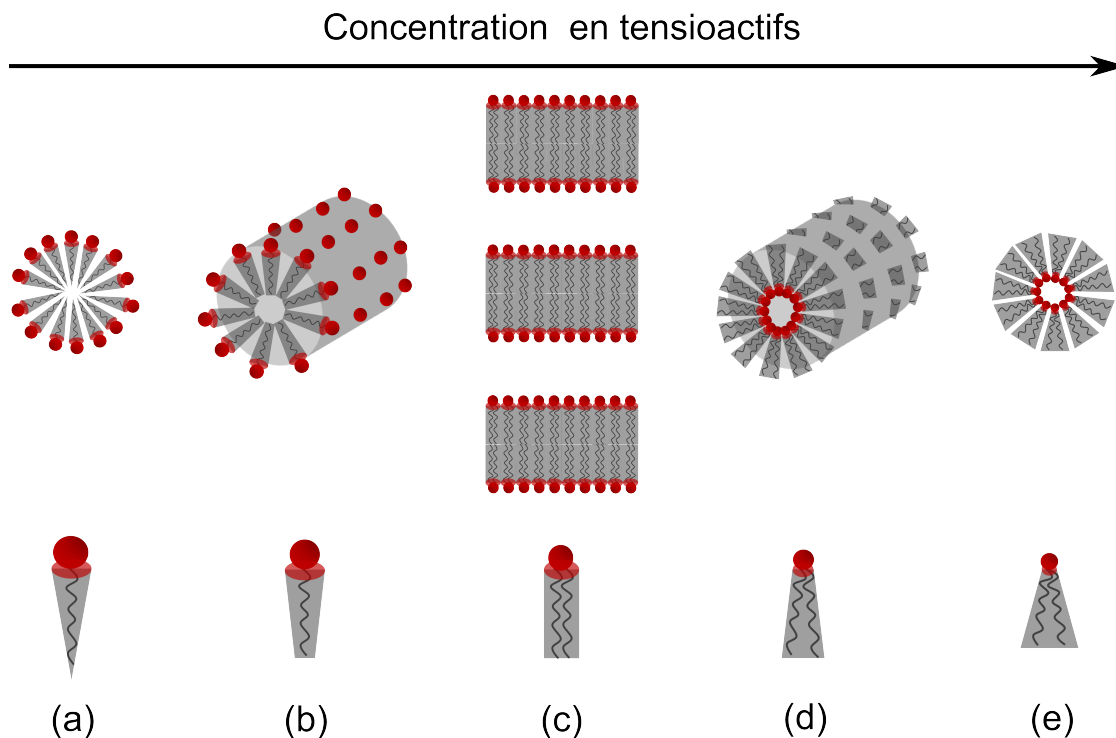


Figure 1.1.3 – Exemples d'auto-assemblages de systèmes lyotropes. Ceux-ci diffèrent par leur courbure qui est définie principalement suivant les interactions latérales (dépendantes des conditions environnementales) entre les têtes polaires, d'une part, et entre les chaînes hydrocarbonées, d'autre part. (a) Micelles sphériques directes (le solvant demeure à l'extérieur). (b) Micelles cylindriques directes. (c) Bicouches ordonnées sous forme d'empilement. (d) Micelles cylindriques inverses (le solvant demeure contenu à l'intérieur). (e) Micelles sphériques inverses.

1.1.3 Micelles cylindriques

La micelle est composée d'une monocouche de tensioactifs qui auront tendance à se regrouper sous la forme d'une sphère, à haute dilution, afin de minimiser l'énergie libre

du système. Dès lors que la concentration est augmentée ou bien que les interactions entre molécules sont telles qu'elles ont tendance à définir une aire interfaciale plus petite, ces molécules amphiphiles forment des micelles plus allongées de forme cylindrique. Ces agrégats de « bâtonnets », de taille large et polydisperses, peuvent s'organiser de façon hexagonale dans une représentation 2D, voir Figure 1.1.4. Comme illustré Figure 1.1.3, on retrouve ce type de micelles sous forme directe, c'est-à-dire que le solvant est à l'extérieur des micelles, ou bien sous forme inverse, avec le solvant à l'intérieur des micelles, en fonction notamment de la nature du solvant et globalement des conditions physico-chimiques environnementales.

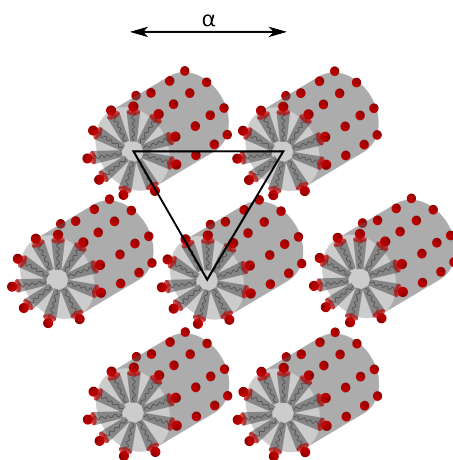


Figure 1.1.4 – Micelles cylindriques organisées suivant une symétrie hexagonale (2D) selon un paramètre de maille α .

1.1.4 Bicouches

La bicouche est composée de deux monocouches de tensioactifs inversées l'une par rapport à l'autre de manière à ce que les chaînes aliphatiques minimisent leur contact avec le solvant. Les molécules, qui la composent, présentent une tête hydrophile petite en proportion par rapport au volume total de la molécule ; pointant ici le volume important occupé par les chaînes hydrocarbonées au sein de cette bicouche, spécialement lorsque celle-ci est à l'état fluide, voir Section 1.2.3. Les bicouches, apparentées de manière simplifiée aux membranes cellulaires, peuvent en solution, notamment en fonction de leur courbure locale, s'assembler au sein d'un domaine plus important comme c'est le cas pour les phases lamellaires ou les vésicules.

1.1.4.1 Phase lamellaire

Les bicouches interagissent entre elles et s'arrangent sous la forme d'un empilement lamellaire comme représenté Figure 1.1.5. A l'état fluide, la bicouche est en moyenne plane latéralement dans le plan X-Y et fluctue autour d'une position d'équilibre selon la direction z. On définit alors une épaisseur « géométrique » de membrane (ou de bicouche), $\delta_m = 2l = 2(\delta_H + \delta_T)$, et une distance de répétition entre les bicouches d appelée aussi paramètre d'ordre d'empilement ou périodicité. Si l'on considère une extension « infinie » des bicouches suivant les directions X et Y devant l'épaisseur de la membrane, on peut postuler une longueur moyenne L suivant l'axe X et une longueur moyenne Δ suivant l'axe Y et ce pour toutes les bicouches. On peut alors définir un sous-volume de la phase lamellaire, $V = d.L.\Delta$, regroupant une bicouche et le solvant contenu entre deux membranes consécutives de telle sorte que $V_{total} = k.V$, avec k un entier. Suivant cette considération géométrique, il est possible de définir le volume occupé par les tensioactifs, ou les lipides, comme $V_{lip} = k.\delta_m.L.\Delta$. Il vient naturellement une définition de la fraction volumique en lipides :

$$\phi_{lip} = \frac{V_{lip}}{V_{total}} = \frac{\delta_m}{d} \quad (1.1.2)$$

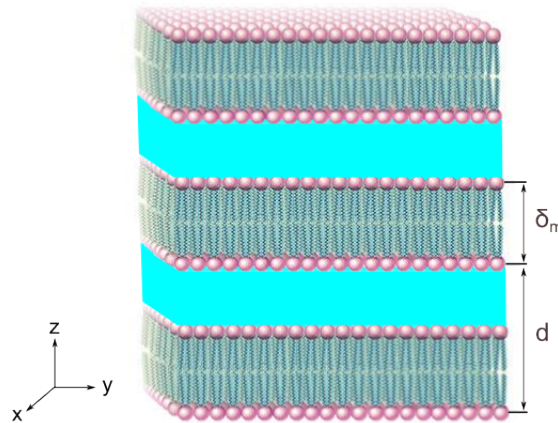


Figure 1.1.5 – Représentation d'une phase lamellaire de bicouches. Les bicouches, d'épaisseur δ_m , sont empilées suivant la direction z avec un ordre d'empilement d et sont séparées les unes des autres par une couche de solvant.

1.1.4.2 Vésicules

Lorsque la bicouche présente une courbure sous certaines conditions, il devient alors plus favorable de former des bicouches recourbées en une sphère, de façon spontanée, plu-

tôt que des bicouches planes « infinies ». Ces objets macromoléculaires sont alors désignés de vésicules ou de liposomes si les molécules qui les constituent sont des lipides. Comme illustré Figure 1.1.6, les vésicules peuvent être unilamellaires ou multilamellaires, posséder un cœur de solvant ou non, et sont alors appelés « oignons » lorsque ce caractère multilamellaire persiste jusqu'au cœur de l'objet, essentiellement lorsqu'ils sont créés à partir d'un cisaillement d'une phase lamellaire concentrée. Les vésicules peuvent être de tailles très variées avec un diamètre D allant de la dizaine de nanomètres pour les plus petites (unilamellaires) jusqu'à la dizaine de micromètres (multilamellaires). Il paraît évident que l'on peut associer, à une dispersion de vésicules, une certaine distribution en tailles (polydispersité), qu'elles s'auto-assemblent de manière spontanée ou bien qu'elles soient préparées via une technique expérimentale (cisaillement, sonication, extrusion, etc). S'il en est ainsi, elles auront tendance à demeurer dans l'état où elles sont préparées puisque le temps nécessaire pour ramener de telles structures à leur état d'équilibre peut prendre jusqu'à des mois.

Malgré la polydispersité, il est possible d'estimer la taille du noyau de solvant au sein de ces vésicules multilamellaires (considérées comme parfaitement sphériques) à partir du diamètre moyen D , de la périodicité d et du nombre de bicouches empilées en moyenne N . Il vient :

$$\Phi = D - 2.(N - 1).d \quad (1.1.3)$$

Pour des vésicules unilamellaires, la taille du noyau de solvant se déduit connaissant l'épaisseur de membrane δ_m par la relation :

$$\Phi = D - 2.\delta_m \quad (1.1.4)$$

1.2 Thermodynamique de la bicouche

La bicouche représente l'organisation de base des complexes qui sont étudiés dans ce manuscrit. Il convient donc de décrire les interactions inter-moléculaires qui interviennent au sein de la membrane, essentiellement d'orientation latérale, qui contrôlent l'élasticité et l'état membranaires. Au sein de nos bicouches lipidiques, un copolymère, jouant le rôle de co-tensioactif, est ajouté à leur composition afin de varier ces interactions. Ces différents effets sont présentés théoriquement dans cette section.

1.2.1 Interactions latérales

1.2.1.1 Interactions intra-bicouche

La bicouche est considérée comme moins rigide lorsqu'elle est dans son état « fluide ». Les interactions, qui maintiennent les molécules amphiphiles regroupées ainsi, ne sont

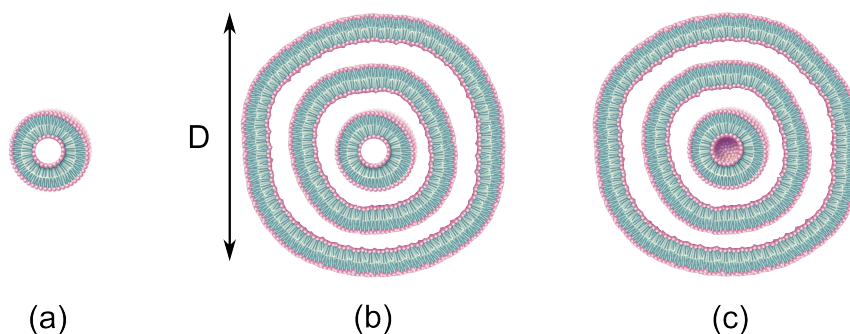


Figure 1.1.6 – Représentation schématique (vue en coupe) des différentes variétés de vésicules dispersées dans un solvant. (a) Vésicule unilamellaire ; le solvant se situe au centre, délimitant un noyau, et à l'extérieur. La bicouche se recourbe sur elle-même de manière à former une sphère. (b) Vésicule multilamellaire ; le solvant se situe au centre, entre chaque bicouche et à l'extérieur de la vésicule. Chaque vésicule peut être géométriquement définie par son diamètre total D . (c) Ogon, soit une vésicule multilamellaire, obtenue par cisaillement d'une phase lamellaire, et dont le diamètre du noyau central de solvant peut être négligeable.

donc pas de fortes liaisons covalentes ou ioniques mais résultent d'une combinaison d'interactions telles que de faibles interactions de van der Waals, des liaisons hydrogènes, des contributions stériques répulsives, des interactions « hydrophobes » ou des interactions électrostatiques écrantées qui dépendent, toutes, des conditions thermodynamiques [85]. On peut néanmoins s'affranchir de la connaissance précise de ces différentes contributions pour décrire thermodynamiquement les interactions au sein de la bicouche en faisant une analogie astucieuse avec la célèbre équation d'état proposée par van der Waals en 1873. A partir de la loi des gaz parfaits, il vient apporter une correction en prenant en considération le volume exclu moléculaire v_0 , résultant de la taille finie des molécules, ainsi que les interactions entre ces molécules, via un terme d'interaction b_2 , selon l'équation suivante définissant la pression au sein du gaz [90] :

$$P_{vdW} = k_B T \left[-\frac{n^2 \cdot b_2}{2v_0} + \frac{n}{1 - n \cdot v_0} \right] \quad (1.2.1)$$

où P_{vdW} est la pression de van der Waals, n est la densité volumique de molécules soit $n = \frac{N}{V} = \frac{1}{v}$, avec N le nombre de molécules au sein du gaz, V le volume total occupé par le gaz, v le volume moléculaire, k_B est la constante de Boltzmann et T est la température.

Cette équation présente, de plus, la particularité de décrire la transition de phase liquide-gaz, et il s'avère qu'elle concorde bien expérimentalement pour décrire la thermodynamique des gaz, comme des fluides, avec une différence quantitative sur les paramètres introduits v_0 et b_2 . L'équation d'état de van der Waals résulte de la définition de la densité volumique de l'énergie libre du système f_{vdW} via la relation usuelle $P = -\frac{dF}{dV} |_{T,N}$. Celle-ci s'exprime alors :

$$f_{vdW} = n.k_B T. \ln\left[\frac{n.\lambda^3}{e(1-n.v_0)}\right] - k_B T \frac{n^2.b_2}{2.v_0} \quad (1.2.2)$$

avec λ la longueur d'onde thermique de de Broglie.

L'énergie libre définie ci-dessus peut s'appliquer pour décrire les interactions entre molécules au sein d'une bicouche fluide dispersée dans un solvant. Si l'on considère une monocouche de molécules amphiphiles, plane en moyenne, les interactions vont survenir latéralement, ce qui est mis en évidence par une modification de l'aire moléculaire à l'interface couche-solvant Σ . On peut alors considérer non plus une définition 3D de l'énergie libre de van der Waals mais une représentation 2D pour décrire le fluide bidimensionnel de molécules lipidiques [57, 122] :

$$f_{2D} = \frac{k_B T}{\Sigma} . \ln\left[\frac{\xi^2}{e(\Sigma - \Sigma_0)}\right] + \frac{k_B T}{2} \frac{b_2}{\Sigma^2} \quad (1.2.3)$$

où ξ est une longueur analogue à la longueur d'onde de de Broglie mais à deux dimensions et Σ_0 est l'aire exclue dans la représentation du fluide à deux dimensions. Pour une bicouche composée de lécithines, la valeur typique de Σ est d'environ 0.7 nm^2 .

L'énergie libre du fluide 2D de van der Waals f_{2D} permet de décrire aussi la thermodynamique d'une bicouche isolée dès lors que l'on considère certaines approximations. On néglige ici les effets verticaux devant les interactions latérales au sein de notre bicouche. On s'affranchit, de plus, de la présence de pores, c'est-à-dire de trous au sein de la bicouche, ou de protrusions, sorties verticales des molécules par rapport à la surface de la bicouche.

1.2.1.2 Surfaces « décorées » de polymères

Un polymère est une macromolécule composée d'une répétition de n_p unités de monomères que l'on considère ici comme tous identiques mais qui peuvent être de nature différente (copolymères, hétéropolymères). On définit le monomère comme un cube rigide de volume v_m , de longueur l_m et de masse molaire M_m . Le polymère, de longueur de contour $L_c = n_p.l_m$, conserve cette rigidité dès lors que sa longueur demeure inférieure à sa longueur de persistance L_p ($L_c \leq L_p$) dépendante des conditions physico-chimiques. Si l'on considère un solvant « idéal » où il n'y a aucune interaction entre chaque segment (monomère) du polymère, de telle sorte que chacun est libre de bouger par rapport aux autres et ceci dans toutes les directions, le polymère prend la forme d'un bulbe quelconque. Il est possible alors de définir un rayon de giration R_g , représentant une extension latérale effective du polymère, qui est défini dans le cadre d'une marche aléatoire sur réseau du polymère ($F \propto \frac{R^2}{n_p l_m^2} k_B T$) par :

$$R_g = \frac{l_m \sqrt{n_p}}{\sqrt{6}} \quad (1.2.4)$$

En réalité, le volume défini par le rayon de giration englobe du solvant. Il dépend donc de la « qualité » du solvant, résumé sur la Figure 1.2.1 (a), c'est-à-dire de la présence d'interactions attractives ou répulsives entre les monomères. Dans un mauvais solvant, les monomères s'attirent les uns et les autres et la pelote rétrécit jusqu'à définir une sphère compacte pour de très fortes attractions. Au contraire, dans un bon solvant, la pelote de polymère se gonfle, grâce aux interactions répulsives de volume exclu entre les monomères, et devient plus étendue. L'énergie libre de Flory de la chaîne en conformation « champignon » se décrit en ajoutant un terme d'interaction, en plus de l'énergie libre décrivant la marche aléatoire, par l'intermédiaire d'un volume de Flory v_F du monomère [36], soit :

$$F_{ch}^{Flory} \approx k_B T \cdot \left[\frac{v_F \cdot n_p^2}{R^3} + \frac{R^2}{n_p \cdot l_m^2} \right] \quad (1.2.5)$$

où R est la distance bout à bout de la chaîne de polymère.

Par minimisation de l'énergie libre par chaîne, en négligeant les interactions non stériques (soit $v_F \sim v_m$), on définit alors son rayon de Flory qui tient compte des effets du solvant [41, 87] :

$$R_F \approx l_m \cdot n_p^{3/5} \quad (1.2.6)$$

Les polymères peuvent s'adsorber à une surface via des interactions faibles ou bien des liaisons chimiques spécifiques liées à la présence de groupes fonctionnels. En première approximation, la conformation du polymère greffé à une surface peut être assimilée à celle qu'il adopte lorsqu'il est libre en solution. Cette forme de pelote à la surface est alors caractérisée de conformation « champignon ». Dans cette conformation, chaque polymère greffé, occupant latéralement une surface $\Sigma_{ch} = \pi R_F^2$, est suffisamment éloigné des autres pour ne pas interagir avec eux. Mais si la densité surfacique de greffage est augmentée comme illustré Figure 1.2.1 (b), à partir d'une certaine limite, les polymères vont interagir latéralement entre eux. Ces interactions latérales, que l'on peut comparer à celles entre lipides au sein d'une bicouche, entraîne une transition dans la conformation du polymère. Celui-ci, sous l'effet du confinement latéral produit par les interactions avec ses voisins, adopte alors une configuration « brosse », puisque la surface par molécule adsorbée Σ_{br} est fortement diminuée. Cette transition champignon/brosse apparaît dès lors que les polymères commencent à s'entremêler, $2R_F \simeq \sqrt{\Sigma_{br}^{lim}}$ ou plus précisément $\Sigma_{br}^{lim} = \Sigma_{ch}$. Dans le contexte où les polymères sont greffés à une membrane lipidique, considérant une fraction molaire en polymères χ_p et une aire moyenne interfaciale par molécule composant la bicouche A , cette transition apparaît pour :

$$\left(\frac{A}{\chi_p} \right)^{lim} = \Sigma_{br}^{lim} = \pi \cdot l_m^2 \cdot n_p^{6/5} \quad (1.2.7)$$

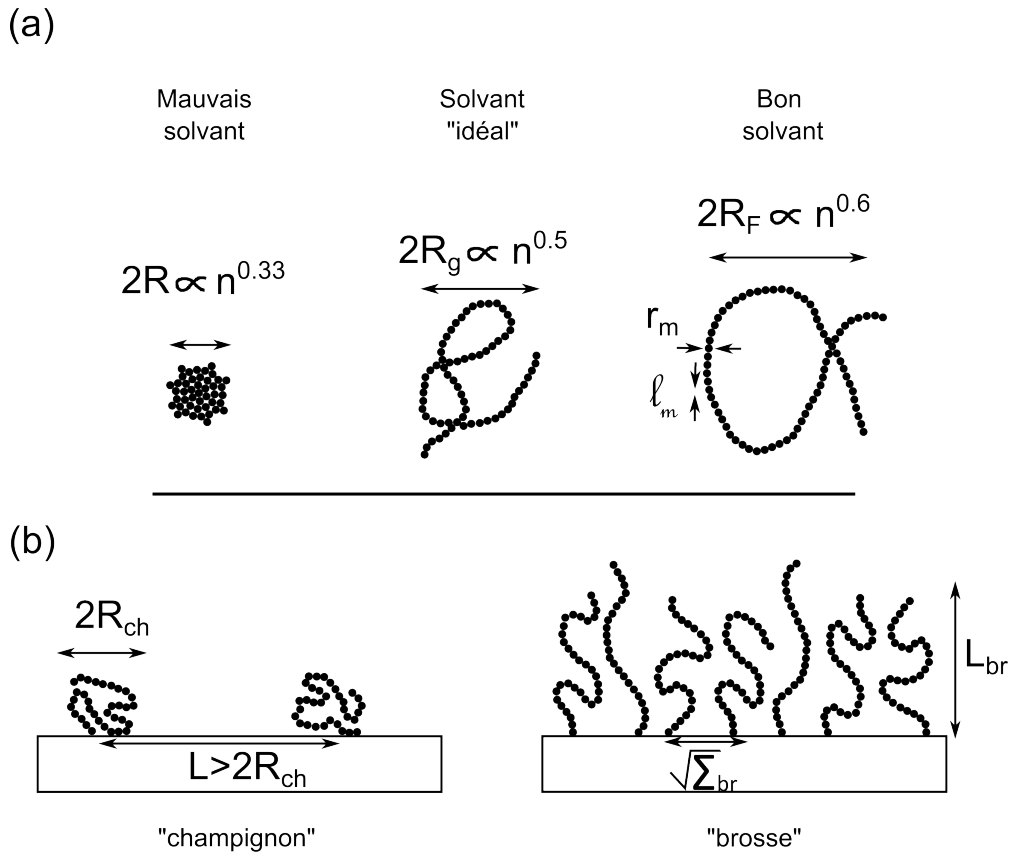


Figure 1.2.1 – Les différentes conformations de polymères. (a) Conformation du polymère dispersé en solution dépendante du solvant. Pour un mauvais solvant, la chaîne de n monomères, cylindres de longueur l_m et de rayon r_m , se recourbe en un bulbe de rayon R . Dans le cas d'un solvant « idéal », le volume sphérique englobant la chaîne polymérique est décrit par un rayon de giration R_g . Dans un bon solvant, ce même volume est alors décrit par la théorie de Flory avec un rayon R_F . (b) Conformation du polymère dépendante de sa densité de greffage sur une surface. Si les polymères, attachés à une surface plane, sont espacés d'une distance suffisante pour ne pas interagir entre eux, alors leur conformation est qualifiée de « champignon » et ils sont décrits, par un rayon de giration R_g , de manière analogue à lorsqu'ils sont dispersés en solution. S'il y a interaction latérale entre chaque polymère, la conformation qui en résulte est qualifiée de « brosse ». Chaque polymère est défini par une extension verticale L_{br} et une surface latérale Σ_{br} . Illustration inspirée de [57].

De cette réduction de surface par polymère résulte une augmentation de l'épaisseur verticale L_{br} de la couche de polymères en conformation « brosse ». Cette épaisseur L_{br} est proportionnelle au nombre n_p de monomères et est définie, dans un bon solvant, selon Alexander [3], comme :

$$L_{br} = n_p \cdot \sqrt[3]{\frac{l_m^5}{\Sigma_{br}}} \quad (1.2.8)$$

Cette longueur à l'équilibre est obtenue, tout comme précédemment, à partir de la minimisation de l'énergie libre par chaîne, donnée ici par la théorie de champ moyen [98, 87] :

$$F_{br} \approx k_B T \cdot \left[\frac{v_m \cdot n_p^2}{R \cdot \Sigma_{br}} + \frac{R^2}{n_p \cdot l_m^2} \right] \quad (1.2.9)$$

Cette énergie libre provient d'un profil de densité en polymère, qui selon la direction verticale, proposé par De Gennes et Alexander [41, 3] est en fonction créneau. Milner et al. [97, 87] ont alors apporté une correction à ce profil de densité qui semble se rapprocher d'un profil parabolique pour une forte densité en polymères.

1.2.2 Description élastique

1.2.2.1 Élasticité de la bicouche

La bicouche, demeurant un système fluide, peut néanmoins être déformée sous l'influence de différentes contraintes. Malgré la cohésion entre les molécules amphiphiles qui la composent, si une tension latérale est appliquée, résultant en une extension ou une compression de la bicouche, l'aire moléculaire A est modifiée. On définit la densité surfacique d'énergie d'étirement latéral ou « stretching » [48] :

$$f_{étirement} = \frac{1}{2} \cdot k_e \left(\frac{\Delta A}{A_0} \right)^2 \quad (1.2.10)$$

avec k_e le module élastique d'étirement, A_0 l'aire par lipide à l'équilibre et $\Delta A = A - A_0$ la variation de surface par molécule. Ici l'influence de la pression hydrostatique est négligée. Les valeurs typiques de k_e pour des systèmes à base de lécithine varient de l'ordre de l'unité à la centaine de $k_B T \cdot nm^{-2}$ [57].

La bicouche peut, de plus, perdre son caractère planaire si une courbure lui est appliquée. Si l'on considère une bicouche fine, comme un fluide bidimensionnel de vecteur normal local $\vec{n} = n_x \cdot \vec{e}_x + n_y \cdot \vec{e}_y + n_z \cdot \vec{e}_z$, l'expression générale de l'énergie surfacique de courbure ou « bending » est définie telle que [48] :

$$f_{courbure} = \frac{1}{2} \cdot k_c (c_x + c_y - c_0)^2 + \bar{k}_c (c_x \cdot c_y) \quad (1.2.11)$$

avec x et y les coordonnées latérales de la bicouche, z la coordonnée verticale, k_c le module élastique moyen de courbure, $c_x = \frac{dn_x}{dx}$ et $c_y = \frac{dn_y}{dy}$ les courbures principales de la bicouche, c_0 sa courbure spontanée ($c_0 = 0$ si la bicouche est de composition symétrique), \bar{k}_c le module élastique gaussien de courbure (pertinent lorsqu'il y a un changement de topologie/structure). D'après cette expression, une courbure cylindrique implique que c_x ou c_y est nul ce qui dépend de la direction de la déformation, pour une déformation sphérique $c_x = c_y$ et pour une déformation en forme de col ou de selle $c_x = -c_y$. L'élasticité gaussienne de courbure a pour effet d'incrémenter, d'une constante, l'énergie libre du système. En effet, si l'on intègre sur la surface fermée totale S , l'énergie libre surfacique de la membrane, on obtient d'après le théorème de Gauss-Bonnet :

$$\iint_S \bar{k}_c(c_x.c_y)dS = 4\pi.\bar{k}_c(1 - g) = \text{constante} \quad (1.2.12)$$

où g est une constante dépendante du changement de topologie/structure.

On ne prend pas en considération une éventuelle inclinaison des molécules lipidiques par rapport à la normale à la bicouche ce qui peut avoir lieu par exemple pour des molécules sensibles à l'application d'un champ magnétique. Ces différents modules élastiques exprimés ici sont dépendant des conditions physico-chimiques environnementales et plus particulièrement de la composition des membranes. Ainsi, lorsque l'on modifie la longueur des molécules insérées ou l'aire de la tête polaire du tensioactif à l'interface membrane-solvant, le module de courbure de la membrane est modifié [145, 69]. Les valeurs typiques mesurées de k_c , pour des bicouches à base de lécithine, sont de l'ordre de $k_B T$ à $25.kT$ [128, 32, 143].

1.2.2.2 Effet élastique de polymères greffés sur une membrane

L'élasticité membranaire lipidique se trouve altérée avec l'ajout de polymères greffés à sa surface. Comme expliqué Section 1.2.1.2, les polymères interagissent latéralement entre eux tout particulièrement dans le régime dit « brosse » où les interactions sont les plus intenses. La pression latérale qu'ils exercent induit alors une expansion de l'aire surfacique moyenne de chaque molécule lipidique composant la membrane. On définit une densité surfacique d'énergie d'étirement latéral $f_{\text{étirement}}^{\text{poly}}$ « modifiée » en ajoutant le terme de l'énergie libre F_{br}^{eq} , à l'équilibre, par molécule de polymère qui est exprimé selon l'équation 1.2.9 où $R_{eq} = L_{br}$ [58, 87]. L'expression modifiée est donné par :

$$f_{\text{étirement}}^{\text{poly}} = \frac{1}{2}.k_e\left(\frac{\Delta A}{A_0}\right)^2 + \chi_p.\frac{F_{br}^{eq}}{A_0} \quad (1.2.13)$$

avec χ_p la fraction molaire de polymères greffés, A_0 l'aire moléculaire à l'équilibre sans polymère au sein de la membrane, $\Delta A = A - A_0$.

Dans cette expression, la constante élastique d'étirement latéral de la bicouche k_e est considérée comme constante mais il est possible de prendre en considération une dépen-

dance de la constante élastique avec la variation de l'aire moléculaire A [58, 86, 87]. L'aire d'équilibre par molécule se trouve donc modifiée par cette pression latérale des polymères de même que la constante élastique effective de la membrane, $k_e^{eff} = A_0 \cdot \frac{d^2 f_{étirement}^{poly}}{dA^2} \Big|_T$. Lorsque les bicouches se trouvent empilées en phase lamellaire, les interactions latérales entre polymères sont couplées avec les interactions verticales entre bicouches adjacentes. L'énergie libre par polymère est alors modifiée comme il en est discuté Section 1.3.4.

Tout comme pour l'élasticité latérale, l'ajout de polymère joue un rôle sur l'élasticité de courbure de la membrane. Ainsi, si on ajoute l'équation 1.2.11 à l'expression de la densité surfacique d'énergie totale, on obtient :

$$f_{totale}^{poly} = \frac{1}{2} \cdot k_e \left(\frac{\Delta A}{A_0} \right)^2 + \frac{1}{2} \cdot k_c (c_x + c_y - c_0)^2 + \bar{k}_c (c_x \cdot c_y) + \chi_p \cdot \frac{F_{br}^{eq}}{A_0} \quad (1.2.14)$$

La constante élastique de courbure effective k_c^{eff} résulte toujours de la relation $k_c^{eff} = k_c + k_c^{poly} = \frac{d^2 f_{totale}^{poly}}{dc^2}$ où $c = c_x + c_y - c_0$ désigne la courbure moyenne et k_c^{poly} la contribution à la constante élastique de courbure résultant de la présence des polymères. On peut cependant évaluer cette contribution de polymères greffés à la membrane grâce à la relation suivante [96, 138, 87] :

$$k_c^{poly} = - \int_0^{\delta_m/2} z \cdot \frac{\partial \Pi_p'(z)}{\partial c} \Big|_{c=0} dz \quad (1.2.15)$$

où z représente l'axe vertical dont l'origine est le milieu de la membrane, $\Pi_p = -\chi_p \cdot \frac{\partial F_{br}^{eq}}{\partial A}$ la pression latérale provenant des polymères, δ_m l'épaisseur moyenne de la membrane (composée de lipides et de polymères ; dans la limite d'une haute densité de greffage ou d'une longueur de polymère L_{br} grande, $\delta_m \simeq 2L_{br}$).

Si l'on considère une évolution de l'aire moléculaire au sein de la membrane avec la hauteur z selon une géométrie cylindrique, telle que $A = A^{interface} (1 + z \cdot c)$ et $c = \frac{1}{R_{courbure}^{moyen}}$, on peut estimer que :

$$k_c^{poly} \simeq \chi_p \cdot A \cdot \frac{\delta_m^2}{8} \cdot \frac{d^2 F_{br}^{eq}}{dA^2} \quad (1.2.16)$$

Ces effets élastiques influencés par le greffage de polymères sont bien observés expérimentalement, comme c'est le cas avec l'utilisation de copolymères triblocs, greffés sur des membranes empilées en phase lamellaire [18, 19]. Ainsi, les impacts sur le module élastique d'étirement latéral k_e^{eff} [18] et sur le module de rigidité de courbure k_c^{eff} [19] sont caractérisés selon la densité de greffage en polymères χ_p et selon la compression verticale, évaluée par la périodicité de l'empilement.

L'effet de la densité de greffage sur l'élasticité gaussienne effective de courbure et sur la courbure effective spontanée de la membrane ne sont pas pris en considération ici pour des arguments similaires exposés Section 1.2.2.1. Les effets élastiques, moins intenses

néanmoins, de la présence de « champignons » peuvent, de même, être pris en compte via cette méthode en utilisant l'énergie libre à l'équilibre adéquate (équation 1.2.5). Ces effets sont caractérisés théoriquement [52] et observés expérimentalement [89] sur des membranes avec polymères greffés en phase lamellaire.

1.2.3 Etats de la bicouche

La thermodynamique associée à la bicouche, qui est discutée dans la Section 1.2, est relative à une bicouche à l'état fluide. Cependant, celle-ci peut se trouver dans des états physiques plus organisés, où les molécules ont accès à moins de degrés de liberté et possèdent plus qu'un unique ordre d'orientation, comme c'est le cas pour la bicouche fluide. Ces différents états liquides cristallins sont dépendants des conditions physico-chimiques ; quelques exemples sont illustrés Figure 1.2.2. Si l'on s'intéresse à des bicouches composées de phosphatidylcholines [67], donc des molécules lipidiques à deux chaînes hydrocarbonées, qui sont dispersées dans une phase aqueuse, on peut obtenir, pour une même composition de membrane, différents états liquides cristallins lorsque notamment la température est variée.

Ce faisant, en dessous d'une température de transition $T_{c-\beta}$, la bicouche se trouve à l'état cristallisé et l'empilement lamellaire associé est noté L_c , Figure 1.2.2 (a). Lorsque la température est augmentée, le système passe respectivement par différentes transitions de phases lamellaires telles que par les états lamellaires gel L_β , Figure 1.2.2 (b), gel, où les molécules sont inclinées, $L_{\beta'}$, Figure 1.2.2 (c), gel, où la bicouche est ridée (« rippled phase »), P_β , Figure 1.2.2 (d), puis par l'état lamellaire fluide L_α , Figure 1.2.2 (e). Ces différentes températures de transition de phase sont caractérisées par des techniques de calorimétrie.

Dans le but de définir dans quel état cristallin la bicouche demeure, une technique efficace utilisée est la diffusion de rayons X aux grands angles (WAXS). Ainsi, lorsque les molécules sont très corrélées entre elles dans le plan latéral X-Y, comme c'est le cas pour les phases gels, certaines distances entre chaînes sont bien définies et il apparaît alors des pics étroits caractéristiques aux grands angles de diffusion [70]. Certaines structures 2D des molécules, dans le plan latéral, peuvent même apparaître telles que les structures orthorhombique, hexagonale, rectangulaire, voir Figure 1.2.2 (h), (i) et (j).

Enfin, les différentes structures de la bicouche sont dépendantes de sa composition c'est-à-dire des propriétés des molécules qui la composent. On peut obtenir des bicouches telles que leurs molécules soient interdigitées comme à titre d'exemple représentées Figure 1.2.2 (f) et (g). Ces structures moins communes sont dépendantes de la différence de longueur entre les deux chaînes hydrocarbonées, de la présence d'insaturations ou non et de la taille de leur tête dite polaire.

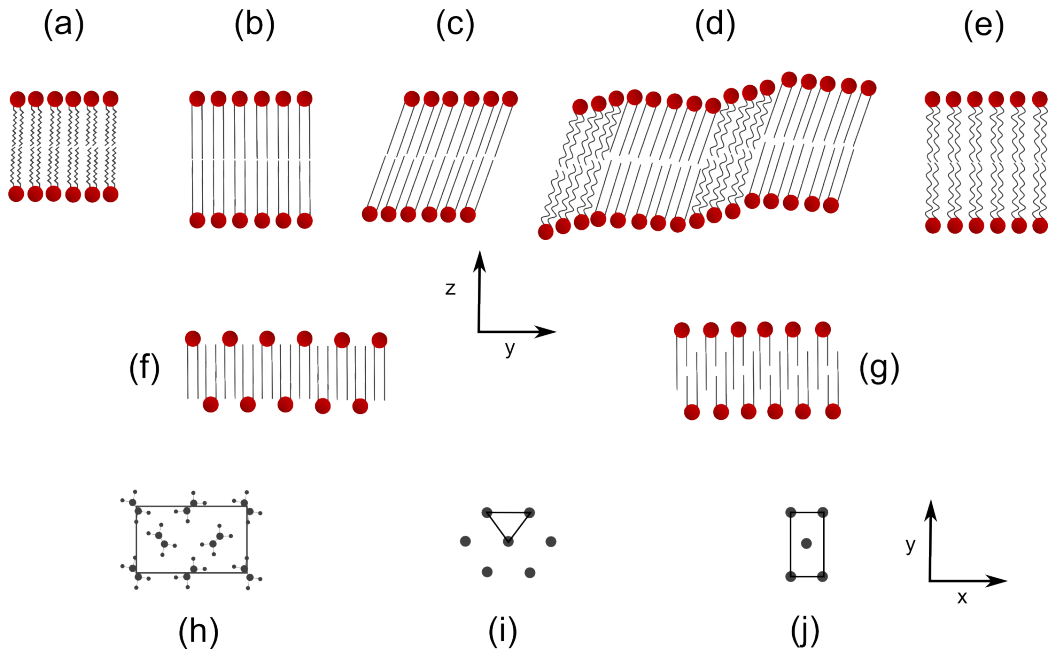


Figure 1.2.2 – Illustration de la structure de bicouches. (a) Bicouche cristallisée. (b) Bicouche en phase gel. (c) Bicouche en phase gel dont les molécules sont inclinées par rapport à la normale. (d) Bicouche ridée (« rippled »). (e) Bicouche à l'état fluide. (f) Bicouche dont les molécules sont interdigitées. (g) Bicouche dont les lipides sont partiellement interdigités résultant d'une différence de longueur entre chaque chaîne hydrocarbonée. (h) Symétrie orthorombique, dans le plan latéral, définie par la position des molécules au sein de la bicouche. (i) Symétrie hexagonale dans le plan latéral de la bicouche. (j) Symétrie rectangulaire dans le plan latéral de la bicouche. Inspirée de [67].

1.3 Interactions inter-bicouches de l'empilement lamellaire

Ces différentes bicouches ne sont pas isolées les unes des autres en solution et, par conséquent, interagissent entre elles. Au sein de l'empilement lamellaire, ces interactions se décomposent en les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques, s'il y a présence de molécules chargées, les ondulations d'Helfrich et les interactions entre polymères, si ceux-ci sont greffés à la membrane. Dans cette section, une description synthétisée de ces interactions est proposée ainsi que leurs effets sur les propriétés élastique et thermodynamique de l'empilement des bicouches.

1.3.1 Élasticité de l'empilement lamellaire

L'énergie libre élastique d'un empilement de bicouches en phase lamellaire peut être vue comme une extension généralisée de l'énergie libre de la bicouche isolée, développée Section 1.2.2.1, lorsque celle-ci interagit avec ses semblables. Pour un empilement lamellaire, de distance d'empilement d , à deux composants (solvant-lipides), la densité volumique d'énergie libre d'une phase lamellaire L_α , à l'état isothermique, est définie à partir des fluctuations du vecteur déplacement \vec{u} et de concentration en lipides δc (en fraction massique) associées aux bicouches lipidiques [11, 101] :

$$f = \frac{1}{2}B\left(\frac{\partial u}{\partial z}\right)^2 + \frac{1}{2}K(\nabla_\perp^2 u)^2 + \frac{1}{2\chi}(\delta c)^2 + C_c \delta c \frac{\partial u}{\partial z} \quad (1.3.1)$$

où B définit le module de compression de la bicouche à concentration constante, K est le module de rigidité de courbure moyen de l'empilement lamellaire, associé au module élastique de courbure de la bicouche k_c par la relation $K = \frac{k_c}{d}$ (par identification avec l'équation 1.2.11, on définit les courbures principales $c_x = \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}$ et $c_y = \frac{\partial^2 u}{\partial y^2}$), χ est la compressibilité osmotique à périodicité d'empilement constante et C_c la constante de couplage entre les déplacements de bicouches et les fluctuations de concentration. Afin de mettre en évidence l'élasticité de l'empilement lamellaire résultant des interactions entre les membranes, il est pertinent de définir le module de compressibilité de la bicouche à potentiel chimique constant [101] :

$$\bar{B} = B - C_c^2 \cdot \chi \quad (1.3.2)$$

Par comparaison avec un développement limité de Taylor, à l'ordre 2, de la densité volumique d'énergie libre, soumises à des fluctuations de concentration δc et de distance de répétition δd , on identifie chaque constante par [101] :

$$B = d^2 \frac{\partial^2 f}{\partial d^2}; C = d \frac{\partial^2 f}{\partial d \partial c}; \chi^{-1} = \frac{\partial^2 f}{\partial c^2} \quad (1.3.3)$$

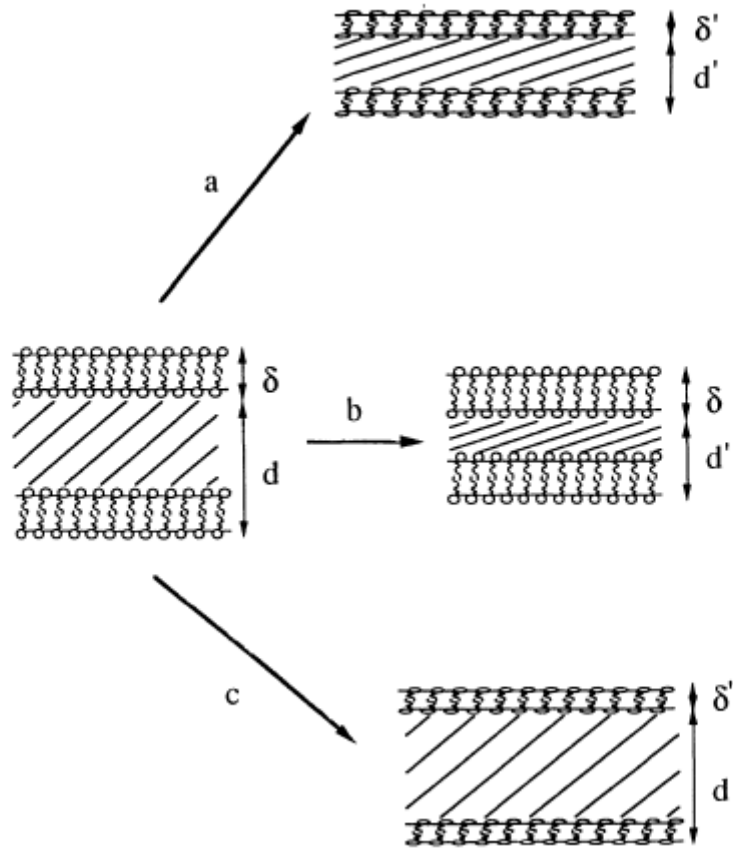


Figure 1.3.1 – Représentation schématique des différents états de contrainte d'un smectique *A* lyotrope d'épaisseur de membrane δ et de périodicité d'empilement d . (a) Compression de la bicouche à concentration de lipides constante, contrôlée par le module élastique B . (b) Compression de la membrane à épaisseur de bicouche constante, contrôlée par le module \bar{B} . (c) Compression de la lamelle à ordre d'empilement constant, contrôlée par le module χ . Cette interprétation résulte de la description géométrique de la concentration c en lipides définie telle que : $c = \frac{m_l \delta}{\rho v_l d}$ avec m_l la masse moléculaire du lipide, ρ sa densité et v_l son volume moléculaire. Illustration extraite de [101].

Dans le but de remonter expérimentalement aux valeurs de ces constantes élastiques, la diffusion dynamique de la lumière, à différents angles d'observations et à différentes polarisations, s'avère adaptée [101]. Par ailleurs, un paramètre, particulièrement utile et relativement aisé à extraire de diffractogrammes de rayons X d'empilement lamellaire à l'état fluide L_α , est utilisé pour caractériser le couplage entre l'élasticité des membranes, associée au module de rigidité de courbure K , et l'élasticité résultante des interactions inter-bicouches, via le module de compressibilité \bar{B} . Ce paramètre est défini par Alain Caillé en 1972 par la relation [14] :

$$\eta = \frac{q_0^2 k_B T}{8\pi \sqrt{K \cdot \bar{B}}} \quad (1.3.4)$$

où q_0 est le vecteur d'onde de Bragg à l'ordre 0, définissant la périodicité d'empilement via la relation $q_0 = \frac{2\pi}{d}$.

1.3.2 Interactions de van der Waals entre bicouches

Les interactions de van der Waals sont des interactions essentiellement électrostatiques entre des dipôles et qui se répartissent en trois effets distincts : des effets d'orientation des dipôles permanents, aussi appelés les forces de Keesom, des effets d'induction entre dipôle permanent et dipôle induit, nommés les forces de Debye, et enfin des effets de dispersion entre des dipôles induits qui se retrouvent sous l'appellation de forces de London. Ces dernières peuvent intervenir entre des corps non polaires. En ce sens où en moyenne (dans le temps), ils ne présentent pas de moment dipolaire. Néanmoins sous l'effet de fluctuations fondamentalement quantiques, à un instant t , la différence de localisation entre les électrons d'un atome et ses protons entraînent la création d'un moment dipolaire instantanée, générant ainsi un champ électrique instantané qui, lui, polarise les atomes voisins. Il s'en suit une réaction en chaîne où les atomes polarisés, de cette manière, interagissent de nouveau avec l'atome initial et ses voisins. Ainsi, les interactions de van der Waals sont présentes systématiquement, que ce soit pour des corps à l'échelle atomique ou bien des corps « continus » d'échelle macroscopique séparés par des distances pouvant être comprises entre l'angström et le micromètre.

L'intérêt est porté ici sur les interactions entre bicouches empilées, de périodicité d . Il est possible d'estimer la densité d'énergie libre résultant des interactions de van der Waals entre deux lamelles, d'épaisseur de membrane δ_m et séparées d'une épaisseur de solvant (ici l'eau) $\delta_{eau} = d - \delta_m$ [104, 56] :

$$f = -\frac{H_{eau-bicouche}}{12\pi} \left[\frac{1}{(d - \delta_m)^2} - \frac{2}{d^2} + \frac{1}{(d + \delta_m)^2} \right] \quad (1.3.5)$$

où $H_{eau-bicouche}$ est la fonction d'Hamaker qui caractérise l'intensité des interactions entre l'eau et les bicouches.

Puisque les lamelles sont identiques, la fonction d'Hamaker demeure positive et par conséquent, les interactions de van der Waals sont attractives. A de faibles distances de séparation, c'est-à-dire dans le cas où les conditions sont telles que $\delta_w \ll \delta_m$, on peut faire l'approximation suivante :

$$f = -\frac{H_{eau-bicouche}}{12\pi} \frac{1}{(d - \delta_m)^2} \quad (1.3.6)$$

Dans la théorie de Lifschitz [78] appliqué à un milieu, on ne considère plus une somme d'interactions à deux corps, mais on prend en compte les effets globaux (des molécules voisines) sur la polarisabilité de chaque corps en considérant un milieu continu. La fonction d'Hamaker est définie notamment à partir des constantes diélectriques des différents milieux, de la température et des effets de retard sur les interactions.

Pour comprendre ces effets de retard, il faut comparer le « temps d'interaction » entre deux corps avec le temps de fluctuation du « dipôle » initial. Pour deux atomes par exemple, il faut considérer le temps Δt pour que le champ électrique produit par l'atome 1 se propage pour interagir avec l'atome 2, situé à une distance D , puis reviennent interagir avec l'atome 1. Si ce temps Δt est comparable à la période de fluctuation $\frac{1}{\nu}$ du dipôle (atome 1), oscillant à la fréquence ν , alors le temps que le champ électrique interagisse de nouveau avec le dipôle 1, celui-ci ne sera plus dans le même état qu'initialement. L'équation, alors définie pour la constante d'Hamaker par Lifschitz, met en jeu ces effets de retard lorsque les distances sont suffisamment importantes pour qu'ils soient notables. Bien que complexe, cette équation est résolue à l'aide de méthodes numériques, par Mahanty et Ninham [84] et par Parsegian [108], pour décrire l'évolution des forces de van der Waals en fonction de la distance de séparation entre objets.

Afin d'évaluer ces effets de retard sur la fonction d'Hamaker, on peut utiliser une relation plus simple [46] :

$$H_{retard} = H_{\nu=0} + \frac{H_{non-ret}}{1 + \frac{p \cdot \delta_{eau}}{100nm}} \quad (1.3.7)$$

avec $H_{\nu=0}$ la contribution à la constante d'Hamaker de la fréquence à l'ordre 0, $H_{non-ret}$ la constante d'Hamaker dispersive définie sans les effets de retard et p est une constante dépendante de la géométrie des 2 corps qui interagissent : $p = 5.3$ pour deux surfaces planes. Dans cette définition la distance de référence $100nm$ correspond à la distance parcourue par la lumière durant une rotation que fait l'électron de l'atome de Bohr.

Enfin, lorsque l'on se trouve dans la condition où le solvant séparant les bicouches est une solution électrolytique, il faut prendre en considération les effets d'écrantage. Si l'on définit la constante d'Hamaker H_{retard} pour de l'eau, alors lorsque du sel est ajouté, on tient compte des effets d'écrantage par la relation [57] :

$$H \simeq H_{\nu=0}(e^{-kD \cdot \delta_{eau}} - 1) + H_{retard} \quad (1.3.8)$$

avec k_D^{-1} est la longueur d'écrantage de Debye caractéristique des ions en solutions.

1.3.3 Interactions électrostatiques entre deux plaques chargées

Lors de l'auto-assemblage en solution, sous la forme de bicouches empilées, des molécules amphiphiles, notamment les molécules ionique ou cationique, présentent une charge aux alentours de leur tête polaire. Cela a pour conséquence de charger la surface de chaque bicouche (toutes identiques) et entraîne une répulsion entre elles, communément appelée force électrostatique. La présence de ces surfaces membranaires chargées peut provenir de l'ionisation ou de la dissociation de groupes constituant la tête polaire des molécules, ou bien résulter de l'adsorption d'ions, ou de la liaison avec des ions, qui sont déjà présents en solution. En réalité, la répulsion qui s'exerce entre ces surfaces membranaires, séparées par une couche aqueuse, ne provient pas essentiellement des interactions électrostatiques émanant des charges à la surface. Lorsque ces molécules amphiphiles s'ionisent en solution, un « contre-ion » est libéré systématiquement au sein du solvant, ce qui amène une charge globale nulle. La répulsion visualisée est en fait d'origine entropique et provient de la répartition de ces « contre-ions », entre les deux membranes adjacentes, qui subissent une pression osmotique les éloignant ainsi, plus ou moins, de la surface mais surtout les éloignant des uns et des autres de manière à augmenter leur entropie de configuration. Cette force répulsive d'origine entropique compense alors l'attraction électrostatique qui s'exerce entre la surface chargée et les « contre-ions » libérés en solution.

Le problème de l'interaction électrostatique entre deux surfaces chargées en solution peut se résoudre via l'équation de Poisson-Boltzmann [57, 4]. Si l'on considère un modèle simple où la solution initiale n'est pas électrolytique, la présence d'ions y est alors négligée, et où l'adsorption éventuelle des « contre-ions » aux surfaces n'est pas prise en compte, on définit l'équation de Poisson-Boltzmann par :

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = \frac{z.e}{\varepsilon}\rho(\psi(x)) = \frac{z.e}{\varepsilon}\rho_0.e^{-\frac{z.e\psi}{k_B.T}} \quad (1.3.9)$$

avec ψ le potentiel électrique, x la position entre les plaques, z la valence des « contre-ions » dissous, e la charge élémentaire, ε la permittivité de la solution (ici l'eau), $\rho(x)$ la fonction de densité en nombre de « contre-ions » dépendante de la position entre les deux plaques, ρ_0 la densité au milieu des deux plaques et $k_B T$ l'énergie thermique. Il est à noter que le problème est symétrique par rapport au plan $x = 0$.

Il est possible alors de définir la pression osmotique qui s'exerce entre ces deux plaques (pour plus de détails se référer à [57]) :

$$P(\delta_{eau}) = 2\varepsilon\left(\frac{k_B T}{z.e}\right)^2.K_{elec}^2(\delta_{eau}) \quad (1.3.10)$$

avec δ_{eau} la distance séparant les deux membranes et K_{elec} une constante par rapport à la position x déterminée par les conditions aux limites du problème.

Ces conditions aux limites nous donnent accès à la relation :

$$\delta_{eau} \cdot K_{elec} \cdot \tan\left(\frac{K_{elec} \cdot \delta_{eau}}{2}\right) = \frac{\delta_{eau}}{\lambda_{G-C}} \quad (1.3.11)$$

avec $\lambda_{G-C} = -\frac{2\epsilon k_B T}{ze\sigma}$ la longueur de Gouy-Chapman et σ la charge surfacique présente sur chaque plaque.

On peut alors distinguer deux régimes distincts. Un premier régime avec $\frac{\delta_{eau}}{\lambda_{G-C}} \gg 1$ appelé le régime de Gouy-Chapman. Ce régime est caractérisé par une distance interplaques grande ou bien par une densité surfacique de charges importante. Les « contre-ions » sont alors majoritairement concentrés proche de la plaque chargée définissant une « double couche » de charges. L'énergie libre par unité de surface du système est alors donnée par l'équation de Langmuir :

$$f_{elec} = 2\epsilon \left(\frac{\pi \cdot k_B T}{z \cdot e}\right)^2 \cdot \frac{1}{\delta_{eau}} \quad (1.3.12)$$

Le second régime, lorsque $\frac{\delta_{eau}}{\lambda_{G-C}} \ll 1$, est appelé le régime du gaz idéal, à cause de la forme simplifiée que prend la pression osmotique. Dans ce régime, la quantité d'eau séparant les deux bicouches est mince ou bien la densité de charges surfacique est faible. Les « contre-ions » sont alors répartis de façon approximativement uniforme entre les plaques définissant une double couche dite « diffuse ». En réalité, pour de très faibles épaisseurs d'eau, la densité de charges surfaciques au niveau des plaques devient dépendante de δ_{eau} à cause du fort confinement appliqué aux « contre-ions » qui s'adsorbent davantage à la surface (« régulation de charges »). En négligeant cette dépendance, on obtient pour l'énergie libre surfacique du système :

$$f_{elec} = -\frac{2\sigma k_B T}{ze} \ln(\delta_{eau}) \quad (1.3.13)$$

Lorsque le solvant est initialement (sans l'auto-assemblage lipidique) une solution électrolytique, ou bien lorsque les molécules amphiphiles étudiées libèrent différents types d'ions, l'analyse des interactions électrostatiques se complique. Néanmoins, connaissant la fraction molaire de chacun, un raisonnement similaire peut s'appliquer. Pour cela, il est nécessaire de définir la densité de charges nettes et la concentration totale en ions, par rapport à leur valence et à leur fraction molaire, en fonction de la position x entre les plaques. Les théories de Gouy-Chapman et de Debye-Hückel [141, 51, 57] permettent alors de comprendre la physique du problème.

Il est à noter que les liaisons éventuelles ou l'adsorption des « contre-ions » avec la surface sont négligées ici. Si cela intervient, une couche d'épaisseur δ_{Stern} , appelée la couche de Stern ou d'Helmholtz [134], est à définir dans la bicouche et représente ainsi la taille finie des groupes ioniques à la surface ainsi que les « contre-ions » adsorbés. L'équation de Poisson-Boltzman ne tient alors plus mais le problème peut être modélisé par un condensateur plan.

1.3.4 Interactions stériques répulsives entre des surfaces décorées de polymères

Lorsque deux surfaces recouvertes de polymères s'approchent l'une de l'autre, une répulsion verticale a lieu au moment où ces polymères s'enchevêtrent, causée par une entropie défavorable liée à cette nouvelle compression. Ces interactions stériques sont complexes et dépendent de nombreux facteurs tels que la densité surfacique de greffage de polymère sur chaque surface, de l'adsorption du polymère et, comme il a été discuté Section 1.2.1.2, de la qualité du solvant ainsi que de la conformation « brosse » ou « champignon » du polymère. Lorsque les polymères sont en conformation « champignon », pour une faible densité de greffage surfacique, dans un solvant « idéal » ceux-ci interagissent, à haute dilution, avec l'autre surface indépendamment des autres chaînes. L'énergie par molécule qui en résulte est complexe mais s'approche, tant que la distance D séparant les surfaces est comprise entre $D = 2R_g$ et $D = 8R_g$, avec R_g le rayon de giration, par [30, 77, 57] :

$$F_{D-E}^{ch} \approx 36.k_B T . e^{-\sqrt{3}.D/R_g} \quad (1.3.14)$$

Pour décrire la compression de brosses ou de champignons lorsque la distance D entre les surfaces décroît (faible dilution, $D \sim 2R_g$ pour la conformation champignon), deux théories s'appliquent et se complètent : la loi d'échelle, « Scaling concepts », d'Alexander et de de Gennes [24, 3, 87] et la théorie de champ moyen appliquée à l'approche de Flory [54, 98, 87]. Comme précédemment, on se place dans des conditions de faible densité de greffage pour des polymères en conformation « champignon » où les polymères des deux surfaces opposées s'entrecroisent sans interaction mutuelle. La théorie de champ moyen de Flory exprime l'énergie libre par molécule, de manière plus générale que l'équation 1.2.5, telle que :

$$F_{Flory}^{ch} \approx k_B T . \left(\frac{R_F^0}{l_m} \right)^{1/3} \left[\frac{2}{3} \left(\frac{R_F^0}{R} \right)^3 + \left(\frac{R}{R_F^0} \right)^2 \right] \quad (1.3.15)$$

avec $R_F^0 = \left(\frac{3.k}{2} \right)^{1/5} . R_F$ la valeur d'équilibre lorsque $R = D$, k est un facteur permettant de prendre en considération les effets stériques de volume exclu par rapport aux effets d'extension du polymère.

Lorsque la densité de greffage est augmentée, $\pi R_g^2 < \frac{A}{\chi_p} < 2\pi R_g^2$, les polymères de chaque surface sont toujours en conformation « champignon » et commencent à interagir verticalement. La théorie de champ moyen de Flory peut alors s'appliquer mais avec $R = \frac{D}{2}$. On lui confronte la théorie d'échelle ou « scaling concepts » introduite par Daoud et de de Gennes [24, 87] qui présente l'avantage de définir une distance critique entre membranes lipidiques à partir de laquelle les polymères greffés, caractérisés comme des objets à 2D, commencent à s'enchevêtrer verticalement :

$$D_{SC}^{crit} \approx \frac{l_m^5}{A^2} \chi_p^2 . n_p^3 \quad (1.3.16)$$

L'énergie libre par champignon « compressé » est définie comme :

$$F_{SC}^{ch} \approx k_B T \cdot n_p \left(\frac{l_m}{D} \right)^{5/3} \quad (1.3.17)$$

Dans le cas où la densité de greffage surfacique est plus importante, $\frac{A}{\chi_p} < \pi R_g^2$, les polymères d'une même surface interagissent latéralement entre eux, ils changent alors de conformation comme expliqué Section 1.2.1.2. Le polymère est alors en conformation « brosse » et possède une extension verticale L_{br} . Deux surfaces planes sur lesquelles sont greffés des polymères en conformation « brosse » sont soumises à une pression répulsive, lorsque $D < 2L_{br}$. L'énergie libre par molécule qui en résulte est approximée, forme généralisée de l'équation 1.2.9, par la théorie du champ moyen de Flory [54, 98, 87] :

$$F_{Flory}^{br} \approx k_B T \frac{L_{br}^0}{(l_m \cdot \Sigma_{br})^{1/3}} \left[2 \frac{L_{br}^0}{D} + \frac{1}{8} \left(\frac{D}{L_{br}^0} \right)^2 \right] \quad (1.3.18)$$

avec $L_{br}^0 = \left(\frac{k}{2} \right)^{1/3} \cdot L_{br}$ la longueur d'équilibre du polymère en conformation « brosse » pour une membrane isolée et k est un facteur permettant de prendre en considération les effets stériques de volume exclu par rapport aux effets d'extension du polymère.

Une expression exacte améliorée mais légèrement plus complexe est définie avec un profil de densité vertical parabolique de polymère estimée par Milner et al. [97, 87].

On lui confronte, de même que précédemment, la théorie d'échelle d'Alexander et de Gennes [3, 87, 57] :

$$f_{SC}^{br} = \frac{k_B T}{\Sigma_{br}^{3/2}} \left[\frac{4}{5} \frac{(2L_{br})^{9/4}}{D^{5/4}} + \frac{4}{7} \frac{D^{7/4}}{(2L_{br})^{3/4}} \right] \quad (1.3.19)$$

où le premier terme décrit la répulsion osmotique entre les pelotes de polymères tandis que le second décrit l'énergie élastique d'extension des chaînes favorisant leur contraction.

Pour $0.2 < \frac{D}{2L_{br}} < 0.9$, on peut approximer cette relation par :

$$f_{SC}^{br} \simeq \frac{100}{\pi} \frac{L_{br}}{\Sigma_{br}^{3/2}} k_B T \cdot e^{-\pi \cdot D / L_{br}} \quad (1.3.20)$$

Dans ces expressions exposées, les interactions faisant appel à des « liaisons » où les polymères peuvent établir des « ponts » entre les deux surfaces ne sont pas prises en considération. Ces interactions dépendent fortement de l'adsorption du polymère et de la « qualité » du solvant.

1.3.5 Ondulations d'Helfrich

Les structures lipidiques dites fluides, telles les membranes, ne peuvent être analysées comme des objets rigides puisque la conformation de leurs chaînes hydrocarbonées leur confère une certaine élasticité (Section 1.2.2.1 et Section 1.3.1). Ainsi, les membranes sont

soumises à des mouvements collectifs thermiques à l'échelle macroscopique. Ces bicouches peuvent alors « onduler » sous l'effet de la température selon différents modes d'ondulation dépendants de la constante élastique de courbure k_c . Au sein de l'empilement lamellaire, elles expérimentent alors des forces répulsives stériques à longue portée résultant de ces ondulations thermiques qui entraînent alors des « collisions » entre lamelles adjacentes. La densité surfacique de l'énergie libre associée à ces effets répulsifs de volume exclu au sein de la phase lamellaire est calculée théoriquement par Helfrich [49] :

$$f_{\text{Helfrich}} = \frac{3\pi^2}{128} \frac{(k_B T)^2}{k_c (d - \delta_m)^2} \quad (1.3.21)$$

avec d l'ordre d'empilement, δ_m l'épaisseur de la lamelle, $k_B T$ l'énergie thermique.

L'empilement lamellaire étant soumis à des interactions stériques, donc résultant des effets de volume exclu, il est possible d'estimer une longueur d'onde d'ondulation λ_\perp de la bicouche dans le plan latéral X-Y qui est couplée à la périodicité d'empilement d , paramètre d'ordre dans la direction verticale \vec{z} via la relation d'Helfrich et Servuss [50] :

$$\lambda_\perp \simeq \sqrt{\frac{2\pi^3}{3} \frac{k_c}{k_B T}} \cdot d \quad (1.3.22)$$

Pour des valeurs de k_c de l'ordre de $0.5 - 25 k_B T$, on obtient $\lambda_\perp \simeq 3 - 23 d$ en supposant que k_c est indépendant de d .

Lorsque l'on se trouve dans un régime de forte dilution, les interactions stériques d'Helfrich peuvent dominer les interactions en présence. Dans ce cas, on peut déterminer leur contribution au module de compression à potentiel chimique constant \bar{B} (voir Section 1.3.1) qui est pertinent pour sonder les interactions entre lamelles via la relation [101] :

$$\bar{B} = d \cdot f''(d) \quad (1.3.23)$$

En ne considérant seulement que les ondulations d'Helfrich, on obtient alors :

$$\bar{B} = \frac{9\pi^2}{64} \frac{(k_B T)^2}{k_c} \frac{d}{(d - \delta_m)^4} \quad (1.3.24)$$

Les autres interactions possibles, telles que celles de van der Waals, ne sont plus pertinentes et sont négligées dans ce « régime » d'Helfrich, il n'y a, par conséquent, plus d'attraction entre les membranes. La phase lamellaire est alors dans un état dit « non lié » seulement régie par la répulsion stérique inter-membranes. En ce sens où, si la dilution est augmentée, l'empilement lamellaire gonfle proportionnellement avec l'ajout de solvant et ce, « indéfiniment » selon la théorie d'Helfrich. Expérimentalement, on peut se rapporter à la théorie de Caillé (Section 1.3.1) pour remonter aux paramètres élastiques des lamelles empilées de façon à caractériser le régime d'Helfrich à l'aide de la diffusion de rayons X aux petits angles. Combinant les équations 1.3.4 et 1.3.24, on évalue le paramètre de Caillé pour les ondulations d'Helfrich comme :

$$\eta = \frac{4}{3} \left(1 - \frac{\delta_m}{d}\right)^2 \quad (1.3.25)$$

Les forces d'ondulations ont été mesurées expérimentalement et cette relation du paramètre de Caillé semble tenir de sa pertinence [127]. Néanmoins, il semble que le facteur numérique $a = \frac{4}{3}$ puisse être sujet à débat [45, 102, 64, 44]. Ainsi, certaines caractérisations expérimentales de membranes décorées de peptides ou de polymères prennent en compte un facteur numérique a et une épaisseur δ_m effectifs pour décrire les différences avec les ondulations d'Helfrich de la membrane « seule » [140, 139, 89]. Une procédure similaire est effectuée pour des membranes de tensioactifs empilées dans un mélange ternaire [69]. Si les nouvelles interactions sont ajoutées, de manière quantitative, aux ondulations telles que définies par Helfrich, il semble que celles-ci demeurent pertinentes même pour des systèmes complexes comme c'est le cas pour des phases lamellaires avec des copolymères à blocs (triblocs) greffés aux membranes [19] soumises aux interactions d'Helfrich, aux interactions stériques, induites par les polymères, et aux interactions électrostatiques.

1.3.6 Phases lamellaires « liées » ou « non liées »

Comme expliqué Section 1.3.5, pour des bicouches suffisamment flexibles, les interactions stériques répulsives surpassent en intensité les autres interactions inter-bicouches en présence, telles que les forces de van der Waals. Le régime d'Helfrich décrit alors un état « non lié ». Dans un cadre plus général, les interactions entre bicouches empilées, sont régies par une compétition entre les répulsions électrostatiques, d'hydratation et entropiques avec les attractions de van der Waals et celles d'origine entropique. Cette compétition entre ces différentes forces implique alors une portée limite d'interaction, c'est-à-dire une quantité de solvant limite, pour laquelle les différentes attractions et répulsions se compensent. Lorsque cette distance bicouche-bicouche limite est atteinte, correspondant à la limite de dilution, l'ajout de solvant est alors en excès de la phase lamellaire entraînant une coexistence entre l'empilement lamellaire et une phase uniquement composée d'eau. Un tel système est alors caractérisé d'état « lié ».

Une transition entre ces deux états, référée comme « the unbinding transition » ou « la transition de décrochage », est possible et repose sur une variation sensible entre les interactions membrane-membrane. Cette question de transition de phase est abordée théoriquement par Leibler et Lipowsky [79, 73, 72] puis par Podgornik et Parsegian [114]. Cette délicate transition peut, de plus, être induite par l'ajout d'une contribution polymérique participant aux interactions entre membranes [12]. Milner et Roux proposent par la suite une description revisitée des contributions attractives, tout en conservant les mêmes caractéristiques fondamentales, à l'aide d'une description de Flory, en adoptant une approche perturbative, pour décrire des interactions attractives faibles [99].

Afin d'effectuer une description thermodynamique de l'empilement de bicouches, il est nécessaire d'établir deux équations d'état [6], établies à partir de l'énergie libre du sys-

tème à deux composants (solvant-lipides), défini pour une fraction volumique en lipides ϕ_{lip} . D'une part, l'équation d'état dit de l'empilement lamellaire est associée au gonflement, dans la direction perpendiculaire aux bicouches, et est mesuré par la périodicité lamellaire d . D'autre part, l'équation d'état de la bicouche est associée à l'extension latérale et gouverne la variation de l'aire moléculaire Σ , dans le plan de la bicouche, à l'interface membrane-solvant. Dans le but d'obtenir ces deux équations, il convient de décrire la densité volumique de l'énergie libre d'excès f_{exc} [122]. L'énergie libre dépend alors intrinsèquement de trois variables que sont l'ordre d'empilement d , l'aire moléculaire lipidique Σ et la fraction volumique en lipides ϕ_{lip} . Considérant des bicouches homogènes et planes, une relation géométrique simple de l'empilement lamellaire permet de coupler ces paramètres [10, 122] :

$$d = 2 \frac{v}{\Sigma \cdot \phi_{lip}} \quad (1.3.26)$$

avec v le volume moléculaire du lipide, constant car supposé incompressible. Grâce à cette équation, il est possible de définir une dépendance de f_{exc} selon seulement deux variables indépendantes (d, ϕ_{lip} ou Σ, d ou Σ, ϕ_{lip}). En revanche, cette relation géométrique n'est plus pertinente si la bicouche présente des défauts structuraux ou des ondulations d'amplitudes importantes.

L'équation d'état de l'empilement lamellaire, considérant le couple de variables (d, ϕ_{lip}), correspond à l'expression de la pression osmotique Π donnée par [122] :

$$\Pi = \phi_{lip} \frac{\partial f_{exc}}{\partial \phi_{lip}} - f_{exc} \quad (1.3.27)$$

Dans le cas d'un état « lié » de l'empilement, la coexistence entre l'empilement lamellaire de périodicité d_{max} et de l'eau pure ajoutée en excès apparaît lorsque la pression osmotique atteint une valeur nulle et ce pour une valeur de fraction volumique finie ϕ_{lip}^* : $\Pi(\phi_{lip}^*) = 0$.

L'équation d'état de la bicouche résulte de la minimisation de l'énergie libre par rapport aux fluctuations de l'aire moléculaire à l'interface Σ , ou de la périodicité d'empilement d dans le cas choisi ici, que l'on couple ensuite à l'équation 1.3.26, afin d'obtenir leur expression à l'équilibre ($\Sigma_{eq}(\phi_{lip})$ et $d_{eq}(\phi_{lip})$), soit :

$$\frac{\partial f_{exc}}{\partial d} = 0 \quad (1.3.28)$$

Pour des systèmes électriquement neutres, les interactions à considérer pour définir une expression de f_{exc} sont séparées en interactions inter-bicouches et intra-bicouches. On se propose de considérer les ondulations d'Helfrich (Section 1.3.5), les interactions attractives entre bicouches par une approche perturbative [99] et les interactions intra-bicouches par la thermodynamique du fluide bidimensionnel de van der Waals, dans des conditions éloignées de sa propre transition « non liée » liquide-gaz (Section 1.2.1.1). Dans cette approche, la contribution attractive f_{vdW} est ajoutée à la densité volumique de l'énergie

libre d'excès du système sous la forme d'un terme de type viriel, à l'ordre perturbatif le plus faible, tel que [10] :

$$f_{vdW} = -k_B T \chi \phi_{lip}^2 \quad (1.3.29)$$

avec le second coefficient de viriel χ , analogue au coefficient introduit dans la correction de la thermodynamique du gaz réel considérant des sphères dures, qui est défini positif pour des interactions attractives.

La densité volumique de l'énergie libre d'excès est finalement :

$$f_{exc} = \frac{3\pi^2}{128} \frac{(k_B T)^2}{d \cdot k_c \cdot (d - \delta_m)^2} - k_B T \chi \phi_{lip}^2 + \frac{k_B T}{d \cdot \Sigma} \cdot \ln \left[\frac{\xi^2}{e(\Sigma - \Sigma_0)} \right] + \frac{k_B T}{2d} \frac{b_2}{\Sigma^2} \quad (1.3.30)$$

Ici, les éventuelles forces d'hydratation [110] affecteront légèrement l'intensité du coefficient b_2 . Cette description thermodynamique s'est démontrée efficace pour décrire les expériences de mesure de pression osmotique [122] pour des empilements lipidiques en phase aqueuse, à deux composants lipidiques, similaires à ceux étudiés et présentés dans ce manuscrit.

1.4 Encapsulation de bâtonnets d'ADN entre des lamelles

Dans le cadre de cette thèse, l'attention est dirigée, comme décrite précédemment, vers la caractérisation des interactions membranes-membranes et de la thermodynamique de l'empilement de bicouches, composées de lipide et de copolymères diblocs. Un second objectif est ensuite de comprendre davantage les différentes structures formées avec l'insertion de bâtonnets d'ADN, système dit « ternaire », à partir notamment d'une corrélation effectuée avec le système dit « binaire », c'est-à-dire dépourvu d'ADN. Pour cela, il s'avère nécessaire de décrire quelques propriétés de l'ADN et de ses différentes organisations, déjà observées, en solution aqueuse, d'une part, et au sein de différents complexes lipidiques d'autre part.

1.4.1 L'acide désoxyribonucléique

1.4.1.1 Quelques propriétés générales

L'acide désoxyribonucléique, ou ADN, est une macromolécule biologique, plus particulièrement, un polymère poly-anionique semi-flexible dont la fonction principale est de contenir l'information génétique. L'ADN est donc constitué d'une répétition de monomères, appelés nucléotides, qui se décomposent eux-mêmes en trois « blocs ». En effet,

chaque nucléotide est composé d'un (ou plusieurs) groupe(s) phosphate(s), d'un sucre pentose, le désoxyribose, et d'une base azotée. Ils existent alors quatre types de nucléotides qui diffèrent par leur base azotée. Parmi ces bases, on retrouve les purines avec l'Adénine (notée A) et la Guanine (notée G) et leur complémentaire respectif, les pyrimidines, à savoir, la Thymine (notée T) et la Cytosine (notée C). Les séquences entre ces différentes bases hétérocycliques permettent ainsi de coder l'ensemble de l'information génétique.

L'ADN, sous sa forme naturelle, résulte de l'organisation de deux brins liés entre eux, sous la forme hélicoïdale, via des interactions faibles au niveau de leurs bases azotées, « complémentaires » deux à deux (A-T ou G-C), définissant une paire de bases (notée bp). Sa structure fut révélée de manière expérimentale, par diffusion de rayons X, par Rosalind Franklin et Maurice Wilkins et fut définie théoriquement par James Wastson et Francis Crick en 1953 [142]. Cette forme en double hélice s'explique par la minimisation de la surface de contact entre les bases azotées hydrophobes (constituant le cœur du double brin) et les molécules d'eau. L'ADN, demeurant une molécule complexe, existe sous diverses conformations dépendantes des conditions physico-chimiques environnementales telles que la présence d'ions en solution [144]. De plus, celles-ci dépendent fortement de l'arrangement des bases azotées, empilées au cœur de la molécule, qui suivant certaines séquences significatives, modifient les caractéristiques géométriques et élastiques de l'ADN [15]. Les conformations les plus communes sont les conformations dites « B » et « A » que l'on peut distinguer, à titre d'exemple, par leur régime d'hydratation : haute hydratation pour l'ADN « B » et faible hydratation pour l'ADN « A » [71, 34, 124]. Le tableau 1.4.1 résume quelques caractéristiques physiques de ces deux formes d'ADN.

	Pas d'hélice	Diamètre	Régime d'hydratation	L_p	ρ	M_{nucl}
ADN « B »	10 bp	$\sim 20\text{\AA}$	haute dilution	$150bp \sim 50nm$	1.7	~ 330 ($g.mol^{-1}$)
ADN « A »	11 bp	$\sim 23\text{\AA}$	faible dilution			

Table 1.4.1 – *Propriétés physiques de l'ADN dans les conditions physiologiques. Deux conformations de l'ADN, dont la transition dépend par exemple du taux d'hydratation, sont prises en considération : l'ADN « B » et l'ADN « A ». On définit leur longueur de persistance L_p , leur densité ρ et la masse molaire par nucléotide M_{nucl} .*

De plus, La molécule d'ADN, est un polymère poly-électrolyte de répartition de charges uniforme à sa surface. En effet, en solution, chaque groupe phosphate, porté par chaque nucléotide, libère un proton H^+ résultant en une densité de charges surfacique de l'ADN hautement négative [91]. La longueur de persistance de ce polymère L_p dans des conditions physiologiques est d'environ 50 nm . Par conséquent, pour des longueurs plus courtes ou égales, l'ADN peut être représenté comme un bâtonnet cylindrique rigide. Néanmoins, cette longueur de persistance est très dépendante des conditions environnementales, comme la force ionique qui peut diminuer celle-ci de 40% [13].

1.4.1.2 Les phases liquides cristallines de bâtonnets d'ADN en solution aqueuse

L'intérêt est porté ici sur les interactions intervenant entre les différentes molécules d'ADN en solution aqueuse. Pour simplifier le problème, on se concentre sur des tailles d'ADN équivalentes à sa longueur de persistance, de manière à pouvoir considérer les doubles hélices comme des bâtonnets cylindriques rigides comme expliqué à la section précédente. Il a été exposé précédemment que l'ADN est un polymère poly-électrolyte. On peut s'attendre alors à des interactions entre ADN de même nature que celles, caractérisées Section 1.3.3, qui apparaissent entre deux surfaces chargées. Des mesures directes de forces s'exerçant entre molécules d'ADN ont été entreprises à partir de méthodes de contrôle de pression osmotique [114]. Il est démontré que ces interactions répulsives de types double couche (« double layer »), dites électrostatiques, sont bien pertinentes pour des distances entre surfaces d'ADN de plus de 1 nm . De manière générale, les interactions entre les molécules d'ADN demandent encore de l'investissement pour être totalement comprises théoriquement. Néanmoins, il semblerait qu'elles soient d'origine entropique que ce soit à courte distance ($\leq 1\text{ nm}$), avec la présence d'une force d'hydratation [136], ou à plus grande distance avec des interactions stériques répulsives provenant des fluctuations thermiques associées à la configuration qu'adopte l'ADN au sein du solvant [135]. Des forces attractives sont même observées expérimentalement [118, 40], pour des fortes concentrations en ions ou pour des ions multivalents, et prédites théoriquement [107, 105], pointant ici l'importance des contre-ions dans les interactions entropiques entre molécules d'ADN. Enfin, il semble possible de négliger l'éventuelle importance des interactions d'origine purement électrostatique puisque la teneur en sels ajoutés ne semble pas jouer un rôle sur l'intensité de ces interactions à courte portée [74, 120, 136].

Un riche polymorphisme apparaît dans les différentes mésophases que définissent les molécules d'ADN en solution. Ces cristaux liquides dépendent bien entendu des conditions environnementales notamment de la longueur du polymère et de la solution électrolyte. L'attention sera portée dans le cadre de ce travail plus particulièrement sur l'effet de la concentration en molécules d'ADN sur les différentes organisations. Livolant et ses collaborateurs [83, 81, 80, 82, 31] ont entrepris une caractérisation globale du diagramme de phase de bâtonnets d'ADN de 50 nm en solution en présence de contre-ions monovalents (voir Tableau 1.4.2). Cette caractérisation fut réalisée à partir de techniques de microscopies à lumière polarisée, de microscopies électroniques associées à de la cryofracture et via la diffusion de rayons X aux petits et grands angles (SAXS et WAXS).

Ainsi, une phase isotrope est mise en évidence à faible concentration. Lorsque la concentration est augmentée, l'anisotropie apparaît sous la forme de phases bleues, sur un domaine très restreint, puis les bâtonnets définissent une phase cholestérique, illustrée Figure 1.4.1. Au sein de cette phase nématique chirale, les bâtonnets d'ADN sont, en moyenne, parallèles entre eux dans un même plan et une orientation continue des molécules, autour d'une direction donnée (axe cholestérique), s'effectue de couches en couches. L'organisation structurée de l'ADN s'accroît sous la formation d'une phase hexagonale 2D colon-

	Isotrope	Bleue	Cholestérique	Hexagonale	Orthorhombique
$C_{ADN}(mg/ml)$	0 \rightarrow \sim 160		\sim 160 \rightarrow 380	380 $\xrightarrow{2D}$ 455 $\xrightarrow{3D}$ 670	670 \rightarrow 1055
ϕ_{ADN}	0 \rightarrow \sim 0.1		\sim 0.1 \rightarrow 0.22	0.22 $\xrightarrow{2D}$ 0.27 $\xrightarrow{3D}$ 0.4	0.4 \rightarrow 0.62
$a(\text{\AA})$			49 \rightarrow 32	31.5 $\xrightarrow{2D}$ 29 $\xrightarrow{3D}$ 23.7	$a = 24.1 \rightarrow 20.8$ $b = 39.3 \rightarrow 29.7$
$\delta_{hélice}(\text{\AA})$					34.6 \rightarrow 30.2

Table 1.4.2 – Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN (50 nm) en solution tampon d'acétate d'ammonium à 0.25 M. Le domaine de chaque symétrie structurale, qu'adoptent les bâtonnets, est délimité par la concentration en ADN au sein du solvant C_{ADN} ou par sa fraction volumique ϕ_{ADN} . La distance a séparant chaque bâtonnet d'ADN ainsi que le pas de la double hélice de l'ADN sont représentés. Extrait de [82]

naire, les bâtonnets ont alors un ordre d'orientation mais aussi un ordre de position. Les molécules décrivent donc un motif hexagonal dans le plan latéral et sont unidirectionnellement alignées dans le plan vertical. Cette phase se relie d'un point de vue structural aux micelles cylindriques lipidiques mentionnées Section 1.1.3. Cette structure ordonnée tend avec la diminution en eau vers une structure cristalline hexagonale 3D donc une organisation progressive s'installe selon la direction d'orientation des cylindres, dite longitudinale. Enfin, sous un confinement fort, les doubles hélices s'organisent en phase cristalline orthorhombique 3D. Celles-ci, de façon remarquable, demeurent tout au long du fort confinement imposé sous la conformation « B » de l'ADN.

1.4.2 Confinement d'ADN dans des phases lipidiques cationiques

Des complexes lamellaires encapsulant de l'ADN ont été étudiés dans le but de la thérapie génique. Basés sur des interactions électrostatiques, les premiers lipoplexes cationiques, utilisés pour l'encapsulation de l'ADN poly-anionique, ont été caractérisés expérimentalement [117, 65, 66] et théoriquement [47, 92]. Dans le cadre de ces travaux pionniers, de longs bâtonnets semi-flexibles d'ADN (de longueur de contour $L_C = 16.5 \mu m$) sont introduits au sein d'un complexe lipidique formé par un mélange de lipides cationiques, DOTAP (di-oleoyl triméthylammonium propane), et de lipides neutres, DOPC (dioleoyl phosphatidylcholine) ou DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine). Les expériences sont conduites au point isoélectrique de façon à ce que les charges positives des DOTAP compensent les charges négatives de l'ADN. Deux principales structures sont mises en évidence. La première, nommée L_α^C , où l'ADN est pris en sandwich au sein de la phase lamellaire; les molécules d'ADN décrivent une organisation nématique dans le plan latéral, caractérisée par une distance de corrélation d_{ADN} entre bâtonnets de même orientation, au sein de la couche aqueuse séparant chaque bicouche membranaire. Elle est obtenue pour les deux mélanges [117, 65, 66]. La seconde, la phase hexagonale inverse colonnaire H_{II}^C , Figure 1.4.2 (b), est une structure lipidique de micelles cylindriques inverses organisées hexago-

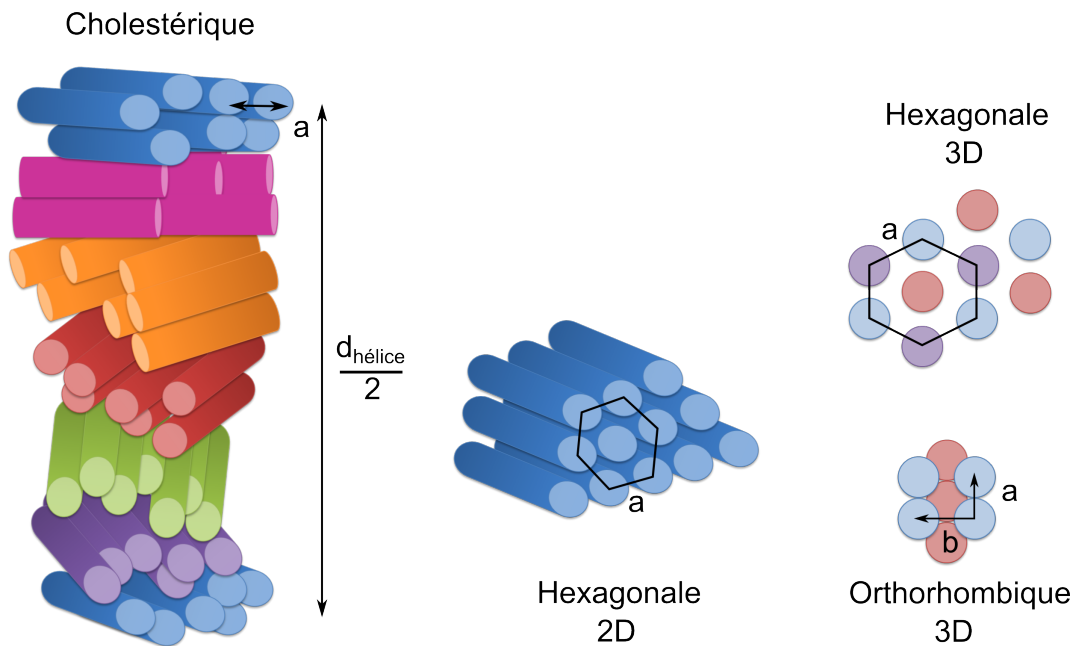


Figure 1.4.1 – Phases anisotropes de l'ADN. En fonction des conditions environnementales, notamment de la concentration en ADN dans le solvant, les bâtonnets d'ADN décrivent différentes organisations. La phase cholestérique où chaque bâtonnet d'une même couche ont une orientation commune et sont séparés par une distance a . Cette orientation varie verticalement décrivant une hélice de pas $d_{\text{hélice}}$. La phase hexagonale 2D où les bâtonnets sont empilés de manière à décrire une symétrie hexagonale latéralement mais ne possède pas d'ordre positionnel verticalement. La phase hexagonale 3D où les bâtonnets d'ADN conservent leur symétrie latérale hexagonale mais possèdent de plus une structure dans la direction verticale. La phase orthorhombique des bâtonnets d'ADN est définie par deux paramètres de mailles a et b .

nalement, encapsulant l'ADN au sein de chaque « cylindre » d'eau, et qui se caractérise par un paramètre a de la maille hexagonale 2D. Celle-ci, en revanche, n'apparaît que pour les mélanges lipidiques DOTAP/DOPE [66].

L'auto-assemblage du complexe L_α^C résulte principalement des interactions, d'origine entropique, associées au relargage des contre-ions dans la solution, en dehors de l'empilement lamellaire, qui étaient au préalable liés à l'ADN via des liaisons unidimensionnelles et aux membranes cationiques via des liaisons bidimensionnelles [125]. Contrairement à la situation précédente gouvernée par l'entropie, la structure H_{II}^C est la conséquence des interactions électrostatiques attractives entre l'ADN poly-anionique et les membranes cationiques sous forme de monocouches qui minimisent leur distance de séparation. La différence observée entre les structures pour les deux types de membranes provient de leur élasticité distincte. En effet, l'ajout de DOPE a pour effet d'augmenter de façon notable (davantage que le DOPC) la constante élastique de courbure k_c de la membrane lipidique. Les interactions inter-membranes sont gouvernées par les ondulations d'Helfrich (Section 1.3.5) qui sont d'autant plus prépondérantes pour une faible valeur de constante élastique. Ainsi, lorsque la teneur en DOPE est diminuée, la constante de rigidité de courbure diminue aussi, et les interactions stériques répulsives compensent alors l'attraction électrostatique donnant alors lieu à la transition $H_{II}^C \rightarrow L_\alpha^C$ [47, 92, 125].

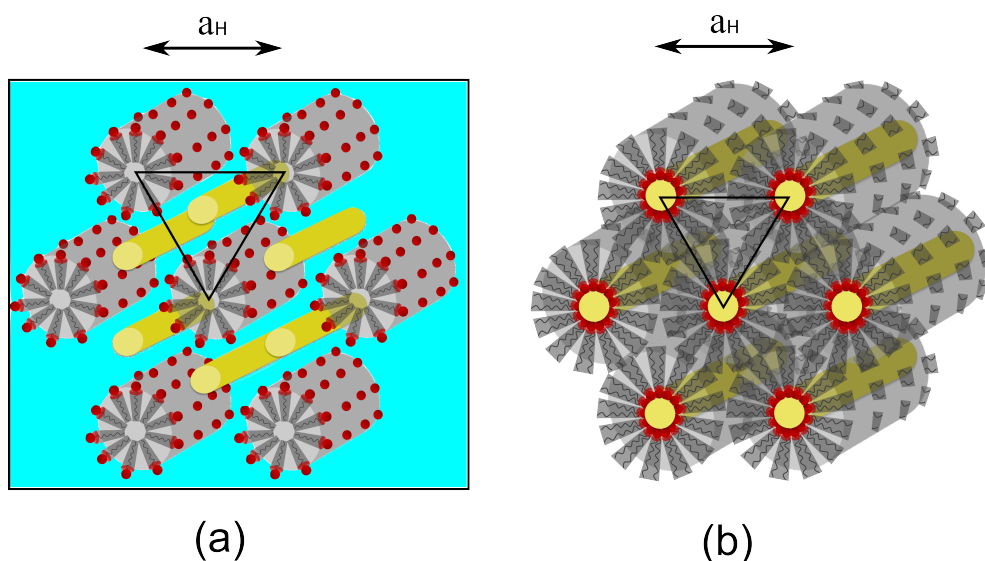


Figure 1.4.2 – Représentation des deux organisations hexagonales lipidiques encapsulant l'ADN. (a) Des micelles cylindriques lipidiques encapsulent les bâtonnets entre elles selon une symétrie hexagonale 2D de paramètre de maille a_H . (b) Des micelles cylindriques inverses encapsulent chaque bâtonnet d'ADN en leur « cœur » tout en décrivant, de même, une symétrie hexagonale 2D.

A la suite de ces expériences conduites sur des complexes lipidiques cationiques, de nou-

velles structures d'ADN ont été révélées expérimentalement. La phase hexagonale directe H_I^C , Figure 1.4.2 (a), est mise en évidence, où les lipides décrivent des micelles cylindriques directes organisées hexagonalement confinant, entre elles, les bâtonnets d'ADN qui s'organisent similairement [33, 126]. D'autres arrangements de l'ADN ont lieu, pour différentes variétés de compositions lipidiques, telles que les organisations rectangulaires [5, 17] et cubique [9] d'ADN confinés au sein d'un empilement de bicouches.

Récemment, il est montré que l'ensemble des études effectuées sur les liposomes cationiques encapsulant de l'ADN ont permis de comprendre et d'améliorer la performance des méthodes de transfections [126]. Malgré l'avantage de pouvoir se lier électrostatiquement aux membranes anioniques de cellules spécifiques [68, 16], ces complexes peuvent, néanmoins, présenter une cytotoxicité causée par leurs charges positives [131, 25].

1.4.3 Confinement d'ADN dans des phases lipidiques non ionique

L'avantage indéniable de l'attraction électrostatique pour maintenir l'ADN au sein de vecteurs lipidiques cationiques a privilégié leur essor. Cependant, le confinement de molécules chargées d'ADN demeure possible au sein d'une structure lamellaire électriquement neutre [116, 115, 26, 23] sans aucun ajout de sels divalents, utilisés pour médier des interactions électrostatiques « dirigées » similaires à celles responsables de la formation des complexes cationiques [93, 94, 9]. En effet, des phases lamellaires lyotropes en solution aqueuse, composées de lécithines et d'une faible teneur en tensioactifs non ioniques, se sont révélées capables d'encapsuler des bâtonnets d'ADN, dispersés entre les bicouches [116]. Dans de tels systèmes, les interactions électrostatiques ne semblent donc pas gouverner l'auto-assemblage qui résulte, sans doute, d'interactions entropiques et de van der Waals. Le premier pas effectué pour décrire ces auto-assemblages se base sur des effets de volume exclu, avec l'utilisation d'un modèle de Flory, pour décrire les résultats expérimentaux. Ainsi, une transition de phase est mise en évidence entre un empilement lamellaire lipidique dépourvue d'ADN et une seconde phase lamellaire concentrée en ADN. Ce changement de phase semble corrélé à la transition isotrope-nématique du système binaire uniquement composé de bâtonnet d'ADN dispersés dans de l'eau [20, 115].

Poursuivant ces recherches, pour un complexe similaire, Emerson Rodrigo Teixeira da Silva a investigué, dans le cadre de sa thèse [22], l'effet du confinement appliqué sur l'organisation de ces bâtonnets nanométriques (de longueur 50 nm). Dans cet objectif, des expériences sont menées en variant de manière contrôlée l'hydratation du système, d'une part, et la proportion volumique entre les lipides et l'ADN, d'autre part [26, 23]. Ce faisant, un riche polymorphisme est affiché, exposant des organisations isotropes L_α , nématiques L_α^N , rectangulaires L_α^R et hexagonales L_α^H d'ADN, au sein d'un empilement lamellaire de bicouches lipidiques, Figure 1.4.3. De plus, le confinement de faible amplitude imposé au système permet aux bicouches de garder leurs chaînes aliphatiques à l'état fluide définissant donc un empilement L_α .

Les membranes lipidiques sont composées de lécithine (70% en teneur massique), une

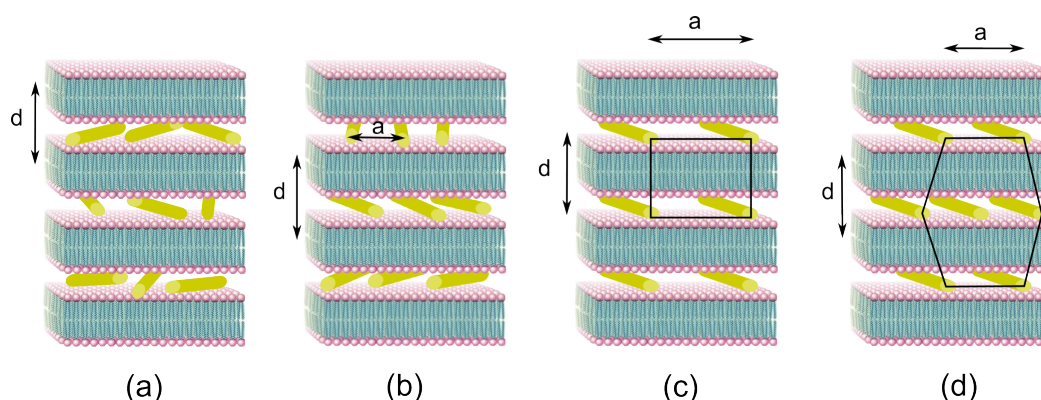


Figure 1.4.3 – Organisations de l'ADN au sein d'un empilement de bicouches. (a) Organisation isotrope de l'ADN, les bâtonnets sont complètement désordonnés. (b) Organisation nématique des bâtonnets d'ADN. Au sein d'une même couche aqueuse, les bâtonnets ont une orientation commune et sont séparés latéralement par une distance moyenne a . Il n'y a pas de corrélation orientationnelle ni positionnelle entre chaque couche. (c) Organisation rectangulaire de l'ADN. Chaque bâtonnet est séparé latéralement par une distance a et verticalement par une distance d , ordre d'empilement des bicouches. (d) Organisation hexagonale de l'ADN. L'ADN adopte une symétrie hexagonale 2D de paramètre de maille a .

phosphatidylcholine zwiterionique, et d'un co-tensioactif non-ionique sous la forme d'un copolymère. Trois lignes de dilution sont analysées, définie chacune par un rapport volumique constant entre lipides et ADN $\rho_V = \frac{\phi_{lip}}{\phi_{ADN}}$, Figure 1.4.4a. Il apparaît alors différentes organisations, énumérées précédemment, dans des domaines d'hydratation monophasique ou biphasique. Une ligne de dilution, pour $\rho_V = 3.1$ ressort particulièrement pour mettre en évidence des domaines monophasiques plus étendus. Une organisation de l'ADN apparaît, sous la forme nématique, pour une périodicité d de l'empilement, représentant le confinement vertical, d'environ 75 \AA avec une distance de corrélation ADN-ADN au sein d'une même couche, c'est-à-dire contenue dans le plan latéral, de 32 \AA . Le confinement le plus « intense » atteinte, marquée par une faible hydratation, est établie par l'organisation hexagonale de l'ADN au sein de la phase lamellaire avec une périodicité de 58 \AA et un paramètre de maille hexagonale 2D de 67 \AA . Or, le diamètre d'un bâtonnet d'ADN se situe typiquement aux alentours de 20 \AA (voir Tableau 1.4.1) et l'épaisseur de membrane d'une bicouche de lécithines est de l'ordre de 40 \AA [57] ce qui montre ici qu'un confinement « limite » est atteint, soulignant alors une forte interaction, à courte distance, entre l'ADN et la membrane.

Cette interaction bicouche-ADN intense est démontrée par le renforcement structural de l'ordre smectique au sein de l'empilement, par la présence de l'ADN dans la couche aqueuse, qui se manifeste sur les diffractogrammes de rayons X aux petits angles, à confinement vertical identique, voir Figure 1.4.4b. Puisque l'ADN n'est pas confiné entre des plaques rigides, le rôle clé de la membrane sur les organisations distinctes observées se

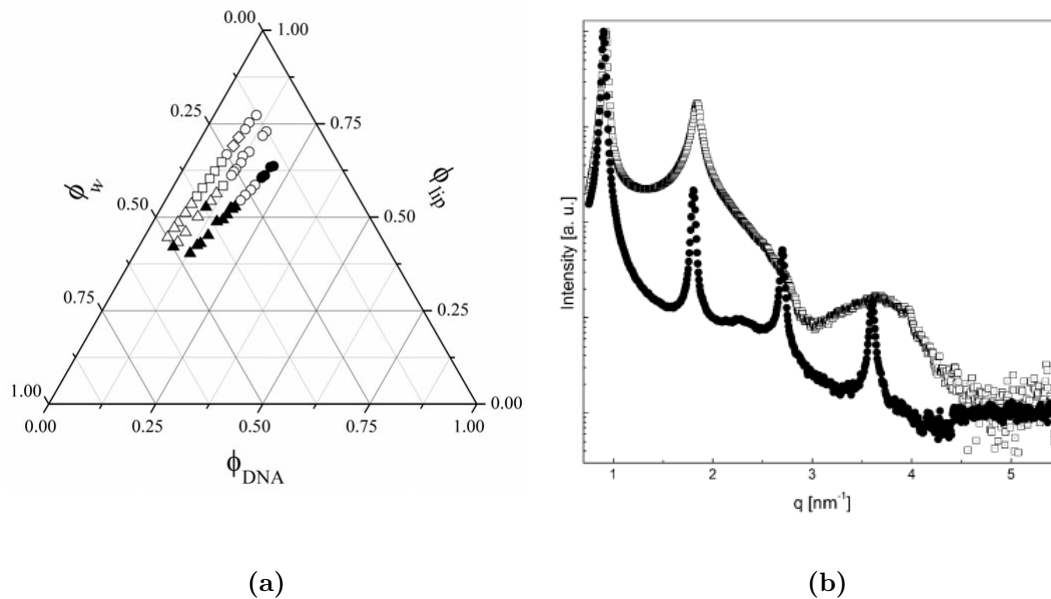


Figure 1.4.4 – Synthèse de principaux résultats de l'étude des complexes lipidiques électriquement neutres confinant de l'ADN. (a) Diagramme de phases ternaire. Trois lignes de dilutions, autrement dit trois proportions ADN-lipides, sont analysées. Les symboles solides indiquent des domaines monophasiques : $\blacktriangle = L_{\alpha}^N$, $\bullet = L_{\alpha}^H$. Les symboles ouverts indiquent une coexistence de phases : $\triangle = L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^N$ ou $L_{\alpha}^N + L_{\alpha}$, $\circ = L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^H$ ou $L_{\alpha}^H + L_{\alpha}$, $\diamond = L_{\alpha}^H + L_{\alpha}^R$, $\square = L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^H$ ou $L_{\alpha}^H + L_{\alpha}$. (b) Interaction ADN-membranes mises en évidence par un changement significatif entre les diffractogrammes RX. Les cercles pleins désignent le complexe ADN-lipides en phase nématique tandis que les carrés ouverts représentent l'empilement lamellaire dépourvu d'ADN, tous deux définis pour une périodicité similaire ($d \simeq 6.8\text{nm}$). Figures extraites de [22]

doit d'être pris en compte de manière plus précise. Notre recherche se concentre sur la détermination des mécanismes permettant d'expliquer la formation de ces auto-assemblages diversifiés.

« That was a waste of a
perfectly good explanation. »"

(Jack O'Neill)

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

2.1 Préparation des échantillons

2.1.1 Préparation des membranes lipidiques

Les membranes lipidiques sont constituées d'un mélange de Lécithine de soja et de Simulsol, qui est un tensioactif non ionique dont la nature chimique peut être modélisée.

La Lécithine de soja, achetée auprès de Sigma-Aldrich, est un mélange polydisperse composé de phosphatidylcholines (PC) dont les double chaînes carbonées sont approximativement constituées : d'acide linoléique (C18 :2) à 64%, d'acide palmitique (C16 :0) à 13%, d'acide oléique (C18 :1) à 10%, d'acide linoléique (C18 :3) à 6% et d'acide Stéarique (C18 :0) à 4% [1]¹. Puisque les groupes choline et phosphate portent des charges électriques opposées, en solution, la Lécithine est une molécule zwitterionique. La masse molaire moyenne est d'environ $\sim 776 \text{ g.mol}^{-1}$. La masse volumique est estimée, à l'aide d'une méthode de mesure expérimentale de densité au sein d'un solvant, à $\rho_{Lécithine} = 1.00 \text{ g.cm}^{-3}$ ce qui amène un volume moléculaire $v_{Lécithine} = 1.29 \text{ nm}^3$. La prédominance de phospholipides insaturés procure au mélange un point de fusion suffisamment bas qui permet aux chaînes aliphatiques de se trouver à l'état fluide à la température ambiante.

Le Simulsol est un acide gras éthoxylé, fourni gracieusement par l'entreprise Seppic. Grâce à la collaboration avec la société Seppic, il est possible d'avoir accès à un panel de 7 tensioactifs qui diffèrent de par leur nature chimique. Plus précisément, ils se distinguent par leur nombre moyen n de groupements d'oxyde d'éthylène $-CH_2 - CH_2 - O$ ($n=6, 10, 15$ ou 16), variant de ce fait leur longueur hydrophile. Une légère polydispersité des molécules est donc associée, de manière similaire, à chaque longueur. La nature de la chaîne carbonée hydrophobe est, elle aussi, séparée en trois compositions,

1. La nomenclature biochimique associée aux acides gras indique le nombre d'atomes de carbone \mathbf{N} et le nombre de doubles liaisons \mathbf{M} , au sein de la chaîne aliphatique, sous la forme $\mathbf{CN :M}$.

distinctes par le nombre d'atomes de carbone et par la présence ou non d'une double liaison. Ces compositions se répartissent en : acide oléique (C18 :1), acide stéarique (C18 :0) et acide laurique (C12 :0) qui seront respectivement désignés, par la suite, sous la forme [Ac. O], [Ac. S] et [Ac. L]. Les différents Simulsols utilisés sont donc nommés : Simulsol [Ac. O, n=6], Simulsol [Ac. S, n=6], Simulsol [Ac. L, n=6], Simulsol [Ac. O, n=16], Simulsol [Ac. S, n=15] et Simulsol [Ac. L, n=15]. Ces molécules sont représentées schématiquement sur la Figure 2.1.1 afin de donner un aperçu visuel de leurs différences. Les masses molaires M respectives de ces molécules sont : $M_{Ac.O}^{n=6} \simeq 547 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_{Ac.S}^{n=6} \simeq 549 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_{Ac.L}^{n=6} \simeq 465 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_{Ac.O}^{n=16} \simeq 987 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_{Ac.S}^{n=15} \simeq 945 \text{ g.mol}^{-1}$ et $M_{Ac.L}^{n=15} \simeq 861 \text{ g.mol}^{-1}$. Les masses volumiques ρ et volumes moléculaires v respectifs de ces tensioactifs sont donnés *via* la même procédure de mesure expérimentale que pour la Lécithine : $\rho_{Ac.O}^{n=6} = 1.00 \text{ g.cm}^{-3}$ ($v_{Ac.O}^{n=6} = 0.90 \text{ nm}^3$), $\rho_{Ac.S}^{n=6} = 0.96 \text{ g.cm}^{-3}$ ($v_{Ac.S}^{n=6} = 0.95 \text{ nm}^3$), $\rho_{Ac.L}^{n=6} = 1.01 \text{ g.cm}^{-3}$ ($v_{Ac.L}^{n=6} = 0.76 \text{ nm}^3$), $\rho_{Ac.O}^{n=16} = 1.04 \text{ g.cm}^{-3}$ ($v_{Ac.O}^{n=16} = 1.57 \text{ nm}^3$), $\rho_{Ac.S}^{n=15} = 1.06 \text{ g.cm}^{-3}$ ($v_{Ac.S}^{n=15} = 1.48 \text{ nm}^3$) et $\rho_{Ac.L}^{n=15} = 1.05 \text{ g.cm}^{-3}$ ($v_{Ac.L}^{n=15} = 1.36 \text{ nm}^3$). Les différentes informations concernant les propriétés de ces molécules, utilisées dans ce travail, sont regroupées sur le tableau 2.1.1.

	Masse molaire (g.mol^{-1})	Masse volumique (g.cm^{-3})	Volume moléculaire (nm^3)
Lécithine	776	1.00	1.29
Simulsol [Ac. O, n=6]	547	1.00	0.90
Simulsol [Ac. S, n=6]	549	0.96	0.95
Simulsol [Ac. L, n=6]	465	1.01	0.76
Simulsol [Ac. O, n=10]	723	1.03	1.17
Simulsol [Ac. O, n=16]	987	1.04	1.57
Simulsol [Ac. S, n=15]	945	1.06	1.48
Simulsol [Ac. L, n=15]	861	1.05	1.36

Table 2.1.1 – Propriétés des différentes molécules.

Un dernier tensioactif est inclus au panel de tensioactifs afin d'effectuer une comparaison avec des travaux antérieurs [26, 23, 22, 42], le Simulsol 2599 PHA. Ce tensioactif commercial est similaire aux Simulsols précédemment présentés. Il est composé de 10 groupements d'oxyde d'éthylène en moyenne mais présente une polydispersité au niveau de sa partie hydrophobe qui le distingue des autres tensioactifs utilisés. Il est constitué majoritairement d'acide oléique à 72%, d'acide palmitique à 11%, d'acide stéarique à 3% et de composés mineurs tels que les acides palmitoléique, linoléique et myristique. Il sera par la suite désigné sous la forme Simulsol [Ac. O, n=10]. Sa masse molaire est donc d'environ $M_{Ac.O}^{n=10} \simeq 723 \text{ g.mol}^{-1}$. La masse volumique mesurée est $\rho_{Ac.O}^{n=10} = 1.03 \text{ g.cm}^{-3}$ ($v_{Ac.O}^{n=10} = 1.17 \text{ nm}^3$).

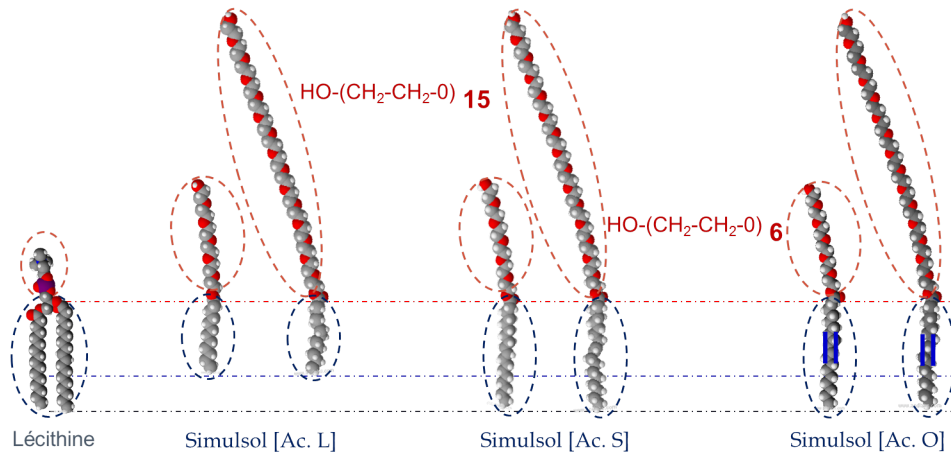


Figure 2.1.1 – Les molécules amphiphiles utilisées dans la composition des bicouches.

Afin d'assurer une homogénéité et une purification, les mélanges de Lécithine et de Simulsol sont co-solubilisés dans du cyclohexane puis lyophilisés jusqu'à évaporation complète du solvant. Les membranes lipidiques (désignées par la suite par l'abréviation *lip*) sont donc formulées à différentes proportions molaires en co-tensioactif, énumérées sur le Tableau 2.1.2². Les membranes composées avec le co-tensioactif commercial, Simulsol 2599 PHA, correspondent à celles décrites dans les travaux effectués antérieurement [23, 42]. La masse volumique de la membrane lipidique est alors estimée via une combinaison linéaire des masses volumiques de la Lécithine et du Simulsol et de leur teneur respective : $\rho_{lip} = \%Lécithine \cdot \rho_{Lécithine} + \%Simulsol \cdot \rho_{Simulsol}$ (de même pour le volume moléculaire moyen v_{lip}).

Pour la préparation des échantillons dits « binaires », qualificatif donné par opposition aux échantillons « ternaires » qui contiennent en outre de l'ADN, de l'eau pure est ajoutée au mélange lyophilisé de Lécithine et de Simulsol dans des proportions appropriées, de manière à atteindre une hydratation désirée du système qui se définit alors par une fraction volumique en lipides (Lécithine + Simulsol) $\phi_{lip} = \frac{V_{lip}}{V_{lip} + V_{eau}}$ (avec $V_x = \frac{m_x}{\rho_x}$ où m désigne la masse mesurée). Les échantillons sont ensuite centrifugés quotidiennement à température ambiante pour aider à l'homogénéisation du système, durant une semaine au minimum, jusqu'à atteindre l'équilibre thermodynamique. Ils sont conservés à une température de 4°C en dehors des cycles de centrifugation.

2. Les différentes formulations (et les analyses qui en découlent) ont été effectuées grâce à l'aide de différents expérimentateurs : Annie Février, Julien Peyencet, Nadia Ziane, Simon Von-Pine, Jules Sauveroché, Cécile Gouzon, Rafael Leite Rubim et moi-même.

n = 6									
Oléique	5%	11%	30%	44%	64%	70%	73%	85%	100%
Stéarique			30%			70%			
Laurique			30%			70%			100%

(a)

n = 15-16					
Oléique		20%		70%	100%
Stéarique	8%	26%	45%	66%	100%
Laurique	9%	28%	48%	68%	100%

(b)

Table 2.1.2 – *Compositions des différentes membranes de Lécithine et de Simulsol. Les compositions sont indiquées en termes de teneur en co-tensioactif (Simulsols). Ceux-ci se distinguent par le nombre de groupement d'oxyde d'éthylène n, qui varie entre (a) n=6 et (b) n=15 ou n=16, au sein de leur chaîne hydrophile et par l'acide qui compose leur partie hydrophobe. La bicouche composée uniquement de Lécithine est, elle aussi, analysée.*

2.1.2 Préparation de l'ADN

L'ADN, issu du thymus de veau, est acheté auprès de Sigma-Aldrich et se trouve sous la forme de longues fibres d'une longueur d'une dizaine de kilobases (kb). Une étape de désalinisation, à l'aide d'une solution buffée, serait alors nécessaire pour éviter que les sels apportés par l'ADN aient un impact sur le gonflement de nos systèmes lamellaires. Néanmoins, cet impact est en réalité négligeable pour nos systèmes comme cela a été démontré par E. R. T. da Silva lors de sa thèse, rendant ainsi cette étape de désalinisation facultative. Les différentes étapes de préparations de l'ADN pour obtenir des objets unidimensionnels et marqués par un fluorophore sont résumées sur la Figure 2.1.2³.

Par une méthode d'ultrasonication au sein d'un bain thermostaté à faible température, les molécules d'ADN sont découpées jusqu'à atteindre une longueur moyenne $l \approx 150 \text{ pb}$ qui correspond à une longueur de contour $L_C \approx 50 \text{ nm}$. Cette taille de polyélectrolyte coïncide avec la longueur de persistance de la macromolécule d'ADN dans des conditions physiologiques. Elles sont donc décrites en tant que bâtonnets cylindriques et rigides, en raison du rapport d'aspect élevé des particules créées

$$\left(\frac{L_C}{\Phi_{ADN}} \simeq 25\right).$$

Dans l'optique d'effectuer de la microscopie de fluorescence afin d'observer la répartition de l'ADN au sein des échantillons, chaque fragment d'ADN est marqué par un fluorophore qui se lie aux nucléotides. Le fluorophore choisi est le YOYO, acheté auprès de Thermo

3. Toutes les étapes de préparation de l'ADN sont effectuées par Annie Février au Centre de Recherche Paul Pascal.

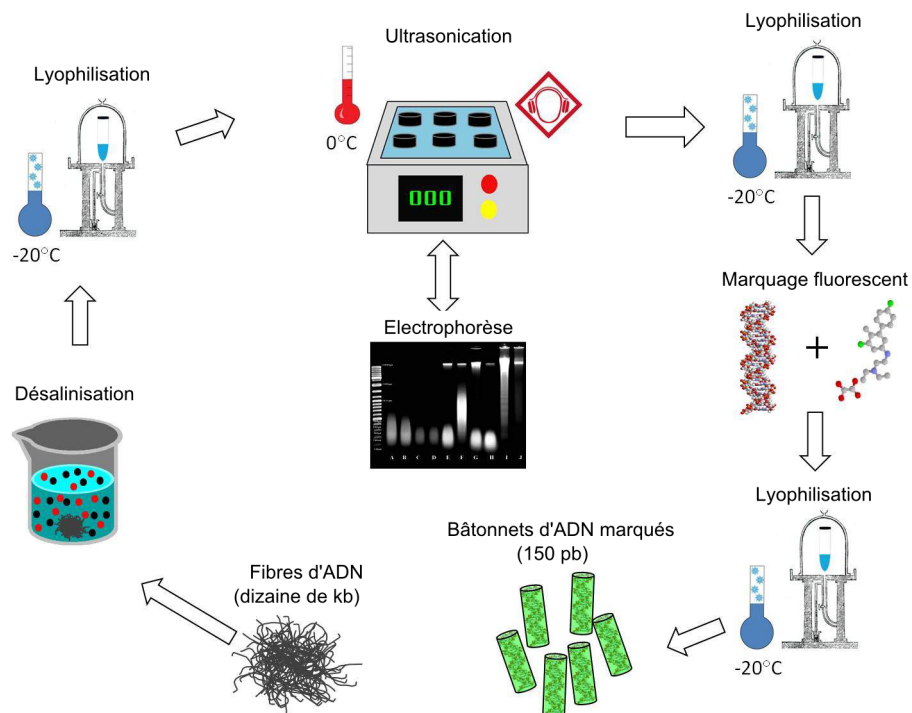


Figure 2.1.2 – Les différentes étapes de la préparation de l'ADN. Figure extraite de la thèse d'E. R. T da Silva [22].

Fisher Scientific/Molecular Probes. Le pic d'absorption du fluorophore YOYO se situe à la longueur d'onde $\lambda_{abs} = 491 \text{ nm}$ tandis que le pic d'émission, relativement proche, se situe à la longueur d'onde $\lambda_{em} = 508 \text{ nm}$.

2.1.3 Préparation des échantillons dits « ternaires »

Les échantillons dits « ternaires » sont des échantillons issus du mélange entre la « membrane » lipidique, détaillée Section 2.1.1, les bâtonnets d'ADN et l'eau pure. L'ensemble du diagramme ternaire n'est pas exploré, dans le cadre de ce projet. L'étude consiste en une comparaison entre les systèmes « binaires » et les systèmes « ternaires » et elle s'appuie donc fortement sur les résultats obtenus par E. R. T. da Silva dans le cadre de sa thèse [22]. Da Silva a montré l'existence de larges domaines monophasiques en hydratation pour lesquels les bâtonnets d'ADN présentent différentes structures au sein d'une matrice hôte lamellaire, spécifiquement pour une ligne de dilution qui se caractérise par le ratio volumique $\rho_v = \frac{\phi_{lip}}{\phi_{ADN}} \simeq 3.4$, voir Section 1.4.3.

Ce ratio volumique est donc conservé pour chaque échantillon « ternaire » formulé. De plus, différentes compositions de la membrane lipidique, en Lécithine et en Simulsol [Ac. O, n=6], ont été formulées, soit à 0%, 5%, à 30%, à 44%, à 77% et à 100% en pourcentage molaire de co-tensioactif et ce tout en variant l'hydratation du système (identifiée par la valeur de ϕ_{lip} , $0.1 \lesssim \phi_{lip} \lesssim 0.9$). De plus, une comparaison est effectuée avec les résultats de da Silva qui caractérisent des membranes composées à 70% et à 50% en Simulsol [Ac. O, n=10] [23, 22].

Après formulation, les échantillons sont conservés à 4°C et centrifugés fréquemment jusqu'à atteindre l'équilibre thermodynamique qui se justifie le plus souvent par une homogénéité macroscopique et que l'on obtient après une attente d'un mois au minimum (par précaution).

2.1.4 Préparation d'ognons

2.1.4.1 Cisaillement et dispersion

Dans le but d'étudier les propriétés des ognons formés à partir du cisaillement de la phase lamellaire lipidique, une méthode systématique est mise en place avec l'utilisation d'un dispositif de type Couette⁴. Ce dispositif procure l'avantage d'un cisaillement complet et rapide de la phase lamellaire, obtenue par la méthode expliquée Section 2.1.1, pour lequel seule une faible quantité d'échantillon est nécessaire. Les ognons sont créés à partir de mélanges de Lécithine et de Simulsol [Ac. O, n=6].

La pâte lamellaire qui a atteint l'équilibre thermodynamique ($\sim 4 \text{ mg}$ pour la préparation d'ognons dispersés et $\sim 10 \text{ mg}$ pour la caractérisation de la pâte cisailée seule, ce qui

4. La préparation des échantillons cisailés et leur caractérisation expérimentale ont été effectuées par Simon Von-Pine dans le cadre d'un stage.

correspond à la quantité minimum suffisante à introduire dans un capillaire), est étalée uniformément sur le piston qui par rotation (100 tr/min pendant environ une minute) entraîne un cisaillement de la phase lamellaire avec les parois d'un microtube d'Eppendorf de 500 μl . La pâte lamellaire cisailée est alors directement prélevée, sans aucun ajout d'eau, pour effectuer les caractérisations expérimentales de la pâte concentrée seule.

En revanche, la pâte cisailée est dispersée dans un volume d'eau pour former les oignons dispersés. Pour une caractérisation optimale par diffusion de rayons X sur les dispositifs utilisés, la dispersion est effectuée à 15% afin d'avoir rapidement un signal suffisant (une dispersion à 2% ne modifie pas les résultats obtenus). Pour une caractérisation par diffusion dynamique de la lumière, la dispersion est effectuée à 0.2% ce qui permet à la fois de se placer dans des conditions de mouvements Brownien des oignons et d'avoir une quantité suffisante d'échantillon pour le dispositif expérimental.

Pour les mesures effectuées avec contrôle de la pression osmotique, les oignons sont dispersés dans une solution de polymères (PVP10 acheté auprès de Sigma-Aldrich à 0.4 g.ml^{-1}). Après une calibration de l'osmomètre et grâce à une étude précédente [122], une pression osmotique est imposée à $1,6 \cdot 10^6\text{ Pa}$ pour quelques échantillons composés à 5% et à 30% en co-tensioactifs (pour trois ϕ_{lip} différentes par composition).

2.1.4.2 Extrusion

Pour effectuer un contrôle de taille dans la fabrication des oignons, la méthode mécanique d'extrusion est utilisée. Celle-ci consiste à disperser 100 mg de phase lamellaire, thermodynamiquement équilibrée, dans 500 μl d'eau pure puis à extruder la solution à travers une membrane dont les pores ont un diamètre d'environ 0.1 μm . Plusieurs protocoles sont alors utilisés afin de comparer l'efficacité sur le contrôle de taille des oignons.

Une première méthode consiste à extruder une fois une pâte lamellaire auparavant cisailée. La seconde consiste à répéter dix fois supplémentaires l'opération (soit 11 fois au total). La dernière est d'extruder 11 fois une pâte lamellaire qui n'a pas été cisailée au préalable. Les différents résultats sont alors comparés aux oignons issus de la méthode de cisaillement en Couette puis dispersion.

2.2 Observation microscopiques

2.2.1 Microscopie optique à lumière polarisée

Pour chaque échantillon, la biréfringence éventuelle est regardée par microscopie optique à lumière polarisée afin de vérifier l'anisotropie optique résultante des phases lamellaires. De plus, on contrôle par cette méthode si l'échantillon est bien monophasique microscopiquement ou s'il présente différents domaines tels que la présence de gouttes d'eau ou d'autres zones non anisotropes qui apparaissent alors sombres. Les échantillons sont

déposés sur une lame de verre, puis recouverts par une lamelle et enfin scellés grâce à l'utilisation d'une colle UV, afin d'empêcher l'évaporation de l'eau. Les échantillons dits « binaires » sont par la suite observés, à grossissement modéré, à l'aide d'un microscope Olympus BX 51 dont la paire de polariseurs est en position croisée.

2.2.2 Microscopie en épifluorescence

Afin d'observer la répartition des bâtonnets d'ADN, marqués par un fluorophore YOYO, au sein des complexes lipidiques, la microscopie en épifluorescence est utilisée. Les échantillons dits « ternaires » sont préparés par une méthode identique à celle présentée à la section précédente. La biréfringence est alors observée simultanément avec l'épifluorescence sur un microscope confocal à balayage laser Leica DMIRE2. Un laser Argon illumine les échantillons à 488 nm ce qui est proche du pic d'excitation du YOYO (491 nm) permettant l'observation de la fluorescence.

2.2.3 Cryofracture et microscopie électronique à transmission

La technique de cryofracture repose sur une congélation rapide par trempe d'un échantillon fluide, ce qui permet de figer le système et de le conserver, idéalement, dans un même état d'arrangement⁵. L'échantillon congelé est ensuite fracturé par une technique dite de couteau afin de pouvoir observer, au microscope électronique à transmission, une réplique d'une coupe de l'échantillon et de mettre en évidence, dans les travaux qui sont présentés, les lamelles au sein des oignons formés.

Les échantillons, c'est-à-dire les pâtes lamellaires dans notre cas, sont déposés sur un socle en or légèrement creusé. Celui-ci est ensuite rapidement plongé dans un bain de propane liquide ($\sim -200^\circ\text{C}$) qui demeure dans un bain-marie d'azote liquide bouillant à pression atmosphérique. Après cette étape, l'échantillon est introduit, toujours de manière rapide afin de préserver une bonne congélation, au sein d'un appareil de cryofracture Leica BAF060 ($\sim -170^\circ\text{C}$, 10^{-7} mbar). L'échantillon est alors fracturé par passages successifs d'un couteau. Puis, par évaporation sous ultra-vide, une réplique composée de platine et de carbone est créée par condensation à l'état solide sur la surface de l'échantillon.

Pour ce faire, un alliage de platine (95%) et de carbone (5%) est chauffé et projeté sous forme gazeuse par l'intermédiaire d'un canon, orienté à 45° par rapport à la surface de l'échantillon congelé, dans le but de former une couche mince d'environ 4 nm d'épaisseur, sous une vitesse de dépôt de 0.02 nm.s^{-1} . Une seconde couche, plus épaisse (30 nm d'épaisseur) et composée de carbone seulement, recouvre la couche de platine carboné suivant un même processus (vitesse de 0.2 nm.s^{-1}) mais avec, cette fois-ci, une orientation de canon à 90° , pour conférer à la réplique une meilleure résistance mécanique.

5. Les images d'échantillons qui seront présentées proviennent des travaux de stage de Vincent Sénéchal et ont été effectuées par Isabelle Ly, véritable experte de la technique de cryofracture, au Centre de Recherche Paul Pascal.

Les répliques sont, par la suite, décollées du socle en or, séparées de l'échantillon et surfaciquement étendues par lavages successifs dans des bains de solvant sous agitation. Ceux-ci sont issus d'un mélange d'éthanol et d'eau qui diffèrent selon les différentes étapes (différence de tension superficielle). Elles sont enfin déposées sur des grilles de cuivre pour une observation à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi H600. Une tension d'accélération de 75 kV et un courant de filament de tungstène de $100\ \mu\text{A}$ sont appliqués. Un grossissement $\times 300\ 000$ maximal peut être atteint accompagné d'une résolution de $1\ \text{nm}$. Néanmoins, la taille des grains de platine ($5\ \text{nm}$) limite cette résolution expérimentale.

Une étude, par la technique de cryofracture, des textures d'échantillons non cisailés a, de plus, été entreprise afin de caractériser les différents empilements lamellaires et la phase de Simulsol hydraté⁶. Cette approche complexe nécessite, néanmoins, d'être plus approfondie afin de faire ressortir des résultats suffisamment concluants. Ces travaux ne sont, par conséquent, pas présentés dans ce manuscrit.

2.2.4 Cryo-microscopie électronique

La technique de Cryo-microscopie électronique (Cryo-TEM) permet l'observation directe, sans la nécessité d'effectuer de répliques, de structures macromoléculaires au sein d'un film d'eau vitrifié par congélation rapide (trempe). Un meilleur contrôle de la congélation de l'échantillon a lieu puisque toutes les étapes, c'est-à-dire la congélation et l'observation microscopique, sont regroupées au sein d'un même instrument.

Les expériences de Cryo-TEM ont été effectuées par Cédric Gaillard à l'INRA de Nantes (voir l'ouvrage suivant pour des détails techniques sur la procédure et les instruments [38]).

2.3 Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière est une technique utilisée afin d'avoir accès, d'une manière générale, à la distribution de tailles de particules en suspension dans un milieu fluide. La lumière diffuse sur les particules qui sont mises, de préférence, dans un état suffisamment dilué pour qu'il n'y ait pas d'interactions entre-elles, d'une part, et que l'échantillon reste essentiellement transparent, d'autre part. À partir de la fonction d'auto-corrélation de l'intensité de diffusion, il est possible de s'appuyer sur leur mouvement Brownien pour remonter aux différents diamètres hydrodynamiques d_H . Le laser illumine l'échantillon à une longueur d'onde et à une intensité choisies, en fonction de la composition du système, afin de se placer dans les conditions de la diffusion Rayleigh, d'avoir une diffusion détectée statistiquement suffisante et de limiter une chauffe de l'échantillon, par forte absorption, et donc une convection thermique.

6. Toute cette étude a été effectuée par Cécile Gouzon dans le cadre d'un stage.

2.3.1 Instrument utilisé

Le dispositif expérimental a été, en partie, confectionné au Centre de Recherche Paul Pascal. Le laser, provenant de Spectra Physics, illumine l'échantillon, contenu dans un tube de verre de trajet optique 8 mm , à une longueur d'onde $\lambda = 532\text{ nm}$. L'échantillon, composé de vésicules dispersées à 0.2% en solution aqueuse, est placé au sein d'un dispositif Brookhaven BI-200SM dans une cuve remplie de décaline, pour limiter les réflexions parasites aux interfaces, régulée en température. Le dispositif Brookhaven comprend un goniomètre permettant une variation angulaire θ de 30° à 140° , par rapport au faisceau incident, associé à un détecteur qui est une photodiode à avalanches (APD), dont le temps mort est inférieur à 50 ns .

On procède à des enregistrements de 3 minutes que l'on réitère trois fois pour chaque échantillon afin de limiter l'influence du passage de poussières éventuelles dans le faisceau ou d'autres artéfacts qui viendraient perturber le signal reçu. Si les signaux sont corrects, on effectue une moyenne des tailles sur ces 3 mesures. La barre d'erreur affectée à la taille des objets (d_H) correspond alors à l'écart-type obtenu sur ces 3 mesures. Cette procédure est effectuée pour 4 angles de diffusion pour chacun des échantillons : 60° , 75° , 90° et 105° .

2.3.2 Modélisation

Pour satisfaire à l'expérience, les particules se doivent d'être statistiquement indépendantes, pour simplifier l'analyse dynamique, de façon à ce que seul le mouvement Brownien des particules intervienne sur la diffusion de la lumière. On pose l'hypothèse que les particules sont parfaitement sphériques et que leur distribution de taille est monodisperse.

Un exemple de courbe d'auto-corrélation de l'intensité de diffusion I est représenté sur la Figure 2.3.1. Cette fonction d'auto-corrélation se définit par la relation suivante [8] :

$$I(\tau) = C_{min} + (C_{max} - C_{min}) * \exp[-2(\frac{\tau}{\Delta})^\beta] \quad (2.3.1)$$

avec τ la durée séparant les deux instants où l'auto-corrélation est effectuée, C_{min} qui définit le nombre de coups minimum au temps τ_{max} pour lequel il n'y a plus de corrélation, C_{max} le nombre de coups maximal, Δ le temps caractéristique de la diffusion, β un facteur proche de 1 qui représente un écart à la monodispersité des particules. Le coefficient β est introduit pour ajuster la courbe expérimentale lorsque les oignons présentent une faible polydispersité ou qu'ils ne sont pas parfaitement sphériques, présentant de ce fait des tailles distinctes selon l'angle de diffusion. On considère que la validité du modèle est correcte tant que le coefficient β reste proche de 1. Expérimentalement, la valeur la plus faible obtenue pour caractériser nos oignons est $\beta \gtrsim 0.7$.

Le diamètre hydrodynamique des oignons s'obtient alors à partir du temps caractéristique de la diffusion Δ et est donné par la relation :

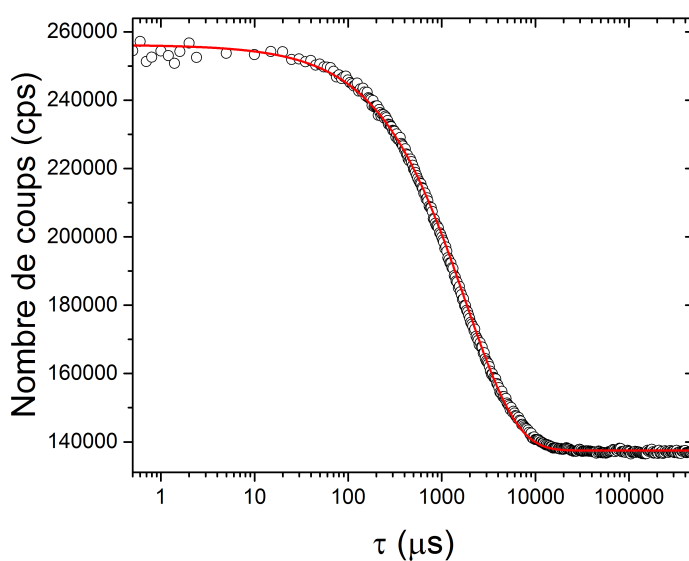


Figure 2.3.1 – Exemple de courbe d'auto-corrélation de l'intensité de diffusion de la lumière. Le nombre de coups reçu au détecteur est représenté en fonction du temps de corrélation τ . La courbe rouge représente l'ajustement par la relation 2.3.1. Les oignons sont composés de Lécithine (70%) et de Simulsol [Ac. O, $n=6$] (30%). L'angle de diffusion est de 60° . $\phi_{lip}^{initial} = 0.70$.

$$d_H(q) = \frac{k_B T}{3\pi\eta} \Delta q^2 \quad (2.3.2)$$

avec $k_B T$ l'énergie thermique, η la viscosité de l'eau, le vecteur d'onde $q = \frac{4\pi}{\lambda} n \sin[\frac{\theta}{2}]$ où n est l'indice de réfraction de l'eau et le coefficient de diffusion $D = \frac{1}{\Delta q^2}$.

Le diamètre hydrodynamique moyen des oignons est estimé pour chaque échantillon et pour chaque angle de diffusion θ . En effet, la mesure de l'intensité de diffusion aux petits angles résulte statistiquement de la diffusion des plus gros objets, s'il y a polydispersité, tandis que les grands angles caractérisent les plus petits objets. En estimant leur diamètre de cette manière, on a ainsi accès à une estimation rapide de la polydispersité.

2.4 Diffusion de rayons X

Les rayons X interagissent avec les électrons de la matière et permettent ainsi d'avoir accès au détail de la structure des objets à une échelle nanométrique, des empilements de bicouches dans notre cas. La diffusion de rayons X est la principale technique utilisée pour caractériser les systèmes qui sont étudiés au sein de ce manuscrit.

2.4.1 Dispositifs utilisés

Les échantillons équilibrés sont introduits dans des capillaires cylindriques de quartz dont le diamètre varie de 1 à 3 mm en fonction de la viscosité de l'échantillon et de l'utilisation de support métalliques avec fentes, essentiellement pour les échantillons concentrés dits « ternaires ». Les capillaires sont ensuite scellés par flamme. La grande majorité des échantillons est analysée par diffusion de rayons X sur deux appareils au Centre de Recherche Paul Pascal. Une plus petite partie est analysée sur deux autres appareils (Nanostar et Xeuss) au sein du groupe de fluides complexes à l'Université de São Paulo. Bien que ces machines soient plus performantes, leurs caractéristiques restent globalement similaires et par souci de simplicité ne seront pas décrites ici.

2.4.1.1 Nanostar

L'appareil utilisé est une machine Nanostar⁷ de Bruker équipée d'un détecteur Hi-Star. Une paire de miroirs Göbel couplés sélectionne la radiation $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ d'une source de cuivre (Siemens) qui opère à une tension de 40 kV et à un courant de 35 mA. Un système de 3 ouvertures circulaires permet de collimater le faisceau incident avec une largeur (FWHM) de 0.43 mm au niveau de la position des échantillons. À l'aide de cet appareil

7. La formation inestimable, pour la compréhension et l'utilisation des dispositifs de diffusion de rayons X, est donnée par Ahmed Bentaleb au centre de recherche Paul Pascal.

entièrement sous vide, différentes distances échantillon-détecteur sont accessibles, notamment les configurations présentées dans ce manuscrit qui sont nommées Grands Angles (GA) et Petits Angles (PA) et qui correspondent aux distances respectives $d \simeq 0.25 m$ et $d \simeq 1.06 m$. La configuration GA permet ainsi d'avoir accès à l'intervalle de vecteurs d'onde $[0.04 \text{ \AA}^{-1}; 0.8 \text{ \AA}^{-1}]$ tandis que la configuration PA donne accès à l'intervalle $[0.01 \text{ \AA}^{-1}; 0.2 \text{ \AA}^{-1}]$.

La calibration du système se fait à partir de la diffusion d'une poudre de bécényte d'Argent dont les pics de Bragg apparaissent à des positions connues. La résolution expérimentale est alors estimée à partir de la largeur à mi-hauteur (FWHM) du pic de Bragg de premier ordre et se définit comme $\Delta q \simeq 0.01 \text{ \AA}^{-1}$ pour la configuration GA et $\Delta q \simeq 0.005 \text{ \AA}^{-1}$ pour la configuration PA. Puisque les échantillons sont majoritairement non orientés, les images 2D du détecteur sont moyennées azimuthalement afin de représenter les diffractogrammes sous la forme d'une courbe caractérisant l'intensité de diffusion I en fonction du vecteur d'onde de diffusion q .

L'intensité de diffusion de chaque échantillon $I_{éch}$ est alors corrigée de la diffusion du capillaire d'eau I_{eau} en appliquant la soustraction suivante :

$$I_{corrigée} = \frac{I_{éch}}{T_{éch}} - k \cdot \frac{I_{eau}}{T_{eau}} \quad (2.4.1)$$

avec $T_{éch}$ la durée d'acquisition de la diffusion de l'échantillon, T_{eau} celle du capillaire contenant l'eau, k un facteur de correction qui prend en compte les différences de proportion en eau et d'épaisseur de capillaire. Les temps d'acquisition sont variés en fonction de l'hydratation de l'échantillon et sont typiquement de l'ordre de 2 à 4 heures. La température est contrôlée à l'aide d'un système de circulation d'eau et est maintenue à 20°C pour chaque expérience.

2.4.1.2 Anode

Pour accéder à des domaines de vecteurs d'onde de diffusion de valeurs plus élevées, un appareil « fait-maison », nommé l'Anode, est utilisé. Cet appareil est constitué d'un système d'anode tournante composée de cuivre et d'une paire de miroirs Göbel couplés qui proviennent de Rigaku. Pour la collimation, un système similaire de 3 ouvertures circulaires est utilisée et pour la détection un détecteur à plaque luminescente photostimulée (image plate) mar345 (marXperts GmbH). Contrairement au Nanostar, seul le tube de collimation est sous vide. Le domaine de vecteurs d'onde de diffusion accessible par variation de la distance est d'environ de $[0.12 \text{ \AA}^{-1}; 3.3 \text{ \AA}^{-1}]$. La résolution expérimentale est d'environ $\Delta q \simeq 0.01 \text{ \AA}^{-1}$ dans les conditions expérimentales présentées dans ce manuscrit. Les diffractogrammes, présentés dans ce manuscrit et obtenus sur ce dispositif, ne sont pas corrigés de la diffusion du capillaire d'eau, correction nécessaire lorsqu'une modélisation est appliquée, ce qui n'est pas le cas ici.

2.4.2 Modèle d'ajustement de diffractogrammes

Le modèle choisi pour effectuer les ajustements des diffractogrammes expérimentaux de rayons X est le modèle de Nallet et collaborateurs [100]. Les ajustements sont alors optimisés à l'aide d'une procédure d'ajustement mise en place par C. L. Pinto de Oliveira [106]. Ce modèle est adapté pour décrire les bicouches de lipides empilées au sein d'une phase lamellaire ou bien au sein de vésicules.

L'intensité de diffusion des rayons X, après interaction avec les bicouches, est donnée par la relation suivante :

$$I(q) = 2\pi \frac{V}{d} \frac{P(q)\tilde{S}(q)}{q^2} \quad (2.4.2)$$

où $P(q)$ désigne le facteur de forme de la bicouche, $\tilde{S}(q)$ le facteur de structure de l'empilement après convolution par la fonction de résolution expérimentale, V le volume d'échantillon irradié, d la période d'empilement, q le vecteur d'onde.

Le facteur de structure de l'empilement $\tilde{S}(q)$ permet de décrire, comme son nom l'indique, l'intensité de diffusion qui résulte de l'organisation structurale des bicouches, compte tenu de la thermodynamique. Il prend alors en considération les fluctuations de déplacement u des bicouches qui dépendent de leur élasticité au sein de l'empilement, quantifiée par le paramètre de Caillé η [14], voir Section 1.3.1. Le facteur de structure est donné par la relation :

$$\tilde{S}(q) = 1 + 2 \sum_1^{N-1} \frac{(1 - \frac{n}{N})}{\sqrt{1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n)}} \cos\left(\frac{qdn}{1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n)}\right) \exp\left(-\frac{2q^2 d^2 \alpha(n) + \Delta q^2 d^2 n^2}{2(1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n))}\right) \quad (2.4.3)$$

où $\alpha(n) = \langle (u_n - u_0)^2 \rangle = \frac{\eta}{2\pi^2} (\ln(\pi n) + \gamma) d^2$ est la fonction de corrélation smectique, n est l'indice de la bicouche au sein des N bicouches qui sont corrélées entre elles, γ est la constante d'Euler et Δq est la résolution expérimentale déduite de la largeur d'un profil gaussien, choisi pour la fonction de résolution. La validité du modèle est correcte dès lors que $q \gg \Delta q$.

La périodicité lamellaire est aisément déterminée, sans l'aide d'une modélisation, par la position en vecteur d'onde du premier pic de Bragg q_0 *via* la relation $d = \frac{2\pi}{q_0}$. Les autres paramètres du facteur de structure qui caractérisent l'empilement des bicouches η et N sont déterminés à l'aide de l'ajustement. Néanmoins, leur variation peut être intuitée si l'on s'appuie sur la Figure 2.4.1 qui illustre les variations du facteur de structure. Pour des bicouches infiniment rigides ($\eta = 0$), donc ne présentant aucune fluctuation, les différents ordres de Bragg restent identiques. Lorsque l'élasticité des bicouches se remarque, on observe la décroissance exponentielle dans l'intensité maximale de diffusion des ordres de Bragg. Ainsi, les ordres supérieurs tendent à disparaître plus l'élasticité est augmentée (augmentation de η). De même, le nombre N de bicouches, qui interagissent au sein de

l'empilement lamellaire, augmente de manière globale l'intensité de diffusion jusqu'à une valeur maximale, dépendante des autres paramètres, à partir de laquelle l'intensité ne varie plus. Lorsque l'intensité de diffusion issue du facteur de structure atteint une valeur proche de 1, on a alors une prédominance du facteur de forme sur l'intensité de diffusion totale.

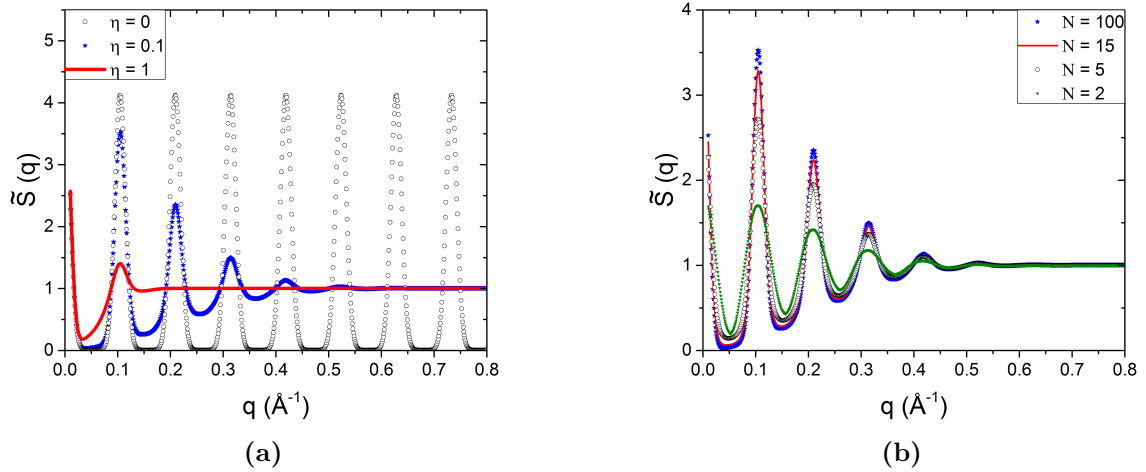


Figure 2.4.1 – Variation du facteur de structure \tilde{S} avec (a) le paramètre de Caillé η et (b) le nombre de bicouches corrélées N pour différents vecteurs d'onde de diffusion q . (a) $d = 60 \text{ \AA}$, $N = 100$, $\Delta q = 0.01 \text{ \AA}^{-1}$. (b) $d = 60 \text{ \AA}$, $\eta = 0.1$, $\Delta q = 0.01 \text{ \AA}^{-1}$.

Le facteur de forme $P(q)$ permet de décrire la structure de la bicouche du point de vue de la densité en électrons, comme il est représenté sur la Figure 2.4.2. Ainsi, il convient de séparer, de façon sommaire, la densité électronique du solvant ρ_S , la densité électronique de la tête polaire ρ_H et la densité électronique de la queue hydrophobe ρ_T . Le modèle de Nallet décrit alors l'empilement des bicouches sous la forme simplifiée d'une succession de fonctions créneau pour représenter un contraste de densité électronique $\Delta\rho_i$ par rapport à la densité du solvant ρ_S . L'épaisseur hydrophile d'une couche de molécules δ_H et l'épaisseur hydrophobe δ_T donnent alors accès à une épaisseur de membrane δ_m issue d'un contraste électronique. Le facteur de forme $P(q)$ est finalement donné par la relation :

$$P(q) = \frac{4}{q^2} (\Delta\rho_H)^2 \left\{ \sin(q(\delta_H + \delta_T)) - \sin(q\delta_T) \left(1 - \frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H} \right) \right\}^2 \quad (2.4.4)$$

avec le rapport des contrastes électroniques $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$ (il n'est pas possible d'avoir accès aux contrastes électroniques séparément puisque les expériences ne sont pas effectuées dans des conditions où l'intensité de diffusion est mesurée en valeur absolue).

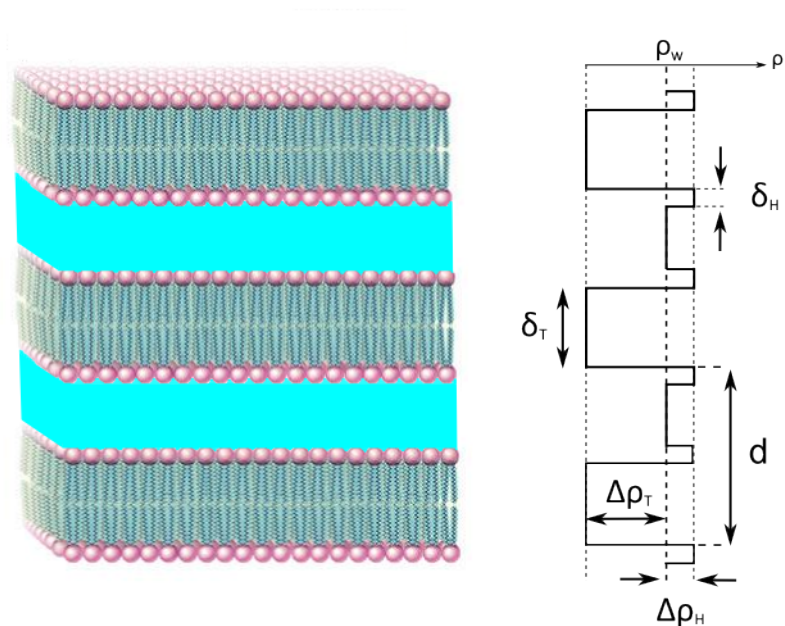


Figure 2.4.2 – Représentation schématique du facteur de forme de la bicouche décrit par le modèle de Nallet. δ_T et δ_H désignent les épaisseurs hydrophobe et hydrophile de la monocouche. ρ_S correspond à la densité électronique du solvant. $\Delta\rho_T$ et $\Delta\rho_H$ sont les contrastes des densités électroniques hydrophobe et hydrophile par rapport à la densité du solvant. d est la période d'empilement des bicouches.

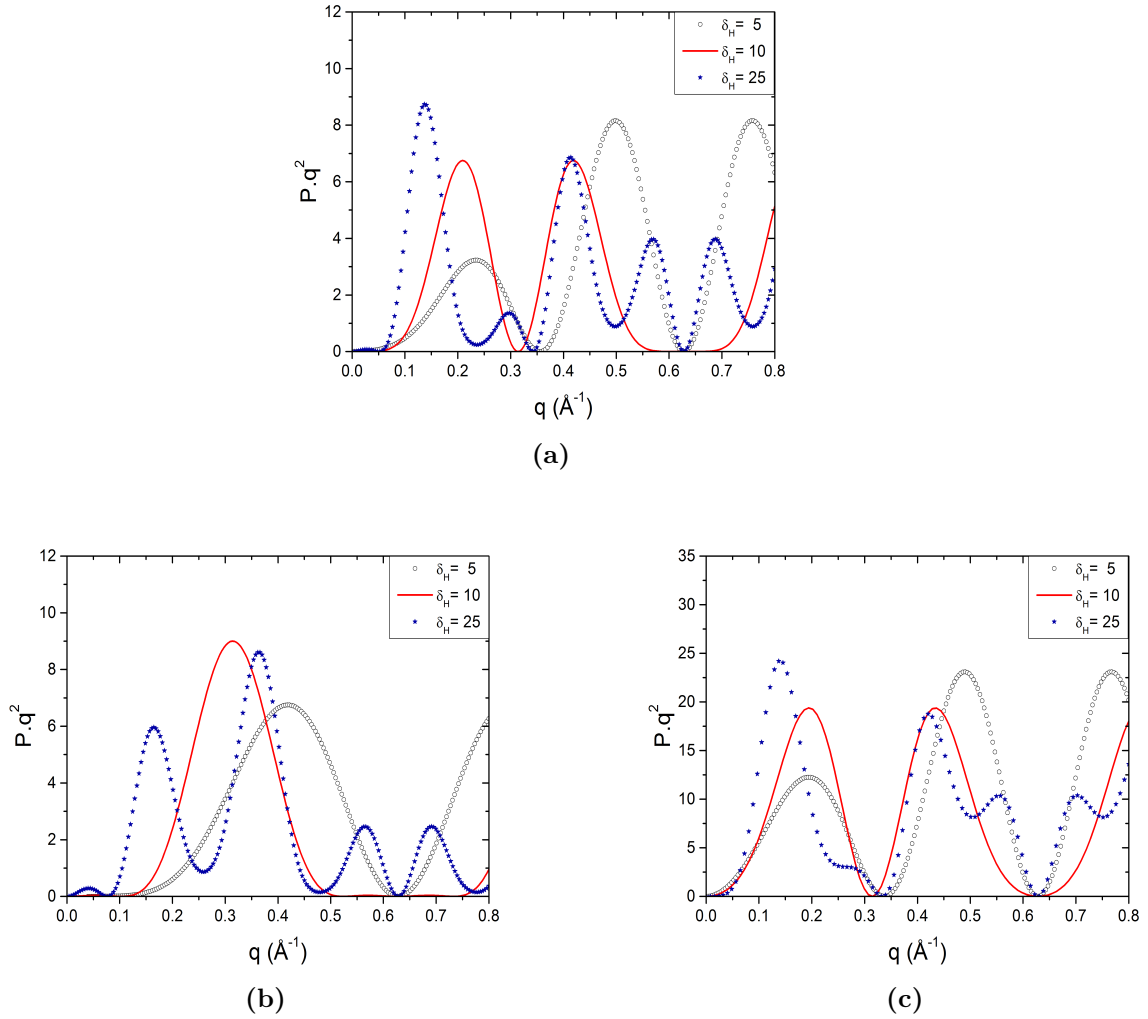


Figure 2.4.3 – Variation du facteur de forme P selon les épaisseurs hydrophile δ_H et hydrophobe δ_T et le rapport des contrastes de densité électronique $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$. (a) $\delta_T = 10 \text{ \AA}$, $\Delta\rho_T = -1$, $\Delta\rho_H = -1$. (b) $\delta_T = 5 \text{ \AA}$, $\Delta\rho_T = -1$, $\Delta\rho_H = -1$. (c) $\delta_T = 10 \text{ \AA}$, $\Delta\rho_T = -3$, $\Delta\rho_H = -1$.

De même que précédemment, il est possible d'avoir un aperçu visuel de la variation des différents paramètres sur l'intensité de diffusion issue du facteur de forme, voir Figure 2.4.3. Les variations de δ_H et de δ_T modifient le nombre et le déplacement des sinusoides tandis que le rapport des contrastes électroniques $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$ modifie l'amplitude de l'intensité de diffusion du facteur de forme. Pour certains échantillons analysés dans le domaine d'hydratation concentré en lipides, le modèle présente une limite lorsque l'on obtient une épaisseur de membrane δ_m plus grande que la périodicité lamellaire d , ainsi les ajustements ne plus pertinents et ne sont pas pris en compte.

« Cool. Cool, cool, cool. »"

(Abed Nadir)

L'empilement lamellaire de bicouches lipidiques

« When you see a worthy person,
endeavor to emulate him.
When you see an unworthy
person, then examine your inner
self. »

(Confucius)

Chapitre 3

Stabilisation d'empilements lamellaires de bicouches lipidiques : effets du confinement et effets stériques

Ce chapitre est consacré à l'étude d'un système binaire lipides-eau dans lequel les lipides s'auto-assemblent principalement sous la forme d'un empilement lamellaire selon l'hydratation du système. Celui-ci se décrit en réalité comme un système ternaire si l'on décompose la partie lipidique en deux molécules distinctes, soit : la lécithine et le co-tensioactif ajouté (Simulsol [Ac.O, n=6])¹. À l'aide de cette composition de membrane « modèle », étudiée pour différents teneurs en co-tensioactif, les principales méthodes d'analyse utilisées en vue de caractériser la thermodynamique et la structure de l'empilement de bicouches mais aussi l'évolution du confinement qui leur est appliqué, sont décrites dans ce chapitre.

3.1 Mise en évidence du confinement de la bicouche

La bicouche empilée est soumise, de manière générale, à des interactions de nature entropique ou électrostatique (van der Waals) qui s'exercent perpendiculairement à l'interface membrane-solvant, auxquelles viennent s'ajouter les interactions intermoléculaires essentiellement latérales, voir Section 1.2.1.1, au sein de la lamelle. Ces différentes interactions peuvent être évaluées en estimant le confinement exercé qui se décompose en une composante verticale (normale aux bicouches) et une composante latérale (dans le plan de la bicouche). En réponse à ce confinement, qui varie selon l'hydratation du système et selon la densité de greffage en co-tensioactif associé alors à un copolymère, la struc-

1. Le nombre de constituants, chimiquement distincts, est même encore plus grand si l'on prend en compte le fait que lécithine et Simulsol sont, en fait, des mélanges.

ture de la bicouche, décrite de par sa densité électronique, est sensiblement altérée. Ces descriptions sont effectuées d'une part, pour des compositions lipidiques à un composant Lécithine ou Simulsol, et d'autre part pour les compositions à deux composants et ce, pour différentes teneurs en co-tensioactif.

3.1.1 L'état « non lié » : exemple des bicouches composées de Simulsol [Ac. O, n=6]

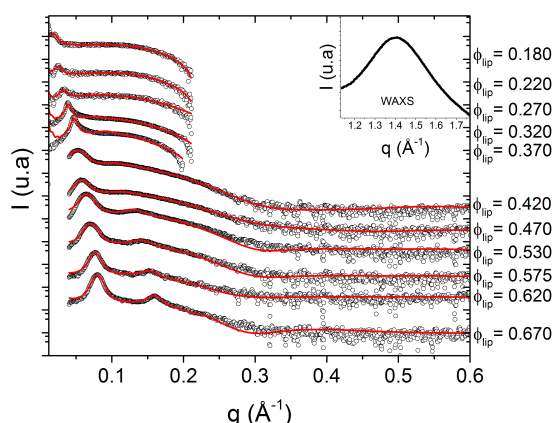


Figure 3.1.1 – Hydratation d'empilements lamellaires de bicouches, composées exclusivement de Simulsol [Ac. O, n=6], analysée par diffusion de rayons X. Chaque diffractogramme est ajusté (courbe rouge) par le modèle de Nallet et al., Section 2.4.2. Deux configurations expérimentales, voir Section 2.4.1.1, liées à la dilution des échantillons sont utilisées pour ces expériences, justifiant ainsi les deux domaines en vecteurs d'onde q qui apparaissent. L'encart représente l'intensité de diffusion de rayons X aux grands angles (WAXS) pour une bicouche de Simulsol [Ac. O, n=6] afin de mettre en évidence l'état fluide des chaînes aliphatiques caractérisé par la présence d'une bosse diffuse à $q \simeq 1.4 \text{ \AA}^{-1}$.

À partir d'une certaine quantité d'eau introduite, $\phi_{lip} = 0.67$, les molécules amphiphiles de Simulsol [Ac. O, n=6] s'auto-assemblent sous forme de bicouches en phase lamellaire, identifiées par diffusion de rayons X aux petits angles, voir Figure 3.1.1, et par la biréfringence, homogène pour chaque échantillon, observée en microscopie optique à lumière polarisée. De par la composition chimique du Simulsol, ce tensioactif peut être associé à un copolymère dibloc si l'on considère une ancre hydrophobe, représentée par la chaîne aliphatique, et une chaîne polymérique hydrophile constituée de groupements d'oxyde d'éthylène. De plus, ces bicouches de « copolymères » restent à l'état fluide le long de la ligne de dilution, état caractérisé par la présence d'une bosse diffuse pour $q \simeq 1.4 \text{ \AA}^{-1}$ (technique WAXS) qui traduit le désordre intrinsèque des chaînes aliphatiques dans leur

état fluide, Inset Figure 3.1.1. Le premier pic de Bragg, apparaissant sur les diffractogrammes (technique SAXS), se déplace continument vers les petits vecteurs d'onde avec l'augmentation de l'hydratation du système, depuis une périodicité lamellaire définie aux alentours de $d_{min}^{Simulsol} = 7.8 \text{ nm}$ jusqu'à $d_{max}^{Simulsol} = 30 \text{ nm}$ qui est la valeur maximale obtenue compte tenu des limitations de la technique expérimentale. L'observation de la biréfringence, demeurant de faible intensité pour ces échantillons dilués, n'a pas été effectuée pour des échantillons encore moins concentrés. Ainsi, l'empilement lamellaire gonfle apparemment « indéfiniment » avec l'ajout de solvant définissant un état « non lié », voir Section 1.3.5. Ce gonflement lamellaire vertical, exposé Figure 3.1.2a, s'effectue proportionnellement à la quantité de solvant selon la relation géométrique 1.1.2 qui est pertinente pour des bicouches planes, identiques et parallèles les unes aux autres. Par conséquent, le gonflement lamellaire suivant la direction latérale (dans le plan de la bicouche), mis en évidence par l'évolution de la surface moléculaire moyenne Σ à l'interface bicouche-eau, est négligeable, Figure 3.1.2b. On définit donc une surface moléculaire $\Sigma^{Simulsol}$ constante avec l'hydratation du système aux alentours de 0.36 nm^2 . L'empilement lamellaire est alors régi, en majeure partie, par les interactions répulsives verticales intervenant entre les membranes de Simulsol [Ac. O, n=6].

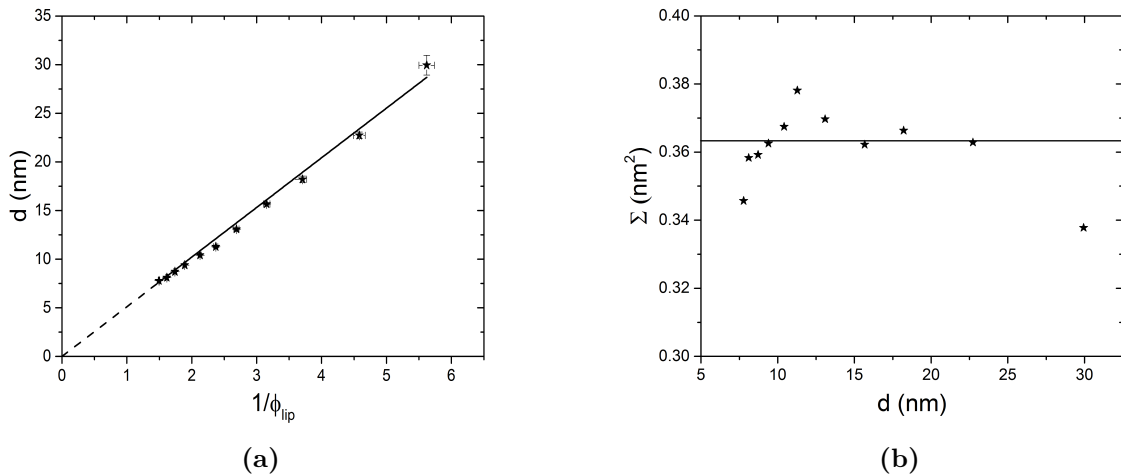


Figure 3.1.2 – Confinements vertical et latéral mis en évidence pour des empilements de membranes de Simulsol [Ac. O, n=6]. (a) Loi de dilution de l'empilement lamellaire. L'ajustement par la description géométrique reliant la périodicité lamellaire d et la fraction volumique en lipides ϕ_{lip} , équation 1.1.2, décrit une épaisseur membranaire $\delta_m^{geo} = 5.0 \text{ nm}$. (b) Couplage entre confinement latéral, représenté par l'aire moléculaire à l'interface eau-bicouche Σ , et confinement vertical, illustré par une périodicité lamellaire d . L'aire moléculaire Σ , du fait de sa faible variation, peut être considérée comme constante ($\Sigma \sim 0.36 \text{ nm}^2$).

À l'aide des ajustements entrepris sur chaque diffractogramme, voir Section 2.4.2, il est

possible de remonter à l'épaisseur de la bicouche δ_m^e obtenue par contraste électronique, Figure 3.1.3. Celle-ci tend à augmenter sensiblement avec le gonflement lamellaire, depuis une valeur minimale $\delta_m^{min} \simeq 4.5 \text{ nm}$, jusqu'à atteindre une valeur définie, malgré les imprécisions dues au changement de configuration expérimentale, comme quasi-constante : $\delta_m^{lim} \sim 5.5 \text{ nm}$. Il est remarquable de constater que l'épaisseur hydrophile de la membrane $2\delta_H$, c'est-à-dire représentant les chaînes éthoxylées du Simulsol [Ac. O, n=6], s'étend verticalement ($\sim 2 \text{ nm}$, Figure 3.1.3b) tandis que l'épaisseur hydrophobe $2\delta_T$, représentant les chaînes hydrocarbonées, se contracte légèrement lorsque l'on dilue le système ($\sim 1 \text{ nm}$, Figure 3.1.3c).

Cependant, cette épaisseur de contraste électronique est à comparer à l'épaisseur de la membrane décrite géométriquement telle que $\delta_m^{géo} = d * \phi_{lip}$, Figure 3.1.3a. Il est à noter que ces deux épaisseurs, quoique demeurant du même ordre de grandeur, diffèrent dans leur évolution suivant l'hydratation du système. L'épaisseur géométrique de la bicouche, pointant néanmoins une légère diminution autour de $d \simeq 11.2 \text{ nm}$, est définie par une valeur sensiblement constante, $\delta_m^{géo} \sim 5.0 \text{ nm}$ ce qui explique l'évolution du gonflement lamellaire vertical de la Figure 3.1.2a.

La définition en quelque sorte simplifiée de l'épaisseur de membrane peut être altérée par la présence de groupements d'oxyde d'éthylène, provenant de deux membranes adjacentes, qui peuvent s'enchevêtrer dans la couche aqueuse, en régime concentré. Lorsque l'hydratation est variée, mais plus particulièrement la distance membrane-membrane, la concentration en groupements d'oxyde d'éthylène dans la couche d'eau varie de même, modifiant ainsi la densité électronique moyenne de l'eau telle que définie par le modèle de Nallet. L'évolution de l'épaisseur de contraste électronique δ_m^e permet alors de suivre, en plus d'une réelle variation d'épaisseur, la concentration en chaînes éthoxylées dans la couche de solvant. À l'inverse de son homologue géométrique, elle souligne l'hydratation et l'enchevêtrement des chaînes éthoxylées s'allongeant verticalement avec l'augmentation de la teneur en eau du système, Figure 3.1.3b.

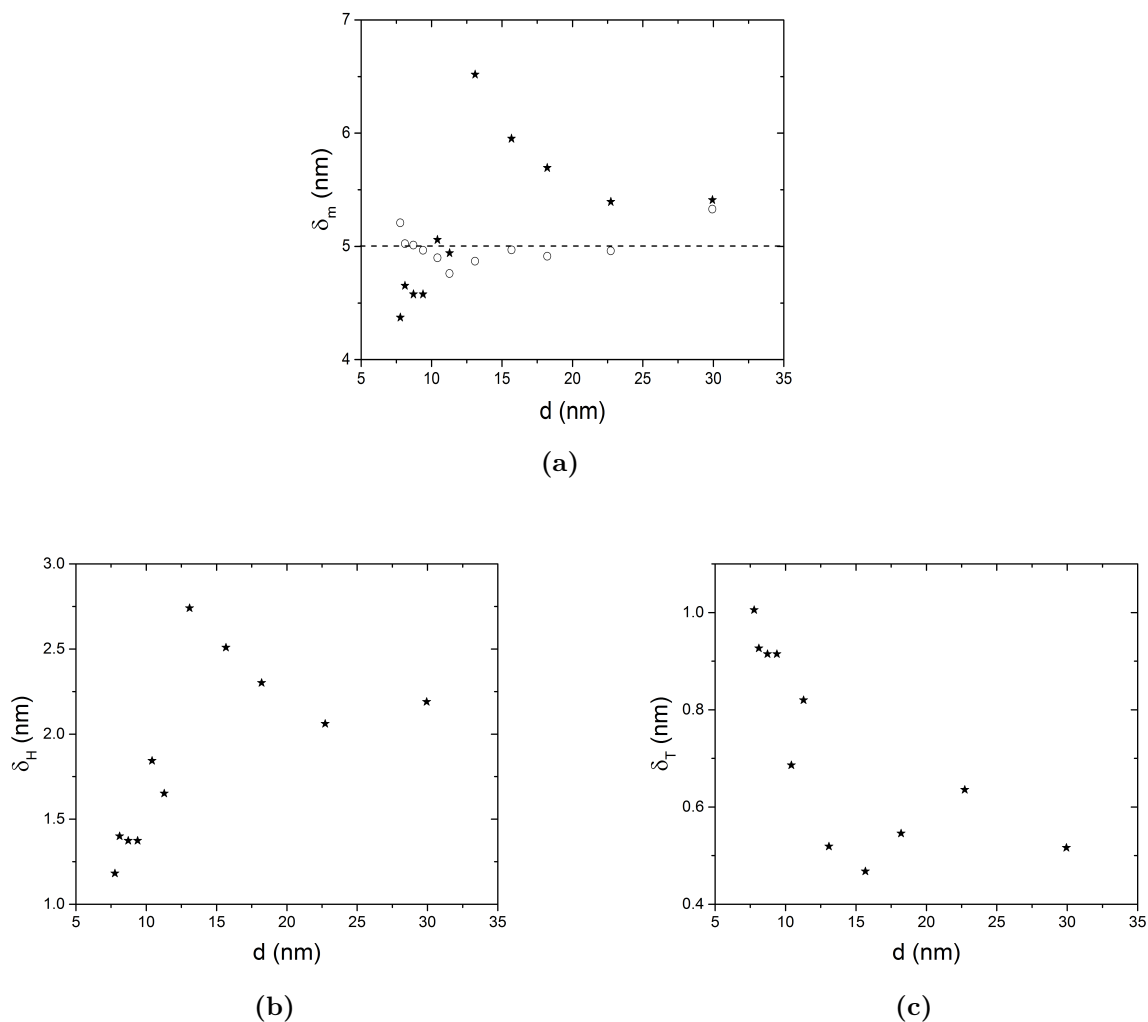


Figure 3.1.3 – Évolution des différentes épaisseurs décrivant la bicouche de Simulsol [Ac. O, $n=6$], par contraste de densité électronique via le modèle de Nallet (voir Section 2.4.2), avec le confinement appliqué. (a) Comparaison entre les épaisseurs de membrane décrite géométriquement, $\delta_m^{géo}$ (\circ), et par contraste électronique, δ_m^e (\star), en fonction du confinement vertical qui est illustré par l'ordre d'empilement d . Les évolutions respectives de l'épaisseur hydrophile δ_H (b) et de l'épaisseur hydrophobe δ_T (c) d'une monocouche sont représentées en fonction du gonflement lamellaire. Les erreurs estimées par l'ajustement de diffractogrammes sont d'un maximum de 5% pour les périodicités les plus importantes et sont pour les différentes épaisseurs soit de 5% (partie confinée) ou de 30% (partie diluée).

3.1.2 L'état « lié » : exemple des bicouches composées de Lécithine

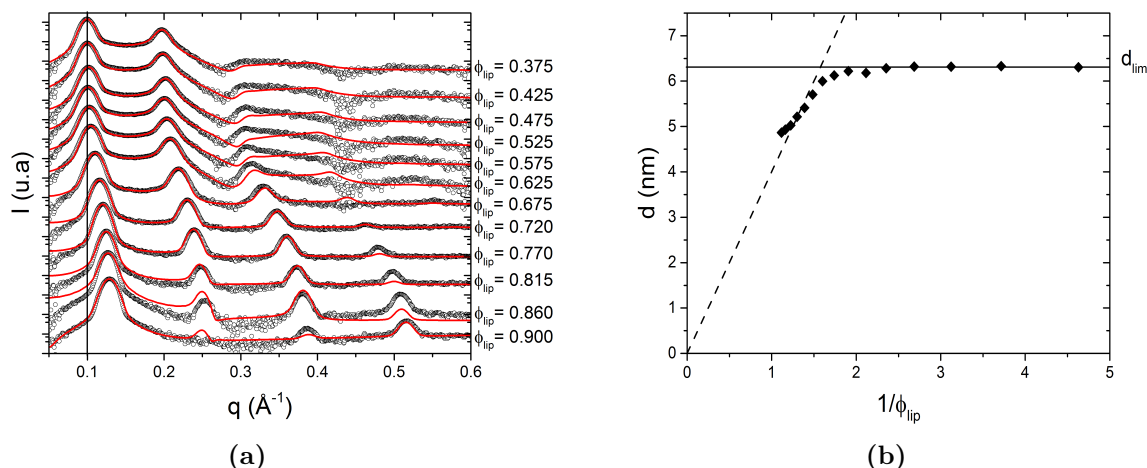


Figure 3.1.4 – Gonflement lamellaire des bicouches de Lécithine. (a) Diffractogrammes pour des bicouches empilées de Lécithine à différentes concentrations. Chacun est ajusté (courbe rouge) par le modèle de Nallet et al., Section 2.4.2. La droite verticale indique la position de la limite de dilution atteinte. (b) Loi de dilution de l'empilement lamellaire. L'ajustement par la description géométrique reliant la périodicité lamellaire d et la fraction volumique (apparente, en excès d'eau) en lipides ϕ_{lip} , équation 1.1.2, n'est ici plus adaptée (tirets). La droite horizontale indique la périodicité lamellaire en limite de dilution d_{lim} .

L'auto-organisation en bicouches des molécules de Lécithine se réalise pour une plus faible teneur en eau, $\phi_{lip} > 0.90$. Tout comme précédemment, un gonflement lamellaire est observé dans la direction (verticale) de l'empilement des membranes lipidiques à l'état fluide, Figure 3.1.4a. La valeur maximale de la période d'empilement atteint $d = 6.3 \text{ nm}$ et correspond non plus à une limite de la technique expérimentale mais à une limite en dilution pour une fraction volumique en lipides $\phi_{lip} \sim 0.375$. À partir de cette concentration, l'eau qui est ensuite rajoutée à la solution se place en dehors de la phase lamellaire, en excès. On obtient ainsi une coexistence de phase entre un empilement lamellaire lipidique et une phase aqueuse pure caractérisée par microscopie optique mais aussi macroscopiquement pour une quantité d'eau suffisante. Le système est alors dans un état dit « lié » où les interactions attractives telles que celles de van der Waals compensent les répulsions essentiellement stériques, voir Section 1.3.6.

Outre cette différence avec les bicouches de Simulsol [Ac. O, $n=6$] en haute dilution, l'empilement lamellaire ne gonfle pas proportionnellement à la teneur de solvant ajouté, Figure 3.1.4b. La raison en est que l'épaisseur de membrane géométrique, définie telle que $\delta_m^{geo} = 2 \frac{v}{\Sigma}$, ne demeure pas constante (Figure 3.1.5b), soulignant une variation de l'aire

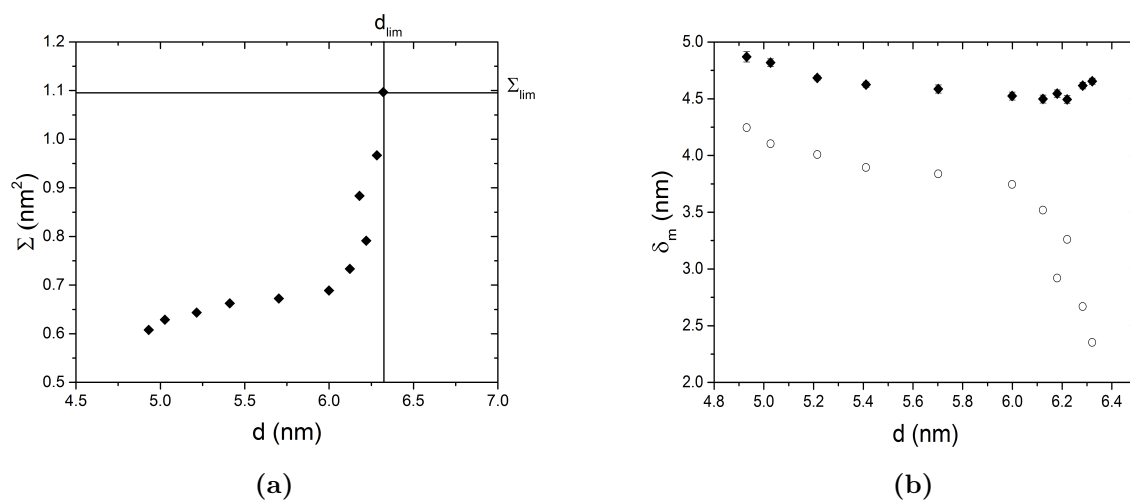


Figure 3.1.5 – *Etude du confinement des bicouches de Lécithine. (a) Couplage entre un confinement latéral, représenté par l'aire moléculaire à l'interface bicouche-eau Σ , et un confinement vertical, illustré par la périodicité lamellaire d . Les droites horizontale et verticale indiquent les valeurs caractéristiques du confinement associé à la limite de dilution (d_{lim} , Σ_{lim}). (b) Comparaison entre les épaisseurs de membrane décrite géométriquement, δ_m^{geo} (\circ), et par contraste électronique (voir Section 2.4.2), δ_m^e (\blacklozenge), en fonction du confinement vertical qui est illustré par la période d'empilement d .*

moléculaire à l'interface solvant-bicouches Σ ; le volume moléculaire v est bien entendu supposé invariant dans le cadre des faibles confinements appliqués. Sur la Figure 3.1.5a, l'aire moléculaire croît faiblement avec l'hydratation jusqu'à une limite de confinement ($d_2^{Lécithine} = 6 \text{ nm}$, $\Sigma_{12}^{Lécithine} = 0.7 \text{ nm}^2$) à partir de laquelle a lieu une rupture de pente dévoilant une forte dilatation de Σ , dans le régime restreint fortement hydraté, qui s'arrête à la limite de dilution ($d_{lim} = 6.3 \text{ nm}$, $\Sigma_{lim} \simeq 1.1 \text{ nm}^2$). Cette approche géométrique permet de prendre explicitement en considération la compressibilité latérale des bicouches bien qu'il soit relativement simplifié de considérer les bicouches comme demeurant parfaitement planes. Certains modèles géométriques élaborés ont été proposés pour prendre en compte les déviations à la loi de dilution « idéale », discutée précédemment pour les bicouches de Simulsol [Ac. O, n=6]. Un exemple est de considérer le surplus de surface stocké lorsque l'on considère les ondulations thermiques des bicouches [50]. Bien que cet effet soit généralement faible, il a été décrit expérimentalement pour des empilements de bicouches très flexibles [137, 121, 37]. Cependant, cela n'est pas pertinent ici car les déviations qui sont observées sont en dessous de la loi de dilution « idéale » alors qu'elles seraient au dessus dans le cas de cet effet dû aux ondulations [42].

L'épaisseur géométrique $\delta_m^{géo}$, obtenue par cette approche géométrique, est à comparer à l'épaisseur obtenue par contraste électronique δ_m^e qui présentent, toutes deux, une évolution commune, malgré une différence d'amplitude de l'ordre du nanomètre, jusqu'à la limite de confinement identifiée précédemment. Dès cette limite, l'épaisseur géométrique $\delta_m^{géo}$ diminue grandement, reliée à l'extension de l'aire moléculaire Σ , tandis que l'épaisseur de contraste électronique δ_m^e tend à légèrement augmenter. La variation de l'épaisseur de contraste électronique semble plus énigmatique avec une évolution analogue à un puits de potentiel de Lennard-Jones lorsqu'elle est représentée selon le confinement latéral, Figure 3.1.6a. En la décomposant en parties hydrophile et hydrophobe, on s'aperçoit que l'épaisseur hydrophobe ne diminue que de 2 \AA , Figure 3.1.6b, alors que c'est la variation de l'épaisseur hydrophile (de l'ordre de 1 nm), c'est-à-dire l'hydratation de la tête polaire phosphate-choline, qui est la source du comportement de l'épaisseur des bicouches, Figure 3.1.6c. Dans le régime peu hydraté, les têtes hydrophiles sont confinées à la fois verticalement et latéralement. Lorsque la quantité d'eau du système s'accroît, il semble que la partie polaire des molécules privilégie une expansion latérale, sur un domaine étroit en Σ , entraînant ainsi une diminution de l'épaisseur mesurée. Puis pour un certain confinement ($d_2^{Lécithine}$, $\Sigma_{12}^{Lécithine}$), d'une manière similaire aux chaînes éthoxylées du Simulsol [Ac. O, n=6], les groupes phosphate-choline s'hydratent verticalement expliquant ainsi la remontée de l'épaisseur δ_m^e .

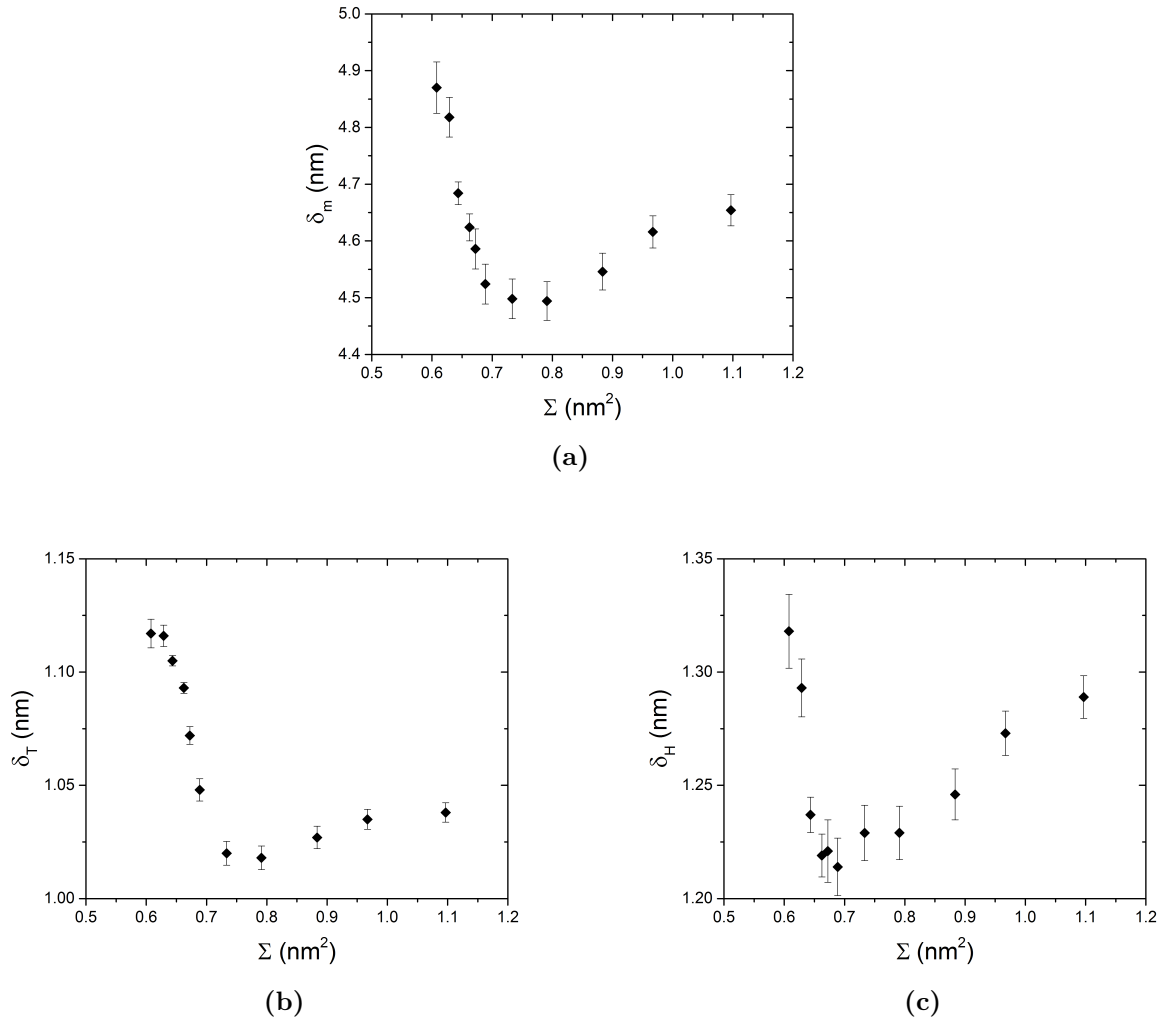


Figure 3.1.6 – Évolution des différentes épaisseurs qui caractérisent les bicouches de Lécithine. L'épaisseur de la membrane δ_m (a) et les demi-épaisseurs hydrophobe (b) et hydrophile (c) sont représentées face au confinement latéral, illustré par l'aire moléculaire à l'interface eau-bicouche Σ . (voir Section 2.4.2)

3.1.3 Transition de décrochage : bicouches composées d'un mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac.O, n=6]

Bien que les systèmes composés uniquement de Lécithine ou de Simulsol [Ac.O, n=6] présentent certaines similitudes de par leur auto-assemblage sous forme de bicouches empilées et de par leur comportement membranaire en haute hydratation, les interactions Lécithine-Lécithine et Simulsol-Simulsol sont fondamentalement différentes. Ceci est illustré expérimentalement par la présence ou non d'une limite de dilution ainsi que par la variation notable de l'aire moléculaire avec l'hydratation du système, leur permettant ainsi d'atteindre respectivement des régimes de confinements vertical et latéral distincts. Il apparaît alors intéressant de porter de l'attention aux bicouches lipidiques issues du mélange Lécithine-Simulsol, tout particulièrement dans le cadre de l'étude de la transition « liée-non liée », voir Section 1.3.6.

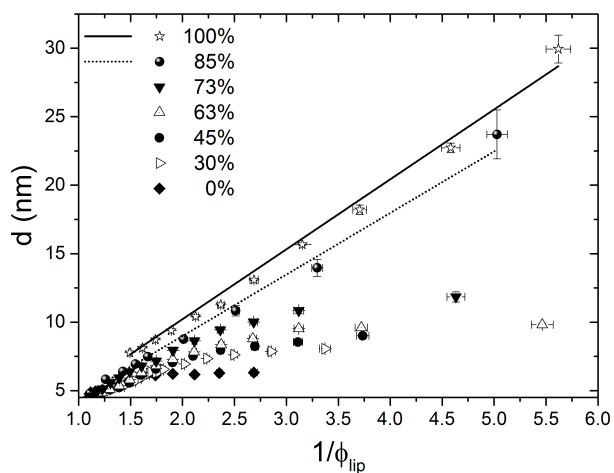


Figure 3.1.7 – Lois de gonflement lamellaire de bicouches empilées de compositions distinctes par leur teneur molaire en Simulsol [Ac.O, n=6]. Les droites représentent un ajustement par la description géométrique reliant la périodicité lamellaire d et la fraction volumique en lipides ϕ_{lip} , équation 1.1.2, et donnent accès aux épaisseurs membranaires $\delta_m^{géo} = 5.0 \text{ nm}$ (100%) et $\delta_m^{géo} = 4.5 \text{ nm}$ (85%) .

Sur la Figure 3.1.7 sont présentées les lois de dilutions des empilements lamellaires de bicouches composées de mélange Lécithine-Simulsol pour différentes teneurs en Simulsol [Ac.O, n=6]. Les bicouches de Simulsols [Ac.O, n=6] et celles de Lécithine représentent respectivement les limites haute et basse de l'évolution de la période d'empilement d , représentatif du confinement vertical, lorsque l'hydratation est modifiée. Dans le régime concentré, la variation de la période d'empilement avec la teneur en co-tensioactif semble négligeable alors que dans le régime dilué, on remarque un effet indéniable de l'agrandis-

sement de la distance membrane-membrane, résultant de l'intensification des interactions répulsives issues des chaînes éthoxylées du Simulsol [Ac.O, n=6].

Tout comme les bicouches de Lécithine, les membranes lipidiques de composition en Simulsol [Ac.O, n=6] variant de 0% à 73% présentent un état « lié » et par conséquent une limite de dilution. Cette limite de dilution est marquée par un couplage entre interactions verticales inter-membranaires, représentées par une périodicité lamellaire limite d_{lim} , et interactions latérales intra-membranaires, illustrées par une aire moléculaire interfaciale limite Σ_{lim} . Cette borne de la coexistence de phase eau-empilement lamellaire est caractérisée par un confinement vertical qui diminue avec la teneur en co-tensioactif (augmentation de d_{lim} , Figure 3.1.7) et par un confinement latéral qui, au contraire, augmente (diminution de Σ_{lim}).

La transition de décrochage, c'est-à-dire la transition entre un état « lié » et un état « non lié » d'un empilement lamellaire, est obtenue par variation de la teneur en co-tensioactif au sein de la membrane. Pour ce système, celle-ci s'effectue à partir d'une teneur en Simulsol [Ac.O, n=6] d'environ 70% (difficulté de reproductibilité expérimentale pour cette composition à cause de la transition entre les deux états distincts, dépendante de la précision expérimentale associée aux différents paramètres thermodynamiques). L'état « non lié » de l'empilement lamellaire est, quant à lui, parfaitement observé pour une composition mixte à 85% en co-tensioactif, Figure 3.1.7, gonflant jusqu'à un ordre d'empilement $d \sim 42 \text{ nm}$ ($\phi_{lip} \simeq 0.1$, non représenté pour raison de clarté). Cette transition de décrochage peut, de plus, s'évaluer à l'aide de mesures de pression osmotique, permettant ainsi une caractérisation thermodynamique plus approfondie, effectuée toutefois pour un système parent comportant des « copolymères » hydrophiliquement plus longs [122].

3.1.4 Régimes d'hydratation dilué et intermédiaire : transition de phase entre un empilement lamellaire « concentré » et un empilement lamellaire « dilué »

3.1.4.1 Contrôle du confinement lamellaire par l'hydratation du système et par la densité de greffage

Dans le cas des bicouches mixtes Lécithine-Simulsol, la définition de l'aire moyenne moléculaire à l'interface solvant-bicouche Σ se doit d'être légèrement modifiée de la relation 1.3.26 pour tenir compte des teneurs respectives des molécules au sein de la membrane. Ainsi, supposant les bicouches planes et homogènes, on définit un volume moléculaire moyen incompressible $v = x.v_S + (1 - x).v_L$ (avec x la proportion molaire en Simulsol [Ac.O, n=6], v_S le volume moléculaire du Simulsol [Ac.O, n=6] et v_L le volume moléculaire de Lécithine) et une aire moléculaire moyenne $\Sigma = x.\Sigma_S + (1 - x).\Sigma_L$ (avec Σ_S l'aire moléculaire du Simulsol [Ac.O, n=6] et Σ_L l'aire moléculaire de la Lécithine). Sur la Figure 3.1.8a, l'évolution de Σ est représentée pour chaque composition en Simulsol

[Ac.O, n=6] en fonction de la période d'empilement. Celle-ci, pour une composition donnée, semble augmentée avec la périodicité lamellaire d , c'est-à-dire la quantité d'eau du système d'après la Figure 3.1.7. On remarque, de plus, que l'insertion du Simulsol [Ac.O, n=6] a pour effet de diminuer l'aire moléculaire moyenne à l'interface, pour un confinement vertical donné, pointant une interaction latérale moins répulsive qui résulte probablement de la chaîne aliphatique monocaténaire entropiquement plus favorable, du point de vue du volume exclu, que la chaîne bicaténaire de la Lécithine. De la même manière, on retrouve l'effet répulsif vertical des chaînes éthoxylées du Simulsol [Ac.O, n=6] si l'on s'intéresse à l'augmentation de la période d'empilement avec la teneur en Simulsol [Ac.O, n=6], pour un confinement latéral donné, pointé par l'aire moléculaire Σ .

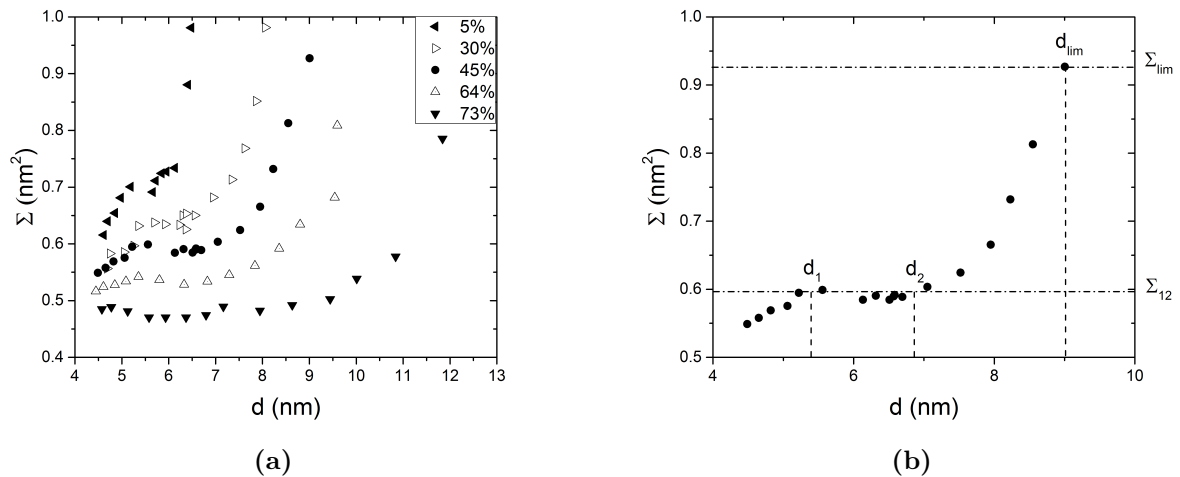


Figure 3.1.8 – Couplage entre un confinement latéral, représenté par une aire moléculaire à l'interface eau-bicouche Σ , et un confinement vertical, illustré par une périodicité lamellaire d pour différentes densités de greffage en co-tensioactif. (a) Confinements vertical et latéral, appliqués aux empilements lamellaires, dépendant de la composition membranaire c'est-à-dire du pourcentage molaire en Simulsol [Ac.O, n=6]. (b) Exemple modèle, pour une bicouche composée à 45% en Simulsol [Ac.O, n=6], illustrant les différents confinements qui caractérisent les régimes d'hydratations distincts de l'empilement de bicouches mixtes.

Un couplage certain existe donc entre confinement vertical et confinement latéral. Celui-ci est dépendant du couplage entre la densité de greffage en Simulsol [Ac.O, n=6] et l'hydratation de l'empilement lamellaire. Afin de simplifier l'analyse, on se propose de se consacrer à la description des confinements pour une composition membranaire « modèle » qui représente globalement le comportement de chacune, Figure 3.1.8b. Il est alors possible de distinguer trois domaines d'hydratation distincts.

Pour une faible teneur en eau, on définit le régime confiné où l'aire moléculaire augmente quasi linéairement avec la période d'empilement et ce pour chaque empilement lamellaire

dans l'état « lié » jusqu'à un confinement vertical limite d_1 . Le régime intermédiaire, lorsqu'on enrichit l'hydratation, présente une faible variation du confinement latéral que l'on peut spécifier de constant, en fixant une aire moléculaire moyenne Σ_{12} , tout au long du plateau de confinement délimité par les distances d'empilements d_1 , pour la zone la moins hydratée, et d_2 pour l'extrémité la plus diluée. Le régime dilué s'étend lui à partir du couple de confinements vertical/latéral (d_2, Σ_{12}) jusqu'à la limite marquant la coexistence de phase eau-empilement lamellaire définie par le couple (d_{lim}, Σ_{lim}). Ce régime est caractérisé par un élargissement important de l'aire moléculaire avec l'extension verticale de la distance entre les membranes.

Comme la teneur en co-tensioactif modifie les interactions verticales répulsives inter-membranes et les interactions latérales attractives intra-membranes (analogie avec un copolymère dibloc), la composition de la membrane permet de moduler en intensité le couplage entre les confinements vertical et latéral. Sur la Figure 3.1.9², un résumé des effets résultant de la densité de greffage, du confinement latéral et du confinement vertical est représenté schématiquement à l'échelle pour l'empilement lamellaire « dilué ». On remarque ainsi, d'une part, que lorsque l'hydratation du système est variée, les deux confinements sont modifiés avec une augmentation significative de l'ordre d'empilement d et de l'aire moléculaire Σ pour une composition membranaire donnée [70(L)/30(S)]. D'autre part, il est possible de moduler uniquement soit le confinement latéral soit le confinement vertical en jouant sur le couplage entre la teneur en eau et la densité de greffage en « copolymères » au sein de la bicouche.

La transition entre les deux régimes de confinements que sont le régime « dilué » et le régime « intermédiaire », relevée par le couple (d_2, Σ_{12}), coïncide en réalité avec une transition de phase entre un empilement lamellaire dit « dilué » et un empilement lamellaire dit « concentré ». En effet, bien qu'aucune coexistence de phase ne soit observée ici puisque seule une famille de pics de Bragg est constatée et que l'évolution du gonflement lamellaire semble continu, celle-ci est belle et bien mise en évidence par une réorganisation membranaire, évaluée par la modélisation de la densité électronique de la bicouche qui sera discutée par la suite à la Section 3.1.4.2, et qui est corroborée par la coexistence de phases effectivement observée pour des co-tensioactifs hydrophiliquement plus long, Section 4.3. Cette transition de phase intervient pour des confinements vertical et latéral sensiblement différents selon la densité de greffage et qui semblent dépendants des propriétés de l'empilement lamellaire « dilué ». Malgré une différence en terme de valeurs, on note une évolution similaire pour les deux extrémités délimitant la variation de l'hydratation qui sont régies par les interactions membranes-membranes et intra-membranaires caractéristiques de l'empilement lamellaire « dilué ». On retrouve donc une augmentation de la périodicité critique d_2 avec la teneur en co-tensioactif (variant de 6.0 nm pour des bicouches de Lécithine à 7.8 nm pour des membranes de Simulsol [Ac.O, n=6]), corré-

2. Aide précieuse apportée par Mélodie Auriol pour la réalisation de cette représentation schématique à l'échelle.

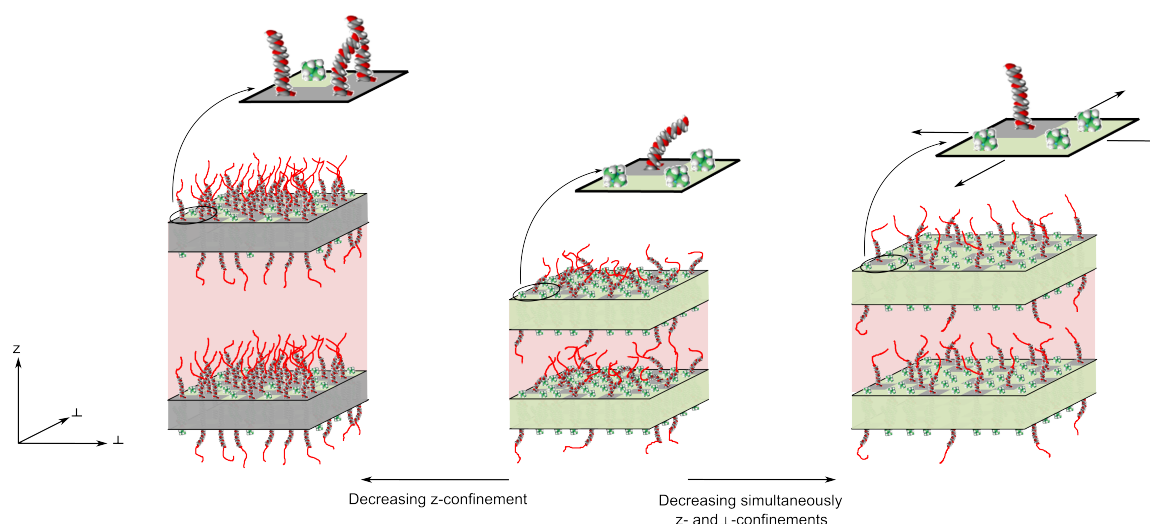


Figure 3.1.9 – Représentation schématique et à l'échelle des effets de confinements vertical (axe z) et latéral (plan \perp), de l'hydratation et de la densité de greffage en co-tensioactif polymérique sur l'empilement lamellaire « dilué ». Au milieu est représenté une phase lamellaire en limite de transition de phase (d_2 , Σ_{12}) pour des membranes composées à 30% en Simulsol [Ac.O, $n=6$]. À droite est représenté l'effet de l'augmentation de l'hydratation sur la périodicité de l'empilement d , sur l'aire moléculaire Σ et sur l'épaisseur de la membrane. À gauche est représentée une phase lamellaire, composée à 70% en Simulsol [Ac.O, $n=6$], de même confinement latéral (même Σ) que celle du milieu. L'épaisseur hydrophile, donnée par les ajustements liés au modèle de Nallet (voir Section 2.4.2) correspond à la taille du Simulsol représentée par l'aspect moléculaire tandis que la double épaisseur hydrophobe est affichée par la taille (selon l'axe z) du parallélépipède. Les filaments rouges représentent, de façon sommaire, la fraction en polymères non prise en compte dans la description modélisée de la membrane et qui fait donc partie intégrante de la couche aqueuse.

lée à l'augmentation de d_{lim} , Figure 3.1.10a. Au contraire, on observe une diminution de l'aire moléculaire critique Σ_{12} avec la densité de greffage (variant de 0.66 nm^2 pour des bicouches de Lécithine à 0.35 nm^2 pour celles de Simulsol [Ac.O, n=6]) corrélée à la diminution de Σ_{lim} , Figure 3.1.10b. D'une manière analogue, Silva et al. [132] ont montré, dans un contexte de structures lamellaires catanioniques en solution aqueuse, l'impact fort qu'ont des effets de confinements sur la structure de la bicouche. À travers un mécanisme de condensation de contre-ions, les interactions entre les bicouches sont alors modifiées et entraînent de telles coexistences de phase.

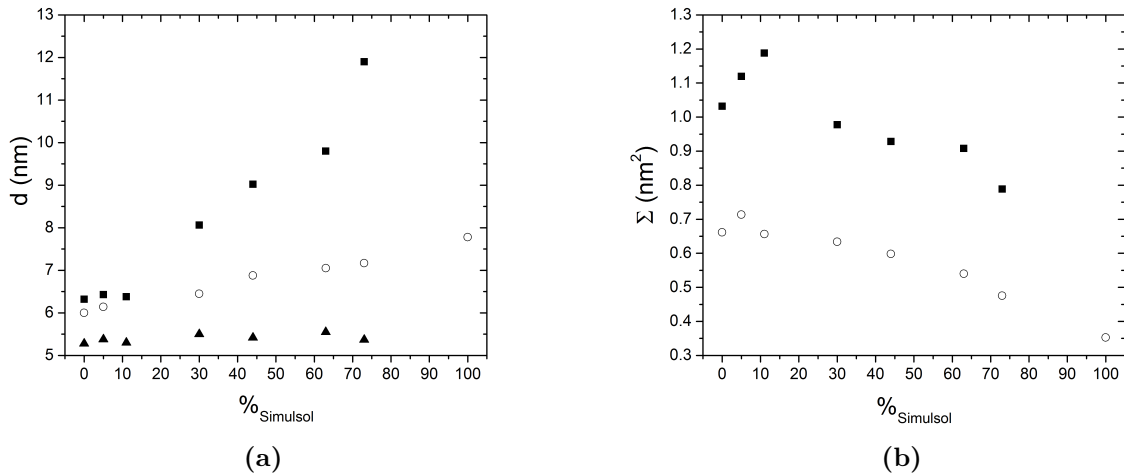


Figure 3.1.10 – Évolution des confinements critiques, indiquant des transitions de phase ou de régime d'hydratation, avec la densité de greffage en co-tensioactif polymérique. (a) Variation du confinement vertical, représenté par la périodicité lamellaire d , avec la composition membranaire (en pourcentage molaire de Simulsol [Ac.O, n=6]) lorsqu'il est associé à la limite de dilution d_{lim} (■), à la transition entre les régimes d'hydratation dilué et intermédiaire d_2 (○) et à la transition entre les régimes d'hydratation intermédiaire et confiné d_1 (▲). (b) Variation du confinement latéral, représenté par l'aire moléculaire à l'interface bicouche-eau Σ , avec la composition de la bicouche lorsqu'il est associé à la limite de dilution Σ_{lim} (■) et au quasi-plateau de confinement définissant le régime intermédiaire Σ_{12} (○).

Il est, de plus, possible de postuler la présence d'un plateau de confinement latéral aussi pour les membranes de Lécithine, d'après la courbe 3.1.5a, et donc de comparer ces confinements critiques au changement d'hydratation des têtes polaires de Lécithine apparaissant pour le couple de confinements $(d_2^{Lécithine}, \Sigma_{12}^{Lécithine})$, voir Section 3.1.2, qui sont, par conséquent, possiblement reliés. De même, pour des bicouches de Simulsol [Ac.O, n=6], les confinements définissant la limite concentrée de la phase lamellaire $(d_{min}^{Simulsol}, \Sigma^{Simulsol})$, voir Section 3.1.1, semblent pouvoir être corrélés à cette transition lamellaire-lamellaire bien que ceux-ci apparaissent dans un état « non lié ».

À l'autre extrémité du plateau de confinement latéral, la limite concentrée du régime d'hydratation intermédiaire, identifiée par le couple (d_1, Σ_{12}) , présente une étonnante caractéristique car le confinement vertical associé semble indépendant de la composition membranaire de l'empilement lamellaire « concentré » avec une distance de répétition membrane-membrane constante, $d_1 \simeq 5.5 \text{ nm}$, voir Figure 3.1.10a.

3.1.4.2 La structure électronique de la bicouche

À partir du facteur de forme, issu de la description modélisée de la bicouche par contraste de densité électronique appliquée à la diffusion de rayons X (voir Section 2.4.2), il est possible de discuter les différents régimes de confinement, identifiés précédemment, sur la membrane lipidique mixte.

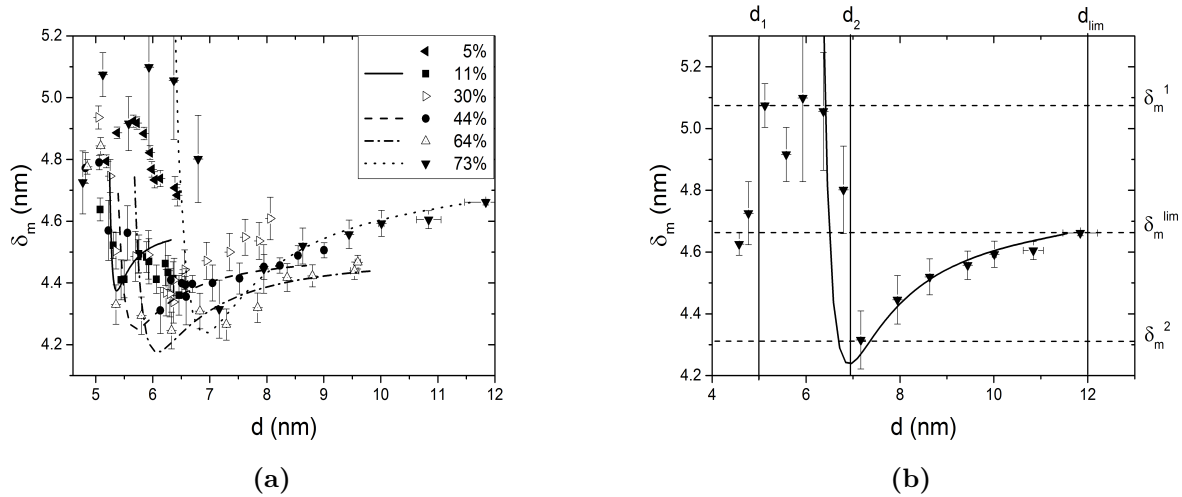


Figure 3.1.11 – Comportement de la membrane face au confinement vertical appliqué. (a) Évolution de l'épaisseur de bicouche δ_m^e , définie par contraste de densité électronique (voir Section 2.4.2), pour différentes teneur en Simulsol [Ac.O, $n=6$]. Les courbes représentent un ajustement paramétrique de type potentiel Lennard-Jones utilisé pour une meilleure visualisation. (b) Membrane modèle, composée à 73% en Simulsol [Ac.O, $n=6$], illustrant les épaisseurs de membrane caractéristiques des différents régimes d'hydratation : la limite de dilution associée à un confinement vertical d_{lim} et à une épaisseur δ_m^{lim} , la transition entre les régimes dilués et intermédiaires (d_2, δ_m^2) et la transition entre les régimes intermédiaire et confiné marqué par la périodicité lamellaire d_1 et par une épaisseur de membrane maximale δ_m^1 quasi-constante sur le domaine d'hydratation intermédiaire.

Sur la Figure 3.1.11a, l'épaisseur de la membrane obtenue par contraste de densité électronique δ_m^e , pour chaque composition, est représentée face au confinement vertical

appliqué (couplé au confinement latéral via la Figure 3.1.8a). De manière globale, l'épaisseur de membrane pour chaque composition est du même ordre de grandeur, se répartissant sur l'intervalle d'épaisseur $4.2 \text{ nm} \leq \delta_m^e \leq 5.1 \text{ nm}$, puisque les différences de tailles entre le Simulsol [Ac.O, n=6] et la Lécithine sont du même ordre de grandeur. Malgré des informations dissimulées par cette superposition nuagée de points expérimentaux, une tendance commune est extraite et est explicitement développée Figure 3.1.11b.

Tout comme pour les bicouches composées de Lécithine, Section 3.1.2, on retrouve une évolution de l'épaisseur de la bicouche sous la forme d'un puits de potentiel Lennard-Jones. Il est alors possible de faire coïncider chaque régime de confinement à une variation particulière de l'épaisseur de membrane. En limite de dilution, soulignée par une valeur limite de la période d'empilement d_{lim} , la valeur de δ_m^e tend vers une constante δ_m^{lim} qui ne varie plus même si le système passe dans un état biphasique eau-empilement lamellaire. En revanche, d'une composition à l'autre, l'épaisseur δ_m^{lim} semble être modifiée avec la teneur en co-tensioactif, Figure 3.1.12b. Selon cette évolution parabolique de δ_m^{lim} , il semble possible d'identifier une valeur minimale qui est atteinte aux alentours de 60% – 70% de Simulsol [Ac.O, n=6] en pourcentage molaire. Il est alors possible d'émettre l'hypothèse que cette valeur critique en densité de greffage du co-tensioactif, associée à l'évolution de cette épaisseur constante δ_m^{lim} en régime hautement dilué, puisse mettre en évidence la transition de décrochage discutée précédemment Section 3.1.3.

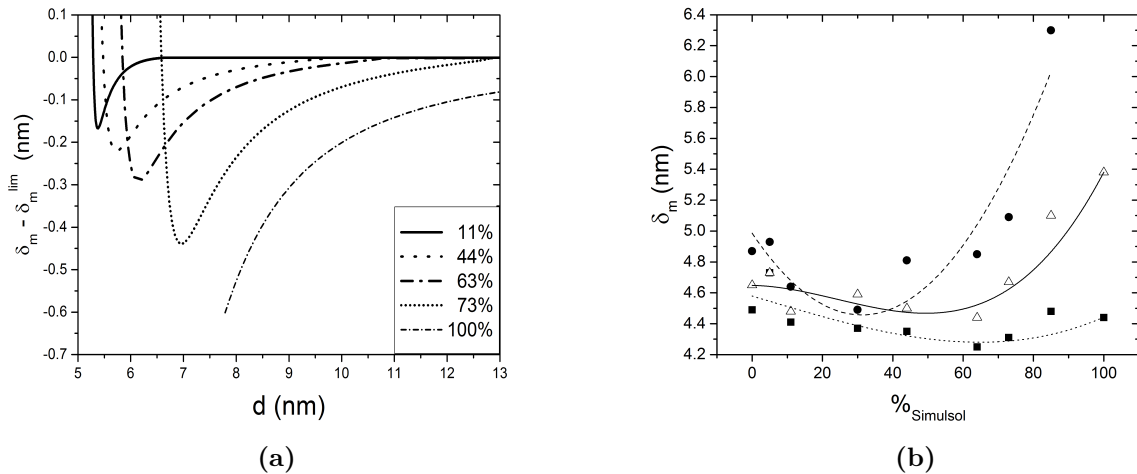


Figure 3.1.12 – Analyse de la déformation de la bicouche obtenue par contraste de densité électronique. (a) Déformation de la membrane soumise à la densité de greffage en co-tensioactif polymérique. Les courbes représentées proviennent des ajustements paramétriques de type potentiel Lennard-Jones exposés Figure 3.1.11a. (b) Évolution des épaisseurs membranaires caractéristiques des différents régimes d'hydratation avec la teneur molaire en Simulsol [Ac. O, n=6] : δ_m^1 (●), δ_m^2 (■) et δ_m^{lim} (Δ) (avec leurs guides visuels).

Depuis cette limite de dilution, lorsque le système se concentre, les confinements vertical et latéral s'intensifient, voir Figure 3.1.8a, et l'épaisseur de la membrane se contracte face à ce confinement doux amplifié jusqu'à une valeur critique minimale de l'épaisseur de la membrane δ_m^2 , associée au changement d'hydratation à la limite de confinement (d_2, Σ_{12}). Afin de mettre en évidence la déformation de la membrane analysée par le contraste de densité électronique, on soustrait à l'épaisseur de bicouche δ_m^e l'épaisseur asymptotique en haute dilution δ_m^{lim} pour chaque composition, Figure 3.1.12a. Plus la teneur en co-tensioactif est conséquente, plus la lamelle est à même à se rétrécir face au confinement de faible amplitude appliqué (maximale pour une bicouche de Simulsol [Ac. O, n=6], $\delta_m^e - \delta_m^{lim} \sim 6 \text{ \AA}$), ce qui semble résulter d'une combinaison de facteurs associée à une plus grande taille moléculaire et à une élasticité augmentée. La partie hydrophile du Simulsol [Ac. O, n=6], étant plus longue que celle de la Lécithine, confère à la membrane lipidique un aspect « poilu ». C'est alors principalement les chaînes éthoxylées du Simulsol qui se contractent dans ce régime d'hydratation puisque l'épaisseur hydrophobe de la bicouche ne varie qu'insensiblement (de l'ordre de l'Ångström), Figure 3.1.13a, excepté pour de très fortes concentrations en Simulsol [Ac. O, n=6] où la variation n'est plus négligeable mais demeure bien inférieure à la variation de la partie hydrophile. À cause de cet aspect « poilu » de la membrane et de la rusticité du modèle utilisé pour décrire le contraste de densité électronique de la bicouche, sous la forme d'une succession de créneaux dans la direction verticale de l'empilement, une fraction des chaînes éthoxylées provenant de deux interfaces membranaires adjacentes sont définies dans la couche aqueuse, modifiant ainsi la valeur de référence de la densité électronique de l'eau ρ_{eau} . Pour une quantité d'eau suffisante, il est donc possible de négliger cet effet des bouts de chaînes éthoxylées dans la définition du rapport des contrastes de densité électronique, voir Section 2.4.2. Expérimentalement, on définit un rapport de contraste de densité électronique limite à haute dilution, $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}^{lim} \sim -1.4$, commun à chaque composition membranaire. La densité de greffage n'intervient donc pas sur les densités électroniques dans le régime dilué car les densités électroniques hydrophobe, d'une part, et hydrophile, d'autre part, de la Lécithine et du Simulsol [Ac. O, n=6] sont approximativement équivalentes. Lorsque l'hydratation est diminuée, les membranes se rapprochent et un recouvrement des membranes a lieu au niveau de leurs chaînes éthoxylées mis en évidence par l'augmentation de la densité électronique apparente de l'eau et, par conséquent, par la diminution de la valeur algébrique du rapport des contrastes de densité électronique $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$ qui est observée sur la Figure 3.1.13b.

À la limite critique d'épaisseur δ_m^2 et de confinements (d_2, Σ_{12}), une réorganisation moléculaire semble avoir lieu, pointée par une remontée surprenante de l'épaisseur de membrane, Figure 3.1.11b. Néanmoins, cette valeur minimale d'épaisseur, qui met en lumière une transition entre deux régimes de confinement ou d'hydratation, semble se définir aussi pour des bicouches de Lécithine dont l'épaisseur de membrane présente une évolution similaire, Figure 3.1.6a. Il en est de même pour des bicouches de Simulsol [Ac.O, n=6],

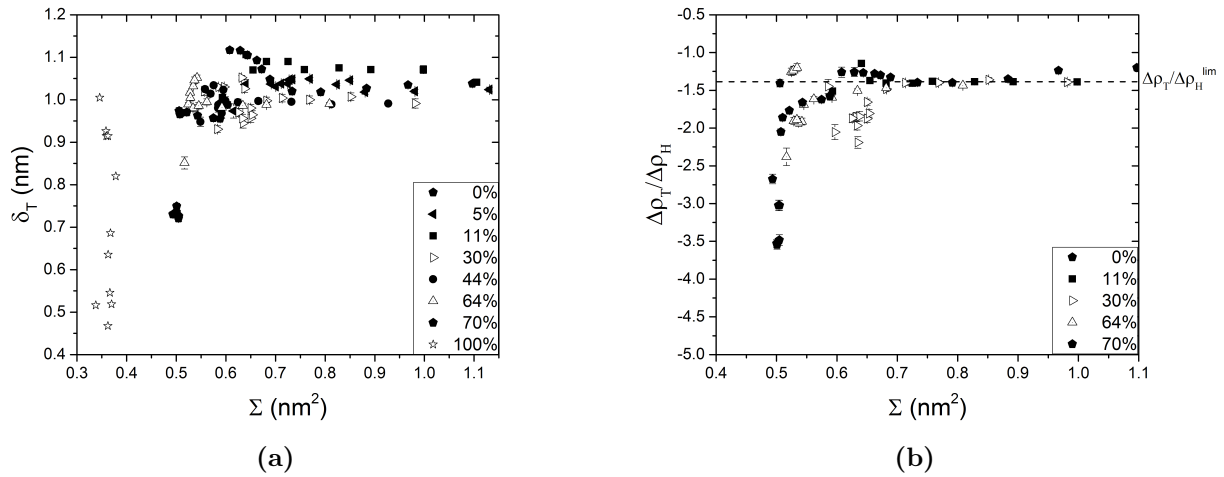


Figure 3.1.13 – Propriétés communes à chaque composition de bicouche issues de l’analyse par contraste de densité électronique (voir Section 2.4.2). (a) Évolution de la demi-épaisseur hydrophobe de la bicouche δ_T suivant l’hydratation du système, sondée par l’évolution de l’aire moléculaire Σ , pour chaque teneur molaire en Simulsol [Ac. O, n=6]. (b) Évolution du rapport de contraste de densité électroniques $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$ avec l’hydratation du système.

Figure 3.1.3, avec un minimum d’épaisseur δ_m^{min} atteint à la transition de phase Simulsol hydraté-empilement lamellaire, qui est développée par la suite à la Section 3.1.5.1. Cette épaisseur de bicouche minimale obtenue évolue avec la teneur en co-tensioactif d’une manière semblable à celle de l’épaisseur limite δ_m^{lim} , Figure 3.1.12b, renforçant la visualisation de la transition de décrochage et caractérisant ainsi une propriété de l’empilement lamellaire « dilué », dont les molécules membranaires conservent la même conformation tout au long du confinement. Bien que δ_m^2 varie paraboliquement avec la teneur en Simulsol [Ac. O, n=6], l’épaisseur de membrane relative, $\delta_m^2 - \delta_m^{\text{lim}}$, adopte un comportement dépendant de celui de la périodicité critique d_2 , Figure 3.1.12a. Un couplage évident apparaît alors entre la déformation de la membrane et la portée verticale des interactions polymériques mises en jeu entre les membranes qui augmente donc avec la densité de greffage. Une tentative d’explication pour ce comportement peut être recherchée dans la description théorique des « brosses » compressées, équation 1.2.9. Dans la limite où $\frac{R}{L_{Br}} \ll 1$, avec $2R$ la séparation entre deux membranes planes et L_{Br} , la longueur à l’équilibre de chaque polymère greffé, l’énergie libre par chaîne greffée est donnée par :

$$F = n_p^2 \frac{v_m \chi_p}{R A} \quad (3.1.1)$$

Si l’analogie avec la conformation « brosse » est pertinente pour les tête hydrophiles du Simulsol [Ac. O, n=6], interagissant à travers la couche aqueuse d’un empilement

lamellaire déshydraté, alors la répartition surfacique en polymères $\frac{\chi_p}{A}$ augmente avec la teneur en Simulsol χ_p (de plus, pour d fixe, $A \equiv \Sigma$ diminue avec χ_p , Figure 3.1.8a) et R doit être identifié comme $\frac{d}{2} - \delta_T$. Le changement drastique dans la structure de la bicouche, apparaissant dès lors que d devient plus petit que d_2 , pourrait être induit par l'énergie libre par chaîne atteignant une valeur critique F_2 . Cette hypothèse a pour conséquence de prédire que :

$$d_2 = 2(\delta_T + v_m \frac{n_p^2 \chi_p}{F_2 A}) \quad (3.1.2)$$

Cette prédiction est qualitativement en accord avec les observations, Figure 3.1.10a, puisque δ_T varie peu avec l'hydratation ou la composition de la bicouche, Figure 3.1.13a.

Dans le régime déshydraté, la transition de phase entre l'empilement lamellaire « concentré » et l'empilement lamellaire « dilué » a lieu dès que le confinement impose une périodicité et une aire moléculaire suffisamment faibles ($d \leq d_2$, $\Sigma \leq \Sigma_{12}$), accompagnée par une soudaine extension que subit l'épaisseur de la membrane lipidique jusqu'à atteindre une valeur maximale δ_m^1 , Figure 3.1.11b, qui semble alors rester quasi-constante jusqu'à la limite concentrée du plateau de confinement (d_1 , Σ_{12}). Même si les explications manquent pour décrire cette réorganisation membranaire, présente aussi pour des membranes de Lécithine, il est possible de noter une variation avec la densité de greffage de cette épaisseur maximale atteinte. Ainsi, sur la Figure 3.1.12b, une évolution parabolique, similaire à celle des autres épaisseurs caractéristiques, est visualisée mais avec un minimum, cette fois-ci différent, qui est atteint aux alentours de 20% – 30% en teneur de co-tensioactif. Si l'on confronte la transition théorique champignon-brosse pour la conformation de polymères greffés à une surface, équation 1.2.7, aux résultats expérimentaux pour nos différentes compositions membranaires, Figure 3.1.8a, alors les co-tensioactifs présents sur des bicouches à faible teneur en Simulsol [Ac. O, n=6] (5% et 11%) ont la possibilité, théoriquement, de demeurer en conformation champignon malgré le changement de l'hydratation (les autres compositions présentant toutes la conformation brosse dans cette description). Expérimentalement, ces compositions, à forte teneur en Lécithine, présentent un léger biais, de variation opposée à celles des compositions plus riches en co-tensioactif, lorsqu'on compare la réaction de leur empilement lamellaire face au confinement appliqué (Σ , d) avec celle des bicouches empilées de Lécithine (comparaison non représentée). Il n'est donc pas exclu que le comportement observé pour δ_m^1 , donc pour la membrane du régime « confiné », puisse être relié à cette transition champignon-brosse.

3.1.5 Régime peu hydraté : transition de phase entre du Simulsol hydraté et un empilement lamellaire

3.1.5.1 Transition de phase entre du Simulsol hydraté et l'état « non lié » des bicouches de Simulsol [Ac. O, n=6]

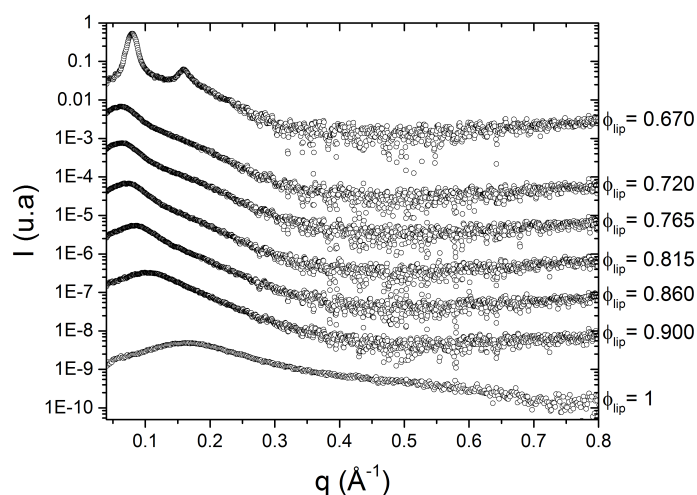


Figure 3.1.14 – *Diffractogrammes d'une phase de Simulsol [Ac. O, n=6] hydraté à différentes concentrations avant la transition en phase lamellaire.*

Comme vu précédemment, Section 3.1.1, les molécules de Simulsol [Ac. O, n=6] ne s'auto-assemblent pas en phase lamellaire dans le domaine peu hydraté ($\phi_{lip} \leq 0.67$). Sous microscopie à lumière polarisée, aucune biréfringence n'est à priori observée. Ces molécules de Simulsol [Ac. O, n=6] n'en sont pas désorganisées pour autant comme il est possible de le constater sur les diffractogrammes d'échantillons plus concentrés, Figure 3.1.14, avec l'apparition d'une bosse de diffusion, plus ou moins étroite selon la dilution. Cette bosse indique une distance structurale moyenne, si l'on applique la relation de Bragg $d = \frac{2\pi}{q}$ (l'application de cette relation peut être erronée), qui varie selon l'hydratation de 3.8 nm pour du Simulsol [Ac. O, n=6] pur ou peu hydraté ($\phi_{lip} \sim 1$, macroscopiquement liquide) à 10.0 nm à la limite de la transition de phase avec l'empilement lamellaire ($\phi_{lip} \sim 0.7$). Cette phase de Simulsol [Ac. O, n=6], hydratée ou non, gonfle avec la teneur en eau et sa structure paraît indépendante de la température (sur la plage de $5^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$). Elle peut être confrontée, lorsqu'elle n'est composée que de Simulsol [Ac. O, n=6], à l'organisation que prennent les molécules dans un liquide ionique [43] caractérisée par la présence de deux larges bosses révélées par diffusion de rayon X aux petits angles.

3.1.5.2 Transition de phase entre du Simulsol hydraté et un empilement lamellaire « concentré » pour des bicouches mixtes

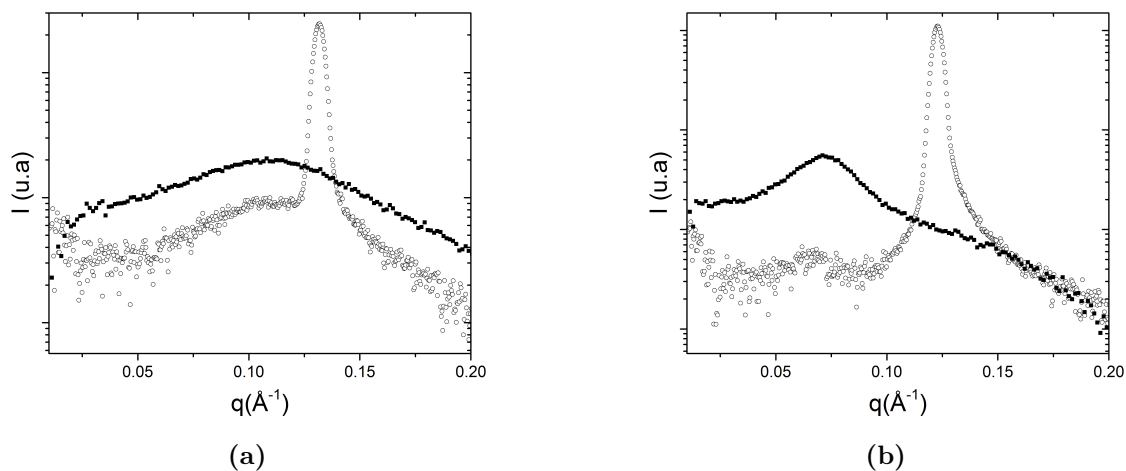


Figure 3.1.15 – Mise en évidence de la transition de phase entre du Simulsol [Ac. O, $n=6$] hydraté et un empilement lamellaire « concentré » pour des bicouches mixtes. (a) Comparaison de diffractogrammes, dans le régime le moins hydraté, entre un mélange binaire Simulsol [Ac. O, $n=6$]-eau ($\phi_{lip} = 0.90$) et un mélange ternaire Lécithine-Simulsol [Ac. O, $n=6$]-eau ($\phi_{lip} = 0.865$, à 70% de teneur molaire en Simulsol [Ac. O, $n=6$]). (b) Comparaison de diffractogrammes, dans le régime le plus dilué où la phase non lamellaire de Simulsol hydraté existe, entre un mélange binaire Simulsol [Ac. O, $n=6$]-eau ($\phi_{lip} = 0.75$) et un mélange ternaire Lécithine-Simulsol [Ac. O, $n=6$]-eau ($\phi_{lip} = 0.82$, à 70% de teneur molaire en Simulsol [Ac. O, $n=6$]).

Pour des bicouches mixtes, mais chargées en co-tensioactif ($\geq 73\%$), la présence d'une bosse est décelée dans le domaine très confiné (d variant de 38 \AA , pour $\phi_{lip} \simeq 1$, à 103 \AA , pour $\phi_{lip} \sim 0.7$), Figure 3.1.15. Une interprétation, liée à la réorganisation membranaire qui apparaît à la transition entre les empilements lamellaires « dilué » et « concentré », serait de stipuler qu'il puisse exister des domaines de répartition, définis latéralement à la bicouche, entre les deux types de molécules qui la composent. Ces domaines, pour un type donné de molécules, seraient alors séparés par une distance moyenne mal définie donnant lieu à l'apparition d'une bosse par diffusion de rayons X. Une seconde interprétation serait que la bosse puisse résulter d'une déformation (mal définie) de la membrane, dans le plan latéral, équivalente aux déformations latérales des bicouches, en solution aqueuse, composées de dodécylsulfate de sodium (SDS) et de longs polymères de poly(éthylène oxyde) (PEO) [63]. Bien que ces deux hypothèses puissent être plausibles, la similarité avec la phase de Simulsol [Ac. O, $n=6$] hydratée déterminée précédemment, Section 3.1.5.1,

est indéniable, que cela soit pour un domaine très concentré, Figure 3.1.15a ou plus dilué, Figure 3.1.15b.

Il apparaît donc une coexistence de phase entre du Simulsol [Ac. O, n=6] hydraté et un empilement lamellaire « concentré », mais révélée seulement pour des bicouches à forte teneur en co-tensioactif. Il s'avère que cette transition de phase se manifeste pour un confinement imposé précis correspondant à l'extrémité concentrée du plateau de confinement (d_1, Σ_{12}), délimitant les régimes d'hydratation « intermédiaire » et « concentré », discuté Section 3.1.4.1.

3.2 Thermodynamique des bicouches lipidiques empilées fluctuantes

L'analyse structurale de la bicouche, que cela soit par description géométrique ou liée à la densité électronique, s'avère être une technique pertinente pour caractériser le diagramme de phase et le gonflement de ces systèmes lamellaires. Cependant, les propriétés élastiques d'un empilement lamellaire de bicouches sont les éléments clés pour comprendre la stabilité de tels systèmes auto-assemblés. Cette élasticité contrôle l'intensité des fluctuations thermiquement induites dans la conformation de la bicouche (fluctuations d'ondulation) et dans la séparation intermembranaire (fluctuations de compression/dilatation). Le paramètre de Caillé η [14], extrait des expériences de diffusion de rayons X et décrit Section 2.4.2, est utile pour caractériser ces fluctuations avec toutefois une limite résultant du fait que ces deux types de fluctuations sont couplées en ce paramètre. Associé à une description thermodynamique de l'énergie libre des bicouches empilées à l'état fluide, il est possible d'utiliser le paramètre de Caillé afin de quantifier les interactions régissant l'équilibre d'empilements lamellaires, de compositions de membrane distinctes et de concentrations en solvant différentes.

3.2.1 Interactions essentiellement d'origine stérique : les ondulations d'Helfrich

Dans le domaine lamellaire des bicouches de Simulsol [Ac. O, n=6], le paramètre de Caillé, voir Section 1.3.1, est extrait des diffractogrammes de diffusion de rayons X aux petits angles, Figure 3.1.1, pour différents confinements appliqués dépendant exclusivement de l'hydratation du système. Le système, caractérisé Section 3.1.1, gonfle « indéfiniment » avec la teneur en solvant et représente ainsi un état « non lié », Section 1.3.6. Les interactions répulsives semblent donc dominer puisqu'il n'y a pas suffisamment d'attraction pour accrocher le système vers une limite de dilution. Le tensioactif étant non ionique, il semble alors naturel d'explorer les effets entropiques pour expliquer cette répulsion observée. Liées à la flexibilité de la bicouche, les ondulations de la membrane sont en effet une

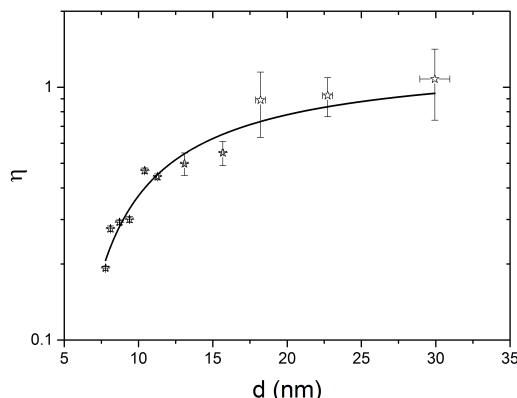


Figure 3.2.1 – Ondulations d’Helfrich décrites à l’aide du paramètre de Caillé. Les propriétés élastiques sont étudiées pour des bicouches empilées composées de Simulsol [Ac. O, n=6] à l’aide du paramètre de Caillé η représenté en fonction du confinement vertical, illustré par la périodicité d . La courbe représente l’ajustement par l’équation 1.3.25. L’épaisseur de membrane δ_m^η extraite est d’environ 4.7 nm.

source non négligeable de répulsion stérique.

Lorsque l’empilement lamellaire est soumis exclusivement à ces ondulations, thermodynamiquement évaluées par Helfrich (voir Section 1.3.5), le paramètre de Caillé est estimé par une relation simple décrite par l’équation 1.3.4 et ne dépend alors que du confinement vertical (relevé par la période d’empilement d). Sur la Figure 3.2.1, l’ajustement correct par cette relation prouve une domination des ondulations d’Helfrich dans les interactions mises en jeu pour stabiliser l’auto-assemblage des bicouches de Simulsol [Ac. O, n=6]. Il est alors possible de définir l’épaisseur de la bicouche $\delta_m^\eta \simeq 4.7 \text{ nm}$ dont la valeur est relativement proche de celle obtenue ($\delta_m^{\text{géo}} \sim 5.0 \text{ nm}$) par la relation géométrique utilisée pour décrire la loi de dilution, Figure 3.1.2a.

Une limite à cette approche est qu’il n’est pas possible d’estimer la valeur de la constante élastique de courbure k_c , voir Section 1.2.2.1, de la bicouche de Simulsol [Ac. O, n=6] qui est alors supposée ne pas dépendre de la périodicité de l’empilement. Des expériences complémentaires, telles que des mesures de pression osmotique le long de la ligne de dilution, sont nécessaires pour estimer la variation de la constante de compressibilité à potentiel chimique \bar{B} , voir Section 1.3.1, afin de remonter à la valeur de k_c .

3.2.2 Deux empilements lamellaires aux propriétés élastiques distinctes

Lorsque les bicouches sont composées d’un mélange de Simulsol [Ac. O, n=6] et de Lécithine, elles adoptent un comportement élastique sensiblement différent de celui des

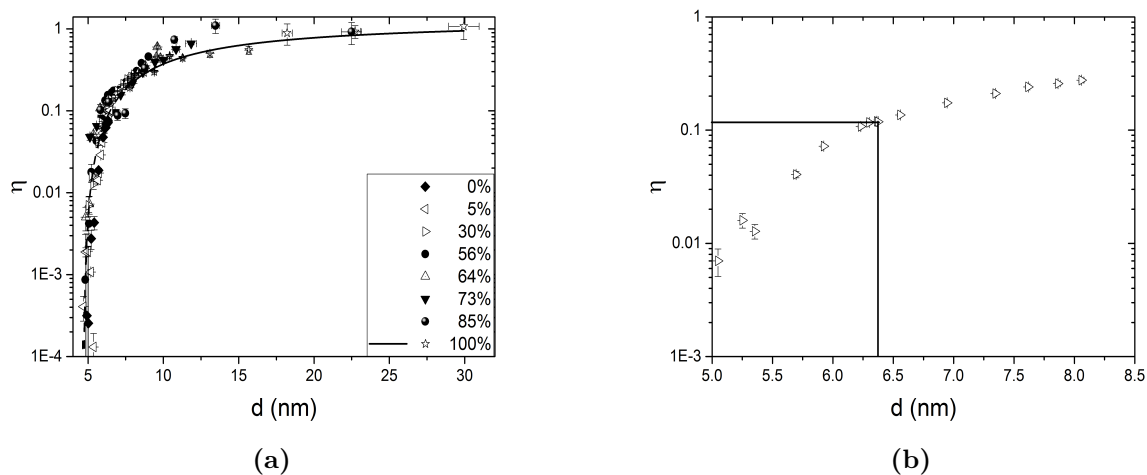


Figure 3.2.2 – Propriétés élastiques des empilements lamellaires « dilués » et « concentrés » pour les compositions de membrane mixtes. (a) Dépendance du paramètre de Caillé η avec l'hydratation du système et la teneur en co-tensioactif. La courbe représente l'ajustement par l'énergie libre des ondulations d'Helfrich appliqué aux bicouches de Simulsol [Ac. O, $n=6$], Figure 3.2.1, afin de démontrer une présence notable de ces ondulations au sein des empilements mixtes en composition. (b) Deux empilements lamellaires, aux propriétés élastiques différentes, illustrés par un exemple de bicouche composée à 30% en co-tensioactif. Les segments indiquent la transition de phase, relevée par la périodicité d_2 , entre l'empilement lamellaire « dilué » et l'empilement lamellaire « concentré ».

bicouches de Simulsol [Ac. O, n=6], soumises uniquement aux ondulations d'Helfrich, comme il est possible de le constater sur la Figure 3.2.2a. Ainsi, même si l'ajustement d'Helfrich semble pouvoir décrire grossièrement l'évolution du paramètre de Caillé pour les membranes mixtes, il n'en demeure pas moins qu'une distinction est notée, légèrement sensible à la teneur en co-tensioactif. La contribution attractive dans les interactions, résultant de l'apport en lécithine au sein de la bicouche, devient suffisamment conséquente pour modifier l'élasticité de l'empilement lamellaire, décrit par η , et le caractère « non lié » de l'empilement, à partir d'une teneur d'environ 30% en Lécithine (Section 3.1.3).

Sur la Figure 3.2.2b est donnée l'allure du paramètre de Caillé pour une composition de membrane (30% en teneur de co-tensioactif) représentative des empilements lamellaires « liés ». Une discrimination apparaît nettement dans les propriétés élastiques, déjà observée pour des systèmes similaires [42], entre l'empilement lamellaire « dilué » et l'empilement lamellaire « concentré », délimités par la périodicité de transition de phase d_2 . L'empilement lamellaire « dilué » se définit par un paramètre de Caillé de valeur assez élevée ($\eta \gtrsim 0.14$, pour chacune des compositions présentées) augmentant avec la distance membrane-membrane $d - \delta_m$ (confinement vertical) ou avec l'aire moléculaire moyenne à l'interface bicouche-eau Σ (confinement latéral), indiquant un empilement de bicouches flexible (puisque η est inversement proportionnel au produit des constante élastiques, $\eta \propto \frac{1}{\sqrt{K,B}}$). En revanche, l'empilement lamellaire « concentré » possède des valeurs plus faibles du paramètre de Caillé exposant un empilement lamellaire plus rigide qui le devient d'autant plus à mesure que le confinement vertical augmente (diminution de d), l'aire moléculaire Σ demeurant relativement constante (voir Figure 3.1.8a). Mais d'une manière générale, pour les deux empilements lamellaires, l'ajout de co-tensioactif entraîne une diminution du confinement vertical (augmentation de la période d'empilement d) et une augmentation du confinement latéral (diminution de Σ) accompagnées d'une augmentation de l'élasticité de l'empilement (augmentation de η).

Une première tentative pour adapter un modèle thermodynamique à la description de l'évolution du paramètre de Caillé pour l'empilement lamellaire « dilué » est effectuée [10]. Dans cette approche perturbative pour prendre en compte la contribution attractive aux interactions stériques, inspirée des travaux de Milner et Roux [99], le système « dilué » est correctement modélisé donnant notamment accès à la limite de dilution de chaque empilement lamellaire. Néanmoins, dans cette description thermodynamique de l'empilement lamellaire, les effets des interactions sur la loi de dilution sont négligés, en d'autres termes la variation de l'aire moléculaire Σ avec l'hydratation du système est négligée. Or, comme observé Figure 3.1.8a, ce modèle ne semble donc pas adapté. Il apparaît alors indispensable de considérer la thermodynamique de la bicouche ajoutée à la description thermodynamique de l'empilement lamellaire telles que présentées Section 1.3.6.

3.2.3 Modélisation thermodynamique d'empilements de bicouches mixtes

Afin de décrire les équations d'état de la bicouche et de l'empilement lamellaire, il convient de s'intéresser à la densité volumique de l'énergie libre d'excès f_{exc} comme définie à l'équation 1.3.30. L'équation d'état de l'empilement lamellaire est alors donnée par l'expression de la pression osmotique Π , équation 1.3.27, tandis que l'équation d'état de la bicouche s'obtient à partir de la loi de dilution en appliquant la relation 1.3.28 couplée à la définition géométrique 1.3.26, reliant les trois variables pertinentes de cette description d , Σ et ϕ_{lip} . Afin que les résultats expérimentaux et cette modélisation proposée correspondent, il convient de respecter ces deux équations simultanément.

Le paramètre de Caillé η se définit, d'une part, par l'équation 1.3.4 en faisant l'hypothèse que la rigidité de courbure k_c de la membrane est constante avec la teneur en eau du système, et d'autre part, à l'aide des relations combinées 1.3.2 et 1.3.3 donnant accès à une description du module de compressibilité à potentiel chimique constant telle que :

$$\bar{B} = d^2 \left[\frac{\partial^2 f_{exc}}{\partial d^2} - \frac{\left(\frac{\partial^2 f_{exc}}{\partial d \partial \phi_{lip}} \right)^2}{\frac{\partial^2 f_{exc}}{\partial \phi_{lip}^2}} \right] \quad (3.2.1)$$

Sur la Figure 3.2.3 sont présentés deux exemples de compositions de membrane concentrées en Simulsol [Ac. O, n=6] (73% et 63%), où le modèle est appliqué dans le but de caractériser thermodynamiquement l'empilement lamellaire. Pour ce faire, la méthode générale utilisée consiste à satisfaire plusieurs points.

Tout d'abord, dans la limite très faiblement hydratée, l'épaisseur de la bicouche δ_0 associée à l'état de densité maximale ($\phi_{lip}^{max} = 1$, d_{min}) du fluide bidimensionnel doit être définie. Pour ce faire, il convient d'adapter les valeurs de Σ_0 et de v de manière à ce que $\delta_0 = \frac{2v}{\Sigma_0}$ ajuste la valeur de l'épaisseur géométrique de la membrane $\delta_m^{géo} = d_{min} * \phi_{lip}^{max}$.

De même, l'extrémité opposée du régime d'hydratation de l'empilement lamellaire « lié » présente expérimentalement une limite de dilution d_{lim}^{exp} . Du point de vue de la thermodynamique (voir Section 1.3.6), cette limite de dilution théorique $d_{lim}^{théo}$ est atteinte dès lors que la pression osmotique Π s'annule. Concrètement, cela revient à ajuster les valeurs des différents paramètres afin de satisfaire l'égalité $d_{lim}^{théo} = d_{lim}^{exp}$.

Enfin, il n'est pas possible de découpler l'équation d'état de l'empilement lamellaire et l'équation d'état de la bicouche. Ainsi, pour chaque ajustement il est nécessaire d'ajuster simultanément l'épaisseur de la membrane $\delta_m^{géo}$ et le paramètre de Caillé η avec l'hydratation du système, tout en satisfaisant la loi de dilution, relation 1.3.28.

Ainsi, il est possible d'obtenir une description modélisée reproduisant la variation des différents paramètres physiques pour les membranes composées à 73% en teneur de co-tensioactif ($\delta_m^{géo}(d) = d * \phi_{lip}(d)$, Figure 3.2.3b, $\Pi(d)$, Figure 3.2.3d, et $\eta(d)$, Figure 3.2.3f) et à 63% ($\delta_m^{géo}(d) = d * \phi_{lip}(d)$, Figure 3.2.3a, $\Pi(d)$, Figure 3.2.3c, et $\eta(d)$, Figure 3.2.3e)

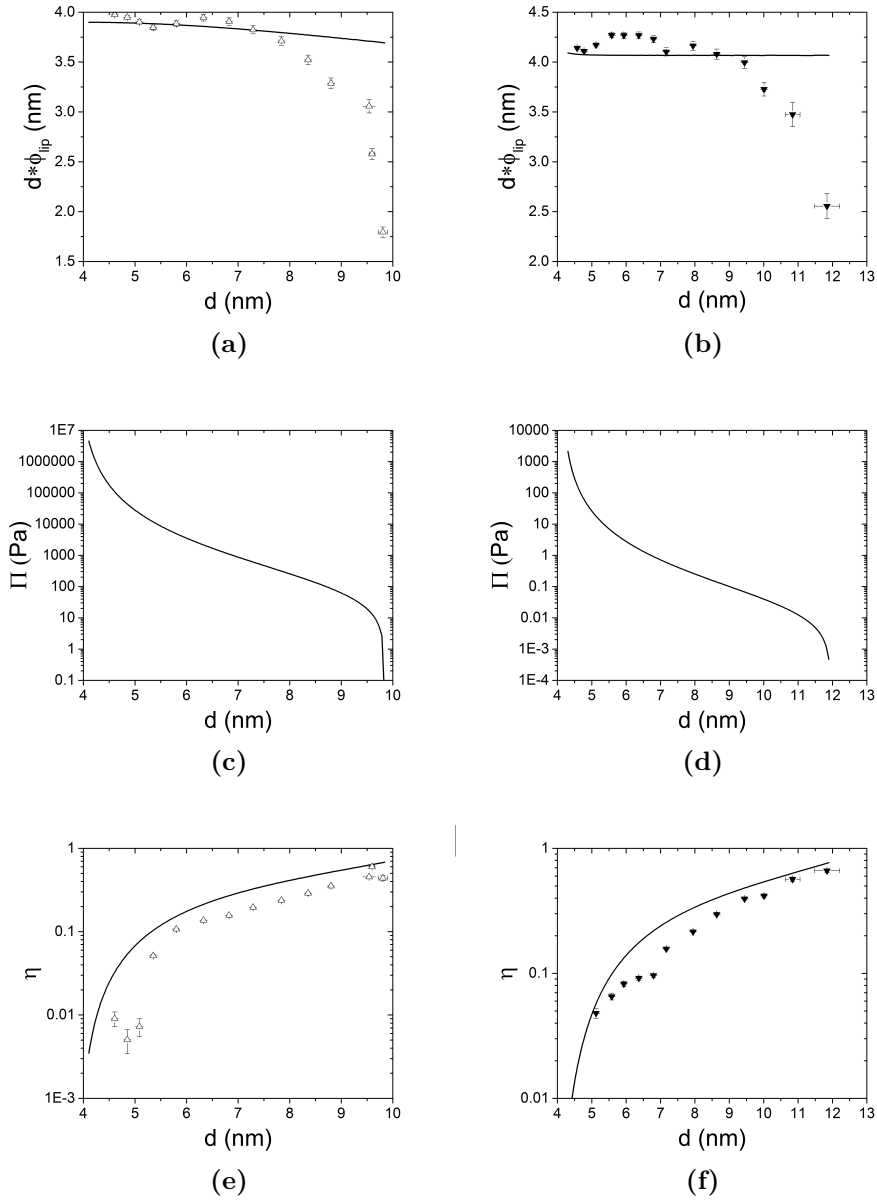


Figure 3.2.3 – Modélisation d'empilements de bicouches par une description thermodynamique de l'énergie libre d'excès f_{exc} du système. Bicouches en phase lamellaire composées à 63% en Simulsol [Ac. O, $n=6$] et à 73% caractérisées par l'énergie libre d'excès, équation 1.3.30, donnant accès, respectivement pour chaque bicouche, à l'épaisseur de membrane $\delta_m^{geo} = d_{eq} * \phi_{eq}$ [(a) et (b)], à la pression osmotique théorique [(c) et (d)] et au paramètre de Caillé η [(e) et (f)]. Les courbes illustrent l'application du modèle avec les paramètres suivants : $v = 1.04 \text{ nm}^3$ (dédit de la masse volumique), $\Sigma_0 = 0.53 \text{ nm}^2$, $k_c = 7.10^{-4} k_B T$, $b_2 = -4.7 \text{ nm}^2$ et $\chi = 20 \text{ nm}^{-3}$ pour la bicouche composée à 63% en Simulsol [Ac. O, $n=6$] et $v = 69 \text{ nm}^3$, $\Sigma_0 = 34 \text{ nm}^2$, $k_c = 1.5 k_B T$, $b_2 = -8.10^3 \text{ nm}^2$ et $\chi = 5,4.10^{-3} \text{ nm}^{-3}$ pour la bicouche composée à 73% en Simulsol [Ac. O, $n=6$].

de façon relativement satisfaisante. Néanmoins, certaines limites de ce cheminement sont constatées.

Des expériences de pressions osmotiques, telles que celles effectuées sur des systèmes proches et correctement décrites par ce modèle [122], manquent ici pour compléter notre analyse. De plus, on remarque que l'expansion de l'aire moléculaire moyenne, donnée par $\Sigma = \frac{2v}{d * \phi_{lip}}$, est trop restreinte par le modèle employé, plus particulièrement dans le domaine où l'hydratation est importante. Bien que le modèle paraisse assez complexe, il nécessite davantage d'optimisation pour parfaire la description de la déformation que subit la bicouche latéralement (variation de Σ). Enfin, cette comparaison, présentée Figure 3.2.3, est amenée afin d'illustrer une dépendance entre certains paramètres participant à la définition de l'énergie libre de l'empilement lamellaire. Ici, l'exemple choisi met en confrontation deux jeux de paramètres, d'ordre de grandeur complètement éloigné, entre le volume moléculaire v et la constante élastique de courbure de la membrane k_c pour décrire ces deux membranes suffisamment proches en composition, soit : $v = 1.04 \text{ nm}^3$, évalué grâce à la masse volumique mesurée du mélange Lécithine/Simulsol à 63% en co-tensioactif, et $k_c \sim 7.10^{-4} k_B T$ comparés à $k_c \sim 1.5 k_B T$, plus proche de valeurs communément mesurées pour des bicouches de lipides, et $v = 69 \text{ nm}^3$. Malgré ces différences de valeurs, pour ces deux paramètres notamment, le modèle semble décrire de la même manière les données expérimentales, même si cela reste illustré pour seulement deux empilements distincts en termes de composition.

En dépit de ces limites du modèle énumérées auparavant, il n'en demeure pas moins que le modèle prodigue des ajustements plutôt convenables auxquels s'ajoute une capacité de prédiction de décomposition spinodale. En effet, expérimentalement une transition de phase entre deux empilements de bicouches distincts est observé, voir Section 3.1.4. Il paraît donc important de pouvoir interpréter cette transition par une analyse thermodynamique. La décomposition spinodale s'effectue dès lors que le module de compressibilité à potentiel chimique \bar{B} devient négatif, dont une illustration est donnée sur la Figure 3.2.4, pour un jeu de paramètre *ad hoc*, avec ses conséquences sur les éléments physiques étudiés dans notre approche ($\delta_m^{géo}(d) = d * \phi_{lip}(d)$, Figure 3.2.4a, $\Pi(d)$, Figure 3.2.4b, et $\eta(d)$, Figure 3.2.4c). Afin de caractériser totalement ces systèmes lamellaires, il faudrait, en plus d'une meilleure définition de l'expansion de l'aire moléculaire, synchroniser une décomposition spinodale, prédite par le modèle, avec la transition de phase intervenant pour le couple de confinements vertical et latéral (d_2, Σ_{12}), dépendante de la densité de greffage en « copolymère », relevée à la Section 3.1.4.1.

3.2.4 Fluctuations de membranes composées de Lécithine

Comme discuté Section 3.1.2, la variation du confinement latéral est la plus intense pour des bicouches composées uniquement de Lécithine. Ainsi, à mesure que la teneur en co-tensioactif au sein de la lamelle diminue, il est encore plus difficile de comparer quantitativement l'analyse modélisée et les résultats expérimentaux, exposés Figure 3.2.5.

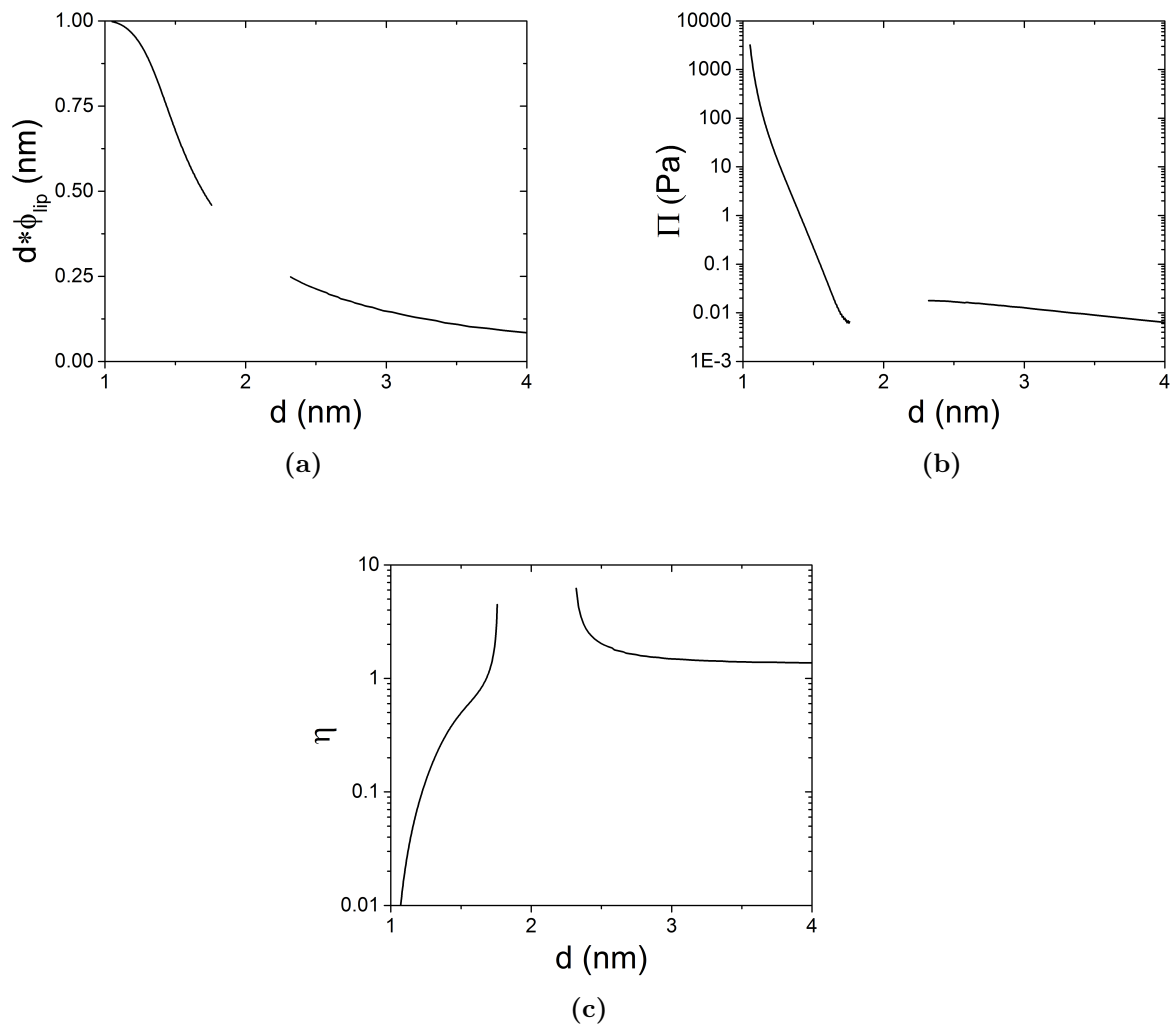


Figure 3.2.4 – Décomposition spinodale mise en évidence par le modèle thermodynamique employé. L'épaisseur de membrane $\delta_m^{géo} = d_{eq} * \phi_{eq}$ (a), la pression osmotique théorique Π (b) et le paramètre de Caillé η (c) illustrent une décomposition spinodale obtenue à partir de l'énergie libre d'excès, définie par l'équation 1.3.30, pour un jeu de paramètres ad hoc : $v = 1 \text{ nm}^3$, $\Sigma_0 = 2 \text{ nm}^2$, $k_c = k_B T$, $b_2 = -0.5 \text{ nm}^2$ et $\chi = 3 \text{ nm}^{-3}$.

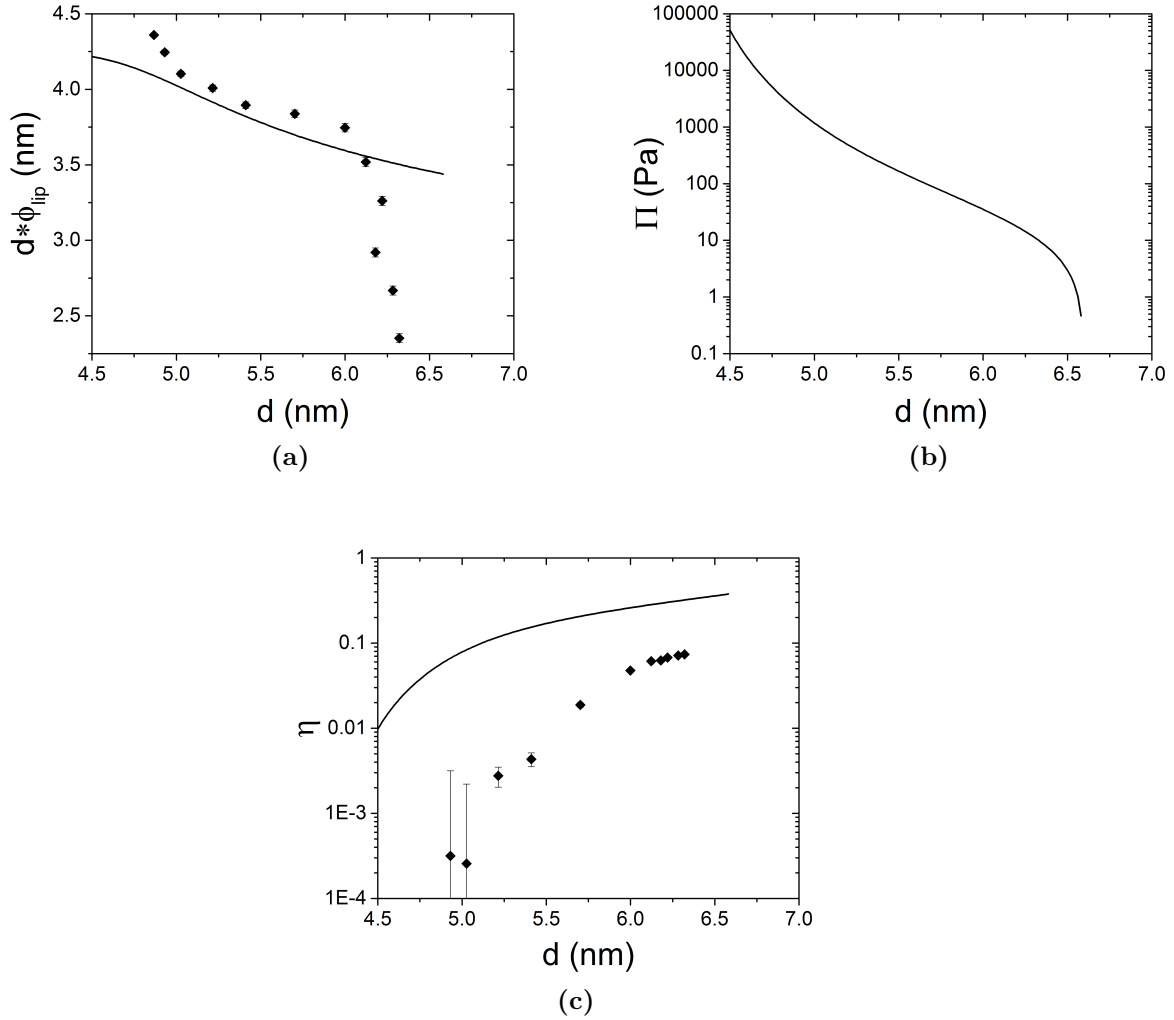


Figure 3.2.5 – Limite du modèle thermodynamique pour décrire les bicouches empilées de Lécithine. Tentative d'ajustement par le modèle, issu de la densité volumique de l'énergie libre d'excès f_{exc} qui est donnée par l'équation 1.3.30, de l'épaisseur de membrane $\delta_m^{geo} = d_{eq} * \phi_{eq}$ (a), de la pression osmotique théorique (b) et du paramètre de Caillé η (c). Les courbes représentent l'ajustement des variables physiques associé au jeu de paramètres suivant : $v = 1.29 \text{ nm}^3$ (dédié de la masse volumique), $\Sigma_0 = 0.61 \text{ nm}^2$, $k_c = 0.03 k_B T$, $b_2 = -5.3 \text{ nm}^2$ et $\chi = 1.8 \text{ nm}^{-3}$.

Le changement de régime d'hydratation, observé Figures 3.2.5a et commenté Section 3.1.2, semble, tout du moins en partie, directement responsable, d'une part, de la transition de phase entre les deux empilements lamellaire et d'autre part, de la difficulté de compréhension et de modélisation de la thermodynamique de ces auto-assemblages lamellaires sur toute la ligne de dilution. Ainsi, bien que le modèle utilisé soit, en apparence, adapté pour décrire les effets de transitions de décrochage [122] et plus particulièrement, pour décrire la variation de la pression osmotique au sein d'empilements de bicouches de Lécithine, il s'avère trop réduit pour aborder de manière raisonnable la dilatation latérale de la membrane.

3.3 Conclusion

Les effets de l'application d'un confinement de faible amplitude et des interactions stériques ont été étudiées sur des empilements lamellaires de bicouches « poilues » composées de mélanges Lécithine-Simulsol [Ac. O, n=6]. Par variation de l'hydratation et de la composition de la bicouche, les confinements vertical et latéral appliqués aux bicouches sont modulés. Ainsi, en plus de son rôle bien documenté d'augmenter la flexibilité membranaire, le co-tensioactif polymérique a aussi un impact conséquent sur les interactions inter- et intramembranaires de telle sorte que les effets de transition de décrochage sont observés. Le caractère « lié » ou « non lié » de l'empilement lamellaire semble alors défini par la compétition verticale entre les interactions attractives de van der Waals et les répulsions stériques couplées aux interactions latérales stabilisant l'auto-assemblage des molécules sous la forme de bicouche.

De plus, trois régimes d'hydratations, des têtes polaires principalement (groupe phosphate-choline pour la Lécithine et les groupements d'oxyde d'éthylène pour le Simulsol [Ac. O, n=6]), sont mis en évidence. Ces régimes d'hydratations diffèrent dans la capacité de la bicouche à faire face aux confinements vertical et latéral, ce qui est mis en avant par des variations, distinctes d'un régime à l'autre, de l'aire moléculaire moyenne à l'interface bicouche-eau Σ , de la périodicité lamellaire d et de l'épaisseur de membrane définie par contraste de densité électronique δ_m^e .

L'empilement lamellaire « dilué » subit un couplage fort entre les confinements vertical et latéral lorsque la teneur en eau du système est modifiée. Dans la limite extrêmement diluée, on remarque que les bicouches empilées, en fonction de leur teneur en co-tensioactif, peuvent être dans un état « lié » (teneur $\leq 70\%$) ou « non lié » (teneur $\geq 70\%$). Ainsi, les auto-assemblages « liés » présentent une limite de dilution, dépendante de la teneur en co-tensioactif et qui est caractérisée par les confinements (d_{lim}, Σ_{lim}) , à partir de laquelle une coexistence avec une phase purement constituée d'eau apparaît. Lorsque ce système se confine, un enchevêtrement vertical des chaînes éthoxylées entre deux membranes adjacentes a lieu, identifié par contraste de densité électronique, qui résulte en une réorganisation des molécules au sein de la membrane et donc en une transition structurale dans la conformation moléculaire des lipides et des « copolymères », soumise à la densité de greffage, pour un confinement critique (d_2, Σ_{12}) . Cette transition de conformation, liée à l'hydratation du système, s'apparente à la transition « brosse »-« champignon » observée pour des polymères greffés sur une surface et qui résulte du surplus d'énergie de compression présent dans la conformation « brosse ».

La réorganisation membranaire, non totalement comprise, prodigue à l'empilement lamellaire « concentré » des propriétés élastiques, mesurées par le paramètre de Caillé η [14] et variant avec la composition membranaire, distinctes de celles de l'empilement lamellaire « dilué ». De plus, un régime « intermédiaire » d'hydratation se définit, à cette transition, dans lequel seul l'ordre d'empilement varie ($\Sigma_{12} \sim \text{constante}$) pour une même

composition. Ce plateau de confinement latéral s'étend jusqu'à la limite concentrée de confinement (d_1, Σ_{12}) à partir de laquelle une seconde transition de phase est notée, mais seulement pour des compositions riches en Simulsol [Ac. O, n=6] ($\geq 70\%$).

Une coexistence de phase avec une phase de Simulsol hydraté est donc observée dans la limite fortement concentrée et qui se caractérise par un liquide de structure désorganisée, identifiée par la présence d'une bosse de diffusion aux rayons X plus ou moins large avec la quantité d'eau.

Afin d'appréhender la thermodynamique des systèmes lamellaires présentés, un modèle décrivant l'énergie libre d'excès f_{exc} , équation 1.3.30, est utilisé. Les bicouches empilées de Simulsol [Ac. O, n=6] correspondent alors à l'exemple adéquat d'auto-assemblages « non liés » soumis à une domination des interactions verticales d'origine stérique, les ondulations d'Helfrich [49]. Lorsque la Lécithine est ajoutée à la composition de la membrane, les composantes verticales attractives plus fortes qui en résulte sont considérées par une approche perturbative [99, 10] tandis que la variation de l'aire moléculaire Σ au sein de la bicouche est abordée par analogie avec le fluide bidimensionnel de van der Waals. Malgré un manque de techniques expérimentales complémentaires, telles que des mesures de pression osmotiques [122], le modèle utilisé semble demeurer pertinent pour décrire un faible couplage entre confinements vertical et latéral, l'élasticité de l'empilement de bicouches et une décomposition spinodale, primordiale pour prédire une transition de phase lamellaire-lamellaire. Néanmoins, il montre ses limites pour accéder à une description thermodynamique complète des bicouches empilées, associées à une variation significative du confinement latéral, lorsque celles-ci sont concentrées en Lécithine.

À travers l'étude approfondie de ces systèmes lamellaires, le rôle clé du co-tensioactif non-ionique, associé à un copolymère dibloc qui est greffé à la membrane, est mis en lumière pour moduler le confinement du système, l'élasticité des empilements de lamelles et de manière générale les interactions en présence. Il s'avère alors intéressant de porter de l'intérêt à ses propriétés particulières, de modifier les effets entropiques et interfaciaux au sein de l'empilement, par altération de ses compositions hydrophobe et/ou hydrophile comme cela est discuté au chapitre suivant.

« "You're a fool!"
Yes. But some day I hope to be
wise. » "

(Rollo Sigurdsson)

Chapitre 4

Physico-chimie de l'empilement lamellaire

L'ajout d'un co-tensioactif, à la composition des bicouches lipidiques empilées, autorise une modification contrôlée des interactions inter et intramembranaires, permettant ainsi la mise en évidence d'un riche diagramme de phase soumis à un confinement doux, imposé verticalement et/ou latéralement à la bicouche. À travers ce chapitre, le rôle prépondérant de ce co-tensioactif, qui s'apparente aux copolymères diblocs, est étudié, non plus seulement par la densité de greffage mais par sa nature chimique. Différents co-tensioactifs sont utilisés séparément dans la composition de la lamelle. Ils se distinguent alors par leur nombre d'atomes de carbone et par la présence d'une double liaison au sein de leur chaîne aliphatique et/ou par la longueur de leur chaîne éthoxylée. La nomenclature associée aux différents co-tensioactifs est expliquée à la Section 2.1.1, mais dans le but de simplifier la lecture, un résumé est brièvement donné : la partie hydrophobe se distingue en Acide Oléique [Ac. O] (C18 :1), Acide Stéarique [Ac. S](C18 :0) et Acide Laurique [Ac. L] (C12 :0) tandis que la longueur de la partie hydrophile est caractérisée par le nombre de groupements d'oxyde d'éthylène n . Ce faisant, l'enjeu est la caractérisation de la fluidité membranaire, de la flexibilité de l'empilement lamellaire et des effets polymériques incorporés au sein de cette compétition d'interactions qui régissent l'auto-assemblage et ses transitions de phase.

4.1 Effet de l'insaturation au sein de la bicouche

La présence d'une insaturation, telle qu'une double liaison, au sein de la chaîne carbonée de la molécule amphiphile lui procure, d'un point de vue géométrique, moins de degrés de liberté. L'insaturation possède alors un effet conséquent sur les interactions entropiques latérales intervenant au cœur de la bicouche. L'état de phase de la membrane, Section 1.2.3, son élasticité de courbure et celle d'étirement, Section 1.2.2.1, peuvent donc en être

sensiblement altérés [57]. La comparaison des propriétés de bicouches empilées, avec ou sans insaturation, est effectuée pour deux co-tensioactifs de longueur hydrophile distincte ($n=6$ et $n=15$) et ce pour différentes densités de greffage.

4.1.1 Etat de phase de la bicouche

L'ajout de Simulsol [Ac. S, $n=6$] à la composition de la bicouche, à la place du Simulsol [Ac. O, $n=6$] étudié au chapitre précédent, a un impact fort sur la structure interne de la bicouche. Sur la Figure 4.1.1, les diffractogrammes de diffusion de rayons X aux grands angles sont représentés pour deux bicouches composées d'un mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac. S, $n=6$], 30% en pourcentage molaire de co-tensioactif sur la Figure 4.1.1a et 70% sur la Figure 4.1.1b, pour différentes concentrations en solvant. La présence d'une bosse large aux alentours de $q \simeq 1.4 \text{ \AA}^{-1}$, caractéristique des chaînes aliphatiques à l'état fluide comme discuté au chapitre précédent, se retrouve sur ces diffractogrammes. En revanche, différents pics cristallins, mal définis, sont observés en plus de la bosse de diffusion, dont les principaux pics apparaissent aux vecteurs d'onde $q_1^{n=6} \simeq 1.43$, $q_2^{n=6} \simeq 1.48$, $q_3^{n=6} \simeq 1.55$ et $q_4^{n=6} \simeq 1.71$. La présence de ces pics dénote donc un état cristallisé de la bicouche apparaissant avec l'insertion de Simulsol [Ac. S, $n=6$]. Cet état cristallisé se conserve lorsque le confinement appliqué aux bicouches, vertical et latéral, est modifié par l'hydratation du système.

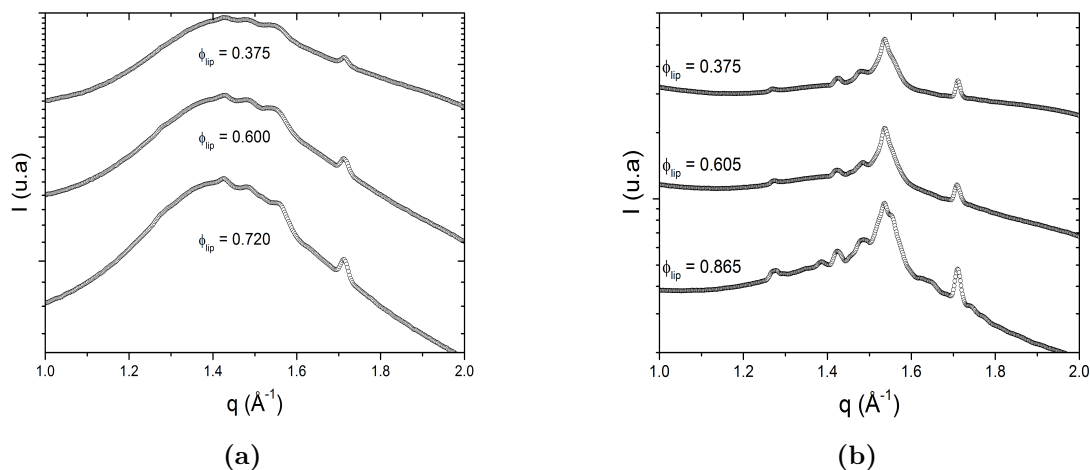


Figure 4.1.1 – Etat cristallisé de bicouches mixtes. Les diffractogrammes de diffusion de rayons X aux grands angles sont présentés pour des bicouches composées de mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac. S, $n=6$] (a) à 30%, en teneur molaire de co-tensioactif, (b) et à 70%. ϕ_{lip} définit la fraction volumique en lipides au sein de l'échantillon (Lécithine + Simulsol [Ac. S, $n=6$]).

Lorsque la densité de greffage en co-tensioactif est augmentée, les pics cristallins observés sont, d'une part, conservés et d'autre part, définis avec une meilleure résolution, pics auxquels s'ajoute l'apparition de quelques pics secondaires et la quasi disparition de la bosse de diffusion, Figure 4.1.1b. Cette comparaison souligne le fait que ce sont les chaînes carbonées du Simulsol [Ac. S, n=6] qui sont plus sujettes à définir un état cristallisé avec le changement de confinement, bien que l'interprétation se complique avec l'omniprésence supposée de coexistence de phases le long de la ligne de dilution de cette composition de bicouches, voir Section 4.1.3.1.

La structure interne de la bicouche ne résulte pas seulement des interactions entre les chaînes carbonées mais elle est aussi la conséquence des interactions entre les têtes polaires, qui sont latérales à la surface d'une même membrane ou bien verticales lorsqu'elles interviennent entre deux membranes adjacentes. En effet, lorsque la longueur de la chaîne de groupements éthylène oxyde est augmentée, Figure 4.1.2, l'état cristallisé de la bicouche est préservé, mais les distances moléculaires caractéristiques de la structure interne sont, elles, modifiées. Pour une même teneur en eau, de valeur assez élevée ($\phi_{lip} \simeq 0.250$), différents diffractogrammes de bicouches, de par la densité de greffage en Simulsol [Ac. S, n=15], sont comparés. On remarque l'apparition de trois principaux pics cristallins, notables à partir d'une teneur molaire de 26% en Simulsol [Ac. S, n=15] au sein de la bicouche, aux valeurs de vecteurs d'onde $q_1^{n=15} \simeq 1.38$, $q_2^{n=15} \simeq 1.54$, et $q_3^{n=15} \simeq 1.66$. Les deux bosses de diffusion sous-jacentes correspondent respectivement à la distance caractéristique des chaînes aliphatiques à l'état fluide et à la distance caractéristique des molécules d'eau à l'état liquide. Le nombre et les valeurs associés aux vecteurs d'onde différent de précédemment (pics où le nombre de groupements est $n = 6$), ce qui démontre une structure interne cristallisée mais différente, du fait non pas de la densité de greffage mais de la longueur hydrophile des « copolymères diblocs ». Les interactions polymériques, intervenant soit à la surface de la bicouche ou soit entre membranes adjacentes de la phase lamellaire, semblent donc responsables de ce changement de structure moléculaire au sein de la bicouche.

4.1.2 Faible densité de greffage en co-tensioactif

4.1.2.1 Membranes avec du Simulsol [Ac. S, n=6]

La présence de la double liaison n'a pas d'effets aussi directs sur les interactions entre membranes régissant le gonflement lamellaire qu'elle en a sur la structure interne de la bicouche. Néanmoins, tout comme la longueur hydrophile joue un rôle sur cette organisation moléculaire au sein de la lamelle, la partie hydrophobe tient son importance pour modifier les interactions à plus longue portée entre les membranes. Ainsi, il convient d'observer les confinements vertical et latéral appliqués aux bicouches empilées afin de mettre en évidence un possible effet de la présence de la double liaison sur le gonflement lamellaire, comme représenté sur la Figure 4.1.3a.

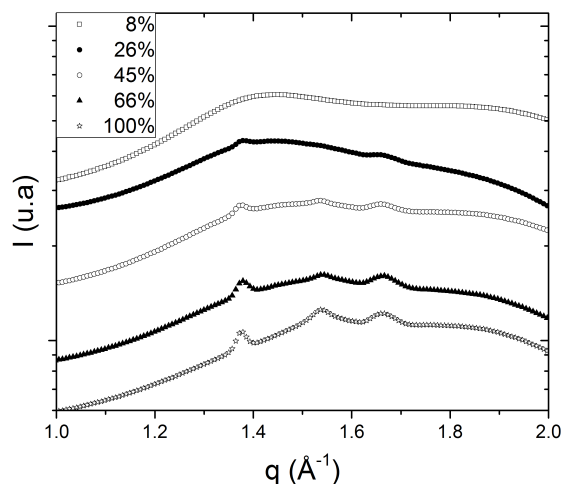


Figure 4.1.2 – Cristallisation de la bicouche pour de longs co-tensioactifs saturés introduits dans sa composition. Les diffractogrammes de diffusion de rayons X aux grands angles sont présentés pour des bicouches mixtes constituées de Lécithine et de Simulsol [Ac. S, $n=15$] pour différentes teneurs molaires en Simulsol. La fraction volumique en lipides étant fixée à $\phi_{lip} \simeq 0.25$.

Dans le domaine dilué, les membranes composées de Lécithine (70%) et de Simulsol [Ac. S, $n=6$] (30%) présentent un gonflement lamellaire, associé à un état « lié », similaire à celui observé au Chapitre 3 pour une même concentration au sein de la membrane avec du Simulsol [Ac. O, $n=6$]. À ceci près, l'intensité des interactions en est tout de même modifiée avec des confinements vertical (périodicité lamellaire) et latéral (aire moléculaire moyenne à l'interface bicouche-solvant) d'amplitude distincte. Le paramètre de Caillé, quantifiant l'élasticité de l'empilement lamellaire et donc de manière implicite les différentes interactions, demeure identique lorsqu'un même confinement latéral (même Σ) est appliqué aux membranes avec ou sans insaturation (il est par conséquent différent, d'après la Figure 4.1.3a, si la comparaison est effectuée pour un même confinement vertical), Figure 4.1.3b. En revanche, l'interprétation de ce paramètre, qui a pour but de discuter les effets sur les constantes élastiques, n'est pas similaire à celle déterminée pour des membranes à l'état fluide (équation 1.3.4) puisque ces membranes avec du Simulsol [Ac. S, $n=6$] sont désormais dans un état cristallisé, voir Section 2.4.2. Pour des membranes cristallisées, l'interprétation du paramètre de Caillé n'est donc pas valable. De plus, le comportement face au confinement latéral en est de même similaire pour l'épaisseur de bicouche δ_m^e obtenue par contraste de densité électronique (comparaison entre les Simulsols [Ac. O, $n=6$] et [Ac. S, $n=6$] non représentée), extraite elle aussi par le modèle utilisé (voir Section 2.4.2). La limite de dilution, c'est-à-dire la limite d'une coexistence entre l'empilement

lamellaire « dilué » et une phase purement constituée d'eau (voir Section 3.1.3), en est alors diminuée verticalement ($d_{lim}^{stéarique} < d_{lim}^{oléique}$). L'autre extrémité de confinement (d_2 , Σ_{12}) de cet empilement lamellaire « dilué » en est, elle, quasiment inchangée, voir Section 3.1.4. La transition de phase entre l'empilement lamellaire « concentré » et l'empilement lamellaire « dilué » ne semble donc pas affectée par cette double liaison, pour une faible densité de greffage en co-tensioactif.

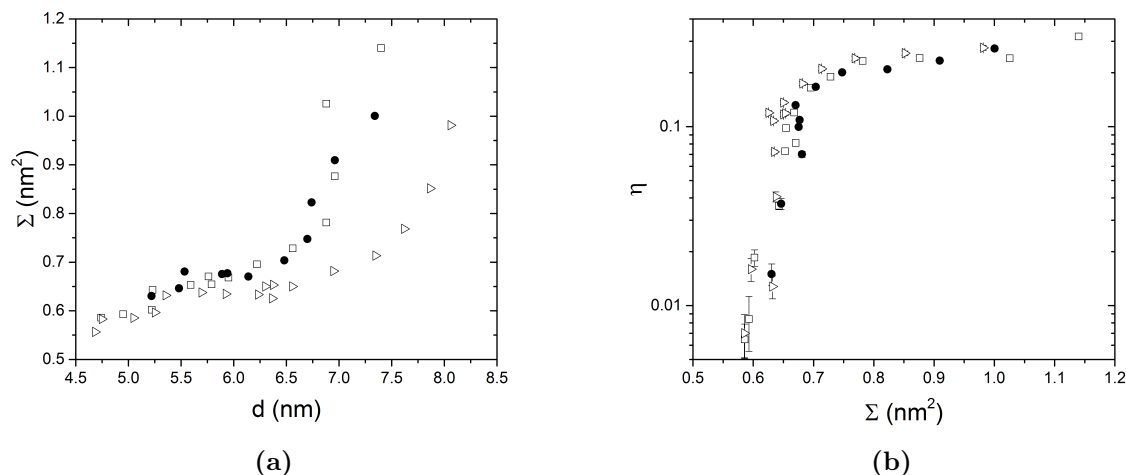


Figure 4.1.3 – Effet de la composition hydrophobe de co-tensioactifs courts greffés sur des bicouches empilées en faible concentration. (a) Confinement appliqué aux bicouches représenté par l'aire moléculaire moyenne Σ , dans la direction latérale au plan de la lamelle, et par une périodicité lamellaire d , dans la direction verticale. (b) Élasticité de l'empilement lamellaire, sondé par le paramètre de Caillé η (voir Section 1.3.1), en fonction du confinement latéral. Les bicouches sont composées d'un mélange de Lécithine ($\sim 70\%$) et de Simulsol ($\sim 30\%$) : (●) Simulsol [Ac. S, $n=6$], (□) Simulsol [Ac. L, $n=6$] et (▷) [Ac. O, $n=6$].

Le domaine d'hydratation intermédiaire, autrement dit le plateau de confinement latéral de l'empilement lamellaire « concentré », d'après la Figure 4.1.3a, se retrouve aussi avec cette composition de membrane sans insaturation. Il ne paraît alors que peu altéré, avec une aire moléculaire Σ légèrement supérieure à celle obtenue pour le mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac. O, $n=6$] et des limites de confinement vertical (d_1 , pour la plus concentrée et d_2 , pour la plus diluée) identiques. L'élasticité de l'empilement lamellaire « concentré » demeure similaire avec ou sans insaturation par comparaison naïve avec le paramètre de Caillé, Figure 4.1.3b.

Le domaine le plus confiné est celui qui admet le plus de changements avec l'apparition, sur la Figure 4.1.5, d'une coexistence de structure entre l'empilement lamellaire « concentré » et un second empilement lamellaire dit « cristallisé » (car défini seulement pour des membranes avec du Simulsol [Ac. S, $n=6$] ou du Simulsol [Ac. S, $n=15$] dont l'état de

phase est cristallisé, voir Section 4.1.1) pour un confinement proche de la limite confinée du plateau (d_1, Σ_{12}), discuté Section 3.1.4.1. Ces bicouches empilées, distinctes de la phase de Simulsol hydraté qui est identifiée pour une forte teneur en Simulsol [Ac. O, n=6] et pour un confinement similaire, Section 3.1.5.1, sont définies par un ordre d'empilement lamellaire plus élevé, en d'autres termes un confinement vertical plus faible. Bien que son étude nécessite plus d'approfondissement, différentes hypothèses peuvent s'envisager comme l'apparition d'une nouvelle phase lamellaire aux propriétés différentes ou bien une nouvelle organisation de bicouches mais d'orientation distincte, suggérée par la biréfringence apparaissant structurée qui est observée en microscopie à lumière polarisée (non représentée).

4.1.2.2 Membranes avec du Simulsol [Ac. S, n=15]

Dans le cadre de co-tensioactifs, dont la partie hydrophile est plus longue (Simulsol [Ac. S, n=15]), un comportement manifestement différent est observé. Une coexistence de phase entre l'empilement lamellaire « dilué » et l'empilement lamellaire « concentré » est mise en évidence, Figure 4.1.4a. Cet effet de la longueur des chaînes éthoxylées est discuté à la Section 4.3 pour des membranes fluides, l'intérêt se portant ici sur le rôle de la double liaison exclusivement. Ainsi, on dénote que le gonflement lamellaire n'apparaît que peu modifié par la présence de l'insaturation pour une faible densité de greffage en longs co-tensioactifs, que cela soit pour la dilution de l'empilement lamellaire du domaine « dilué » ou par la coexistence de phase dans le régime plus confiné (apparaissant à partir de $\phi_{lip}^{totale} \simeq 0.6 - 0.65$; concentration volumique totale des deux empilements lamellaires). L'aire moléculaire moyenne à l'interface bicouche-eau Σ et la périodicité lamellaire d présentent une évolution, couplée à la densité de greffage, commune à toutes les membranes (de même teneur molaire en co-tensioactifs), malgré une composition hydrophobe distincte par le caractère saturé (ou insaturé) ou par la longueur de la chaîne carbonée du co-tensioactif greffé. Néanmoins, une modification de ce couplage, entre les confinements latéral et vertical, apparaît vers une teneur en Simulsol se situant entre 20% et 50% (commune à chaque composition différente par la chaîne aliphatique du Simulsol), signe d'une variation des interactions inter et intramembranaires.

L'élasticité de l'empilement lamellaire, illustrée par le paramètre de Caillé (non représenté), et l'épaisseur de la bicouche δ_m^e , représentée sur la Figure 4.1.4b, apparaissent, de même, manifestement inchangées pour une faible teneur en co-tensioactif, malgré la variation du confinement des bicouches. La longueur de la chaîne éthoxylée (15-16 groupements) semble donc être le paramètre physique contrôlant en majeure partie le gonflement lamellaire et la coexistence de phase dans ces conditions de faible densité de greffage, même lorsque celle-ci est légèrement variée comme cela est montré sur la Figure 4.2.2a pour des bicouches de Lécithine et de Simulsol [Ac. S, n=15] (45%).

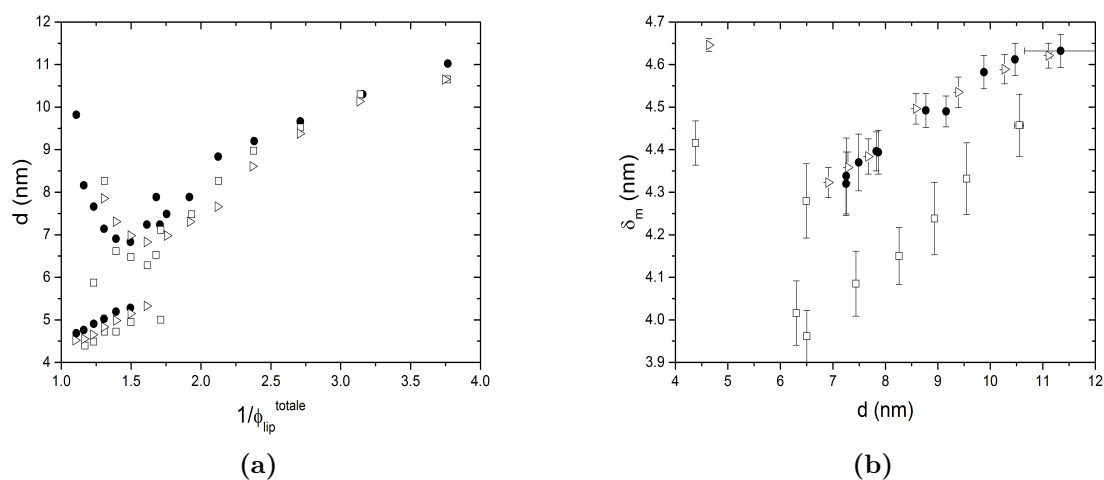


Figure 4.1.4 – Effet de la composition hydrophobe de longs co-tensioactifs polymériques greffés à la membrane en faible concentration. (a) Loi de dilution des empilements lamellaires caractérisés par une périodicité lamellaire d et une fraction volumique en lipides ϕ_{lip}^{totale} , comprenant la somme des fractions en lipides de chaque empilement s'il y a coexistence. (b) Epaisseur de la membrane δ_m^e obtenue par contraste de densité électronique (voir Section 2.4.2) exposée face au confinement vertical qui lui est appliqué. Les bicouches sont composées d'un mélange de Lécithine ($\sim 70\%$) et de Simulsol ($\sim 30\%$) : (●) Simulsol [Ac. S, $n=15$], (□) Simulsol [Ac. L, $n=15$] et (▷) [Ac. O, $n=16$].

4.1.3 Haute densité de greffage en co-tensioactifs

4.1.3.1 Membranes avec du Simulsol [Ac. S, n=6]

Une différence notable sur le diagramme de phase apparaît lorsque la densité de greffage en Simulsol [Ac. S, n=6] est fortement augmentée (de 30% à 70% en pourcentage molaire), Figure 4.1.5. Le domaine lamellaire monophasique est, en effet, perdu lorsqu'il n'y a pas suffisamment d'insaturations ou de doubles chaînes carbonées au sein de la bicouche, qui devient alors très cristallisée (voir Figure 4.1.1b). Dans le domaine peu hydraté, la coexistence entre l'empilement lamellaire « concentré » et l'empilement lamellaire « cristallisé », discutée Section 4.1.2.1, semble quasi indépendante de la teneur en co-tensioactif et est toujours délimitée par un même confinement ($d_1 \sim 5.5 \text{ nm}$, pour l'empilement lamellaire « concentré »).

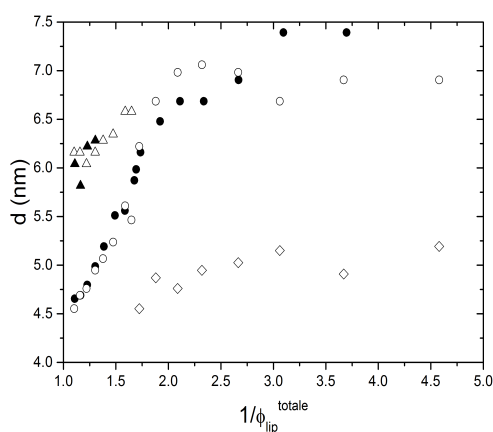


Figure 4.1.5 – Lois de dilution de bicouches empilées composées de mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac. S, n=6]. Chaque empilement est caractérisé par une périodicité lamellaire d et par une fraction volumique totale en lipides ϕ_{lip}^{totale} , comprenant la somme des fractions en lipides dans chaque empilement s'il y a coexistence. (●) Empilement lamellaire constitué de Lécithine ($\sim 70\%$) et de Simulsol [Ac. S, n=6] ($\sim 30\%$) qui est en coexistence dans le domaine faiblement hydraté avec (▲) un empilement lamellaire dit « cristallisé ». (○) Empilement lamellaire constitué de Lécithine ($\sim 30\%$) et de Simulsol [Ac. S, n=6] ($\sim 70\%$) en coexistence, dans le domaine faiblement hydraté, avec (Δ) un empilement lamellaire « cristallisé » et dans le régime dilué, avec (◇) une structure définie par une bosse par diffusion de rayons X.

Dans le domaine plus dilué, les diffractogrammes obtenus par diffusion de rayons X aux petits angles présentent une bosse diffuse mal définie en plus des deux ou trois ordres de Bragg de la phase lamellaire (non représentés). Une faible distance, caractéristique de la position de la bosse, est affichée sur la Figure 4.1.5 (obtenue *via* la relation de Bragg). Un

important écart est souligné entre la périodicité de l'empilement lamellaire et la distance associée *via* la position de la bosse à la structure sous-jacente avec laquelle la phase lamellaire coexiste. Bien entendu, la caractérisation de la structure révélée par cette bosse demande une étude plus approfondie puisque les hypothèses peuvent être nombreuses pour expliquer son apparition telles qu'une ondulation de la membrane dans le plan latéral aux bicouches (on ne verrait alors qu'un ordre supérieur dans la gamme de vecteurs d'onde observée d'après la relation 1.3.22). Néanmoins, si l'attention se porte désormais uniquement sur la phase lamellaire, un arrêt du gonflement lamellaire est remarqué dès une faible concentration ($\phi_{lip} \simeq 0.5$, $d_{lim} \simeq 7\text{ nm}$), bien que les échantillons paraissent macroscopiquement et microscopiquement homogènes (pas de présence d'eau en excès). Il est alors possible qu'une sorte de gonflement lamellaire s'effectue mais uniquement dans la direction latérale. Cette hypothèse implique donc un gonflement lamellaire opposé à celui des bicouches de Lécithine et de Simulsol [Ac. O, n=6] à une même teneur, Figure 3.1.8a, qui tend vers un état « non lié » et donc admet une plus grande variation du confinement vertical devant celle du confinement latéral. Mais cette présomption est biaisée par la coexistence de phase qui complique l'analyse de cette région d'hydratation pour ce système.

4.1.3.2 Membranes avec du Simulsol [Ac. S, n=15]

Les membranes empilées contenant peu de longs co-tensioactifs saturés, décrites Section 4.1.2.2, présentent un comportement lamellaire similaire à celles composées par des co-tensioactifs insaturés, mais il en est autrement lorsque la densité de greffage est accrue. Les systèmes composés de polymères plus longs se voient être plus complexes et laissent apparaître un infléchissement, donc une transition, dans la mise en jeu des différentes interactions régissant l'auto-assemblage (transition entre 20% et 50% en Simulsol, voir Figure 4.2.3). Néanmoins, ce changement, lié à la densité de greffage et à la longueur hydrophile, semble s'effectuer différemment selon la composition hydrophobe de la membrane. On remarque, en effet, que les systèmes chargés en Simulsol [Ac. S, n=15] dans le régime dilué ne se comportent pas de manière classique, lorsque la densité de greffage est modifiée, face aux confinements vertical et latéral qui leur sont appliqués, Figure 4.2.3a. Le gonflement lamellaire se voit alors restreint verticalement ce qui diffère de celui observé pour les autres types de membranes constituées de co-tensioactifs distincts par leur composition hydrophobe (Simulsol [Ac. O, n=16] ou Simulsol [Ac. L, n=15]), Figure 4.2.3. Ce changement de gonflement lamellaire est observé, de manière plus conséquente, à partir d'une teneur molaire en Simulsol [Ac. S, n=15] d'environ 70%. Il paraît alors nécessaire de comparer ces deux gonflements lamellaires selon l'hydratation du système qui participe à la modification du confinement imposé.

Le régime très confiné, Figure 4.1.6a, présente pour sa part, une similitude entre les membranes saturées et insaturées avec la coexistence, sur un domaine très restreint, entre un empilement lamellaire « concentré » et un empilement lamellaire « dilué » telle qu'ob-

servée pour une plus faible teneur en co-tensioactif, Figure 4.1.4a. À ceci près, l'empilement lamellaire constitué du Simulsol [Ac. S, $n=15$] présente, pour une concentration légèrement plus faible, une coexistence présumée avec une phase de Simulsol hydraté, illustrée par une bosse de diffusion bien définie (Figure 4.1.6a), similaire à celle décrite à la Section 3.1.5.1.

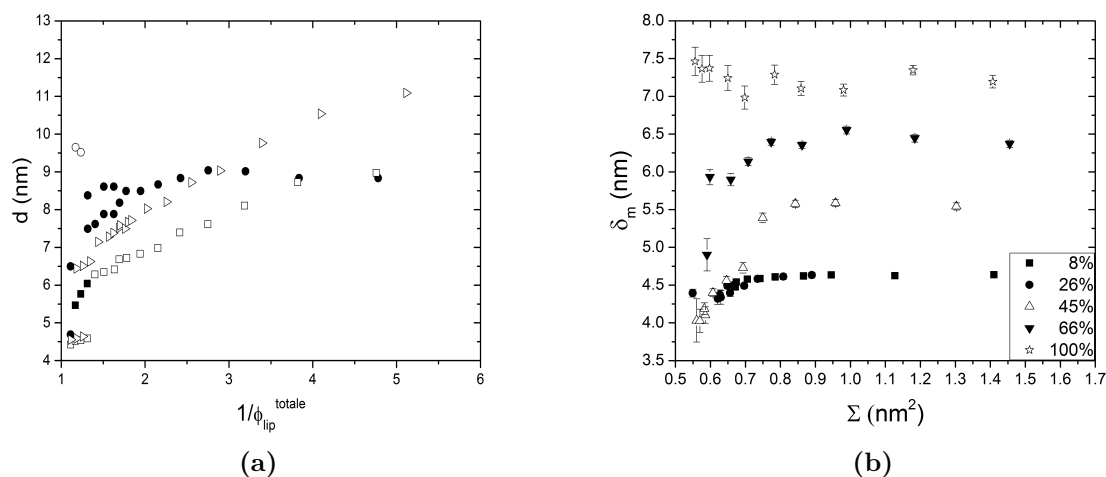


Figure 4.1.6 – Transition dans le gonflement lamellaire de bicouches empilées constituées de Lécithine et d'une forte concentration de longs co-tensioactifs. (a) Lois de dilution, marquées par la périodicité de l'empilement d et par une fraction volumique en lipides ϕ_{lip}^{totale} , comprenant la somme des fractions en lipides de chaque empilement s'il y a coexistence. Les bicouches sont à $\sim 70\%$ constituées de co-tensioactifs. (●) Empilement(s) lamellaire(s) avec du Simulsol [Ac. S, $n=15$] qui peut être en coexistence avec (○) une phase de Simulsol [Ac. S, $n=15$] hydraté. (□) Empilement lamellaire avec du Simulsol [Ac. L, $n=15$] qui peut être en coexistence avec (■) une phase de Simulsol [Ac. L, $n=15$] hydraté. (▷) Empilement(s) lamellaire(s) avec du Simulsol [Ac. O, $n=16$]. (b) Epaisseur de bicouche δ_m obtenue par contraste de densité électronique (voir Section 2.4.2) représentée en fonction du confinement latéral, relevé par une aire moléculaire moyenne Σ , pour différentes teneurs molaires en co-tensioactifs.

Lorsque l'hydratation du système augmente, la coexistence de phase entre les deux empilements lamellaires semble disparaître pour ne laisser entrevoir que l'empilement lamellaire « dilué », pour des membranes composées à 70% de Simulsol [Ac. O, $n=16$]. En revanche, pour des bicouches composées à 70% de Simulsol [Ac. S, $n=15$], une nouvelle coexistence a lieu entre l'empilement lamellaire « dilué » et ce qui s'apparenterait à l'empilement lamellaire « cristallisé », déterminé précédemment pour des bicouches contenant du co-tensioactif polymérique dont la longueur hydrophile est moins longue, Section 4.1.3.1.

Dans le régime le plus dilué, deux empilements lamellaires s'opposent lors de la com-

paraison entre les deux variétés de membranes composées par des Simulsols saturé ou insaturé. En effet, tout comme exposé précédemment, Section 4.1.3.1, l'empilement lamellaire « dilué » contenant du Simulsol [Ac. S, n=15] ne gonfle quasiment plus dans la direction verticale aux bicouches ($d \sim \text{constante}$) pour une concentration ($\phi_{lip} \sim 0.4$) ne correspondant pas à sa limite de dilution en ce sens où il ne semble pas y avoir de phase d'eau pure en excès qui soit observée macroscopiquement ou bien microscopiquement. L'hypothèse précédente selon laquelle une extension latérale continuerait de s'effectuer demeure alors plausible.

Le fort changement observé dans le gonflement lamellaire de bicouches composées de Simulsol [Ac. S, n=15], mais de densité de greffage distincte, semble corrélé à une modification de l'hydratation de la membrane. Alors que l'épaisseur de la bicouche δ_m^e , obtenue par contraste de densité électronique, demeure identique pour une faible teneur en co-tensioactif ($\%_{Simulsol} \leq 26\%$), Figure 4.1.6b, une importante extension de l'épaisseur δ_m^e (de $\delta_m^e \simeq 4.5 \text{ nm}$ à $\delta_m^e \simeq 7.3 \text{ nm}$, pour une bicouche purement constituée de Simulsol [Ac. S, n=15]) est observée à mesure que le pourcentage molaire en co-tensioactifs augmente. Une transition dans l'organisation moléculaire au sein de la bicouche a lieu par ce changement de densité de greffage, n'affectant que modestement le paramètre de Caillé et donc l'élasticité de l'empilement lamellaire (non représenté), lorsque le confinement ou l'hydratation du système est modifié.

4.2 Effet de la longueur de la chaîne aliphatique

Ces différents empilements lamellaires ou phases observés selon les domaines d'hydratation, en plus de la cristallisation de la membrane, illustrent l'impact fort que possède la présence, ou non, de la double liaison au sein de la bicouche. Le cœur hydrophobe tient donc toute son importance sur les interactions, dépendantes du confinement, qui gouvernent le gonflement de l'empilement lamellaire. Dans cette optique d'étude, une autre manière relativement simple d'influer sur la composition non polaire est de sonder les effets de la longueur de la chaîne carbonée. Ainsi, deux « copolymères diblocs » saturés, de longueur de chaîne aliphatique plus courte et de longueur hydrophile distincte, sont introduits à la composition membranaire lipidique, pour différentes densités de greffage, afin de comparer les propriétés des auto-assemblages formés à ceux des membranes précédemment étudiées.

4.2.1 Membranes avec du Simulsol [Ac. L, n=6]

Lorsque la longueur de la chaîne carbonée saturée est diminuée, la cristallisation de la membrane, auparavant observée pour des bicouches lipidiques mixtes composées de Simulsol [Ac. S, n=6] ou de Simulsol [Ac. S, n=15] (Section 4.1.1), disparaît. Un état de phase fluide de la bicouche, tout comme celui démontré pour les bicouches composées de

Lécithine et/ou de Simulsol [Ac. O, n=6], est alors retrouvé grâce à cette diminution de la longueur hydrophobe du co-tensioactif.

Pour des petits co-tensioactifs, le gonflement lamellaire de telles bicouches, exposé Figure 4.2.1a pour différentes compositions membranaires, adopte un comportement similaire à celui des lamelles constituées de Lécithine et de co-tensioactifs, insaturés et de longueur de queue hydrophobe plus longue (Simulsol [Ac. O, n=6]), qui est décrit sur la Figure 3.1.7. Tout comme à la Section 3.1.4.1, trois régimes d'hydratation se démarquent pour ces compositions de membranes, Figure 4.1.3a, se délimitant par les mêmes confinements critiques, illustrés sur la Figure 3.1.8b. De plus, on identifie une transition de décrochage, apparaissant avec la variation de la teneur en Simulsol [Ac. L, n=6], entre un état « lié » (teneurs molaires en co-tensioactif de 30% et de 70%) qui atteint donc une limite de dilution et un état « non lié » (100% de Simulsol [Ac. L, n=6]) qui semble gonfler « indéfiniment ». Ainsi, cet empilement lamellaire « non lié » présente, lui aussi (Section 3.1.5.1), une transition de phase avec une phase de Simulsol hydraté dans le régime confiné ($\phi_{lip} \simeq 0.7$) marquée par la présence d'une bosse de diffusion aux rayons X.

Lorsqu'une comparaison quantitative est effectuée, Figure 4.1.3a, un sensible écart, entre les deux types de co-tensioactifs utilisés, est noté dans le couplage entre les confinements latéral (Σ) et vertical (d) auxquels est soumis le gonflement lamellaire, spécifiquement dans le domaine d'hydratation dilué. Cet écart est alors identique à celui observé pour des membranes cristallisées par la présence du Simulsol [Ac. S, n=6] pour une teneur molaire de 30%. Néanmoins, à mesure que la concentration membranaire en co-tensioactifs diminue, la différence de confinements (donnés par les valeurs de Σ et de d) s'atténue, malgré un volume moléculaire moyen qui demeure lui différent (comprenant le volume de la molécule de Lécithine et celui du co-tensioactif, affectés de leur teneur respective au sein de la bicouche).

Une légère différence dans la valeur de l'épaisseur de bicouche décrite géométriquement, équation 1.1.2, apparaît entre les deux empilements lamellaires constitués exclusivement de Simulsol [Ac. O, n=6] ($\delta_m^{geo} = 4.3 \text{ nm}$ soit $\Sigma_{moyen} = 0.35 \text{ nm}^2$) ou de Simulsol [Ac. L, n=6] ($\delta_m^{geo} = 5.0 \text{ nm}$ et $\Sigma_{moyen} = 0.36 \text{ nm}^2$, Figure 3.1.2a) qui résulte de l'écart entre les volumes moléculaires des co-tensioactifs (les aires moléculaires Σ et les ordres d'empilements d demeurant similaires). Ce même décalage, en valeur relative, se retrouve dans l'amplitude des épaisseurs de bicouches δ_m^e évaluées par contraste de densité électronique, pour chacune des compositions mixtes, dont la variation est quasiment identique suivant les confinements latéral ou vertical appliqués aux bicouches (non représentées mais analogue qualitativement, dans le domaine dilué, à celles représentées sur la Figure 4.1.4b pour des co-tensioactifs plus longs).

Enfin, l'élasticité de l'empilement de bicouches mixtes composées de Simulsol [Ac. L, n=6], relevée par le paramètre de Caillé (Figure 4.2.1b), s'aligne sur le comportement élastique des bicouches mixtes constituées de Simulsol [Ac. O, n=6], Figure 3.2.2a. En

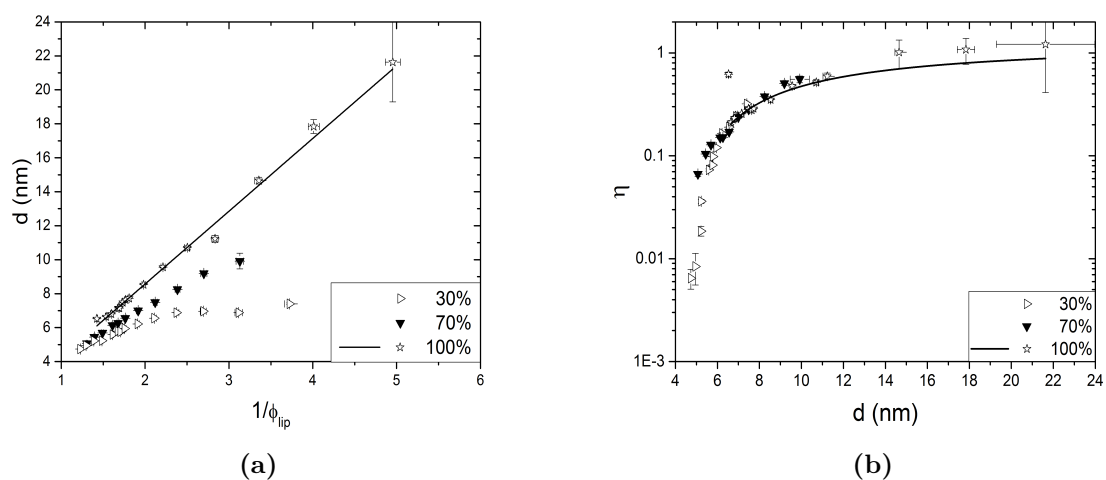


Figure 4.2.1 – Caractérisation d’empilements lamellaires composés d’un mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac. 0, $n=6$]. (a) Lois de gonflement lamellaire de bicouche constituées par différentes teneurs molaires en co-tensioactif. d représente la période d’empilement tandis que ϕ_{lip} représente la fraction volumique en lipides. La droite représente un ajustement par la relation géométrique 1.1.2, donnant accès à une épaisseur de bicouche $\delta_m^{geo} = 4.3$ nm. (b) L’élasticité de l’empilement lamellaire, relevé par le paramètre de Caillé η (voir Section 1.3.1) est affichée face au confinement vertical pour différentes densité de greffage en co-tensioactifs polymériques. La courbe d’ajustement est obtenue via l’équation 1.3.25, donnant accès à une épaisseur de membrane $\delta_m^\eta = 4.05$ nm.

effet, le paramètre de Caillé présente deux évolutions distinctes, qui ne semblent que légèrement modifiées par la variation de densité de greffage, à mesure que le confinement vertical diminue, caractérisant de ce fait la transition de phase entre les deux empilements lamellaires « concentré » et « dilué ». Cette concordance manifeste, entre les empilements différents de par les co-tensioactifs utilisés, est renforcée par la comparaison plus fine réalisée sur la Figure 4.1.3b. L'organisation des bicouches purement constituées de Simulsol [Ac. L, n=6] est alors thermodynamiquement décrite par une prédominance des ondulations d'Helfrich (Figure 4.2.1b), comme l'est décrite l'organisation des bicouches empilées de Simulsol [Ac. O, n=6] (Figure 3.2.1), associées alors à une épaisseur de bicouche δ_m^η extraite légèrement plus faible ($\delta_m^\eta = 4.05 \text{ nm}$ pour du Simulsol [Ac. L, n=6] et $\delta_m^\eta = 4.7 \text{ nm}$ pour du Simulsol [Ac. O, n=6]).

4.2.2 Membranes avec du Simulsol [Ac. L, n=15]

Si la longueur de la chaîne éthoxylée du « copolymère » (saturé et avec une chaîne carbonée courte) est désormais augmentée, la fluidité de la membrane demeure conservée sur tout le domaine de confinement imposé, par la variation de la densité de greffage et de l'hydratation du système. Bien qu'aucun changement ne soit noté sur la structure intramembranaire par l'altération du confinement, la structure de l'empilement en est, elle, dépendante. Pour une faible teneur en co-tensioactif ($\leq 30\%$), une coexistence de phases dans le domaine peu hydraté entre l'empilement lamellaire « concentré » et l'empilement lamellaire « dilué » est mise en évidence, Figure 4.2.2b. Cette coexistence de phases et la dilution de l'empilement lamellaire « dilué » semblent, curieusement, en tout point similaire, pour une même composition en Simulsol (30%), à celles relevées pour des co-tensioactifs dont la partie non polaire est plus longue et insaturée, Figure 4.1.4a. Dans le domaine monophasique lamellaire, l'élasticité de l'empilement de bicouches suit une même évolution indépendamment de la composition hydrophobe du Simulsol ajouté (non représentée). De même, l'épaisseur de membrane δ_m^e obtenue par contraste de densité électronique avec le solvant, Figure 4.1.4b, possède une même évolution en fonction du confinement qui lui est appliqué, où seul un écart constant entre les épaisseurs est indiqué, résultant de l'inégalité des volumes moléculaires.

D'une manière générale, lorsque la densité de greffage est variée, l'empilement lamellaire adopte un même comportement face au confinement que cela soit pour le Simulsol [Ac. L, n=15], Figure 4.2.3b, ou pour le Simulsol [Ac. O, n=16], Figure 4.2.3c. Seul le domaine de variation du confinement vertical appliqué à l'empilement, pour une même teneur concentrée en co-tensioactif, paraît modifié. La diminution de la longueur de la chaîne carbonée compense, notamment en rendant une fluidité à la membrane, l'influence de la perte de la double liaison sur le gonflement lamellaire de l'empilement des bicouches, Figure 4.2.3a.

Quelques différences sont néanmoins observées sur le diagramme de phase, Figure 4.1.6a, pour une concentration enrichie en Simulsol ($\geq 45\%$). Dans le domaine confiné, on dénote,

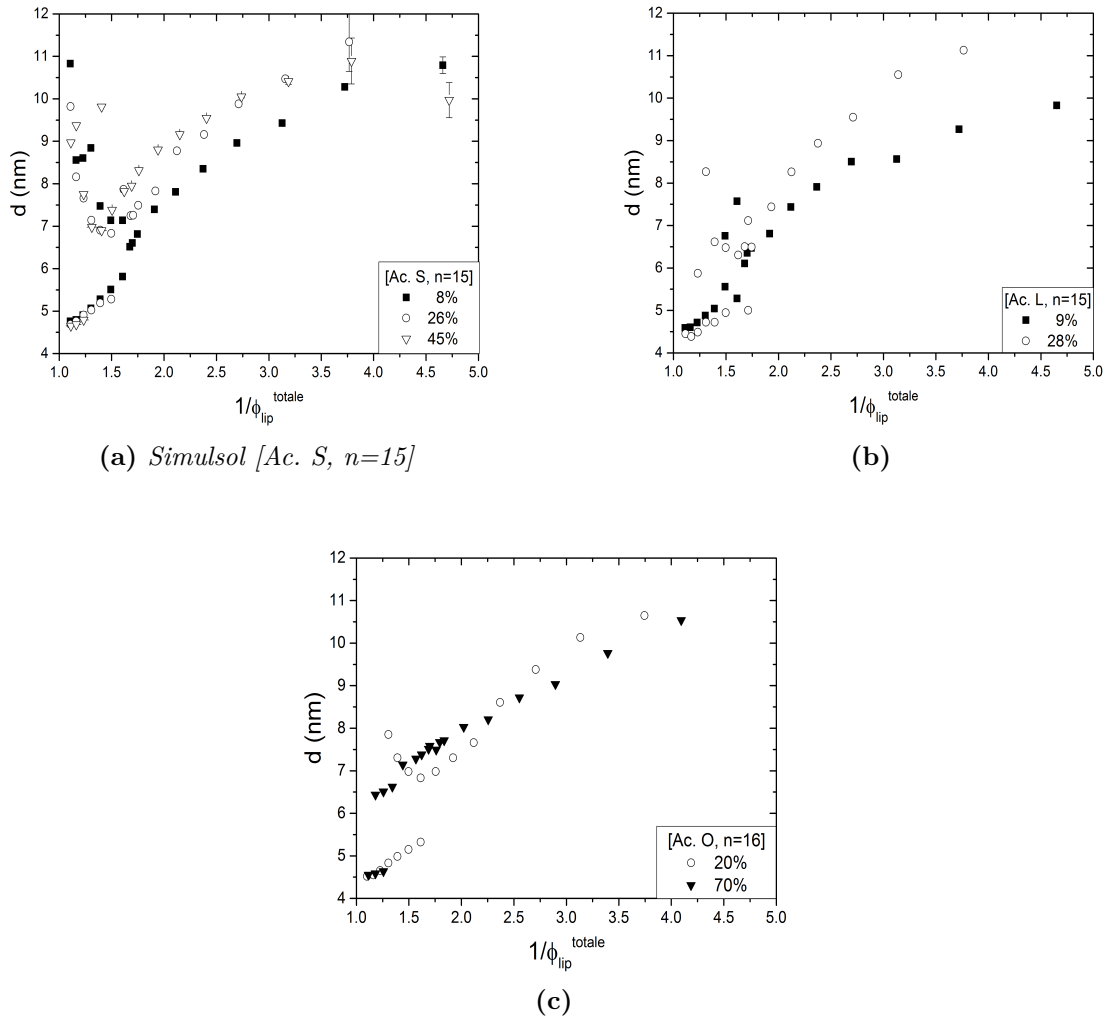


Figure 4.2.2 – Coexistence de phases, entre un empilement lamellaire « concentré » et un empilement lamellaire « dilué », mise en évidence pour des bicouches constituées de Lécithine et de longs co-tensioactifs polymériques de composition hydrophobe distincte. Lois de dilution de bicouches empilées constituée d'un mélange, à différents teneurs molaires en co-tensioactif, de Lécithine et de *Simulsol* : (a) *Simulsol* [Ac. S, $n=15$], (b) *Simulsol* [Ac. L, $n=15$] et (c) [Ac. O, $n=16$]. d définit l'ordre d'empilement alors que ϕ_{lip}^{totale} définit la fraction volumique totale en lipides, comprenant la somme des fractions en lipides de chaque empilement s'il y a coexistence.

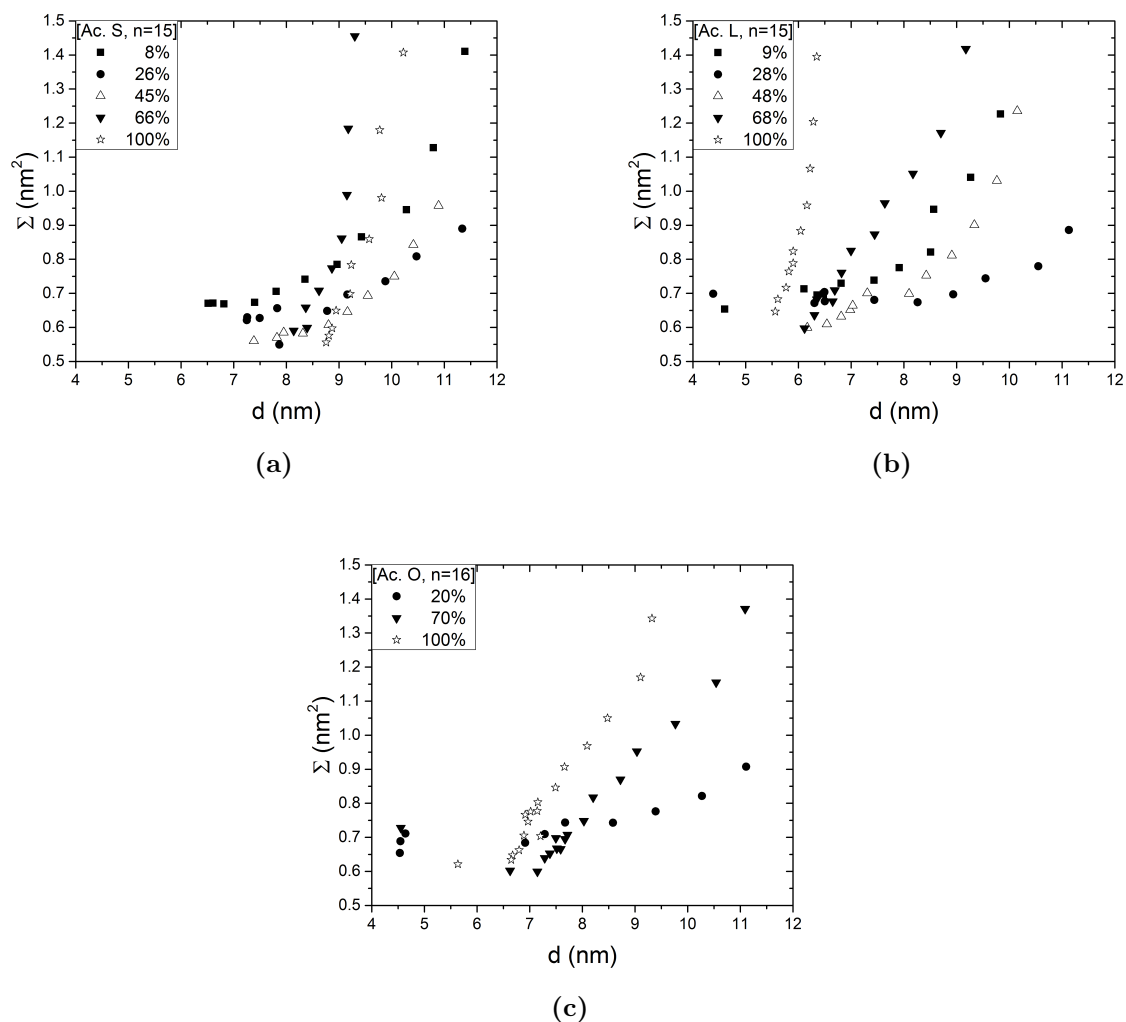


Figure 4.2.3 – Mise en évidence des confinements appliqués aux empilements de bicouches composées d'un mélange de Lécithine et de longs co-tensioactifs de composition hydrophobe distincte. Le confinement latéral, représenté par l'aire moléculaire moyenne Σ , est affiché en fonction du confinement vertical, représenté par la périodicité lamellaire d , pour des bicouches constituées, à différents teneurs molaires en co-tensioactif, de Lécithine et de Simulsol : (a) Simulsol [Ac. S, $n=15$], (b) Simulsol [Ac. L, $n=15$] et (c) [Ac. O, $n=16$].

pour une membrane avec du Simulsol [Ac. L, n=15], la présence d'une coexistence de phase entre l'empilement lamellaire « concentré », de périodicité faible ($\sim 4.5\text{ nm}$), et ce qui semblerait être une phase de Simulsol hydraté, de taille structurale plus grande ($\sim 9.5\text{ nm}$), marquée par une bosse de diffusion relevée aux petits angles. Bien que la coexistence entre les deux empilements lamellaires « concentré » et « dilué » ne soit pas explicitement mise en évidence, la présence de cette transition de phase semble subsister malgré tout (marquée par un saut de valeur de la période d'empilement, à l'image des caractérisations précédemment effectuées pour d'autres compositions de membrane). En revanche, pour une longueur de chaîne carbonée plus longue, cette coexistence persiste. En plus des différences relevées dans les transitions de phases, il semblerait que la diminution de la longueur de cette chaîne carbonée du co-tensioactif entraîne, pour une composition riche en Simulsol, une importante augmentation de la flexibilité de l'empilement lamellaire, à même confinement appliqué (vertical ou latéral), indiquée par une différence significative dans les valeurs du paramètre de Caillé (non représenté).

4.3 Effet de la longueur hydrophile sur des membranes fluides

Le cœur de la bicouche, constitué des chaînes aliphatiques de la Lécithine et du co-tensioactif Simulsol, dirige en grande partie les interactions intramembranaires, contrôlant notamment l'état de phase fluide ou structuré de la membrane. À travers le changement présumé de l'élasticité de la lamelle, une altération des interactions, à plus grande échelle, est alors possible perturbant ainsi le diagramme de phase des bicouches empilées et leur gonflement lamellaire. Une alternative, à la modulation des mécanismes régissant la formation de ces auto-assemblages, réside en la perturbation des interactions à l'interface membrane-membrane qui sont, elles, plus spécifiques. Une méthode possible est alors de varier la longueur hydrophile, donc des chaînes de groupements d'oxyde d'éthylène, des « copolymères » greffés à ces membranes fluides « poilues » afin de réguler une interaction polymérique entre lamelles.

4.3.1 Faible densité de greffage en co-tensioactifs

Tout d'abord, l'effet de la longueur de la chaîne éthoxylée du co-tensioactif est évaluée pour une faible teneur molaire en co-tensioactif (environ 30%) sans que l'état fluide de la bicouche ne soit perturbé, donc en utilisant seulement les Simulsols [Ac. L] et [Ac. O], Figure 4.3.1. Deux effets majeurs sont alors observés sur le diagramme de phase et sur les confinements imposés aux bicouches empilées.

Une coexistence de phase entre l'empilement lamellaire « concentré » et l'empilement lamellaire « dilué » est mise en évidence par l'extension de la longueur hydrophile du

co-tensioactif et ce indépendamment de sa composition hydrophobe, que ce soit pour le Simulsol [Ac. O] (Figure 4.3.1a) ou le Simulsol [Ac. L] (Figure 4.3.1b). Comme remarqué sur les Figures 4.3.1c et 4.3.1d, cette transition s'effectue toujours pour un même confinement critique (d_2, Σ_{12}), discuté Section 3.1.4.1. Cependant, le domaine d'hydratation « intermédiaire », défini par un plateau de confinement latéral (Σ constant) pour un co-tensioactif court, laisse place à la coexistence de phase, dont la limite confinée s'étend alors vers les périodes d'empilements les plus faibles, à mesure que la longueur hydrophile est accrue. Ainsi, même pour une faible densité de greffage en co-tensioactif, il est établi que les interactions au sein de l'empilement lamellaire sont fortement dépendantes de la longueur hydrophile du co-tensioactif polymérique inséré qui interagit spécifiquement avec la membrane adjacente, d'une part, et qui peut modifier, d'autre part, l'élasticité de la bicouche (les constantes élastiques k_c et k_e , définies Section 1.2.2.1) par interactions latérales avec les différentes têtes polaires comme il en est discuté à la Section 1.2.2.2.

Dans le domaine d'hydratation dilué, une intense répulsion verticale a lieu par cet accroissement des chaînes éthoxylées marquée par une augmentation de la périodicité lamellaire pour chacune des membranes composées de Simulsol [Ac. L], Figure 4.3.1b, ou de Simulsol [Ac. O], Figure 4.3.1a. Les limites de dilution sont par exemple étendues avec une valeur de périodicité $d_{lim} = 8 \text{ nm}$ pour $n = 6$ qui atteint une valeur de $d_{lim} = 10.5 \text{ nm}$ pour $n = 16$. Cette répulsion semble alors atteindre une certaine limite puisqu'aucune différence n'est rencontrée dans cette zone de forte hydratation entre les membranes constituées de Simulsol [Ac. O, n=10] ou de Simulsol [Ac. O, n=16]. De plus, l'aire moléculaire moyenne Σ adopte un comportement opposé en se réduisant lorsque la longueur hydrophile du polymère est augmentée. Par conséquent, une extension verticale du polymère a lieu lorsque l'on accroît la longueur de sa tête polaire entraînant ainsi une réduction de son aire à l'interface bicouche-eau, confirmée par une élévation de l'épaisseur de la bicouche δ_m^e à même confinement latéral. La répulsion polymérique intermembranaire augmente alors au profit d'une diminution de la répulsion latérale entre les têtes polaires.

Enfin, l'élasticité de l'empilement lamellaire « dilué », quantifiée par le paramètre de Caillé, est aussi altérée par cette taille des chaînes éthoxylées. Une augmentation de la rigidité de l'empilement lamellaire, pour un même confinement, est alors remarquée lorsque cette taille est agrandie. Cela a pour conséquence de démontrer soit une augmentation de la constante de courbure de la membrane k_c , soit de la constante de compressibilité à potentiel chimique constant \bar{B} , ou finalement un produit globalement croissant de ces deux constantes.

4.3.2 Haute densité de greffage en co-tensioactifs

Lorsque la densité de greffage en co-tensioactifs est augmentée ($\sim 70\%$), un effet amplifié des interactions, souligné à la section précédente, est attendue. En réalité, des distinctions sont notifiées de par la teneur en co-tensioactif et de par la composition hydrophobe, Figure 4.3.2.

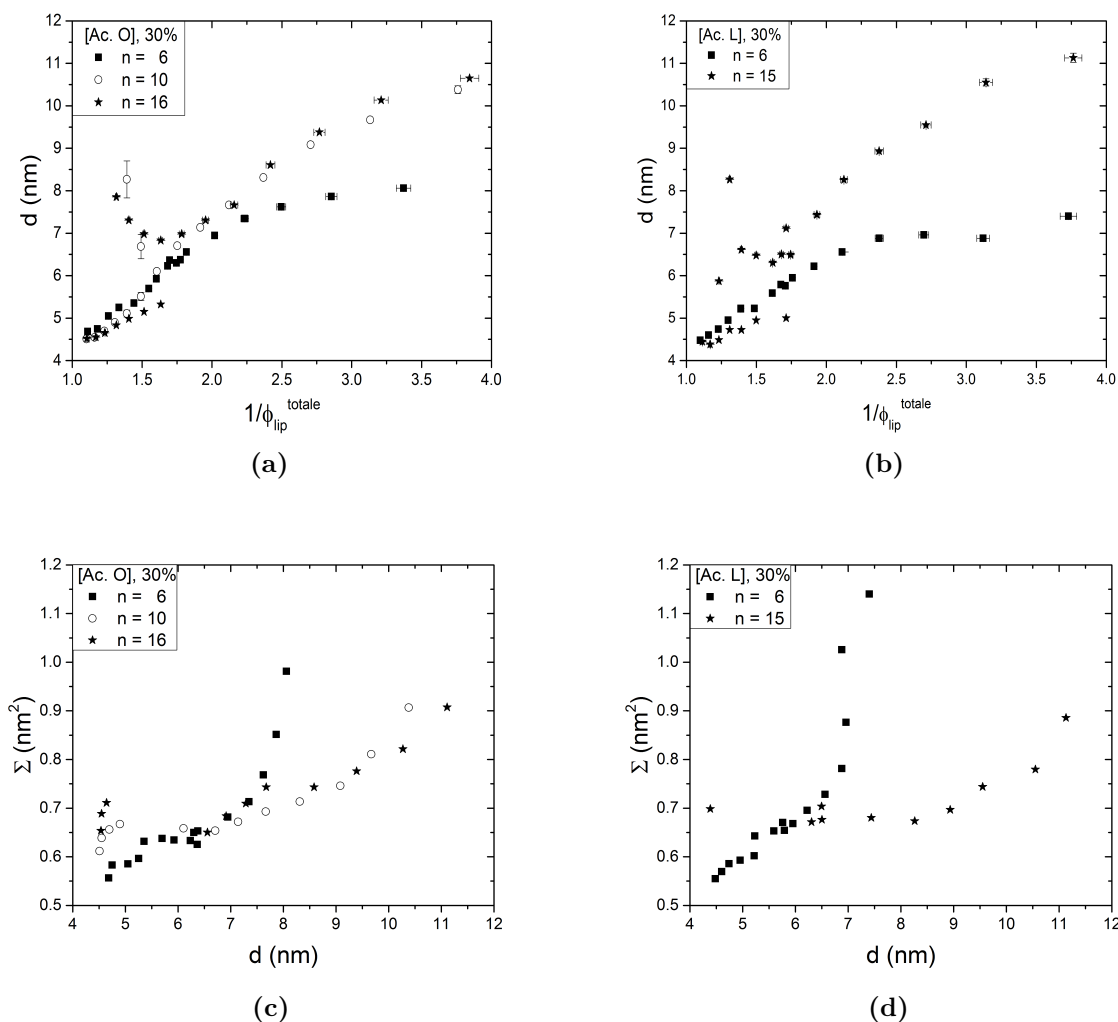


Figure 4.3.1 – Effet de la longueur de chaînes éthoxylées sur le gonflement lamellaire pour des bicouches fluides constituées par du co-tensioactif en faible concentration. Lois de dilution de bicouches constituées d'un mélange de Lécithine ($\sim 70\%$) et de Simulsol ($\sim 30\%$), caractérisé par une taille en nombre de groupements d'oxyde d'éthylène (n), et différents par la composition hydrophobe : (a) Simulsol [Ac. O] et (b) Simulsol [Ac. L]. d définit la période d'empilement alors que ϕ_{lip}^{totale} définit la fraction volumique totale en lipides, comprenant la somme des fractions en lipides dans chaque empilement s'il y a coexistence. Le gonflement lamellaire est alors décomposé, pour les domaines monophasiques, en confinements vertical et latéral, illustré par une aire moléculaire à l'interface bicouche-eau Σ , pour ces même compositions en Simulsol : (c) Simulsol [Ac. O] et (d) Simulsol [Ac. L].

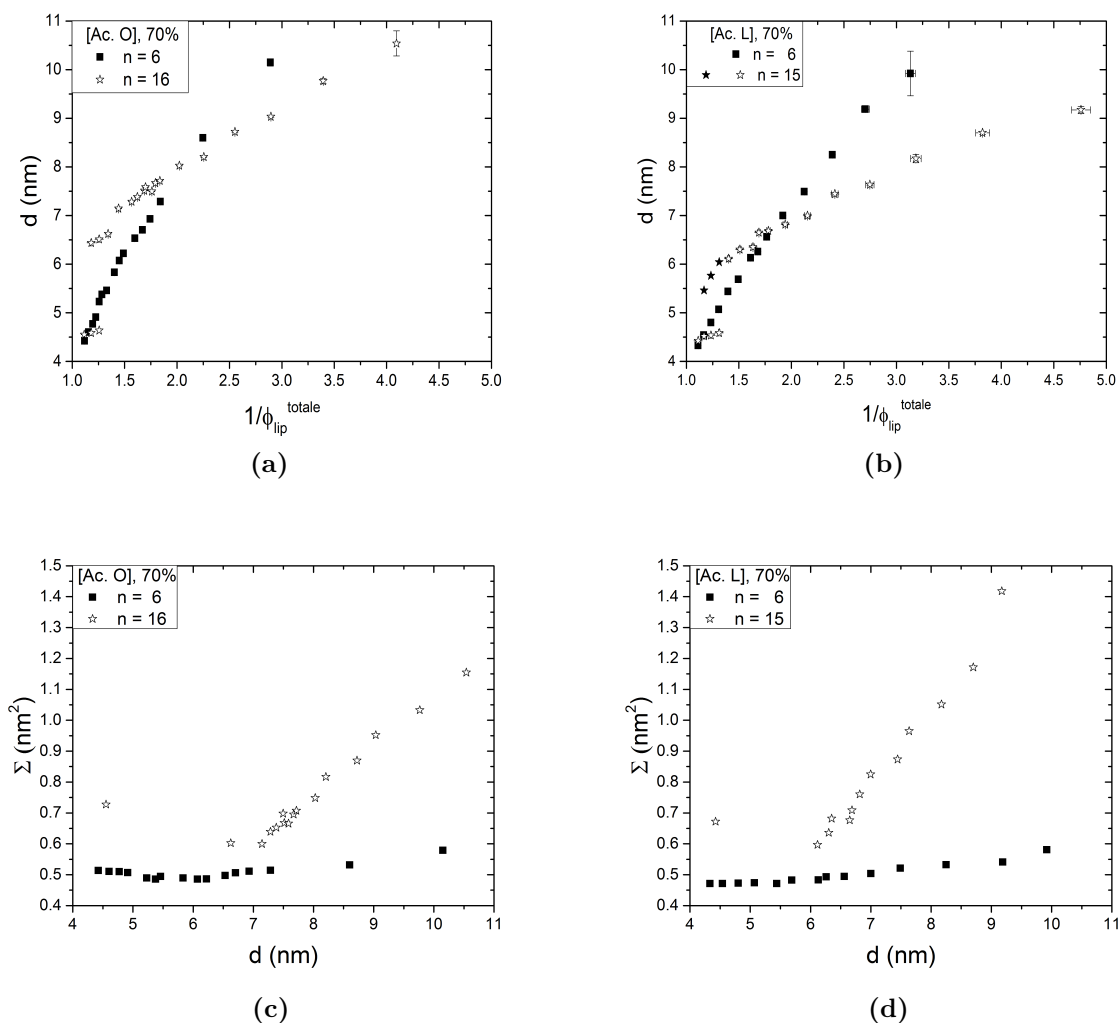


Figure 4.3.2 – Effet de la longueur de chaînes éthoxylées sur le gonflement lamellaire pour des bicouches fluides constituées par du co-tensioactif en haute concentration. Lois de dilution de bicouches constituées d'un mélange de Lécithine ($\sim 30\%$) et de Simulsol ($\sim 70\%$), caractérisé par une taille en nombre de groupements d'oxyde d'éthylène (n), et différent par sa composition hydrophobe : (a) Simulsol [Ac. O] et (b) Simulsol [Ac. L] (★ représente une phase de Simulsol [Ac. L] hydratée, identifiée par une bosse de diffusion aux rayons X). d définit l'ordre d'empilement alors que ϕ_{lip}^{totale} définit la fraction volumique totale en lipides, comprenant la somme des fractions en lipides dans chaque empilement s'il y a coexistence. Le gonflement lamellaire est alors décomposé, pour les domaines monophasiques, en confinements vertical et latéral, ce dernier représenté par une aire moléculaire à l'interface bicouche-eau Σ , pour ces même compositions en Simulsol : (c) Simulsol [Ac. O] et (d) Simulsol [Ac. L].

Une coexistence de phase entre les empilements de bicouches « concentré » et « dilué » est toujours relevée avec l'introduction du Simulsol [Ac. O, n=16], bien que les confinements critiques soient sensiblement modifiés (augmentation de d_2 et diminution de Σ_{12}). Tandis que pour des bicouches composées avec du Simulsol [Ac. L, n=15], une coexistence de phase est remarquée, de même, mais avec une phase de Simulsol hydraté, discutée Section 4.2.2. Cette coexistence s'établit alors, dans le domaine dilué, pour un confinement latéral identique (Σ_{12}) mais pour un confinement vertical légèrement plus intense (d_2).

La comparaison des confinements, pour des co-tensioactifs distingués uniquement par la longueur hydrophile, indique une diminution des répulsions verticales mais une augmentation des répulsions latérales lorsque la taille des têtes polaires du « copolymère » s'agrandit. Cela est notamment marquée par une valeur plus élevée de Σ_{12} et de Σ_{lim} (estimée) et par une valeur plus faible de d_{lim} (d_2 demeurant le même) et ce pour chacune des compositions hydrophobes exposées. Une allure opposée à celle démontrée précédemment pour une plus faible densité de greffage, Section 4.3.1, est donc affichée. Celle-ci laisse présumer une transition dans la compétition des interactions liée à la densité de greffage des polymères longs et qui est d'ailleurs remarquée sur la Figure 4.2.3b.

Enfin, l'élasticité de l'empilement lamellaire paraît affectée par le couplage qui se dévoile entre la taille hydrophile de la molécule de co-tensioactif et par sa composition hydrophobe. Dans le cas des bicouches mixtes composées de Simulsol [Ac. O, n=16], on retrouve une rigidité accrue de l'empilement lamellaire par cette extension des têtes polaires qui semble persister malgré la modification de la densité de greffage. Cependant, dans le cas des bicouches mixtes constituées en partie par du Simulsol [Ac. L, n=15], une augmentation de la flexibilité lamellaire est constatée. L'effet de cette composition hydrophobe sur la rigidité de l'empilement des bicouches ne s'avère pertinente qu'à partir d'une forte densité de greffage en co-tensioactifs polymériques (estimée entre 30% et 50% d'après la Figure 4.2.3b).

4.3.3 Bicouches de tensioactifs apparentés à des copolymères diblocs

Les bicouches de tensioactifs en phase lamellaire présentent l'avantage de réduire l'étude du gonflement de l'empilement à l'analyse des interactions qui interviennent entre les chaînes polymériques, qu'elles soient intramembranaires ou à l'interface membrane-membrane. Ce faisant, il y est remarqué que la longueur des chaînes éthoxylées possède un impact conséquent sur le confinement global que subissent les bicouches.

Ainsi, en présence uniquement de tensioactifs, l'extension de la longueur hydrophile a pour conséquence de diminuer les interactions verticales entre les bicouches empilées (diminution de la périodicité lamellaire d pour une même concentration en molécules amphiphiles), indépendamment de leur composition hydrophobe c'est-à-dire qu'elles soient composées de Simulsol [Ac. O], Figure 4.3.3a, ou de Simulsol [Ac. L], Figure 4.3.3b. Ce phénomène observé peut hypothétiquement résulter d'une intensité plus faible des ondulations répulsives d'Helfrich, voir Section 1.3.5, qui serait alors accompagnée d'une constante

élastique de courbure k_c plus élevée en plus d'un volume moléculaire naturellement plus important. Il semble, en effet, pertinent de suggérer une dépendance de l'aire occupée par le polymère à la surface de la membrane suivant l'extension de sa chaîne polymérique entraînant ainsi une variation de la constante élastique de la bicouche, Section 1.2.2.2. Une augmentation de la constante élastique de courbure k_c avec l'extension de la chaîne de polymère est notamment constatée pour des membranes constituées de copolymères diblocs et triblocs [88]. Une autre possibilité serait que malgré les interactions stériques répulsives qui ont lieu entre les chaînes éthoxylées, une interaction attractive entre ces chaînes, de van der Waals ou d'origine entropique, apparaisse et demeure plus intense à mesure que leur longueur hydrophile est accrue. Ceci favoriserait de cette manière une augmentation du paramètre de viriel χ , caractéristique de l'attraction entre les membranes, dans la description thermodynamique employée qui est discutée Section 1.3.6.

Lorsque l'hydratation du système est variée, un comportement intéressant ressort de la confrontation de l'évolution des confinements latéral et vertical qui sont appliqués aux bicouches empilées, spécifiquement dans le régime dilué, Figures 4.3.3c et 4.3.3d. En effet, tandis que les tensioactifs courts ($n = 6$) entraînent l'auto-assemblage d'empilements de bicouches dans un état « non lié », gonflant verticalement « indéfiniment », l'auto-assemblage de bicouches composées de tensioactifs plus longs ($n = 10$ et $n = 15 - 16$) demeure, lui, dans un état « lié », présentant alors une limite de dilution (dans la direction verticale aux bicouches). Par conséquent, cette observation confirme l'hypothèse d'une attraction verticale apparaissant entre les têtes polaires des Simulsols, greffés sur des membranes adjacentes, et qui devient suffisamment intense, pour venir compenser les ondulations répulsive d'Helfrich, à mesure que le nombre de groupements éthylène oxyde est incrémenté. Néanmoins, cette déduction ne réfute pas pour autant une éventuelle altération de la constante élastique de la membrane k_c par la longueur hydrophile du « copolymère ».

En plus de la modification de l'état de l'empilement des bicouches, un changement radical est remarqué, de manière étonnante, sur leur gonflement lamellaire provenant de cette extension polymérique, que cela soit pour des Simulsols [Ac. L], Figure 4.3.3d ou [Ac. O], Figure 4.3.3c. Alors que les courts tensioactifs polymériques ($n = 6$) ne présentent qu'une faible variation de leur aire par tête polaire Σ (variation maximale d'environ 0.04 nm^2 pour les deux compositions) mais un fort gonflement dans la direction verticale (augmentation de la périodicité lamellaire d de plus de 24 nm pour le Simulsol [Ac. O, n=6] et de plus de 15 nm pour le Simulsol [Ac. L, n=6]), en fonction de la teneur en eau ajoutée, les longs tensioactifs ($n = 15 - 16$) possèdent, eux, un comportement lamellaire pratiquement opposé. Une faible extension de l'ordre d'empilement d est observé (une variation d'environ 3 nm pour le Simulsol [Ac. O, n=16] et une variation de l'ordre de 1 nm pour le Simulsol [Ac. L, n=15]) tandis que le domaine d'extension de leur aire moléculaire à l'interface bicouche-solvant est plus étendu (une extension d'au moins 1 nm^2 pour les deux compositions). La longueur du polymère a non seulement pour effet d'introduire une attraction

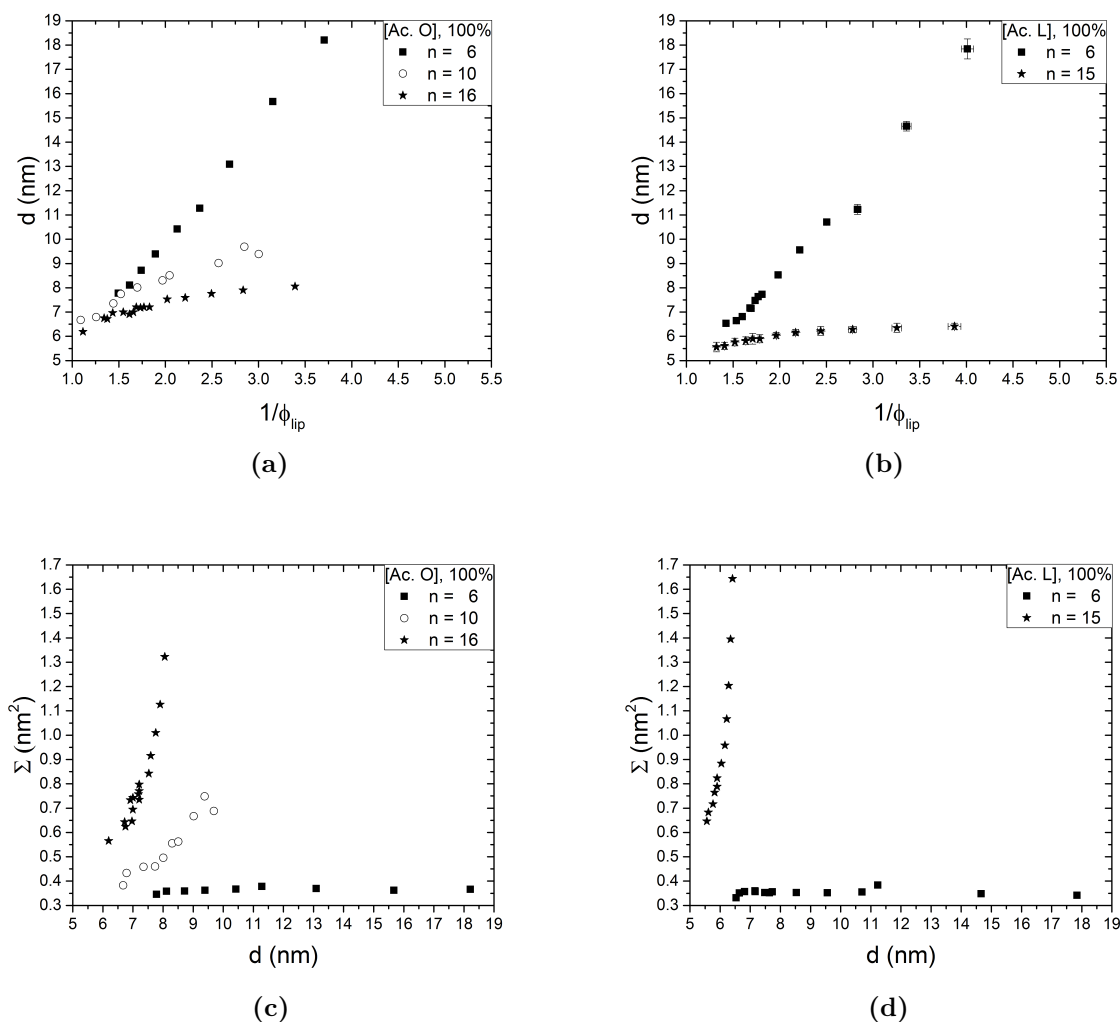


Figure 4.3.3 – Effet de la longueur de chaînes éthoxylées sur le gonflement lamellaire pour des bicouches fluides constituées uniquement de tensioactifs polymériques. Lois de dilution de bicouches constituées uniquement de Simulsol, caractérisé par une taille en nombre de groupements d'oxyde d'éthylène (n), et différents par leur composition hydrophobe : (a) Simulsol [Ac. O] et (b) Simulsol [Ac. L]. d définit la période d'empilement alors que ϕ_{lip} représente la fraction volumique en tensioactifs. Le gonflement lamellaire est alors décomposé en confinements vertical et latéral, illustré par une aire moléculaire à l'interface bicouche-eau Σ , pour ces mêmes compositions en Simulsol : (c) Simulsol [Ac. O] et (d) Simulsol [Ac. L]. Les données expérimentales qui caractérisent les bicouches de Simulsol [Ac. O, $n=10$] sont extraites de l'article de Gerbelli et al. [42].

verticale entre les lamelles empilées, mais il a aussi pour conséquence d'augmenter une répulsion, dans la direction latérale des bicouches, entre les différentes chaînes éthoxylées greffées sur une même membrane.

Un dernier effet est noté sur le diagramme de phase dans le régime confiné de l'empilement lamellaire. Une coexistence de phase entre un empilement lamellaire et une phase de Simulsol hydraté dans le régime concentré ($\phi_{lip} \geq 0.7$) apparaît pour des bicouches constituées de Simulsol [Ac. O, n=6] (voir discussion Section 3.1.5.1) ou de Simulsol [Ac. L, n=6] (voir discussion Section 4.2.1). Lorsque la longueur hydrophile du Simulsol est augmentée, cette coexistence se voit fortement diminuée et recule vers les régimes encore plus concentrés ($\phi_{lip} \geq 0.9$).

Pour les systèmes constitués de longs tensioactifs, des expériences de diffusion dynamique de la lumière (voir la méthode utilisée à la Section 2.3) ont été entreprises dans le domaine dilué, dès lors que les pics lamellaires ne sont plus distingués, ne laissant apparaître seulement qu'un facteur de forme de la bicouche. Ainsi, pour les échantillons les plus dilués, ($\phi_{lip} \leq 0.15$, les expériences sont réalisées sur des échantillons composés de Simulsol [Ac. O, n=16] uniquement) des objets nanométriques semblent être caractérisés par cette technique et se définissent par un diamètre hydrodynamique d_H d'environ 8 nm . Les observations macroscopique et microscopique ne permettent alors pas d'opérer une quelconque distinction de phase. Une possible coexistence entre une phase lamellaire, mal définie par diffusion de rayons X à cause de cette intense dilution, avec des micelles sphériques est donc supposée.

4.4 Conclusion

L'auto-assemblage sous la forme de bicouches empilées est régi par une compétition d'interactions qui interviennent d'une part, au sein de la bicouche elle-même et d'autre part, entre lamelles consécutives de l'empilement. Le confinement appliqué alors à ces membranes, que cela soit dans la direction verticale ou bien dans la direction latérale au plan des bicouches, est aisément modifié par l'hydratation du système ou bien par la variation de la densité de greffage de « copolymères » à ces lamelles initialement principalement composées de Lécithine. Afin d'influer sur la nature et sur les intensités de ces interactions, il est aussi possible de modifier la composition chimique des molécules amphiphiles définissant la bicouche. Pour cela, une méthode pratique consiste à façonner le tensioactif, apparenté à un copolymère dibloc, introduit. Ce faisant, les longueurs des chaînes carbonées et éthoxylées sont ainsi variées et l'effet d'une double liaison présente au sein de la chaîne carbonée est mis en lumière. Une synthèse simplifiée des résultats obtenus est illustrée graphiquement sur la Figure 4.4.1.

La disparition de cette double liaison au sein du co-tensioactif, indépendamment de sa longueur (Simulsol [Ac. S, n=6] ou Simulsol [Ac. S, n=15]) ou de la densité de greffage, entraîne la perte de la fluidité membranaire et l'apparition d'une bicouche cristallisée.

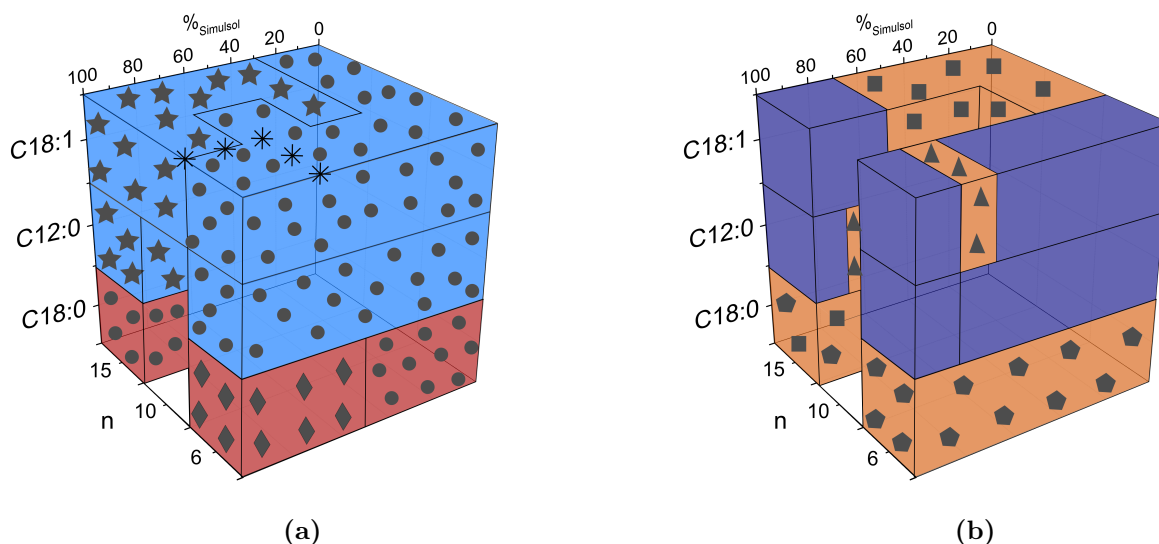


Figure 4.4.1 – Synthèse des résultats obtenus par variation de la physico-chimie des membranes. (a) L'empilement lamellaire « dilué » est décrit au niveau de la fluidité de la membrane et de la compétition entre les interactions verticales et latérales. Code couleur : bleu pour une membrane à l'état fluide et rouge pour une membrane à l'état cristallisé. (●) Le gonflement lamellaire (répulsions verticales) domine par rapport à l'extension de la membrane (répulsions latérales), et (★) inversement, lorsque l'hydratation, la densité de greffage ou la longueur de la chaîne éthoxylée sont augmentées. (◆) Domaine de coexistence de phase non caractérisé. (*) Transition de décrochage entre un empilement « lié » et un autre « non lié ». (b) Le domaine d'hydratation concentré est caractérisé par la présence ou non de coexistence de phases. Code couleur : violet pour un domaine complètement monophasique et orange pour une coexistence de phases. (■) Coexistence entre un empilement lamellaire « concentré » et un empilement lamellaire « dilué ». Les pentagones représentent une coexistence de phases entre un empilement lamellaire « concentré » et un empilement lamellaire « cristallisé ». (▲) Coexistence de phases entre un empilement lamellaire « concentré » et une phase de Simulsol hydraté.

À cette échelle de structure atomique, la longueur de la chaîne éthoxylée (hydrophile) possède, tout de même, une influence qui se remarque par des positions de pics cristallins non semblables, exposant donc des distances caractéristiques différentes entre les plans cristallins des chaînes carbonées. Bien que l'insaturation présente un impact fort sur la structure membranaire, elle possède, de plus, un effet à plus grande distance sur l'empilement lamellaire. Une coexistence entre deux empilements lamellaires est alors notée dans le régime confiné, par la perte de la double liaison du co-tensioactif (excepté pour un long tensioactif de faible teneur au sein de la membrane qui amène une coexistence de phase entre les empilements « dilué » et « concentré »). Ainsi, soit une nouvelle transition de phase entre l'empilement lamellaire « concentré » et un empilement lamellaire dit « cristallisé » (simple nom donné à cet empilement) a lieu pour un certain confinement (d_1, Σ_{12}), soit une structure complémentaire apparaît, organisée selon une orientation distincte.

Par simple diminution de la longueur de chaîne carbonée saturée, l'état fluide de la bicouche est retrouvé (composée de mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac. L, $n=6$] ou de [Ac. L, $n=15$]). Un gonflement lamellaire similaire à celui de bicouches mixtes constituées de Lécithine et de tensioactifs insaturés (Simulsol [Ac. O, $n=6$] ou [Ac. O, $n=16$]) est affiché. Les différents régimes d'hydratation ou de confinement, discutés Section 3.1.4.1, demeurent identiques avec notamment un même confinement qui définit la transition de phase entre les empilements lamellaires « concentré » et « dilué ». Seul un léger écart subsiste dans le régime dilué au niveau des valeurs des périodicités lamellaires et des aires moléculaires à l'interface bicouche-solvant, qui résulte probablement de la différence entre les volumes moléculaires des tensioactifs et d'un effet sensible de l'insaturation. Pour une longueur hydrophile restreinte du co-tensioactif ($n = 6$), une transition de décrochage est donc aussi mise en évidence, liée à la densité de greffage, et une dominance des ondulations répulsives d'Helfrich apparaît, de même, pour des bicouches uniquement composées de tensioactifs polymériques.

Les interactions entre les polymères, qui sont plus spécifiques et qui interviennent latéralement sur une même surface de bicouche ou bien à l'interface membrane-membrane, sont modifiées par variation de la longueur des chaînes éthoxylées. Ainsi, la compétition entre ces interactions est fortement dépendante de la teneur en co-tensioactif.

Pour une faible densité de greffage, une coexistence de phase entre les empilements lamellaires « concentré » et « dilué » est mise en évidence dans le régime confiné grâce à cette augmentation du nombre de groupements d'oxyde d'éthylène (la limite la plus diluée de la coexistence est donnée par le confinement (d_2, Σ_{12})). De plus, une augmentation des répulsions verticales (augmentation de d) a lieu au profit d'une diminution des répulsions latérales (diminution de Σ), spécifiquement dans le domaine d'hydratation dilué. À partir d'une densité de greffage en « copolymères » se situant entre 20% et 50%, pour des Simulsols longs ($n = 15 - 16$), un changement a lieu dans le gonflement lamellaire des bicouches mixtes, quasiment invariant par la composition hydrophobe. En effet, une évolution contraire aux confinements précédemment observés est soulignée par

une augmentation de l'aire moléculaire Σ (augmentation de la répulsion latérale) et par une diminution de la période d'empilement d (diminution de la répulsion verticale). La longueur hydrophile semble alors être le paramètre qui contrôle le gonflement lamellaire pour ces bicouches à l'état fluide.

L'analyse du gonflement lamellaire des bicouches constituées uniquement par les tensioactifs donnent accès à une compréhension plus fine des effets de la longueur hydrophile, puisque les interactions qui mettent en jeu la Lécithine sont retirées. À mesure que la longueur hydrophile du tensioactif augmente, une observation similaire à celle précédente (pour des bicouches mixtes chargées en longs tensioactifs) a lieu. Une diminution des interactions verticales au profit d'une augmentation des interactions latérales semble se produire. De plus, une transition de décrochage prend place par variation de cette taille de chaînes éthoxylées entre un état « non lié » pour des bicouches empilées de tensioactifs courts ($n = 6$) et un état « lié » pour des bicouches empilées de tensioactifs plus longs ($n \geq 10$). Par conséquent, la limite de dilution observée résulte en réalité d'une augmentation présumée de l'attraction entre les bicouches (van der Waals) qui est d'autant plus intense que la longueur des polymères est grande.

L'étude des confinements auxquels sont soumises les bicouches empilées a permis de démontrer une richesse, mais aussi une complexité, autour des interactions qui surviennent dans leur auto-assemblage. Bien que des zones, plus ou moins obscures, demeurent toujours dans l'étude de ces systèmes, la potentialité d'encapsulation de nanoobjets au sein de ces empilements de bicouches légitime une telle investigation. Ainsi, le confinement de courtes molécules d'ADN (objets chargés considérés comme unidimensionnels), disposées entre ces membranes lipidiques au sein de la couche aqueuse, est entrepris dans le chapitre suivant afin de mettre en évidence une organisation possible dirigée par des interactions d'origines entropique et interfaciale.

« C'qui compte, c'est les
valeurs ! »"

(Perceval)

Encapsulation d'ADN & Création de Vecteurs

« A wise man once said : "There are no perfect men in the world, only perfect intentions." »

(Azeem Edin Bashir Al Bakir)

Chapitre 5

Des nano-bâtonnets d'ADN structurés et confinés via des mécanismes entropiques et interfaciaux dans un empilement lamellaire lipidique

À l'échelle nanométrique, des systèmes auto-assemblés et anisotropes en solution aqueuse peuvent être créés en combinant d'une part, une matrice hôte lamellaire, composée de molécules amphiphiles, et d'autre part, l'insertion de nano-objets au sein de la structure stratifiée. Des nano-objets unidimensionnels sont alors privilégiés pour ordonner l'anisotropie sous le confinement appliqué par des bicouches empilées. Des études ont été menées sur le confinement de bâtonnets nanométriques au sein d'une phase lamellaire dans le but d'atteindre différents objectifs. On peut citer la synthèse [2] et l'orientation [27], contrôlées par le confinement lamellaire, de bâtonnets d'or utiles pour leurs propriétés optique, conductrice et catalytique. Ou bien des bâtonnets de goethites, prisés pour leur propriété magnétique, qui s'organisent et s'orientent sous l'effet combiné du confinement lamellaire et de l'application d'un champ magnétique [7, 133].

L'acide désoxyribonucléique est un candidat particulier, en tant que bâtonnet biologique de taille nanométrique, puisque l'étude de son confinement au sein d'un complexe lipidique s'inscrit souvent dans le cadre de la thérapie génique. De nombreuses études, notamment décrites Sections 1.4.2 et 1.4.3, sont ainsi entreprises et font appel à l'utilisation de complexes lipidiques cationiques, basés principalement sur des interactions électrostatiques avec l'ADN, polyélectrolyte anionique, mais elles peuvent aussi être basée sur l'utilisation de lipides neutres. Ces derniers (en l'absence d'ADN) n'apparaissent alors que peu sensibles aux possibles interactions dites électrostatiques et aux effets de sels. Néanmoins, pour des concentrations suffisamment importantes en sels ajoutés (vers $\sim 0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ et au-delà), le gonflement de phases lamellaires de bicouches composées

de phospholipides neutres augmente (d'environ 15%). Ce gonflement résulte alors d'une modification des forces attractives de van der Waals et, dans le cas de sels multivalents notamment, de l'apparition d'interactions électrostatiques répulsives qui, dès lors, ne sont plus négligeables [111, 112].

Poursuivant plus particulièrement les travaux sur les complexes lipidiques neutres-ADN, présentés Section 1.4.3, l'intérêt est porté dans ce chapitre sur la caractérisation des interactions intervenant entre les membranes lipidiques (étudiées Chapitres 3 et 4) et les bâtonnets d'ADN. Les différentes organisations que prennent les bâtonnets d'ADN au sein de ces systèmes sont alors présentées comme dépendantes des confinements latéral et vertical, auxquels est soumise la bicouche, ainsi que des interactions interfaciales privilégiées entre l'ADN et les chaînes éthoxylées du co-tensioactif polymérique.

5.1 Les organisations de bâtonnets d'ADN au sein d'une phase aqueuse

Bien que le confinement de l'ADN, de courte longueur et en solution aqueuse, soit suffisamment bien décrit par Livolant et collaborateurs (voir Section 1.4.1.2), il apparaît utile de décrire brièvement ses différentes organisations dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour les systèmes ADN-lipides, qui seront décrits par la suite, afin de pouvoir effectuer une comparaison quantitative.

5.1.1 Le diagramme de phase

À l'aide de la diffusion de rayons X aux petits et aux grands angles, les différentes structures de l'ADN en solution sont révélées sans recours à une pré-orientation optimisée des échantillons. Les diffractogrammes sont alors intégrés sur l'ensemble des orientations possibles (l'ensemble des angles φ définissant le spectre 2D) supposant ainsi une répartition isotrope de la diffusion. Même si cette hypothèse ne convient pas pour caractériser certaines structures, spécialement lorsqu'elles sont dans un état cristallisé, il demeure ainsi plus aisé de comparer les diffractogrammes par simple identification des positions de pics de Bragg. Le diagramme de phase est défini, Figure 5.1.1, en appliquant la relation de Bragg $d = \frac{2\pi}{q_0}$ à partir du vecteur d'onde définissant la position du premier ou des deux premiers pics de Bragg qui apparaissent aux petits angles. En effet, les ordres de Bragg plus élevés n'apparaissent pas du fait de notre approche expérimentale.

À l'aide des tailles structurales relevées, il est ainsi possible d'identifier plusieurs domaines qui correspondent avec les différentes transitions de phases caractérisées par Livolant et collaborateurs, Tableau 1.4.2. La phase cholesterique d'ADN (domaine A), se définit par une distance entre bâtonnets d'ADN diminuant avec la concentration du système de 5.2 nm à 3.5 nm (4.9 nm à 3.2 nm , Tableau 1.4.2). La transition de phase avec

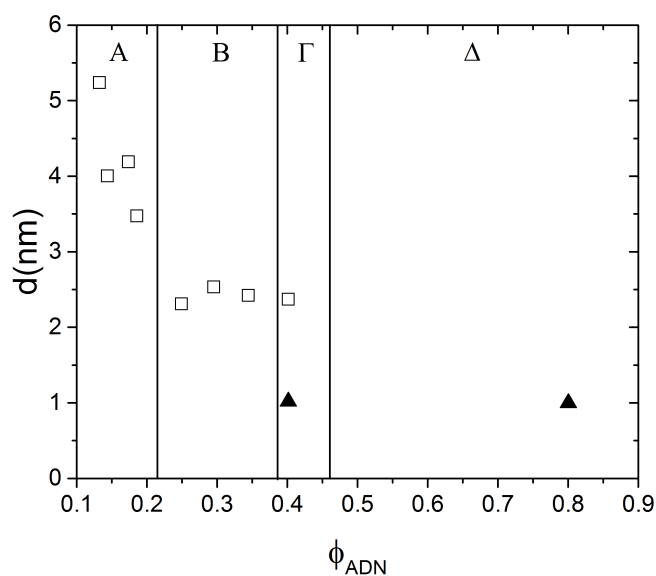


Figure 5.1.1 – Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN en solution aqueuse. Les domaines de phases sont affichés en fonction de la fraction volumique en ADN, ϕ_{ADN} . Domaine A : organisation cholestérique. Domaine B : organisation hexagonale. Domaine Γ : coexistence entre une organisation hexagonale et une organisation supposée orthorhombique. Domaine Δ : organisation supposée orthorhombique. (□) Taille structurale d . (▲) Taille caractéristique associée au pic de diffusion qui apparaît au vecteur d'onde $q \simeq 0.63 \text{ \AA}^{-1}$.

l'organisation hexagonale (domaine B) apparaît pour une fraction volumique $\phi_{ADN} \simeq 0.22$ (Tableau 1.4.2) ce qui est confirmé dans le diagramme de phase par l'apparition d'une nouvelle structure définie par une périodicité, entre les plans de bâtonnets d'ADN $d \simeq 2.5 \text{ nm}$, ce qui correspond à un paramètre de maille hexagonale $a = \frac{2}{\sqrt{3}}d = 2.9 \text{ nm}$ ($2.37 \text{ nm} < a < 3.15 \text{ nm}$, Tableau 1.4.2). Le domaine Γ dénote l'apparition d'un second pic aux alentours de $q \sim 0.63 \text{ \AA}^{-1}$ soit une périodicité donnée *via* la relation de Bragg $d \simeq 1 \text{ nm}$, pour une fraction volumique $\phi_{ADN} \simeq 0.4$, ce qui correspond avec la transition de phase orthorhombique (Tableau 1.4.2). Ce second pic est accompagné le plus souvent par une succession d'autres pics répartis à des échelles de tailles plus petites (aux grands vecteurs d'onde) et qui définissent un état très cristallisé des molécules d'ADN. Il est par conséquent considéré comme un marqueur de la phase orthorhombique de l'ADN.

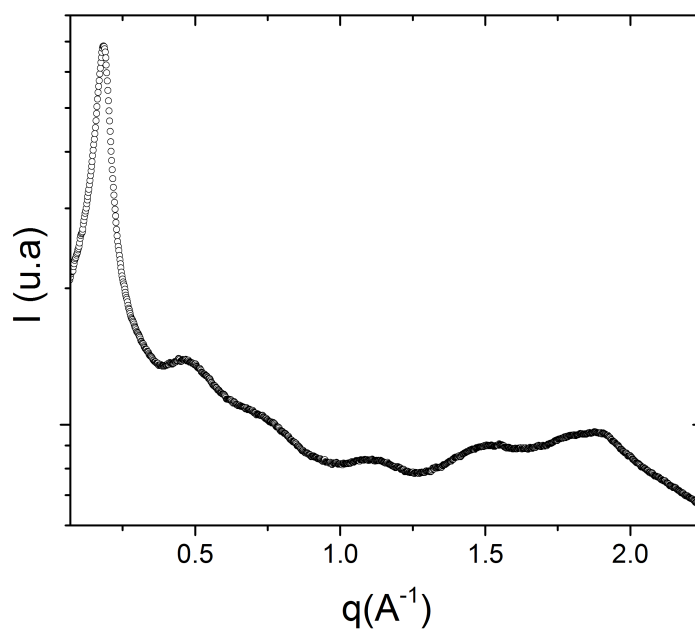
5.1.2 La phase cholestérique

La phase cholestérique est une phase nématique des bâtonnets d'ADN organisés au sein d'une même couche, Figure 1.4.1, mais qui grâce à la chiralité de la molécule, Section 1.4.1.1, s'orientent différemment selon la direction verticale. La phase est donc caractérisée par une distance moyenne a entre bâtonnets dans le plan latéral et par un pas d'hélice $\delta_{\text{hélice}}$ dans le plan vertical, distance pour laquelle les molécules effectuent une rotation complète et se retrouvent orientées à l'identique. Sur le diffractogramme, Figure 5.1.2a, le pic de Bragg définit la distance a entre les bâtonnets de la phase nématique tandis que les « vaguelettes » observées proviennent du pas de l'hélice $\delta_{\text{hélice}}$. La première bosse diffuse, identifiée aux alentours de $q \sim 0.37 \text{ \AA}^{-1}$, permet de remonter directement au demi pas de l'hélice (distance entre deux couches de bâtonnets d'orientation opposée) *via* la relation de Bragg. On obtient ainsi $\delta_{\text{hélice}} = 3.4 \text{ nm}$ ($3.02 \text{ nm} < \delta_{\text{hélice}} < 3.46 \text{ nm}$, Tableau 1.4.2).

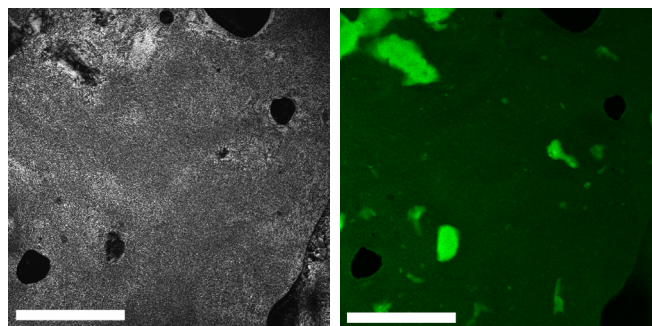
De plus, une texture biréfringente est bien observée par microscopie à lumière polarisée pour cette phase cholestérique, Figure 5.1.2b, qui est alors corrélée à une répartition homogène de l'ADN révélée par la microscopie à épifluorescence, Figure 5.1.2c, malgré la présence de quelques agrégats.

5.1.3 La phase hexagonale

Lorsque le système se concentre en ADN, les bâtonnets définissent une structure hexagonale à deux ou trois dimensions, Section 1.4.1.2. Cette structure s'identifie sur les diffractogrammes, Figure 5.1.3a, par la présence d'un pic étroit au vecteur d'onde $q \simeq 0.26 \text{ \AA}^{-1}$, mieux défini que celui de la phase cholestérique, et qui représente la période de répétition séparant chaque plan de bâtonnets d'ADN. La position de ce pic (donc la taille structurale) ne varie que très légèrement avec l'hydratation du système, ce qui le distingue du pic de la phase cholestérique. Les « vaguelettes », caractéristiques du pas d'hélice, se retrouvent de même sur le diffractogramme.



(a)



(b)

(c)

Figure 5.1.2 – Caractérisation expérimentale de la phase cholestérique d'ADN. (a) Diffractogramme de rayons X d'une phase cholestérique d'ADN identifiée par un pic de Bragg pointant la distance moyenne entre bâtonnets d'ADN et par des bosses diffuses caractéristiques du pas d'hélice. (b) Image de microscopie à lumière polarisée de la phase cholestérique. (c) Image de microscopie en épifluorescence de la phase cholestérique. Les barres d'échelle correspondent à $500 \mu\text{m}$. $\phi_{ADN} = 0.19$.

Une texture biréfringente est toujours observée par microscopie à lumière polarisée, Figure 5.2.7a, bien que différente de la texture de la phase cholestérique. La microscopie à épifluorescence, Figure 5.2.7b, révèle une concentration accentuée de l'ADN illustrée par une fluorescence plus intense que celle de la phase cholestérique.

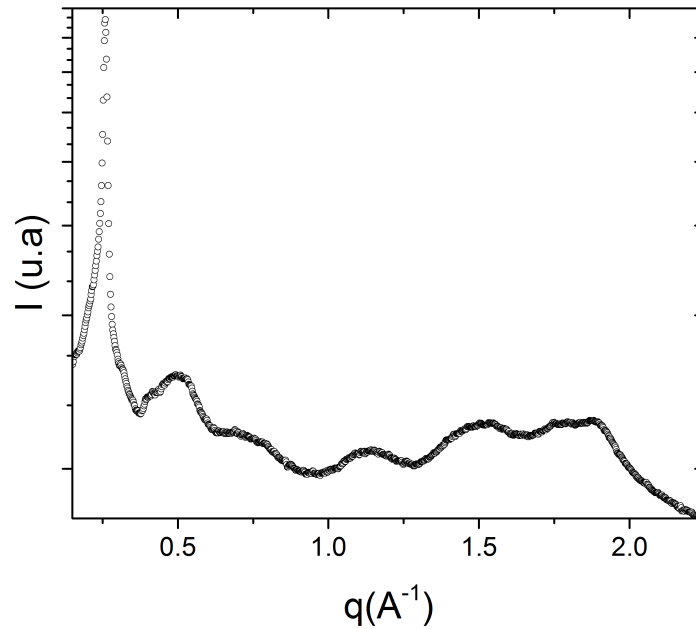
5.1.4 La phase orthorhombique

Dans le domaine d'hydratation le plus faible, les bâtonnets d'ADN s'organisent selon une structure orthorhombique que l'on identifie par la présence d'un pic de Bragg aux alentours de $q \sim 0.63 \text{ \AA}^{-1}$, faute (dans notre cas) d'une meilleure caractérisation expérimentale. Sur le diffractogramme, Figure 5.1.4, une coexistence entre la phase hexagonale (pic au vecteur d'onde $q \simeq 0.26 \text{ \AA}^{-1}$) et la phase orthorhombique est observée. Un état profondément cristallisé des molécules d'ADN est mis en évidence avec la présence d'une multitude de pics de Bragg aux plus grands vecteurs d'onde ($1 \text{ \AA}^{-1} < q < 2 \text{ \AA}^{-1}$).

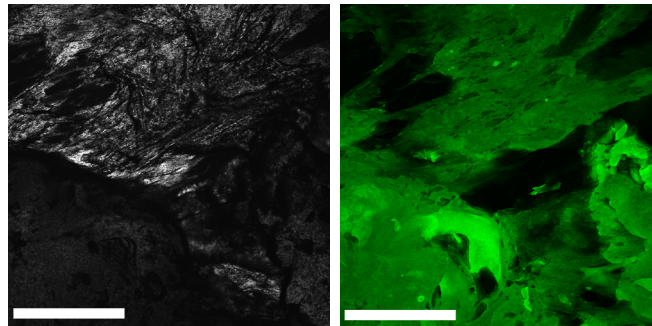
Les études microscopiques ne sont pas effectuées pour les échantillons à cette forte teneur en ADN. En effet, ceux-ci se présentent comme une pâte très visqueuse et collante amenant ainsi une difficulté à une caractérisation microscopique simple, sous contrôle de l'hydratation de l'échantillon.

5.2 Les confinements vertical et latéral des membranes régissent les différentes organisations de l'ADN au sein de la phase lamellaire

L'acide désoxyribonucléique s'auto-organise naturellement en phase aqueuse grâce à des interactions entropiques et à des répulsions électrostatiques entre les bâtonnets. Cependant, au sein d'un complexe lipidique tel qu'un empilement lamellaire de bicouches, la membrane se doit, tout du moins dans un régime confiné, d'avoir des conséquences sur les structures que définissent les bâtonnets d'ADN. Une possible interaction entre l'ADN et la membrane est ainsi supposée, reposant sur des interactions présumées d'origine entropique (interactions stériques) ou sur des interactions de van der Waals. Le confinement de la membrane, qu'il soit vertical ou latéral aux bicouches, a un effet important sur le gonflement lamellaire et sur les conformations que prennent les molécules au sein de la bicouche, chapitre 3. Les effets de confinement de la bicouche, composée de Lécithine et de Simulsol [Ac. O], sur les auto-organisations des bâtonnets d'ADN sont alors décrits d'une manière semblable.



(a)



(b)

(c)

Figure 5.1.3 – Caractérisation expérimentale de la phase hexagonale d'ADN. (a) Diffractogramme de rayons X d'une phase hexagonale d'ADN identifiée par un pic de Bragg pointant la distance de répétition entre les plans de bâtonnets d'ADN et par des bosses diffuses caractéristiques du pas d'hélice. (b) Image de microscopie à lumière polarisée de la phase hexagonale. (c) Image de microscopie en épifluorescence de la phase hexagonale. Les barres d'échelle correspondent à 500 μm . $\phi_{ADN} = 0.25$.

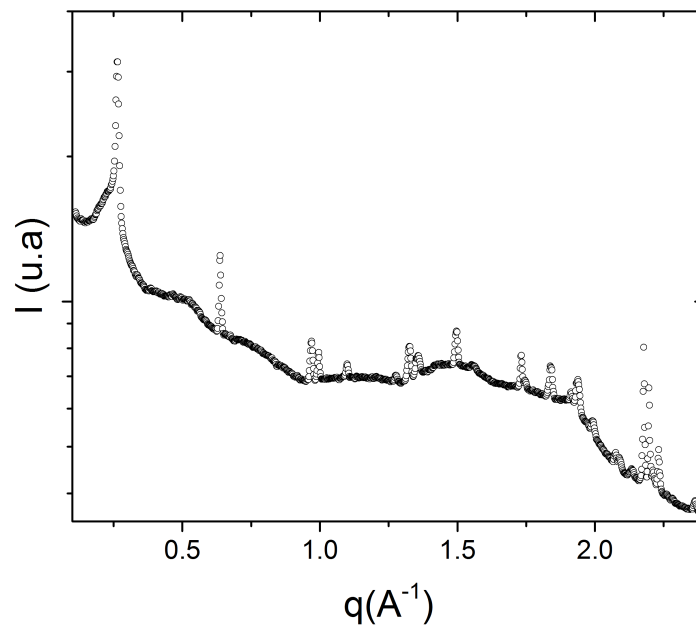


Figure 5.1.4 – Caractérisation par diffusion de rayons X de la phase supposée orthorhombique d'ADN. Diffractogramme de rayons X d'une coexistence entre une phase hexagonale et une phase orthorhombique d'ADN. La phase hexagonale se caractérise par la présence du pic de Bragg d'intensité la plus élevée. La phase orthorhombique se caractérise par la présence des nombreux pics de Bragg indiquant une cristallisation importante des molécules d'ADN. $\phi_{ADN} = 0.53$.

5.2.1 Les principales organisations de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique

Les travaux de thèse d'Emerson Teixeira da Silva [22] ont démontré qu'il était possible de structurer des bâtonnets d'ADN, se répartissant au sein des couches aqueuses de l'empilement lamellaire de membranes composées d'un mélange de Lécithine et de Simulsol [Ac. O, n=10], décrits succinctement à la Section 1.4.3. Les différentes organisations sont alors contrôlées par l'hydratation du système et par la proportion entre les lipides et les molécules d'ADN, fixée pour une même ligne de dilution. Pour une composition mixte donnée (30% en teneur massique de Simulsol [Ac. O, n=10]), il montre ainsi l'apparition de domaines biphasiques ou monophasiques mettant en jeu une variété de structures distinctes. Une ligne de dilution privilégiée ($\rho_v = \frac{\phi_{lip}}{\phi_{ADN}} \simeq 3.4$) est distinguée par ses domaines monophasiques plutôt étendus selon la teneur en eau du système. C'est à partir de cette ligne de dilution fixée que les expériences suivantes sont effectuées.

Afin de présenter les principales organisations que forment les bâtonnets au sein des complexes lipidiques, dont les membranes demeurent à l'état fluide, on se propose de les illustrer à l'aide d'un exemple de diagramme de phase obtenu pour une bicouche composée de Lécithine à une teneur molaire de 23% et de Simulsol [Ac. O, n=6] à une teneur molaire de 77%, Figure 5.2.1. Dans le domaine le plus hydraté étudié (domaine *I*), une coexistence de phase entre deux empilements lamellaires de bicouches à l'état fluide est mise en évidence. Ces deux empilements lamellaires abritent respectivement une organisation nématique de bâtonnets d'ADN (L_α^N) et une organisation supposée isotrope de molécules d'ADN (L_α^I). Par concentration du système ($\phi_{lip} \gtrsim 0.31$), un large domaine monophasique de l'organisation nématique de l'ADN au sein d'un empilement lamellaire (L_α^N) est caractérisé (domaine *II*). Pour une fraction volumique comprise dans l'intervalle $0.52 \lesssim \phi_{lip} \lesssim 0.58$, une coexistence apparaît entre une organisation hexagonale (L_α^H) et une organisation nématique (L_α^N) de l'ADN dans un empilement lamellaire de bicouches (domaine *III*). Il s'ensuit un domaine monophasique assez étendu de l'organisation hexagonale de l'ADN (L_α^H) au sein de l'empilement lamellaire jusqu'à une concentration volumique $\phi_{lip} \lesssim 0.68$ (domaine *IV*). Enfin, dans un régime plus confiné, une phase de micelles cylindriques inverses de lipides en organisation hexagonale (H_{II}^C) est mise en évidence, les bâtonnets d'ADN se répartissant alors au sein de ces micelles cylindriques. Cette phase se répartie sur un domaine d'hydratation monophasique restreint (domaine *VI*, aucune coexistence de phase avec la phase L_α^H n'est identifiée pour cette composition de membrane), $0.68 \lesssim \phi_{lip} \lesssim 0.71$. Pour une concentration plus élevée, une fraction des molécules de Simulsol [Ac. O, n=6] se séparent de la phase lipides-ADN-eau pour former une phase de Simulsol hydraté (domaine *VII*), caractérisée Section 3.1.5.1.

En vue d'une comparaison du confinement que subissent les membranes avec ou sans ADN au sein du système, le confinement latéral est représenté en fonction du confinement

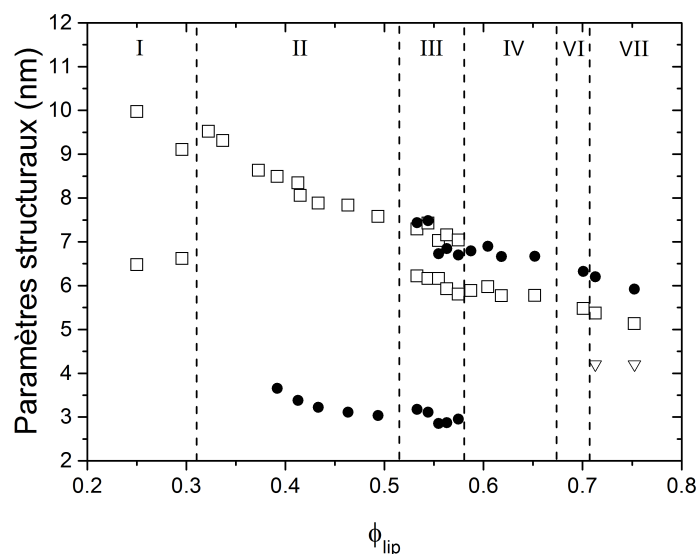


Figure 5.2.1 – Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine (23%) et de Simulsol [Ac. O, $n=6$] (77%). Les tailles structurales sont représentées en fonction de la fraction volumique en lipides ϕ_{lip} . (□) Période d'empilement. (●) Distance entre bâtonnets d'ADN. (▽) Taille structurale de la bosse diffuse. Domaine I : coexistence de phases L_{α}^I et L_{α}^N . Domaine II : phase L_{α}^N . Domaine III : coexistence de phases L_{α}^N et L_{α}^H . Domaine IV : L_{α}^H . Domaine VI : H_{II}^C . Domaine VII : H_{II}^C + phase de Simulsol hydraté. Les pointillés représentent des guides visuels pour séparer les différents domaines de phase.

vertical pour chaque système, Figure 5.2.2. Dans cette représentation, le confinement vertical est identifié par la période d'empilement d de chaque empilement lamellaire des systèmes dits binaire ou ternaire et il est représenté par la distance de répétition entre les plans des micelles cylindriques dans le cadre de la phase H_{II}^C . Le confinement latéral est lui représenté par l'aire moléculaire moyenne Σ de la membrane à l'interface bicouche-eau. L'aire moléculaire Σ est déterminée par la relation 1.3.26 à ceci près que le volume moléculaire v et l'aire moléculaire Σ sont pondérées par les teneurs respectives en Lécithine et en Simulsol comme détaillé à la Section 3.1.4.

Il est à noter que dans le cadre des systèmes ternaires lipides-ADN-eau, les coexistences de phase sont malgré tout représentées *via* cette approche en dépit de son inadéquation. En effet, dans le cadre d'un domaine biphasique entre deux structures 1 et 2, la fraction volumique totale en lipides ϕ_{lip}^{totale} se décompose en deux sous fractions volumiques de lipides ϕ_{lip}^1 (fraction volumique de lipides au sein de la phase 1) et ϕ_{lip}^2 (fraction volumique de lipides au sein de la phase 2) pondérées par les fractions volumiques respectives des phases au sein du système φ et $1 - \varphi$ tel que :

$$\phi_{lip}^{totale} = \varphi \cdot \phi_{lip}^1 + (1 - \varphi) \phi_{lip}^2 \quad (5.2.1)$$

Ces différentes proportions n'étant pas déterminées par notre analyse, on suggère néanmoins une représentation de Σ calculée directement à partir de la fraction volumique totale ϕ_{lip}^{totale} pour chaque structure ($\phi_{lip}^1 = \phi_{lip}^{totale}$ et $\phi_{lip}^2 = \phi_{lip}^{totale}$). Dans le contexte où il y a une coexistence de phase, la valeur de Σ affichée n'est donc pas la valeur réelle de l'aire moléculaire qui est difficilement prédictible.

5.2.2 La coexistence entre l'organisation nématique de bâtonnets d'ADN et l'organisation isotrope au sein d'empilements lamellaires

Dans le régime le plus dilué (domaine I , Figure 5.2.1), la coexistence entre deux empilements lamellaires aux propriétés différentes apparaît. Comme discuté précédemment, ces deux empilements contiennent tous deux des bâtonnets d'ADN en leur sein mais qui s'organisent de manière isotrope pour l'un (L_{α}^I) et sous agencement nématique pour le second (L_{α}^N). Bien que le domaine soit biphasique, il est tout de même possible, à l'aide d'un scan de l'échantillon, astucieux et chanceux, d'obtenir un diffractogramme de l'empilement lamellaire de bicouches L_{α}^I seul, Figure 5.2.3a. Il est caractérisé par deux ordres de Bragg et par la présence d'une bosse diffuse au vecteur d'onde $q \sim 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ résultant du facteur de forme de la bicouche. Le domaine multiphasique est alors mis en évidence grâce à un scan différent de l'échantillon, encart de la Figure 5.2.3a. Les deux ordres de Bragg de la phase L_{α}^I sont retrouvés, mais il y a désormais la présence d'un pic de Bragg qui définit

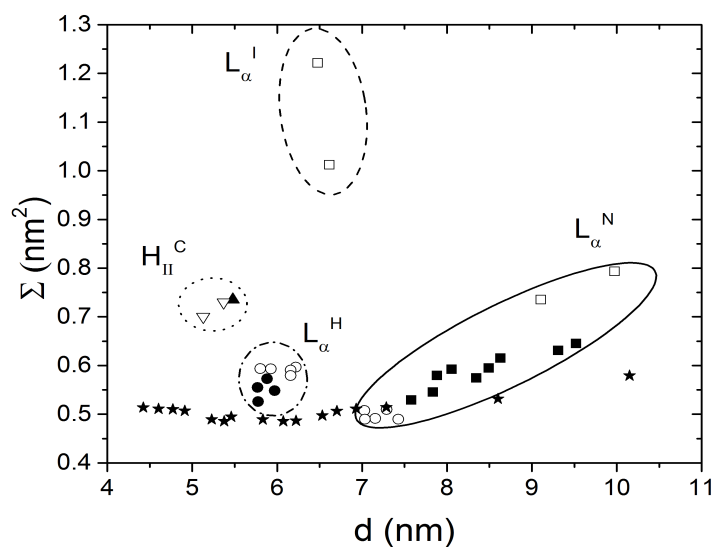
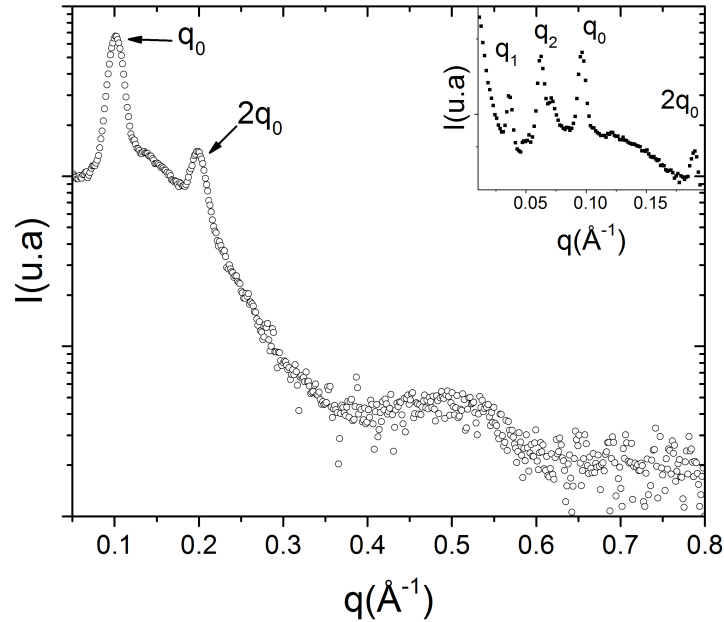


Figure 5.2.2 – Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées à 77% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. L'aire moléculaire Σ est représentée en fonction de la période d'empilement d . Système ternaire lipides-ADN-eau : (\square) coexistence $L_{\alpha}^I + L_{\alpha}^N$, (\circ) coexistence $L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^H$, (∇) coexistence $H_{II}^C +$ Simulsol hydraté, (\blacksquare) L_{α}^N , (\bullet) L_{α}^H , (\blacktriangle) H_{II}^C . Système binaire lipides-eau : (\star).

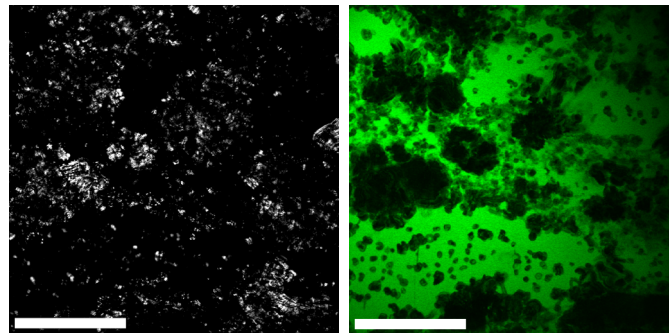
l'empilement lamellaire de la phase L_α^N (au vecteur d'onde q_2) ainsi qu'un troisième pic de Bragg aux plus petits vecteurs d'onde (au vecteur d'onde q_1 , accompagné d'un second ordre mal défini). La phase lamellaire L_α^N sera décrite, elle, plus particulièrement, à la Section 5.2.3 suivante, dans un régime plus concentré où l'organisation nématique des bâtonnets est bien révélée par diffusion de rayons X.

Le pic de Bragg observé au vecteur d'onde q_1 apparaît uniquement dans la zone de coexistence entre les empilements définis comme L_α^I et L_α^N , indépendamment de la teneur en co-tensioactif (à 5% comme à 77%), mais surtout pas de manière systématique (sa présence ou sa non présence ne semblent a priori pas directement liées à la concentration du système). Ce pic caractérise une taille structurale (donnée par la relation de Bragg) qui se situe globalement entre $d \simeq 13.5 \text{ nm}$ et $d \simeq 17.5 \text{ nm}$ en fonction de la concentration et de la teneur en Simulsol [Ac. O, n=6] au sein du système. La nature de ce pic de Bragg (vecteur d'onde q_1) paraît obscure et nécessiterait une étude plus approfondie. Néanmoins il est tout de même possible de suggérer quelques hypothèses expliquant sa présence. Une première consisterait à conclure en la présence d'une autre phase lamellaire : une phase lamellaire lipidique presque entièrement dépourvue d'ADN avec une forte teneur en eau (les bâtonnets d'ADN ne présentent pas de corrélation structurale à cette échelle de taille, voir Tableau 1.4.2). Sa composition de membrane serait alors différente et fortement chargée en Simulsol [Ac. O, n=6] en raison de la valeur élevée de la période d'empilement (voir Figure 3.1.7). Une seconde hypothèse serait de proposer que sa présence soit liée plus particulièrement à la phase L_α^I en définissant par exemple une structure suivant une direction d'orientation distincte (latérale au plan de la bicouche) et qui demanderait alors une optimisation expérimentale afin d'être révélée.

Ce régime très hydraté, exposant une coexistence entre deux phases lamellaires de bicouches à l'état fluide, a déjà été étudié pour des systèmes similaires ADN-lipides-eau composés de Lécithine et de Simulsol en faible quantité ($\leq 30\%$, voisin de la composition chimique du Simulsol [Ac. O, n=10]) [116, 115, 23, 22]. Comme décrit brièvement à la Section 1.4.3, dans ce régime d'hydratation une coexistence de phase entre deux empilements lamellaires est décrite théoriquement à l'aide d'un modèle construit à partir de la théorie de Flory [20, 115]. Ces deux empilements lamellaires contiennent tous deux, dans cette description, de l'ADN agencé entre les membranes mais dans des proportions différentes. Tandis que l'un est très riche en bâtonnets d'ADN, qui manifestent un ordre d'orientation à longue portée (proche de l'organisation nématique), l'autre se voit en être presque dépourvu. Les deux phases lamellaires décrites dans ces travaux possèdent, de plus, des caractéristiques structurales très proches de celles déterminées par notre étude. Il paraît pertinent de conclure que cette coexistence de phase $L_\alpha^I - L_\alpha^N$ résulte d'un auto-assemblage basé sur des interactions d'origine entropique (modèle de Flory) d'autant plus que le système lipides-eau dépourvu d'ADN, à la même concentration en lipides ($\phi_{lip} \sim 0.25$), se situe en limite de dilution dans un régime d'hydratation où le confinement n'a que peu d'impact sur l'hydratation des membranes (les paramètres issues de la différence de densité



(a)



(b)

(c)

Figure 5.2.3 – Caractérisation expérimentale de la phase L_{α}^I . (a) Diffractogramme de rayons X de la phase L_{α}^I identifiée par deux pics de Bragg résultant de la période d'empilement. Encart : diffractogramme de rayons X aux petits angles de la coexistence entre la phase L_{α}^I (q_0 ; $2q_0$), une structure non caractérisée qui peut être associée à la phase L_{α}^I (q_1) et la phase L_{α}^N (q_2). $\phi_{lip} = 0.25$, membrane composée à 77% en Simulsol [Ac. O, $n=6$]. (b) Image de microscopie à lumière polarisée de la coexistence de phases. (c) Image identique mais de microscopie en épifluorescence de la coexistence de phases. Les barres d'échelle correspondent à $500 \mu\text{m}$. $\phi_{lip} = 0.3$, membrane composée à 44% en Simulsol [Ac. O, $n=6$].

électronique demeurent constants, Section 3.1.4.2).

À l'aide de la microscopie à lumière polarisée, on observe une texture biréfringente non homogène sur l'échantillon (séparée entre des zones sombres et des zones éclairées par la biréfringence), caractérisée par la texture présentée sur la Figure 5.2.3b. On remarque alors qu'une grande quantité d'ADN semble se répartir au niveau de ces zones sombres évaluée par la microscopie en épifluorescence, Figure 5.2.3c. Aucune zone en excès d'eau n'est ainsi montrée. Comparant les images 5.1.2c et 5.2.3c, on remarque que la fluorescence associée à l'organisation cholestérique semble plus homogène et moins intense que celle relevée dans le cadre de cette coexistence d'empilements lamellaires. Puisque cette intense fluorescence ne paraît pas associée à une texture biréfringente, on ne peut pas exclure expérimentalement la présence d'une phase ADN-eau qui serait désorganisée et qui coexisterait avec les deux empilements lipidiques.

La phase lamellaire L_{α}^I se caractérise par une faible périodicité bien que le système soit dilué ($d \simeq 6.5 \text{ nm}$, Figure 5.2.1) et qui demeure constante lorsque l'hydratation est variée. Une rapide conclusion serait de postuler que cette phase corresponde à un empilement lamellaire de bicouches de Lécithine en limite de dilution ($d \simeq 6.3 \text{ nm}$, Figure 3.1.4b). En réalité, comme il sera précisé par la suite, Section 5.3.1.5, cette périodicité est dépendante des teneurs respectives en Lécithine et en Simulsol. Cet empilement décrit donc un état « lié » mais, tout comme expliqué Section 5.2.1, il n'est pas possible d'obtenir, sans un modèle thermodynamique, une information sur la variation éventuelle de la concentration en eau au sein de cette phase lamellaire. En effet, bien que la périodicité lamellaire soit invariante, une extension latérale de l'aire des têtes polaires de la membrane reste possible avec l'augmentation de l'hydratation du système, à l'instar des empilements de bicouches composées de longs « copolymères diblocs », identifiés à la Section 4.3.3.

La phase lamellaire L_{α}^N lui est alors opposée en ce sens où cet empilement de bicouches mixtes gonfle avec l'hydratation du système ($d \simeq 9 - 10 \text{ nm}$ sur le domaine de coexistence, Figure 5.2.1) et que sa période d'empilement est plus élevée bien que son apparition ait lieu pour un régime moins hydraté.

5.2.3 L'organisation nématique au sein de l'empilement lamellaire de bicouches

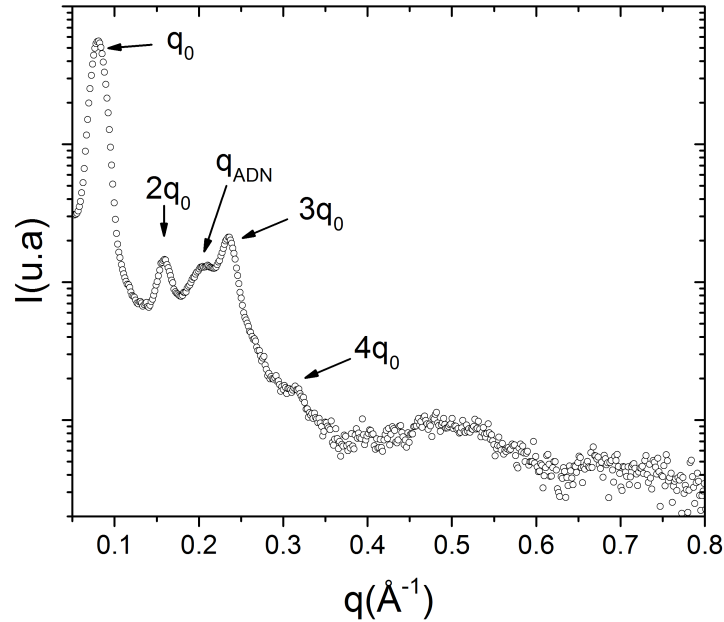
Par déshydratation du système, un domaine monophasique de la structure L_{α}^N est accessible (domaine *II*, Figure 5.2.1). Le diffractogramme associée à cette phase est illustré sur la Figure 5.2.4a. Un renforcement smectique est observé avec la présence de quatre ordres de Bragg qui caractérisent l'empilement lamellaire. De plus, on note la mise en évidence d'une bosse diffuse située entre les deuxième et troisième pics de Bragg de l'empilement (au vecteur d'onde q_{ADN}). Cette bosse diffuse définit un ordre d'orientation moyen entre les bâtonnets d'ADN d'une même couche mettant en lumière une phase nématique des bâtonnets confinés au sein de l'empilement lamellaire, illustrée Figure 1.4.3. D'après une

caractérisation plus fine effectuée par E. T. da Silva, la longueur de corrélation s'étend de 6 à 15 molécules d'ADN, positionnées dans un même plan parallèle à la bicouche, pour un système presque équivalent [23].

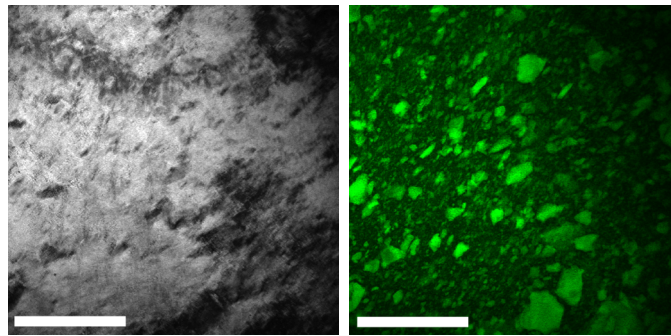
La microscopie à lumière polarisée, associée à cette structure et représentée à la Figure 5.2.4b, confirme la présence d'empilements lamellaires grâce à une biréfringence homogène. Le confinement des bâtonnets d'ADN au sein de ces empilements est justifié par une répartition de la fluorescence sur tout l'échantillon, Figure 5.2.4c, malgré la présence remarquée de regroupements aléatoires plus concentrés des molécules d'ADN. On observe ainsi une ressemblance avec la fluorescence de la phase cholestérique de l'ADN dans de l'eau, Figure 5.1.2c.

La phase L_{α}^N se caractérise par une période d'empilement qui varie grandement sur le domaine monophasique (domaine II, Figure 5.2.1) de $d \simeq 7.6 \text{ nm}$ ($\phi_{lip} \sim 0.52$) à $d \simeq 9.5 \text{ nm}$ ($\phi_{lip} \sim 0.31$). De même, latéralement à la bicouche, l'espacement observé entre les bâtonnets s'accroît de $a \simeq 3 \text{ nm}$ à $a \simeq 3.6 \text{ nm}$. Tout comme le système binaire lipides-eau, ce complexe est sensible à un couplage fort entre confinement vertical et confinement latéral. Cependant, une légère différence apparaît entre les gonflements lamellaires (dans la direction verticale aux bicouches) des deux systèmes lamellaires, Figure 5.2.2. Cette information apporte une preuve que la dilution du système ternaire lipides-ADN-eau ne repose pas uniquement sur des interactions membrane-membrane, où le co-tensioactif tient un rôle prépondérant, mais elle repose aussi sur des interactions membranes-ADN. Néanmoins, la phase nématique des molécules d'ADN au sein de l'empilement lamellaire peut tout de même être comparée au domaine d'hydratation intermédiaire du système binaire lipides-eau, Section 3.1.4.1. Dans ce domaine d'hydratation, les membranes adjacentes « se voient » et les têtes polaires du Simulsol [Ac. O, n=6] commencent à s'enchevêtrer entraînant ainsi une diminution de la longueur hydrophile de la membrane, Section 3.1.4.2. L'épaisseur de la couche aqueuse qui sépare chaque membrane est donc suffisamment diminuée pour permettre des interactions entre chaînes éthoxylées. En raison de la comparaison effectuée entre systèmes lipides-ADN-eau et lipides-eau, il apparaît évident que ces interactions polymériques demeurent en présence des bâtonnets d'ADN et participent alors à l'organisation sous agencement nématique de ces macromolécules unidimensionnelles.

Si l'on effectue une comparaison quantitative entre les deux systèmes avec et sans ADN, on s'aperçoit qu'ils présentent tous les deux une évolution significative et semblable que cela soit pour la période d'empilement d (confinement vertical) ou bien pour l'aire moléculaire Σ de la membrane (confinement latéral), Figure 5.2.2. Dans le régime le plus dilué du domaine monophasique, la phase L_{α}^N se caractérise par le confinement ($d_{N-I} \simeq 9.5 \text{ nm}$, $\Sigma_{N-I} \simeq 0.645 \text{ nm}^2$) alors que l'empilement lamellaire dépourvu d'ADN se définit par le confinement ($d \simeq 9.5 \text{ nm}$, $\Sigma \simeq 0.565 \text{ nm}^2$) à même périodicité lamellaire et apparaît donc légèrement différent. Le point le plus intéressant réside dans la limite confinée du domaine monophasique qui est caractérisé par le confinement ($d_{N-H} \simeq 7.6 \text{ nm}$, $\Sigma_{N-H} \simeq$



(a)



(b)

(c)

Figure 5.2.4 – Caractérisation expérimentale de la phase L_{α}^N . (a) Diffractogramme de rayons X de la phase L_{α}^N identifiée par quatre pics de Bragg (q_0 , $2q_0$, $3q_0$, $4q_0$) résultant de la période d'empilement. L'organisation nématique des bâtonnets d'ADN est identifiée par la bosse diffuse située entre les deuxième et troisième ordres de Bragg (q_{ADN}). $\phi_{lip} = 0.415$, membrane composée à 77% en Simulsol [Ac. O, $n=6$]. (b) Image de microscopie à lumière polarisée de la phase L_{α}^N . (c) Image identique mais de microscopie en épifluorescence de la phase L_{α}^N . Les barres d'échelle correspondent à $500 \mu m$. $\phi_{lip} = 0.39$.

0.525 nm^2) et qui correspond quasiment à l'identique au confinement auquel est soumise la membrane du système dépourvu d'ADN dans de telles conditions d'hydratation ($d \simeq 7.6 \text{ nm}$, $\Sigma \simeq 0.51 \text{ nm}^2$).

5.2.4 La transition nématique-hexagonale au sein de la phase lamellaire

Cette limite de confinement atteinte (d_{N-H} , Σ_{N-H}), qui pointe la transition de phase entre un agencement nématique de l'ADN (L_α^N) et une organisation hexagonale (L_α^H) au sein d'un empilement lamellaire (domaine *III*) [26, 23], se trouve relativement proche de la limite de confinement ($d_2 = 7.1 \text{ nm}$, $\Sigma_{12} = 0.51 \text{ nm}^2$), identifiée à la Section 3.1.4.1, pour le système dépourvu d'ADN. Ce confinement critique (d_2 , Σ_{12}) marque un changement de régime d'hydratation de la membrane et une réorganisation membranaire pour le complexe binaire lipides-eau. Cette transition de phase entre un empilement lamellaire « concentré » et un empilement lamellaire « dilué » est, par ailleurs, mise en évidence de manière plus explicite par la présence d'une coexistence de phase lorsque la longueur de la chaîne éthoxylée du Simulsol est augmentée modifiant ainsi les interactions polymériques à la surface d'une même membrane (latérales) mais aussi entre membranes adjacentes (verticales), Section 4.3.

Par conséquent, une corrélation semble poindre entre la transition de phase lamellaire-lamellaire du complexe binaire lipides-eau et la transition de phase nématique-hexagonale du système ternaire lipides-ADN-eau. Le changement de structure des bicouches, issu d'un confinement appliqué plus intense, est sans doute la raison pour laquelle une organisation différente de l'ADN apparaît. Alors que l'organisation nématique d'ADN résulte des interactions avec une membrane qui définit l'empilement lamellaire « dilué », l'organisation hexagonale apparaît comme la conséquence des interactions entre les bâtonnets d'ADN et la membrane (après réorganisation moléculaire) de l'empilement lamellaire « concentré ».

L'organisation hexagonale des bâtonnets d'ADN au sein d'un empilement lamellaire de bicouches lipidiques L_α^H (domaine *IV*, Figure 5.2.1) est caractérisée par le diffractogramme présenté sur la Figure 5.2.5a. Celui-ci présente 6 pics qui possèdent chacun une relation mathématique avec le premier pic de Bragg situé au vecteur d'onde q_0 . En effet, pour une symétrie hexagonale à deux dimensions des bâtonnets d'ADN, illustrée Figure 1.4.3, les différents pics de Bragg sont prédits géométriquement de se trouver aux vecteurs d'onde suivants [22] :

$$q_{hk} = \frac{2\pi}{d} \sqrt{h^2 + hk + k^2} = \frac{4\pi}{a} \sqrt{\frac{h^2 + hk + k^2}{3}} \quad (5.2.2)$$

ce qui amène aux vecteurs d'onde : q_0 ; $q_{11} = \sqrt{3}q_0$; $q_{20}, q_{02} = 2q_0$; $q_{21}, q_{12} = \sqrt{7}q_0$; $q_{30}, q_{03} = 3q_0$; $q_{22} = \sqrt{12}q_0 \dots$

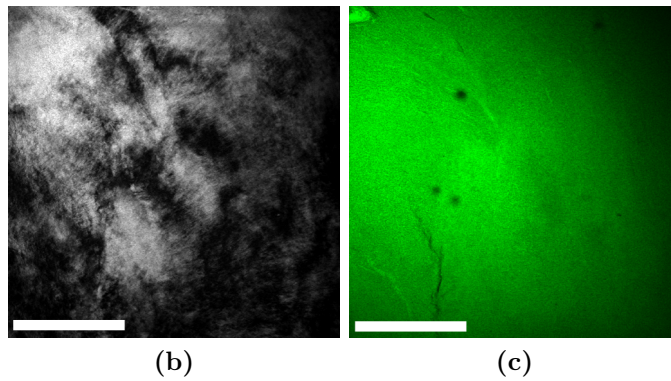
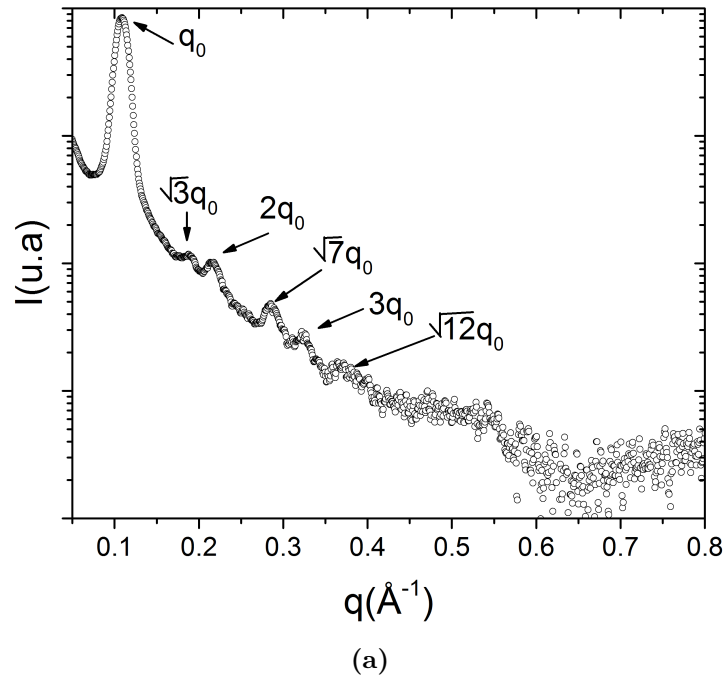


Figure 5.2.5 – Caractérisation expérimentale de la phase L_{α}^H . (a) Diffractogramme de rayons X de la phase L_{α}^H identifiée par six pics de Bragg. $\phi_{lip} = 0.65$, membrane composée à 77% en Simulsol [Ac. O, $n=6$]. (b) Image de microscopie à lumière polarisée de la phase L_{α}^H . (c) Image identique mais de microscopie en épifluorescence de la phase L_{α}^H . Les barres d'échelle correspondent à $500 \mu\text{m}$. $\phi_{lip} = 0.62$.

La microscopie à lumière polarisée révèle une texture biréfringente homogène, Figure 5.2.5b, proche de celle observée pour la phase L_α^N , Figure 5.2.4b caractérisant une biréfringence issue d'un empilement lamellaire de bicouches entre lesquelles les molécules d'ADN sont insérées. La microscopie en épifluorescence indique une répartition concentrée et homogène de l'ADN au sein de l'échantillon, Figure 5.2.5c.

Lorsque l'hydratation du système est variée, le confinement vertical auquel est soumis l'empilement de bicouches de la phase L_α^H demeure, à l'instar de la phase L_α^I bien que le domaine soit désormais monophasique (domaine IV , Figure 5.2.1), constant avec une périodicité lamellaire $d = 5.8 \text{ nm}$, soit un paramètre de maille hexagonale $a = \frac{2}{\sqrt{3}}d = 6.7 \text{ nm}$. Le gonflement lamellaire s'effectue donc essentiellement latéralement avec une aire moléculaire qui varie depuis la limite la plus diluée de $\Sigma_{H-N} \simeq 0.58 \text{ nm}^2$ à $\Sigma_{H-H_{II}^C} \simeq 0.52 \text{ nm}^2$.

Ainsi, de la même manière que la phase L_α^I , la phase L_α^H existe jusqu'à une certaine limite critique de confinement ($d_{H-H_{II}^C} \simeq 5.8 \text{ nm}$, $\Sigma_{H-H_{II}^C} \simeq 0.52 \text{ nm}^2$) qui correspond assez sensiblement au confinement auquel est soumise la membrane lorsqu'il n'y a pas de molécules d'ADN au sein du système ($d \simeq 5.8 \text{ nm}$, $\Sigma \simeq 0.49 \text{ nm}^2$), Figure 5.2.2. Le régime d'hydratation intermédiaire du système lipides-eau est approximé par un plateau de confinement latéral (en fait, évolution légèrement parabolique de l'aire moléculaire Σ) qui est défini entre les confinements critiques (d_1, Σ_{12}) et (d_2, Σ_{12}), Section 3.1.4.1. La limite de confinement associée à l'organisation hexagonale des bâtonnets d'ADN au sein de l'empilement ($d_{H-H_{II}^C}, \Sigma_{H-H_{II}^C}$) est alors relativement proche du confinement associé à l'extrémité concentrée du domaine d'hydratation intermédiaire du système binaire lipides-eau ($d_1 = 5.3 \text{ nm}$, $\Sigma_{12} = 0.51 \text{ nm}^2$) et délimitant donc la transition avec le domaine d'hydratation confiné.

5.2.5 La structure hexagonale inverse de lipides neutres pour organiser l'ADN

Enfin, lorsque le système se concentre, c'est-à-dire lorsque le confinement que subie la bicouche est plus accentué que la limite ($d_{H-H_{II}^C}, \Sigma_{H-H_{II}^C}$), un changement profond de structure lipidique a lieu, Figure 5.2.1 (domaine VI). Une coexistence de phase (domaine V) est aussi parfois détectée mais pas pour cette proportion en Lécithine (23%) et en Simulsol [Ac. O, n=6] (77%). La nouvelle structure se définit, comme la phase L_α^H , par une symétrie hexagonale à deux dimensions comme cela est révélé par le diffractogramme, Figure 5.2.6a. Les pics de Bragg se succèdent donc suivant la même logique que celle décrite à la Section 5.2.4. En outre, malgré le confinement augmenté, les chaînes aliphatiques demeurent à l'état fluide.

La coexistence de phase observée pour d'autres compositions de membrane implique qu'il y ait soit un changement de structure ou soit un autre changement de régime d'hydratation des bicouches (à l'image des coexistences lamellaire-lamellaire). Une compa-

raison des diffractogrammes des phases hexagonales (dans des conditions expérimentales similaires) est représentée sur la Figure 5.2.6b. On remarque que les ordres supérieurs n'apparaissent plus pour la nouvelle structure. Si seule l'hydratation était diminuée, la diminution de la périodicité (observée), qui serait celle d'un empilement similaire à celui de la phase L_{α}^H , entraînerait alors très vraisemblablement un renforcement de ces pics de Bragg qui seraient ainsi mieux résolus. Ce n'est pas le cas constaté ici. De plus, l'évolution de l'intensité de diffusion en fonction des vecteurs d'onde apparaît différente sur chaque diffractogramme. Une hypothèse pertinente est donc de supposer que le facteur de forme (de la structure auto-assemblée) soit modifié.

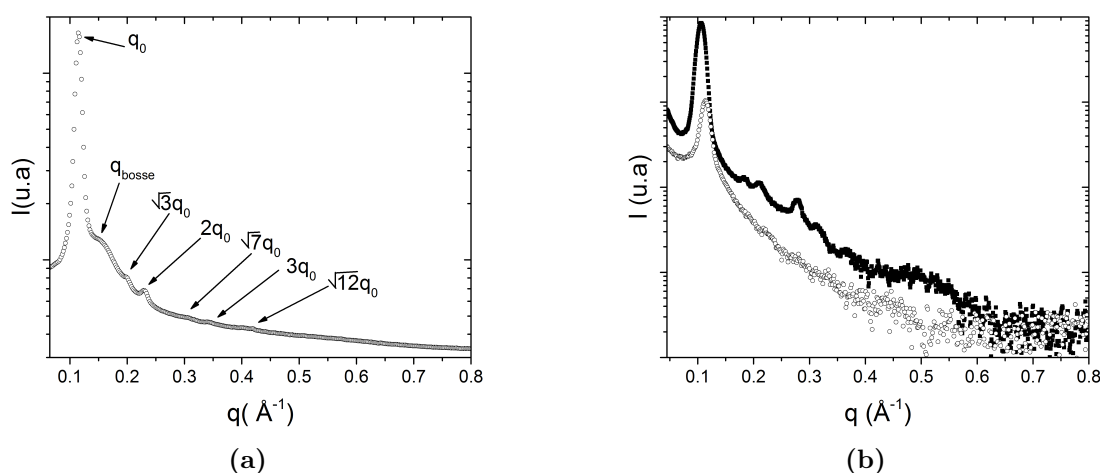


Figure 5.2.6 – Caractérisation expérimentale de la phase H_{II}^C . (a) Diffractogramme de rayons X aux petits angles de la coexistence entre une phase H_{II}^C et une phase de Simulsol hydraté. Les six ordres de Bragg caractérisent la maille hexagonale. La bosse diffuse (q_{bosse}) caractérise la phase de Simulsol hydraté. $\phi_{lip} = 0.715$, membrane composée à 77% en Simulsol [Ac. O, $n=6$]. (b) Comparaison des diffractogrammes aux petits angles entre les phases (■) L_{α}^H ($\phi_{lip} = 0.65$, membrane composée à 77% en Simulsol [Ac. O, $n=6$]) et (○) H_{II}^C . La différence de résolution des pics de Bragg entre (a) et (b) provient de l'utilisation de deux dispositifs expérimentaux distincts (respectivement Anode et Nanostar).

Si l'on se réfère aux lipides cationiques, discutés Section 1.4.2, des symétries hexagonales de l'ADN au sein de complexes lipidiques ont été étudiées avec notamment des structures telles que les phases hexagonales de micelles cylindriques directes H_I^C et inverses H_{II}^C qui confinent les molécules d'ADN, représentées Figure 1.4.2. Dans notre cas, une méthode permettant de distinguer quelle structure est mise en évidence avec l'augmentation du confinement serait de décrire géométriquement la ligne de dilution de ces structures (avec les différentes fractions volumiques des constituants lipides-ADN-eau : ϕ_{lip} , ϕ_{ADN} et ϕ_{eau}).

Pour la phase H_I^C , la description géométrique donne accès aux relations suivantes :

$$\phi_{lip} = \frac{\pi\delta_m^2}{4ad}; \quad \phi_{ADN} = \frac{\pi\Phi_{ADN}^2}{4ad}; \quad \phi_{eau} = 1 - \phi_{lip} - \phi_{ADN} \quad (5.2.3)$$

Pour la phase H_{II}^C , les relations géométriques sont [23] :

$$\phi_{lip} = 1 - \phi_{lip} - \phi_{ADN}; \quad \phi_{ADN} = \frac{\pi\Phi_{ADN}^2}{4ad}; \quad \phi_{eau} = \frac{\pi(a-\delta_m)^2}{4ad} - \phi_{ADN} \quad (5.2.4)$$

avec d la périodicité entre les plans de répétition, $a = \frac{2}{\sqrt{3}}d$ le paramètre de la maille hexagonale, δ_m l'épaisseur de la membrane de lipides, Φ_{ADN} le diamètre de la molécule d'ADN assimilée à un cylindre.

Dans cette représentation, le paramètre δ_m semble particulièrement compliqué à évaluer lorsque l'hydratation est modifiée en raison de l'évolution possible de l'aire moléculaire moyenne Σ des lipides. Il convient donc de comparer plus spécifiquement le confinement imposé par chaque structure et notamment d'évaluer cette aire moléculaire moyenne Σ .

Pour la phase H_I^C , la description géométrique définit l'aire moléculaire Σ à l'interface lipides-eau comme :

$$\Sigma = \sqrt{\frac{\sqrt{3}\pi\bar{v}^2}{2\phi_{lip}d^2}} \quad (5.2.5)$$

Pour la phase H_{II}^C , l'aire moléculaire Σ à l'interface lipides-eau est définie géométriquement telle que :

$$\Sigma = \frac{2\bar{v}}{d\left(\frac{2}{\sqrt{3}} - \sqrt{\frac{8}{\pi\sqrt{3}}(1 - \phi_{lip})}\right)} \quad (5.2.6)$$

avec \bar{v} le volume moléculaire moyen pondéré par les teneurs des molécules amphiphiles au sein de la micelle et par les volumes respectifs v_L et v_S de la Lécithine et du Simulsol.

Ce faisant, les aires moléculaires calculées expérimentalement pour cette composition de membrane (77% en Simulsol [Ac. O, n=6], $\phi_{lip} = 0.68$) et à une périodicité $d = 5.5 \text{ nm}$ (Figure 5.2.1, Domaine VI) sont $\Sigma_{H_I^C} \simeq 0.41 \text{ nm}^2$ et $\Sigma_{H_{II}^C} \simeq 0.77 \text{ nm}^2$. Si une comparaison avec le système dépourvu d'ADN est maintenant effectuée, Figure 5.2.2, il est constaté que l'aire $\Sigma_{H_{II}^C}$ est, d'une part, plus étendue que celle de l'aire moléculaire de la bicouche à même périodicité et correspond en ordre de grandeur, d'autre part, à l'aire moléculaire $\Sigma_{lim} \sim 0.8 \text{ nm}^2$ atteinte lorsque les bicouches empilées sont en limite de dilution (du système lipides-eau, voir Figure 3.1.10b). L'aire $\Sigma_{H_I^C}$ (non représentée sur la Figure 5.2.2) est, quant à elle, plus confinée que l'aire moléculaire à l'interface bicouches-eau du système lipides-eau et ce sur toute sa ligne de dilution. Il est par conséquent entropiquement plus probable, du fait de cette aire moléculaire plus grande et en considérant que les molécules restent dans une conformation similaire à celle qu'elles présentent au sein de la bicouche, que la structure à symétrie hexagonale soit une phase de micelles inverses de lipides qui encapsulent en leur cœur les molécules d'ADN hydratées H_{II}^C .

Pour des membranes dont la teneur en Simulsol [Ac. O, n=6] est suffisamment importante, on observe dans le domaine très faiblement hydraté (domaine *VII*), une coexistence de phase entre la phase H_{II}^C et une phase de Simulsol hydraté (voir Section 3.1.5.1). Cette phase de Simulsol hydraté se caractérise par la présence d'une bosse diffuse qui apparaît au vecteur d'onde q_{bosse} sur le diffractogramme de la Figure 5.2.6a et correspond à une phase très concentrée en Simulsol [Ac. O, n=6] ($\phi_{lip} > 0.67$). Bien que la fraction de molécules de Simulsol [Ac. O, n=6] séparées de la phase H_{II}^C ne soit pas définie, le confinement imposé aux membranes de la phase H_{II}^C est tout de même représenté Figure 5.2.2, en faisant l'hypothèse que la quantité de Simulsol [Ac. O, n=6] éjectée est négligeable.

La phase de micelles cylindriques H_{II}^C présente une biréfringence, sous microscopie à lumière polarisée illustrée Figure 5.2.7a, qui se distingue des textures observées pour les bicouches empilées par son aspect plus localisé donc moins diffus. Les zones sombres peuvent provenir d'interférences destructives selon l'orientation de l'échantillon observée ou bien de la présence de la phase de Simulsol hydraté qui est isotrope. Sous épifluorescence, la microscopie révèle une répartition très organisée de l'ADN, au sein des micelles cylindriques structurées selon une symétrie hexagonale, et qui apparaît homogène sur tout l'échantillon, Figure 5.2.7b.

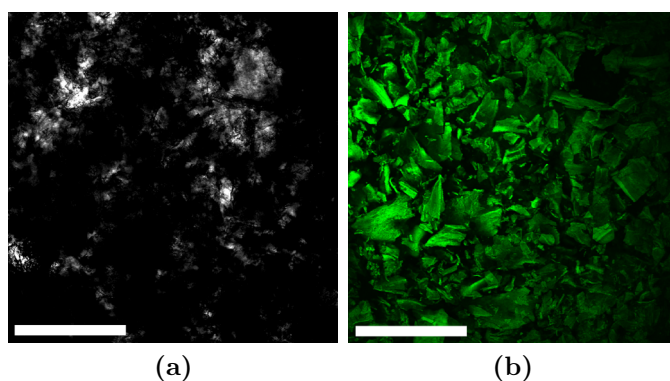


Figure 5.2.7 – Structure hexagonale de micelles lipidiques inverses contenant de l'ADN caractérisée par microscopie. (a) Image de microscopie optique à lumière polarisée. (b) Image de microscopie en épifluorescence. Les barres d'échelle représentent 500 μm .

5.3 Effet des interactions interfaciales stériques stabilisant les structures d'ADN

Le confinement auquel sont soumises les membranes lipidiques contrôle les différentes structures que forme le système lipides-ADN-eau. Par diminution de l'hydratation du

système, les phases suivantes apparaissent successivement : L_{α}^I , L_{α}^N , L_{α}^H et H_{II}^C . Ces différentes organisations s'effectuent pour des confinements bien précis qui sont caractérisés par une périodicité d et une aire moléculaire par tête polaire Σ variant suivant l'hydratation du système. Or, il a été démontré aux chapitres 3 et 4 que le confinement du complexe lipidique dépourvu d'ADN est aussi sensible à la teneur en co-tensioactif au sein de la membrane « poilue » et à la longueur de sa partie hydrophile. De plus, les interactions membranes-ADN sont fortement suggérées d'intervenir sur la stabilisation des différents auto-assemblages notamment pour les transitions $L_{\alpha}^I - L_{\alpha}^N$ et $L_{\alpha}^N - L_{\alpha}^H$. Il semble donc pertinent de s'intéresser aux interactions interfaciales, modulées par les chaînes éthoxylées du co-tensioactif, qui peuvent donc jouer un rôle sur la l'organisation des molécules d'ADN.

5.3.1 Effet de la densité de greffage en Simulsol à la surface de la bicouche

5.3.1.1 Membranes de Simulsol [Ac. O, n=6]

Les systèmes composés essentiellement de Simulsol [Ac. O, n=6] et d'eau présentent un diagramme de phase assez différent de celui commenté à la Section 5.2 pour des bicouches mixtes, Figure 5.3.1. Dans le domaine hydraté (domaine II , $\phi_{lip} < 0.35$), l'organisation nématique des bâtonnets d'ADN au sein d'un empilement de bicouches est retrouvée associée à une période d'empilement élevée $d \geq 10 \text{ nm}$ dans la direction verticale et à une distance entre bâtonnets $a \geq 3.8 \text{ nm}$.

Lorsque le système se concentre, une nouvelle structure apparaît (domaine E , Figure 5.3.1) dans la gamme d'hydratation $0.35 \leq \phi_{lip} \leq 0.49$. Cette structure est caractérisée par le diffractogramme représenté sur la Figure 5.3.2. Un empilement lamellaire de bicouches flexible semble définir cette structure. En effet, deux ordres lamellaires diffus, d'intensités maximales relatives faible, sont observés ainsi que deux bosses diffuses ($q \simeq 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ et $q \simeq 0.75 \text{ \AA}^{-1}$) issues du facteur de forme de la bicouche. Les chaînes aliphatiques restent au sein de cette phase à l'état fluide. En revanche, il n'y a pas de signe apparent d'une organisation de l'ADN. La périodicité de cet empilement lamellaire (nommé phase $L_{\alpha}^?$) s'étend alors de $d = 6 \text{ nm}$ à $d = 7.4 \text{ nm}$

La microscopie à lumière polarisée révèle une biréfringence presque homogène qui confirme la présence de la phase lamellaire, Figure 5.3.3a. La fluorescence associée aux molécules d'ADN semble indiquer que les molécules d'ADN se trouvent bien confinées au sein de ces empilements lamellaires, Figure 5.3.3b. Les zones sombres que l'on peut remarquer sont supposées provenir soit de gouttes d'eau extérieures aux empilements de bicouches (bien que le système soit macroscopiquement homogène) soit d'une phase de

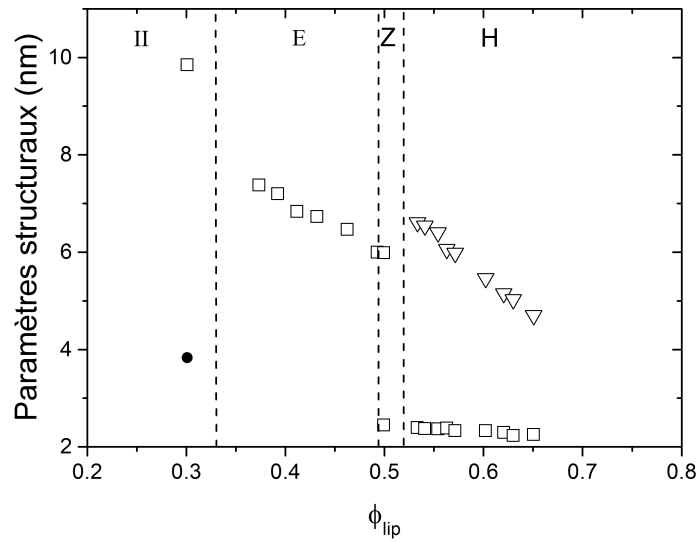


Figure 5.3.1 – Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de tensioactifs Simulsol [Ac. O, $n=6$]. Les tailles structurales sont représentées en fonction de la fraction volumique en lipides ϕ_{lip} . (□) Période d'empilement. (●) Distance entre bâtonnets d'ADN. (▽) Taille structurale de la bosse diffuse. Domaine II : L_{α}^N . Domaine E : phase $L_{\alpha}^?$. Domaine Z : coexistence de phases $L_{\alpha}^?$ et S_H . Domaine H : coexistence de phase S_H + phase de Simulsol hydraté. Les pointillés représentent des guides visuels pour séparer les différents domaines.

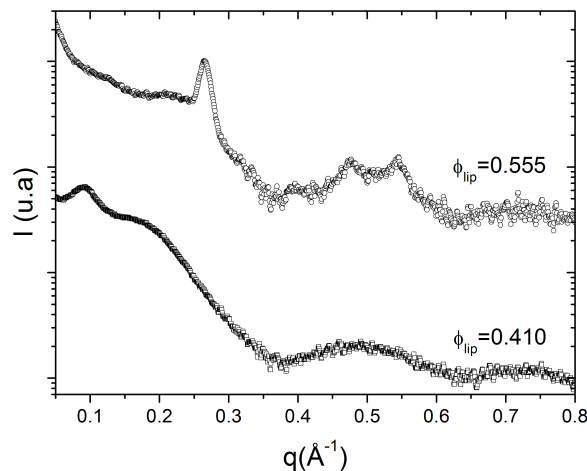


Figure 5.3.2 – Caractérisation par diffusion de rayons X de systèmes ternaires Simulsol [Ac. O, $n=6$]-ADN-eau. Le diffractogramme du haut représente la phase S_H . Le diffractogramme du bas représente la phase L_α .

Simulsol [Ac. O, $n=6$] hydraté (assez concentrée pour ne pas présenter une structure lamellaire) qui serait en quantité trop faible pour apparaître sur les diffractogrammes.

Une déshydratation plus importante du système engendre alors une autre transition de phase comme cela est prouvé par la coexistence de phase affichée sur un domaine restreint de confinement ($0.49 \leq \phi_{lip} \lesssim 0.52$ sur le domaine Z , Figure 5.3.1). La nouvelle phase se caractérise par le diffractogramme représenté sur la Figure 5.3.2. Quatre pics de Bragg se distinguent bien qu'ils ne soient pas tous suffisamment bien résolus. Il est possible d'envisager une relation entre ces pics à partir du premier ordre de Bragg, au vecteur d'onde q_0 , qui serait $q_1 \sim \sqrt{2}q_0$, $q_2 \sim \sqrt{3}q_0$ et $q_4 \sim 2q_0$ mais la caractérisation de cette structure nécessite plus d'approfondissements (cette phase n'apparaît expérimentalement que pour cette unique composition parmi celles étudiées). Si l'on considère seulement le premier pic de Bragg (un seul paramètre pour caractériser la structure), on obtient une taille structurale $d = 2.4 \text{ nm}$ qui correspond donc à une organisation très confinées (le diamètre d'un bâtonnet Φ_{ADN} est d'environ 2 nm). Cette taille structurale est très proche de celle obtenue pour caractériser la distance de répétition de la phase hexagonale d'ADN dans de l'eau (sans lipides, Section 5.1) soit $d \simeq 2.5 \text{ nm}$. Ainsi, il apparaît plausible que cette structure soit essentiellement constituées de bâtonnets d'ADN dans de l'eau, avec seulement une légère teneur en co-tensioactif, et qu'elle adopte une organisation proche de l'organisation hexagonale (on la nomme alors S_H). La phase S_H est, de plus, définie par une biréfringence homogène, Figure 5.3.3c, et une fluorescence intense homogène sur l'échantillon, Figure 5.3.3d.

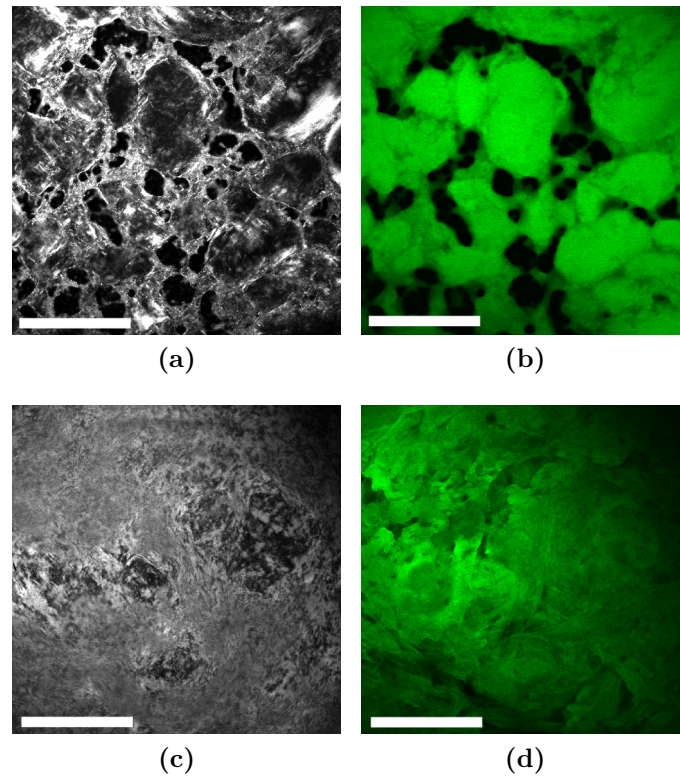


Figure 5.3.3 – Caractérisation par microscopie de systèmes Simulsol [Ac. O, $n=6$]-ADN-eau. (a) Image de microscopie optique à lumière polarisée de la phase $L_{\alpha}^?$. (b) Image de microscopie en épifluorescence de la phase $L_{\alpha}^?$. (c) Image de microscopie optique à lumière polarisée de la phase S_H . (d) Image de microscopie en épifluorescence de la phase S_H . Les barres d'échelle représentent $500 \mu\text{m}$.

Dans le régime le plus concentré (domaine H , $\phi_{lip} \geq 0.52$), une dernière coexistence de phase, observée dès l'échelle macroscopique, est mise en évidence entre la phase S_H et une phase de Simulsol [Ac. O, n=6] hydraté qui est caractérisée par une bosse diffuse aux rayons X sensible à l'hydratation, voir Section 3.1.5.1. Ainsi, il apparaît qu'une importante partie du Simulsol [Ac. O, n=6] se sépare de la phase constituée de l'ADN et que cette phase de co-tensioactif-eau n'est pas suffisamment diluée pour présenter une structure sous la forme de bicouches empilées ($\phi_{lip} \geq 0.67$). On constate enfin que la périodicité de la phase S_H demeure, elle, quasiment constante avec la variation de l'hydratation ($d \simeq 2.3 \text{ nm}$) à l'image de l'organisation hexagonale des molécules d'ADN hydratées.

Des études portant sur les interactions entre des molécules d'ADN et de copolymères diblocs [55] ou triblocs [39], de nature amphiphile, électriquement neutres et dont la partie hydrophile est composée de groupements PEO, ont été entreprises. Celles-ci démontrent que les interactions entre les copolymères et l'ADN peuvent être de faible intensité [55] et sont essentiellement répulsives [39]. L'origine évaluée est que ce sont des interactions stériques c'est-à-dire résultant d'effets de volume exclu. En raison de ces séparations de phase observées, l'interaction entre le Simulsol [Ac. O, n=6] et les molécules d'ADN semble être, de même, essentiellement répulsive, spécifiquement dans le domaine concentré.

5.3.1.2 Membranes de composition 56(L)/44(S)

Lorsque de la Lécithine est ajoutée en faible quantité à la composition de la membrane (Lécithine : 23% et Simulsol 77% , Figure 5.2.1), le diagramme de phase en est radicalement modifié avec l'apparition de structures L_α^I , L_α^N , L_α^H , H_{II}^C et de Simulsol hydraté comme cela a été discuté à la Section 5.2. Si la teneur en co-tensioactif est de nouveau diminuée (44% en Simulsol [Ac. O, n=6]), l'alternance des phases reste similaire, Figure 5.3.4. Néanmoins, la largeur des domaines de phase en est affectée.

Le domaine de coexistence entre les phases L_α^I et L_α^N (domaine I) s'étend jusqu'à une fraction volumique $\phi_{lip} \sim 0.45$ ce qui correspond à un domaine d'hydratation plus large que pour le système plus fortement chargé en Simulsol [Ac. O, n=6] ($\phi_{lip} \leq 0.31$, Figure 5.2.1). Le domaine monophasique de la phase L_α^N (domaine II) se voit donc être raccourci ($0.45 \leq \phi_{lip} \leq 0.54$) alors que la limite de transition et la coexistence avec la phase L_α^H (domaine III) demeurent, elles, inchangées. Le domaine de la phase L_α^H se définit sur l'intervalle $0.57 \leq \phi_{lip} \leq 0.66$ et est donc conservé à l'identique. Une coexistence de phase entre les structures L_α^H et H_{II}^C (domaine V) est mise en évidence, par diminution de la teneur en co-tensioactif, sur le domaine d'hydratation $0.66 \leq \phi_{lip} \leq 0.74$. Ceci implique donc que le domaine monophasique H_{II}^C (domaine VI) soit désormais caractérisé par une concentration en lipides plus importante.

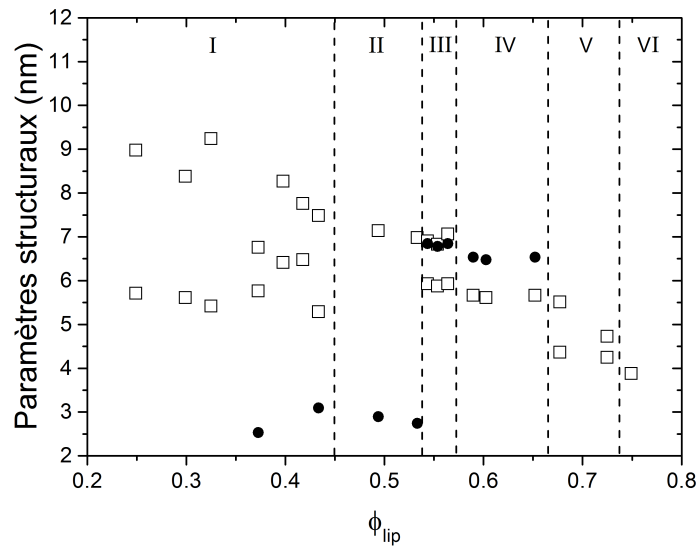


Figure 5.3.4 – Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine (56%) et de Simulsol [Ac. O, $n=6$] (44%). Les tailles structurales sont représentées en fonction de la fraction volumique en lipides ϕ_{lip} . (\square) Période d'empilement. (\bullet) Distance entre bâtonnets d'ADN. Domaine I : coexistence de phases L_{α}^I et L_{α}^N . Domaine II : phase L_{α}^N . Domaine III : coexistence de phases L_{α}^N et L_{α}^H . Domaine IV : L_{α}^H . Domaine V : coexistence de phase L_{α}^H et H_{II}^C . Domaine VI : H_{II}^C . Les pointillés représentent des guides visuels pour séparer les différents domaines du diagramme.

Les tailles structurales se voient être, plus ou moins, diminuées avec la diminution des interactions stériques provenant des chaînes éthoxylées, Figure 5.3.5. La phase L_{α}^I se définit par une périodicité quasi constante $d_I \sim 5.6 \text{ nm}$ ($d_I \sim 6.5 \text{ nm}$ pour une membrane composée à 77% de Simulsol [Ac. O, n=6]) tandis que l'aire moléculaire estimée est définie à partir d'une valeur plus restreinte, $\Sigma_{I-N} \simeq 0.85 \text{ nm}^2$ (contre $\Sigma_{I-N} \simeq 1 \text{ nm}^2$). La phase L_{α}^N se stabilise (sans coexistence) pour une périodicité lamellaire $d_N \sim 7 - 7.4 \text{ nm}$ (contre $7.6 \text{ nm} \leq d_N \leq 9.5 \text{ nm}$, 77% en Simulsol) et pour une aire moléculaire $\Sigma_N \simeq 0.61 \text{ nm}^2$ (contre $0.525 \text{ nm}^2 \leq \Sigma_N \leq 0.645 \text{ nm}^2$). La phase L_{α}^H possède une taille structurale $d_H \simeq 5.6 \text{ nm}$ qui ne diminue que très légèrement (contre $d_H \simeq 5.8 \text{ nm}$, 77% en Simulsol) et une aire moléculaire plus large $0.605 \text{ nm}^2 \leq \Sigma_H \leq 0.67 \text{ nm}^2$ (contre $0.52 \text{ nm}^2 \leq \Sigma_H \leq 0.58 \text{ nm}^2$). Enfin, la phase H_{II}^C indique une taille structurale $d_{H_{II}^C} \simeq 3.9 \text{ nm}$ qui se raccourcit (contre $d_{H_{II}^C} \simeq 5.5 \text{ nm}$) de même que l'aire moléculaire $\Sigma_{H_{II}^C} \simeq 1.05 \text{ nm}^2$ (contre $\Sigma_{H_{II}^C} \simeq 0.74 \text{ nm}^2$). La coexistence avec une phase de Simulsol hydraté n'est pas identifiée pour la plage de concentrations étudiées. Ainsi, les phases L_{α}^N et H_{II}^C sont les plus affectées par la diminution de la teneur en Simulsol [Ac. O, n=6] avec des domaines monophasiques moins bien définis.

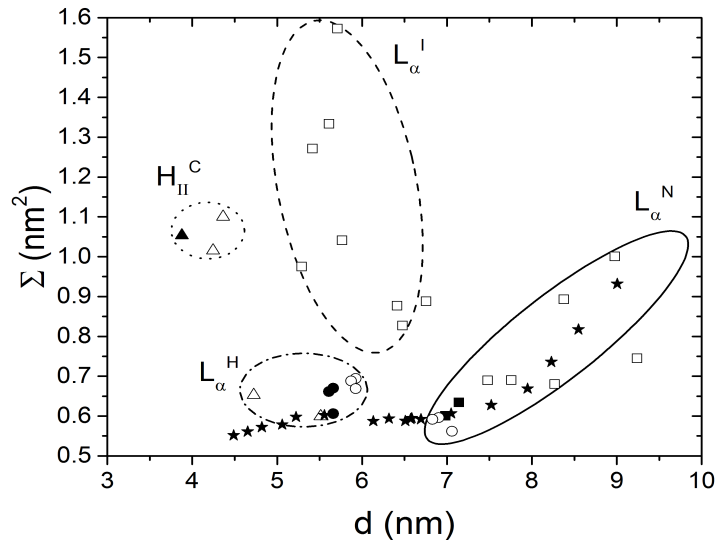


Figure 5.3.5 – Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées à 44% de Simulsol [Ac. O, n=6]. L'aire moléculaire Σ est représentée en fonction de la période d'empilement d . Système ternaire lipides-ADN-eau : (□) coexistence $L_{\alpha}^I + L_{\alpha}^N$, (○) coexistence $L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^H$, (Δ) coexistence $L_{\alpha}^H + H_{II}^C$, (■) L_{α}^N , (●) L_{α}^H , (▲) H_{II}^C . Système binaire lipides-eau : (★).

Par comparaison avec le système binaire lipides-eau, Figure 5.3.5, les similitudes commentées à la Section 5.2 sont aussi remarquées pour cette composition de membrane. La bicouche de la phase L_α^N est confrontée à un confinement presque identique (pour cette composition) à celui de la bicouche du système dépourvu d'ADN. Elles sont toutes deux sensibles aux confinements latéral et vertical avec des variations conséquentes de la période d'empilement d et de l'aire moléculaire Σ . La transition avec la phase L_α^H s'effectue au confinement critique ($d_{N-H} = 7 \text{ nm}$, $\Sigma_{N-H} = 0.6 \text{ nm}^2$) ce qui correspond au confinement indiquant la transition de phase lamellaire-lamellaire du système binaire ($d_2 = 6.9 \text{ nm}$, $\Sigma_{12} = 0.6 \text{ nm}^2$). De même, la transition entre les phases L_α^H et H_{II}^C apparaît pour un confinement ($d_{H-H_{II}^C} = 5.7 \text{ nm}$, $\Sigma_{H-H_{II}^C} = 0.6 \text{ nm}^2$) qui est identifiée à la transition entre les régimes d'hydratation « intermédiaire » et « confiné » du système binaire ($d_1 = 5.4 \text{ nm}$, $\Sigma_{12} = 0.6 \text{ nm}^2$). Pour finir, l'aire moléculaire lipidique qui définit la structure H_{II}^C est du même ordre de grandeur que l'aire moléculaire caractérisant la limite de dilution de l'empilement lamellaire lipides-eau : $\Sigma_{H_{II}^C} \simeq 1.05 \text{ nm}^2$ pour $\Sigma_{lim} \simeq 0.93 \text{ nm}^2$ (Figure 3.1.10b).

5.3.1.3 Membranes de composition 70(L)/30(S)

Quand la membrane lipidique est composée majoritairement de Lécithine (70% en Lécithine, 30% en Simulsol [Ac. O, n=6]), un important changement sur le diagramme de phase est observé, Figure 5.3.6. D'une manière générale, les domaines monophasiques précédemment caractérisés disparaissent laissant place à des domaines multiphasiques (deux phases ou plus, de symétrie supposée à deux ou à trois dimensions). Le domaine dilué qui comprend la coexistence entre les phases L_α^I et L_α^N (domaine *I*) perdure jusqu'à une fraction volumique $\phi_{lip} \simeq 0.42$, limite qui paraît inchangée par l'ajout de Lécithine en plus grande quantité. La coexistence entre les phases L_α^N et L_α^H (domaine *III*) lui succède ensuite jusqu'à une fraction volumique $\phi_{lip} \sim 0.5$ ce qui illustre un déplacement du domaine biphasique vers des régimes plus dilués. Enfin, à partir de $\phi_{lip} \sim 0.5$, différentes structures non caractérisées, plus ou moins multiphasiques, se succèdent avec l'augmentation du confinement. On remarque, par conséquent, l'impact fort des interactions entre les chaînes éthoxylées du Simulsol [Ac. O, n=6] et les molécules d'ADN pour stabiliser les différentes organisations suivant le confinement imposé. À partir de cette teneur en Simulsol [Ac. O, n=6], il n'y a plus assez d'interactions stériques entre les « poils » de la bicouche et les bâtonnets pour les structurer ce qui participe donc à l'apparition des coexistences de phases.

Sur la Figure 5.3.7, les mêmes évolutions des confinements latéral et vertical sont identifiées pour les phases L_α^I et L_α^N , qualitativement indépendantes de la teneur en co-tensioactif. En revanche, la transition de phase entre les structures L_α^N et L_α^H semble se

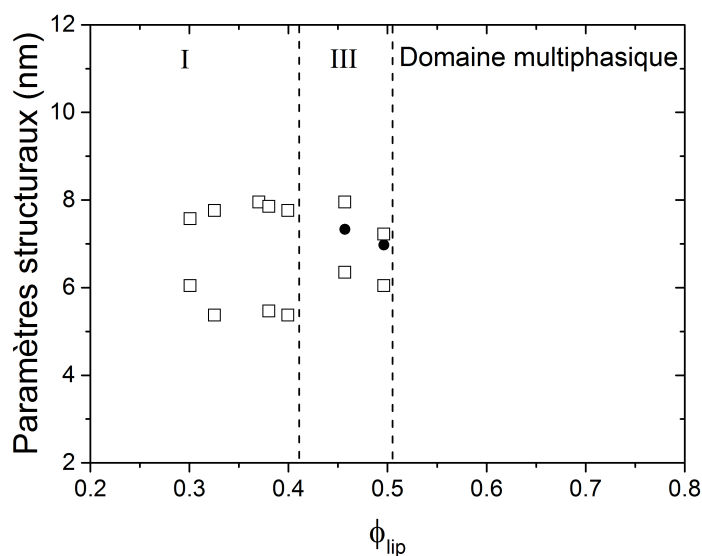


Figure 5.3.6 – Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine et de 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. Les tailles structurales sont représentées en fonction de la fraction volumique en lipides ϕ_{lip} . (□) Période d'empilement. (●) Distance entre bâtonnets d'ADN. Domaine I : coexistence de phases L_{α}^I et L_{α}^N . Domaine III : coexistence de phases L_{α}^N et L_{α}^H . Les pointillés représentent des guides visuels pour séparer les différents domaines du diagramme.

décaler vers les périodes d'empilement plus élevées ($d_{N-H} \sim 7.5 \text{ nm}$, $\Sigma_{N-H} \simeq 0.65 \text{ nm}^2$) par rapport à la transition de phase entre les empilements lamellaires « dilué » et « concentré » pour cette même composition de membrane ($d_2 \sim 6.5 \text{ nm}$, $\Sigma_{N-H} \simeq 0.64 \text{ nm}^2$), en opposition aux aires moléculaires critiques qui demeurent, elles, similaires.

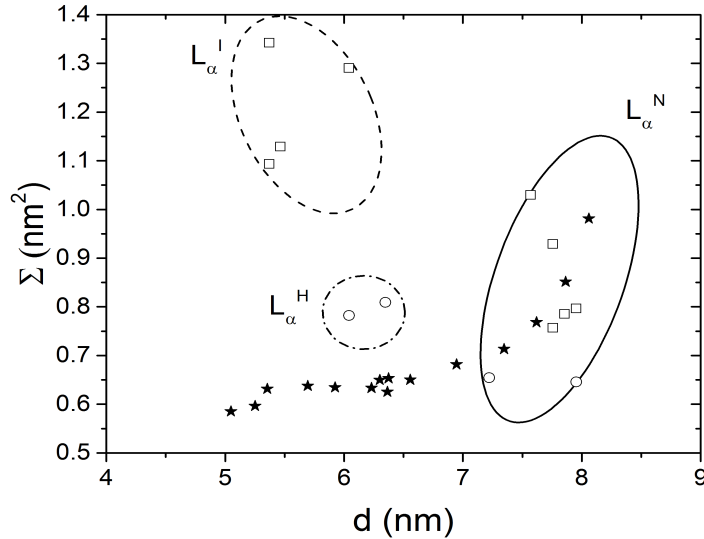


Figure 5.3.7 – Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. L'aire moléculaire Σ est représentée en fonction de la période d'empilement d . Système ternaire lipides-ADN-eau : (□) coexistence $L_\alpha^I + L_\alpha^N$, (○) coexistence $L_\alpha^N + L_\alpha^H$. Système binaire lipides-eau : (★).

5.3.1.4 Membranes de composition 95(L)/5(S)

Le système composé seulement de 5% en Simulsol [Ac. O, $n=6$] confirme les interprétations faites précédemment à savoir que les interactions stériques entre les chaînes éthoxylées et les molécules d'ADN sont essentielles pour stabiliser une organisation bien définie sur un domaine étendu en confinement. La coexistence de phase entre les organisations L_α^I et L_α^N est toujours identifiée et s'étend jusqu'à $\phi_{lip} \simeq 0.46$ indiquant seulement une légère augmentation de la concentration, Figure 5.3.8. La phase L_α^I se définit par une périodicité $d_{I-N} = 5.3 \text{ nm}$, illustrant une diminution de la périodicité à mesure que la teneur en co-tensioactif est diminuée, et par une aire moléculaire Σ_{I-N} qui s'étend à partir de 1.05 nm^2 ce qui demeure dans le même ordre de grandeur que pour les autres compositions, Figure 5.3.9. La phase L_α^N a sa périodicité qui varie de $d_{N-I} = 7.5 \text{ nm}$,

affichant une légère diminution, jusqu'à $d_N = 8.5 \text{ nm}$. De même, l'aire moléculaire varie de $\Sigma_{N-I} = 0.74 \text{ nm}^2$ à $\Sigma_N = 1 \text{ nm}^2$. Alors que la phase L_α^N présente toujours les mêmes spécificités lorsque l'hydratation est variée, l'empilement lamellaire « dilué » du système binaire présente une évolution distincte, Figure 5.3.9. Ce changement résulte d'une modification de la bicouche apparaissant avec la variation de la densité de greffage en cotensioactif, commenté Section 3.1.4.1. On retrouve, néanmoins une corrélation entre les aires moléculaires Σ_{N-I} et $\Sigma_{12} = 0.7 \text{ nm}^2$ mais une déviation de la périodicité est, de même que pour la membrane précédente, observée avec $d_2 = 6.1 \text{ nm}$.

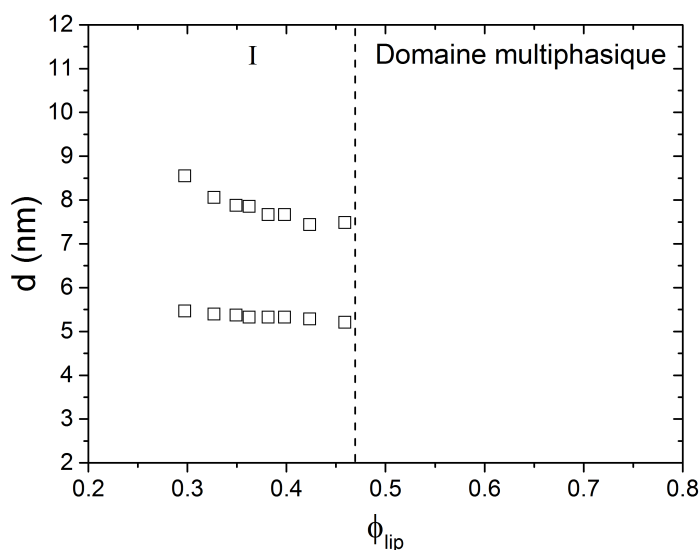


Figure 5.3.8 – Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine et de 5% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. Les tailles structurales sont représentées en fonction de la fraction volumique en lipides ϕ_{lip} . (\square) Période d'empilement. Domaine I : coexistence de phases L_α^I et L_α^N . Les pointillés représentent des guides visuels pour séparer les différents domaines du diagramme.

Par concentration du système, un domaine multiphasique apparaît, bien qu'il ne présente pas forcément les mêmes diffractogrammes que ceux du système composé à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. Un exemple de diffractogramme est illustré sur la Figure 5.3.10a. On s'aperçoit de la présence de plusieurs pics de Bragg dont certains sont facilement corrélés entre eux. Bien que la ou les structure(s) ne soi(en)t pas caractérisée(s) dans

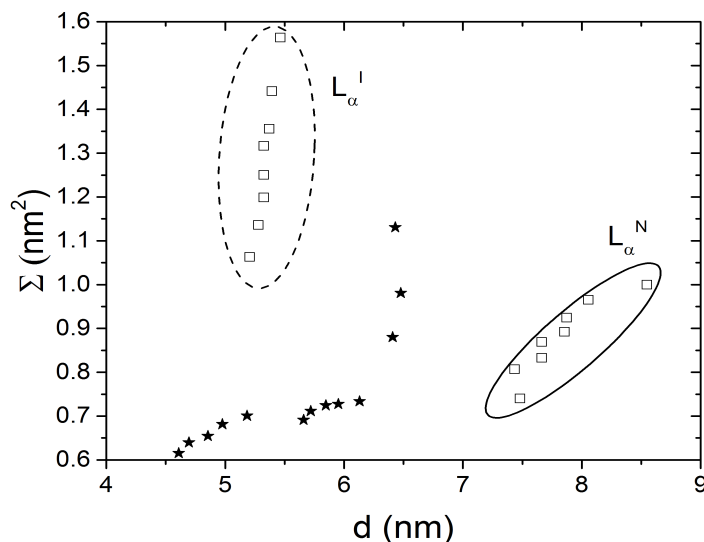


Figure 5.3.9 – Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées à 5% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. L'aire moléculaire Σ est représentée en fonction de la période d'empilement d . Système ternaire lipides-ADN-eau : (\square) coexistence $L_{\alpha}^I + L_{\alpha}^N$. Système binaire lipides-eau : (\star).

cette étude, on remarque la présence d'un pic aux alentours de $q \simeq 0.62 \text{ \AA}^{-1}$. Ce pic semble pouvoir être comparé au pic identifié au vecteur d'onde $q \simeq 0.63 \text{ \AA}^{-1}$ pour indiquer la phase orthorhombique de l'ADN au sein de la phase aqueuse, Section 5.1.4. De plus, le diffractogramme aux plus grands vecteurs d'onde, Figure 5.3.10b, révèle une cristallisation importante du système avec la présence de nombreux pics. En comparant qualitativement avec le diffractogramme de la phase orthorhombique, Figure 5.1.4, il est indéniable de constater qu'une grande partie de la cristallisation observée provient des molécules d'ADN. Il est alors possible que les bâtonnets d'ADN soient structurés, en tout cas en partie, sous la forme orthorhombique dans ce régime de confinement.

5.3.1.5 Membranes de Lécithine

Les membranes de Lécithine sont en mesure de réaliser le confinement de bâtonnets d'ADN au sein d'un empilement lamellaire, Figure 5.3.11. En revanche, elles ne permettent pas de stabiliser une organisation sur un domaine monophasique. Le régime dilué (domaine O) est marqué par la coexistence de phase entre des bicouches de Lécithine en limite de dilution, caractérisées grâce à une comparaison des confinements vertical et latéral avec le système Lécithine-eau sur la Figure 5.3.12, la phase L_{α}^I et donc une phase aqueuse qui apparaît dès l'échelle macroscopique. Seul un léger décalage de période d'empilement est

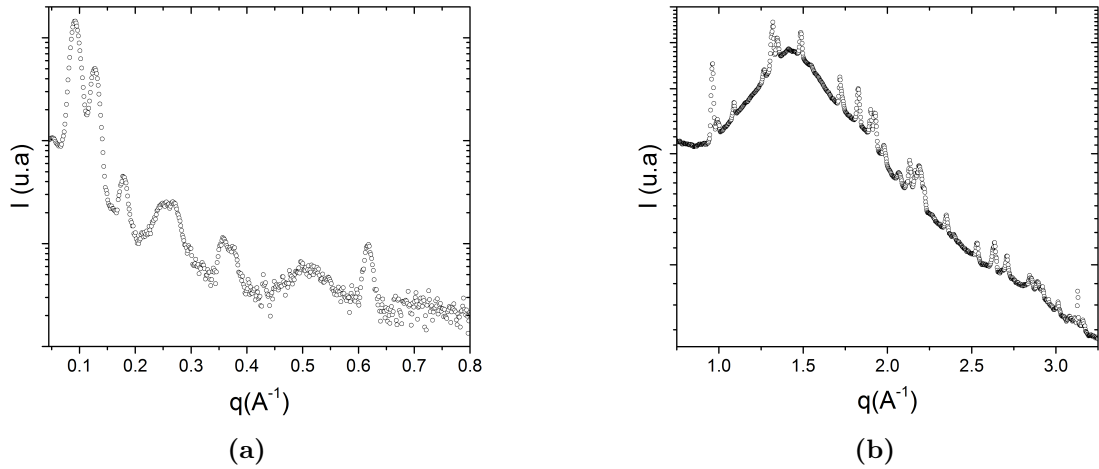


Figure 5.3.10 – Exemple de caractérisation par diffusion de rayons X de domaine multiphasique. (a) Diffractogramme aux petits vecteurs d'onde d'un domaine multiphasique. (b) Diffractogramme aux grands vecteurs d'onde du même domaine multiphasique. $\phi_{lip} = 0.58$, complexe lipidique composé à 5% en Simulsol [Ac. O, $n=6$].

constaté entre les deux structures avec $d_{Lécithine} = 6.3 \text{ nm}$ et $d_I = 5.6 \text{ nm}$.

Il s'ensuit par concentration du système une transition avec la coexistence de phase entre les organisations L_α^I et L_α^N . L'existence de ces deux phases ne repose donc pas sur des interactions spécifiques entre les chaînes éthoxylées du Simulsol [Ac. O, $n=6$] et les molécules d'ADN. En effet, un modèle basé uniquement sur des interactions entropiques entre des membranes empilées et ces bâtonnets permet d'expliquer l'apparition de ces deux structures, comme cela a été discuté à la Section 5.2.2. Il est à noter que les périodes d'empilements lamellaires de bicouches de la phase L_α^N varient de $d = 7.3 \text{ nm}$ à $d = 8 \text{ nm}$ avec l'hydratation ce qui correspond à des confinements verticaux plus faibles que pour des systèmes lamellaires Lécithine-eau. Ainsi, la présence des bâtonnets d'ADN ajoute une interaction répulsive suffisamment intense pour accroître la limite de dilution de l'empilement.

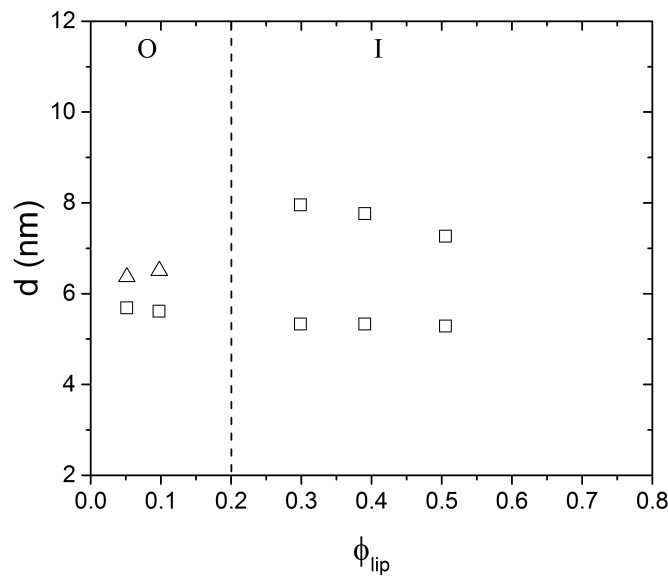


Figure 5.3.11 – Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine. Les tailles structurales sont représentées en fonction de la fraction volumique en lipides ϕ_{lip} . (\square) Période d'empilement de système ternaire lipides-ADN-eau. (Δ) Période d'empilement de système lipides-eau. Domaine O : coexistence de phases $L_{\alpha}^{Lécithine}$ et L_{α}^I . Domaine I : coexistence de phases L_{α}^I et L_{α}^N . Les pointillés représentent des guides visuels pour séparer les différents domaines du diagramme.

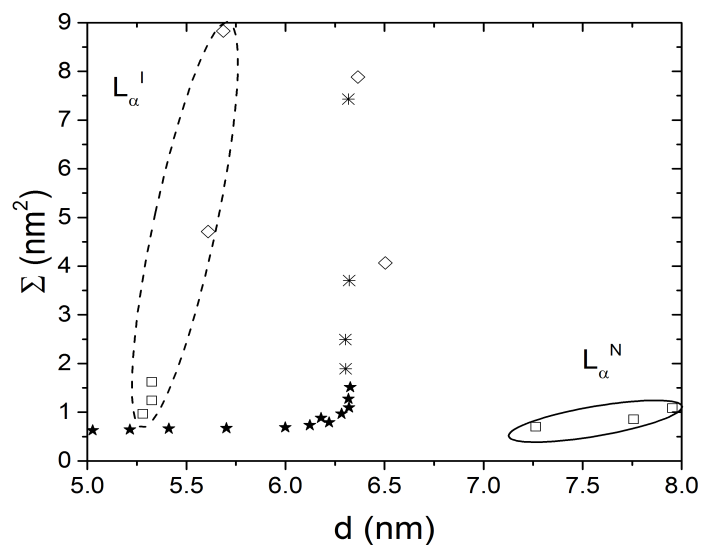


Figure 5.3.12 – Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées de Lécithine. L'aire moléculaire Σ est représentée en fonction de la période d'empilement d . Système ternaire lipides-ADN-eau : (\square) coexistence $L_{\alpha}^I + L_{\alpha}^N$, (\diamond) coexistence L_{α}^I + un empilement de bicouches de Lécithine en limite de dilution. Système binaire lipides-eau : (\star) empilement de bicouches de Lécithine, (\ast) coexistence entre un empilement lamellaire en limite de dilution et une phase aqueuse pure.

5.3.2 Effet de la longueur de la chaîne éthoxylée du co-tensioactif

5.3.2.1 Membranes composées de Lécithine et Simulsol [Ac. O, n=10]

La variation de la densité de greffage en co-tensioactif montre un impact fort sur les interactions participant à la stabilisation des organisations des bâtonnets d'ADN confinés au sein de complexes lipidiques. Des interactions stériques spécifiques entre les molécules d'ADN et les chaînes éthoxylées sont alors supposées régir l'auto-assemblage structuré. Ainsi, la longueur hydrophile du co-tensioactif est pressentie de jouer un rôle conséquent sur ces interactions essentielles au confinement de l'ADN.

Reprenant une partie des travaux effectués par Emerson et collaborateurs [23], le diagramme de phase de bicouches empilées, composées à 30% de Simulsol [Ac. O, n=10] et confinant de l'ADN, est représenté Figure 5.3.13. La même succession de transitions de phases que les systèmes composés à 44% et à 77% en Simulsol [Ac. O, n=6] est observée : $L_\alpha^I \rightarrow L_\alpha^N \rightarrow L_\alpha^H$. Or, si l'on compare avec le diagramme de phase obtenu pour un co-tensioactif plus court (Simulsol [Ac. O, n=6]) mais à même densité de greffage (30%), on s'aperçoit que la longueur hydrophile de la chaîne éthoxylée présente bien des effets conséquents sur les organisations des molécules d'ADN confinées, Figure 5.3.6. Tandis que seuls des domaines multiphasiques sont mis en évidence avec le co-tensioactif court, une stabilisation de structures est atteinte grâce aux interactions entre le co-tensioactif plus long et les bâtonnets d'ADN, soulignée par l'apparition de domaines monophasiques de grande extension des phases L_α^N ($0.38 \leq \phi_{lip} \leq 0.54$) et L_α^H ($0.59 \leq \phi_{lip} \leq 0.64$). Les interactions stériques entre chaînes éthoxylées et molécules d'ADN sont donc renforcées soit par l'augmentation de la teneur en co-tensioactif au sein de la bicouche, soit par l'extension des chaînes de groupements d'oxyde d'éthylène. Elles entraînent ainsi une stabilisation des structures L_α^N et L_α^H sur un domaine de confinement large. Cependant, ces conclusions ne sont valables que dans les régimes d'interactions étudiés. Il est hautement probable que l'analyse devienne plus compliquée à interpréter lorsqu'on accentue davantage le couplage entre l'augmentation de la longueur des chaînes éthoxylées et l'augmentation de la teneur en co-tensioactif en raison des changements de gonflements lamellaires et des coexistences de phases, qui sont discutés à la Section 4.3.

Les tailles structurales observées restent du même ordre de grandeur que celles de membranes composées de co-tensioactifs plus courts. La phase L_α^I est définie par une périodicité lamellaire $d = 5.8 \text{ nm}$. La phase L_α^N monophasique (domaine *II*) est caractérisée par le confinement ($d_{N-I} \sim 7.4 \text{ nm}$, $\Sigma_{N-I} \simeq 0.85 \text{ nm}^2$) dans sa limite diluée et par le confinement ($d_{N-H} \sim 6.8 \text{ nm}$, $\Sigma_{N-H} \simeq 0.68 \text{ nm}^2$) dans sa limite concentrée, cf. Figure 5.3.14. Ainsi, la corrélation avec la transition lamellaire-lamellaire du système binaire lipides-eau subsiste toujours, bien que la coexistence de phase entre l'empilement « dilué » et l'empilement « concentré » soit désormais explicitement mise en évidence pour cette composition.

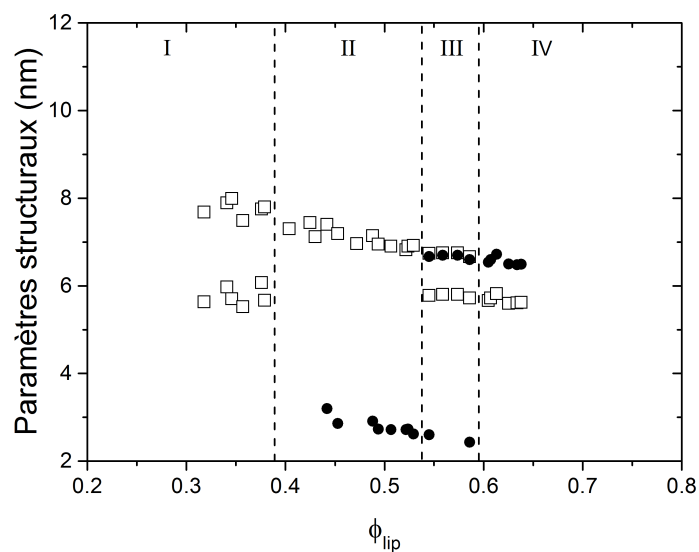


Figure 5.3.13 – Diagramme de phase de bâtonnets d'ADN confinés au sein d'un complexe lipidique composé de Lécithine et de 30% de Simulsol [Ac. O, $n=10$]. Les tailles structurales sont représentées en fonction de la fraction volumique en lipides ϕ_{lip} . (□) Période d'empilement. (●) Distance entre bâtonnets d'ADN. Domaine I : coexistence de phases L_{α}^I et L_{α}^N . Domaine II : phase L_{α}^N . Domaine III : coexistence de phases L_{α}^N et L_{α}^H . Domaine IV : L_{α}^H . Les pointillés représentent des guides visuels pour séparer les différents domaines du diagramme. Extrait de [22].

Il est en effet possible de comparer le confinement (d_{N-H} , Σ_{N-H}) avec le confinement critique ($d_2 \sim 6.1 \text{ nm}$, $\Sigma_{12} \simeq 0.66 \text{ nm}^2$). La phase L_α^H (domaine IV) se définit par le confinement ($d_{H-N} \sim 5.7 \text{ nm}$, $\Sigma_{H-N} \simeq 0.74 \text{ nm}^2$) dans sa limite la plus diluée et par le confinement présumé ($d_{H-H_{II}^C} \sim 5.6 \text{ nm}$, $\Sigma_{H-H_{II}^C} \simeq 0.69 \text{ nm}^2$) dans sa limite concentrée. De même, la corrélation avec le système binaire peut être effectuée en comparant le confinement présumé ($d_{H-H_{II}^C}$, $\Sigma_{H-H_{II}^C}$) avec le confinement du système binaire caractérisant la transition avec le régime d'hydratation confiné ($d_1 \sim 5 \text{ nm}$, $\Sigma_{12} \simeq 0.68 \text{ nm}^2$) qui correspond en réalité ici à la l'extrémité concentrée du domaine de coexistence de phases lamellaire-lamellaire.

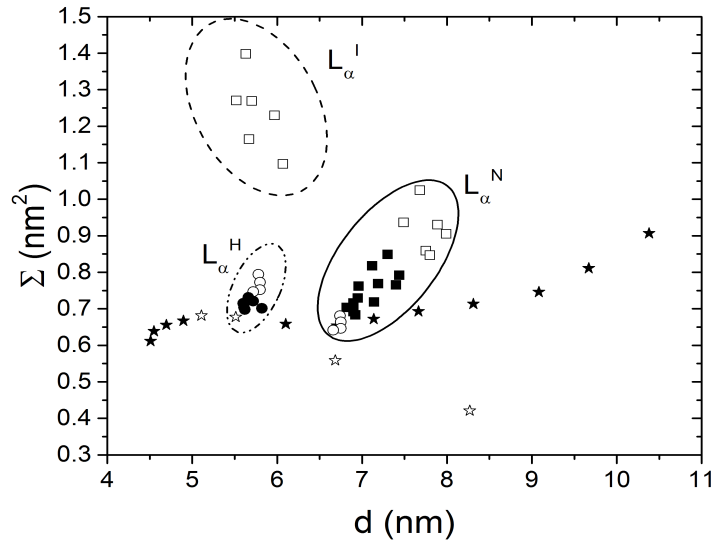


Figure 5.3.14 – Comparaison des confinements appliqués aux membranes ternaires et binaires composées à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=10$]. L'aire moléculaire Σ est représentée en fonction de la période d'empilement d . Système ternaire lipides-ADN-eau : (\square) coexistence $L_\alpha^I + L_\alpha^N$, (\circ) coexistence $L_\alpha^N + L_\alpha^H$, (\blacksquare) L_α^N , (\bullet) L_α^H . Système binaire lipides-eau : (\star) empilement lamellaire de bicouches, (\star) coexistence de phase entre deux empilements lamellaires de bicouches. Les données sont extraites des travaux de thèse d'E. R. T. da Silva [22].

5.4 L'organisation des molécules d'ADN soumise aux différents régimes de confinement des membranes

À travers les études menées sur les interactions entre les membranes lipidiques et les bâtonnets d'ADN, effectuées pour différentes compositions en Lécithine et en Simulsol, certaines corrélations sont mises en évidence entre les systèmes binaires lipides-eau et les systèmes ternaires lipides-ADN-eau. Les confinements vertical et latéral, que subie la membrane lipidique, sont illustrés respectivement par la distance de répétition d et par l'aire moléculaire à l'interface lipides-eau Σ . Ils caractérisent, d'une part, des transitions de phase intervenant dans l'organisation des molécules d'ADN au sein du complexe lipidique et d'autre part, ils déterminent les transitions entre différents régimes d'hydratation du système binaire lipides-eau, avec notamment la transition de phase entre un empilement lamellaire « dilué » et un empilement lamellaire « concentré ». Ainsi, bien que les confinements demeurent d'intensité différente suivant la composition membranaire, ils s'avèrent être des éléments clés pour relier explicitement ces changements d'hydratation entre eux.

Dans l'optique de faire ressortir un comportement général, les confinements vertical et latéral, associés à chaque transition de phase du système ternaire et à chaque transition d'hydratation du système binaire, sont moyennés sur toutes les compositions étudiées et sont représentés sur la Figure 5.4.1. Il est évident que chaque domaine de phase est associé à un confinement particulier qui résulte lui-même d'un couplage entre l'hydratation du système, la teneur en co-tensioactif et la nature du co-tensioactif. Mais *via* cette représentation moyennée des aires moléculaires Σ et des périodicités d , le but est de décrire le confinement des membranes tout en s'affranchissant de la dépendance en la composition du système. Il apparaît alors possible de faire ressortir deux valeurs moyennes de confinement vertical critique (d_1 et d_2) et trois valeurs moyennes de confinement latéral critique (Σ_{lim} , Σ_{int} et Σ_{12}) qui décrivent les différentes transitions de phases.

Globalement, l'aire moléculaire associée à la limite de dilution du système binaire Σ_{lim} , c'est-à-dire la limite d'une coexistence avec une phase aqueuse en excès, semble pouvoir être associée au confinement latéral qui définit l'apparition des structures L_{α}^I et H_{II}^C ($\Sigma_{lim} \sim \Sigma_{I-N} \sim \Sigma_{H_{II}^C-H}$). Les molécules lipidiques seraient donc dans un état « dilué » latéralement pour ces phases. Néanmoins, cette interprétation peut être relativisée puisqu'une dépendance non négligeable intervient avec la composition de la membrane ou du fait du peu d'échantillons analysés (notamment pour la phase H_{II}^C). Sans corrélation remarquée avec les systèmes dépourvus d'ADN, il semble qu'une aire moléculaire intermédiaire Σ_{int} caractérise la détection des phases L_{α}^N et L_{α}^H dans leur limite diluée ($\Sigma_{int} \simeq \Sigma_{N-I} \simeq \Sigma_{H-N}$). Cette aire moléculaire Σ_{int} est donc la conséquence des interactions membrane-ADN principalement. Elle ne semble pas dépendre spécifiquement de la « nature » de la bicouche puisque la transition $L_{\alpha}^N - L_{\alpha}^H$ résulte de la réorganisation de la membrane qui intervient lors de la transition entre l'empilement lamellaire « dilué » et l'empilement lamellaire « concentré ». Même si on définit une aire moléculaire Σ_{int} com-

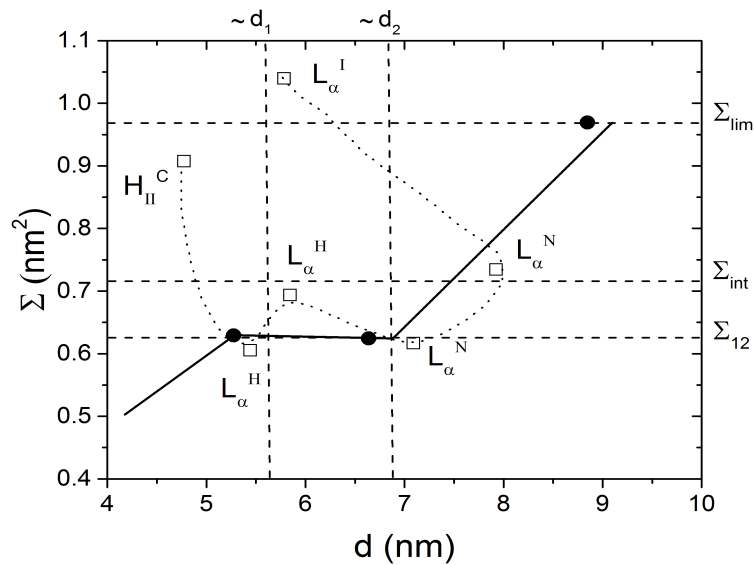


Figure 5.4.1 – Diagramme de phases général caractérisé par les confinements vertical et latéral. L'aire moléculaire Σ est représentée en fonction de la période d'empilement d . Système ternaire lipides-ADN-eau : (□) Délimitations moyennes, sur toutes les compositions membranaires, des domaines monophasiques. Système binaire lipides-eau : (●) Limites moyenne séparant les régimes d'hydratation de la membrane. Les courbes en trait plein et en pointillés représentent un guide visuel pour décrire respectivement l'évolution du gonflement lamellaire binaire et l'évolution du complexe lipidique ternaire.

mune aux deux phases, il apparaît que l'aire moléculaire Σ_{N-I} soit toujours légèrement plus étendue que l'aire moléculaire Σ_{H-N} . Le plateau de confinement latéral du système binaire lipides-eau Σ_{12} définit latéralement la transition entre les régimes d'hydratation dilué et intermédiaire. Mais il correspond, de plus, aux valeurs des aires moléculaires indiquant la transition entre les phases $L_\alpha^N - L_\alpha^H$ et $L_\alpha^H - H_{II}^C$. Ce confinement latéral semble alors définir une limite extrême de confinement auquel peut être soumise la bicouche dans ce régime d'hydratation, en présence d'ADN.

Par rapport au confinement vertical, la période d'empilement d_2 définit la transition entre l'empilement lamellaire « dilué » et l'empilement lamellaire « concentré » du système binaire mais aussi la transition entre les structures L_α^N et L_α^H bien que ces valeurs de périodicités soient assez dépendantes de la proportion en co-tensioactifs. La période d'empilement d_1 qui correspond au passage entre les régimes d'hydratation intermédiaire et confiné du système lipides-eau peut, de même, être reliée aux organisations du système comprenant des molécules d'ADN. En ordre de grandeur, cette périodicité peut, en effet, être associée à trois périodes d'empilements caractérisant le système ternaire. Elle correspond premièrement au confinement vertical de la transition $L_\alpha^H - H_{II}^C$. De plus, sa valeur est relativement proche des confinements verticaux, quasiment identiques, auxquels sont soumises les structures L_α^H et L_α^I , leur période d'empilement ne variant que très peu avec l'hydratation du système.

Les transitions de phases $L_\alpha^N - L_\alpha^H$ et $L_\alpha^H - H_{II}^C$ résultent donc respectivement de la transition de phase entre les empilements lamellaires « dilué » et « concentré » et de la transition entre les régimes d'hydratations intermédiaire et confiné du système lipides-eau. On a donc les égalités globales suivantes entre les confinements :

$$(d_2, \Sigma_{12}) = (d_{N-H}, \Sigma_{N-H}) \quad (5.4.1)$$

$$(d_1, \Sigma_{12}) = (d_{H-H_{II}^C}, \Sigma_{H-H_{II}^C}) \quad (5.4.2)$$

Cette approche permet, par conséquent, de démontrer que les interactions membrane-ADN régissent les différentes organisations structurées des molécules d'ADN au sein des empilements de bicouches indépendamment des caractéristiques spécifiques à chaque composition de membrane. Il faut tout de même nuancer cette conclusion très généralisée en ce sens où ces interactions dépendent de la « nature » de cette membrane (en fonction des régimes d'hydratation dilué, intermédiaire ou confiné).

5.5 Conclusion

Le confinement de molécules nanométriques d'ADN au sein d'empilements lamellaires de bicouches lipidiques électriquement neutres intervient grâce à des mécanismes entropiques, régis par l'hydratation du système et par l'élasticité de la membrane, et grâce à

des mécanismes interfaciaux qui surviennent lors des interactions entre les nano-bâtonnets d'ADN et le co-tensioactif non ionique inséré au sein de la bicouche. Ces mécanismes complexes donnent lieu à de multiples organisations de l'ADN à l'intérieur de ces matrices lipidiques.

Les interactions entre les chaînes éthoxylées du co-tensioactif et les polymères d'ADN sont donc essentielles pour stabiliser les différentes structures sur un domaine de confinement large. Ces interactions sont renforcées principalement par la modification de la densité de greffage en co-tensioactif ou par extension de la longueur des chaînes éthoxylées. Lorsque ces interactions sont suffisamment intenses, un riche diagramme de phase est mis en évidence. Le confinement doux alors appliqué permet le plus souvent aux chaînes aliphatiques des molécules lipidiques de demeurer à l'état fluide.

Dans le domaine le plus hydraté, un empilement lamellaire L_α^I , contenant une faible quantité des bâtonnets d'ADN répartis isotropiquement, est en coexistence avec un second empilement lamellaire L_α^N , confinant les molécules d'ADN au sein de la couche aqueuse sous un agencement nématique. Néanmoins, il est possible que cette coexistence soit accompagnée d'une autre phase isotrope de l'ADN en pur milieu aqueux. La phase L_α^I est dans un état « lié » en ce sens où elle ne gonfle pas dans la direction verticale aux bicouches, bien qu'elle puisse néanmoins s'étendre latéralement. La coexistence entre ces différentes phases est alors régie de façon purement entropique dans cette limite diluée. Les phases sont en effet prédites à l'aide d'un modèle de type Flory qui repose sur des interactions entropiques entre des membranes, associées à des plaques rigides, et des bâtonnets d'ADN dispersés dans la couche aqueuse [20].

L'organisation nématique des bâtonnets entre les bicouches peut être associée à la phase cholestérique de ces molécules en phase aqueuse. La phase L_α^N repose alors sur un gonflement lamellaire similaire à celui de l'empilement lamellaire « dilué » caractérisé dans le cadre de l'étude du système lipides-eau. Tous deux présentent une variation importante dans l'évolution de la période d'empilement d et de l'aire moléculaire Σ , lorsque l'hydratation est variée, donc un fort couplage entre confinements vertical et latéral. Les interactions membrane-ADN modifient sensiblement ces interactions latérales et verticales selon la teneur en co-tensioactif au sein de la bicouche. À ces deux empilements lamellaires, on associe une bicouche de même « nature » dite « diluée ».

Par concentration du système, la transition de phase entre la phase L_α^N et la phase hexagonale d'ADN au sein d'un empilement lamellaire L_α^H a lieu. La structure hexagonale de cette nouvelle phase présente certes une similitude avec la structure hexagonale de l'ADN dans une phase purement aqueuse mais les tailles structurales en sont différentes dues essentiellement à l'épaisseur membranaire. La phase L_α^H , tout comme la phase L_α^I , est dans un état « lié » qui ne gonfle pas verticalement mais qui s'étend légèrement dans la direction latérale aux bicouches. La transition de phase $L_\alpha^N \rightarrow L_\alpha^H$ résulte de la transition de phase entre l'empilement lamellaire « dilué » et l'empilement lamellaire « concentré » qui est mise en évidence lors de l'étude du système binaire lipides-eau. Ainsi, la phase L_α^H

est caractérisée par une membrane de « nature concentrée », qui se voit être élastiquement plus rigide, alors la phase L_{α}^N est définie par la membrane de « nature diluée ». Les interactions membrane-ADN sont donc différentes dans ces deux phases et illustrent toute leur importance sur l'organisation des molécules d'ADN. Cependant ces deux phases L_{α}^N et L_{α}^H ont un point commun qui est un confinement latéral similaire.

Dans le domaine le plus déshydraté, une transition entre la phase L_{α}^H et une structure hexagonale de micelles inverses contenant de l'ADN H_{II}^C apparaît. Les structures possèdent toutes deux une symétrie hexagonale bidimensionnelle mais la phase H_{II}^C est plus confinée. Cette transition de phase repose alors sur une transition de régime d'hydratation de la membrane entre un régime intermédiaire et un régime confiné. Cette phase H_{II}^C est mise en évidence dans un domaine d'hydratation très confiné et pour des bicouches fortement chargées en co-tensioactifs. Ainsi, dans de telles conditions, une coexistence de phase est possible avec une phase de Simulsol hydraté ce qui a pour conséquence de modifier la teneur en co-tensioactif au sein de la membrane. À l'instar de la phase L_{α}^I , la phase H_{II}^C est très confinée « verticalement » mais se situe dans un régime « dilué » latéralement avec une aire moléculaire Σ proche de celle que présentent les bicouches dans leur état le plus dilué, en limite de dilution.

Dans une situation où il n'y pas suffisamment d'interactions entre les chaînes éthoxylées et les molécules d'ADN pour stabiliser les domaines monophasiques des différentes structures, des domaines multiphasiques sont identifiés. Ces domaines multiphasiques peuvent être accompagnés d'une cristallisation des molécules d'ADN dans les régimes les plus confinés avec l'apparition d'une phase probablement orthorhombique.

Le confinement d'objets nanométriques au sein d'empilements lamellaires est donc possible sous différentes organisations et laisse entrevoir la possibilité d'encapsulation au sein de vecteurs sous la forme de vésicules multilamellaires. À partir de ces empilements lamellaires, il est en effet possible de créer des vésicules uni ou multilamellaires. Ces questions seront évoquées dans le prochain chapitre.

« Pour connaître la profondeur, il faut savoir chuter. »"

(Teal'c)

Chapitre 6

De l'empilement lamellaire de bicouches aux oignons dispersés

Un empilement lamellaire de bicouches à l'état fluide L_α , lorsqu'il est soumis à un cisaillement, donne dans certains cas lieu à la formation de vésicules multilamellaires concentrées qui peuvent ensuite être dispersées [28, 113]. Celles-ci sont la plupart du temps révélées à l'aide d'un dispositif de type Couette couplé à de la diffusion de la lumière ou de rayons X. La formation de ces vésicules multilamellaires sous cisaillement, souvent référencées comme des « oignons » dès lors que l'empilement des couches apparaît jusqu'au cœur vésiculaire, repose essentiellement sur les fluctuations d'ondulation des membranes [21] qui ne sont autres que les interactions stériques répulsives d'Helfrich [48]. Par contrôle de la valeur du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$, il est alors possible d'avoir accès à différents diamètres Φ d'oignons donnés *via* la relation [28] :

$$\Phi = \sqrt{\frac{4\pi(2k_c + \bar{k}_c)}{\eta_v d \dot{\gamma}}} \quad (6.0.1)$$

avec k_c et \bar{k}_c respectivement les constantes élastiques de courbure moyenne et gaussienne de la membrane (voir Section 1.2.2.1), d la périodicité lamellaire et η_v un champ moyen de viscosité au sein du solvant ressenti par une vésicule multilamellaire en présence de ses voisins.

Ainsi, il apparaît une dépendance intrinsèque à la composition des membranes qui s'illustre *via* la dépendance en élasticité membranaire. La formation de tels oignons multilamellaires résulte donc de l'application d'un cisaillement mais aussi de la physico-chimie de l'empilement lamellaire initial. D'ailleurs, cet effet physico-chimique est particulièrement central lorsque le système s'équilibre spontanément (sans cisaillement). En effet, Il apparaît que pour des bicouches composées de tensioactifs tels que l'éther monoalkylique de polyéthylène glycol (similaire au Simulsol), la formation d'oignons s'effectue lorsque les bicouches sont à l'état fluide et constituées de molécules comprenant de petites têtes

polaires comparativement à la longueur de leur chaîne aliphatique [53]. Autrement, c'est la formation de micelles qui est favorisée.

Dans ce chapitre, l'accent est mis sur l'importance des interactions entre membranes au sein de l'empilement lamellaire initial, c'est-à-dire de manière plus explicite de la pression osmotique et du régime d'hydratation du système, sur les propriétés finales d'ogons obtenus après cisaillement puis dispersion dans le solvant. L'intérêt de l'étude est alors centré sur la taille de ces oignons, leur nombre de lamelles, leur élasticité et leur stabilité.

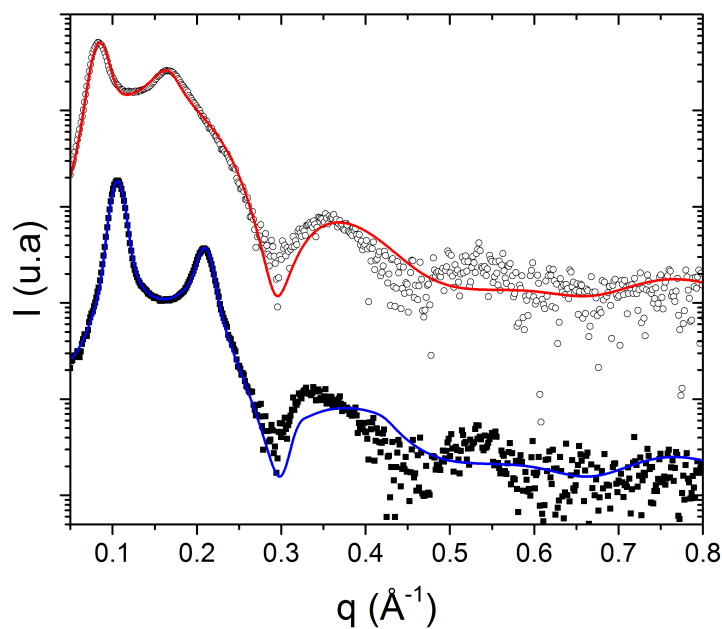
6.1 Cisaillement de phases lamellaires

Les oignons formés sont issus du cisaillement d'un empilement lamellaire qui, par conséquent, dirige en partie leurs propriétés structurales *in fine*. Il convient donc de caractériser préalablement le cisaillement appliqué afin d'entrevoir son effet sur la géométrie et l'élasticité des bicouches empilées. Les pâtes cisillées ainsi engendrées sont étudiées pour différentes proportions de Lécithine et de Simulsol [Ac. O, n=6] et pour différents régimes d'hydratation de l'empilement lamellaire.

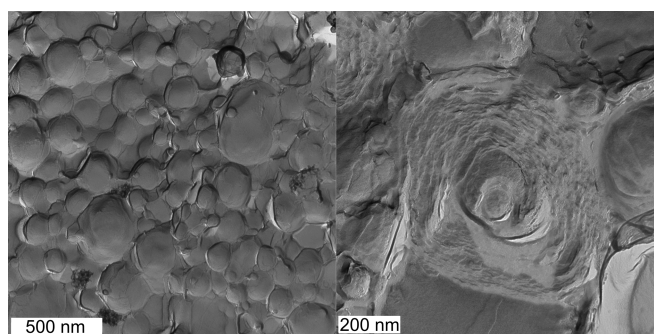
6.1.1 Pâte cisillée multilamellaire

Les conditions du cisaillement appliqué aux phases lamellaires sont gardées constantes (volume d'échantillon, taux et durée de cisaillement similaires) quelle que soit la composition de l'échantillon caractérisé, voir Section 2.1.4.1. Sur la Figure 6.1.1a, l'effet du cisaillement sur l'empilement lamellaire est observé par diffusion de rayons X aux petits angles, illustré pour un échantillon ($\phi_{lip} = 0.40$, composé à 30% de Simulsol [Ac. O, n=6]). Après cisaillement, l'état lamellaire est préservé mais un léger séchage de l'empilement des bicouches est caractérisé par un déplacement, vers les plus grands vecteurs d'onde, du premier pic de Bragg. Chaque diffractogramme est alors ajusté par le modèle de Nallet, voir Section 2.4.2, afin de pouvoir effectuer une comparaison quantitative des paramètres structuraux et élastiques de l'empilement lamellaire, avant et après cisaillement.

Sur la Figure 6.1.1b, la pâte cisillée est identifiée par la technique de cryofracture couplée à la microscopie électronique à transmission. Une texture d'ogons non dispersés ressort, apparentée schématiquement à un nid d'abeille, qui laisse apparaître une polydispersité avérée, image de gauche de la Figure 6.1.1b. Sur l'image de droite, une texture multilamellaire de la pâte d'ogon est révélée de telle sorte qu'un nombre conséquent de lamelles est bien mis en évidence.



(a)



(b)

Figure 6.1.1 – Caractérisation expérimentale de la pâte cisailée multilamellaire. (a) Comparaison des diffractogrammes de rayons X d'un empilement lamellaire de bicouches avant (\circ) et après (\blacksquare) cisaillement. Les courbes représentent les ajustements par le modèle de Nallet, voir Section 2.4.2. $\phi_{lip}^{initiale} = 0.40$ (b) Image de pâte cisailée multilamellaire observée par microscopie électronique à transmission après cryofracture. A gauche, ensemble d'ogons identifié sous une texture de « nids d'abeille ». A droite, coupe d'ogon multilamellaire avant dispersion. $\phi_{lip}^{initiale} = 0.50$. Les bicouches sont composées à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$].

6.1.2 Effet du cisaillement sur les propriétés structurales et élastiques des bicouches empilées

La comparaison des périodes d'empilement le long de la ligne de dilution, avant et après cisaillement, permet de distinguer un séchage manifeste de l'empilement des bicouches, qui est dépendant de la fraction volumique de la phase lamellaire initiale $\phi_{lip}^{initiale}$. Ainsi, pour une hydratation initiale modérée du système ($\phi_{lip}^{initiale} \leq 0.33$, membrane composée à 70% de Simulsol [Ac. O, n=6]), la périodicité lamellaire diminue de 6% à 10% et la baisse peut atteindre jusqu'à 35% pour une hydratation proche de la limite de dilution ($\phi_{lip}^{initiale} \sim 0.2$), Figure 6.1.2a. Cette expulsion de l'eau depuis l'empilement, qui apparaît sous l'effet du cisaillement, est un phénomène déjà connu et est dépendant du taux de cisaillement appliqué même lorsque les circonstances expérimentales sont mieux contrôlées [29].

Malgré cette perte d'eau au sein de l'empilement lamellaire, l'élasticité des membranes n'en est pas perturbée, Figure 6.1.2b. Seul un décalage suivant la courbe d'évolution du paramètre de Caillé η en fonction de la périodicité lamellaire d est observé. De même, l'épaisseur de la membrane δ_m^e obtenue par contraste de densité électronique, Figure 6.1.3a, et le rapport des contrastes $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$ suivent un décalage similaire selon la période d'empilement, Figure 6.1.3b. Ceci illustre la parfaite conservation du système, caractérisé par le modèle de Nallet, que cela soit par gonflement ou par rétrécissement de l'empilement lamellaire. De cette manière, il est notamment possible d'atteindre plus aisément le régime d'hydratation très concentré.

Les propriétés structurales et élastiques de l'empilement lamellaire sont donc conservées, à périodicité égale, à l'issue du cisaillement. Seulement un biais en périodicité est mis en évidence pour chaque densité de greffage en Simulsol [Ac. O, n=6] (seulement représenté ici pour une membrane constituée à 70% de Simulsol [Ac. O, n=6]).

6.2 La thermodynamique de l'empilement lamellaire initial induit des propriétés physiques spécifiques des oignons dispersés au maximum à 15%

Le cisaillement de la phase lamellaire initiale ne modifie pas les propriétés générales des bicouches mais induit un léger déplacement dans le régime d'hydratation (léger séchage). La dispersion de cette pâte cisailée multilamellaire et polydispense au sein d'un volume d'eau plus important permet la formation d'oignons uni ou multilamellaires et de tailles variées. Pour simplifier la compréhension ou simplement par abus de langage, ces oignons seront discutés en tant que vésicules par la suite. Les caractéristiques géométriques de ces vésicules créées *via* un cisaillement sont donc intrinsèquement dépendantes de la thermodynamique de l'empilement lamellaire initial qui elle-même résulte de la composition des

6.2 La thermodynamique de l'empilement lamellaire initial induit des propriétés physiques spécifiques des oignons dispersés au maximum à 15%

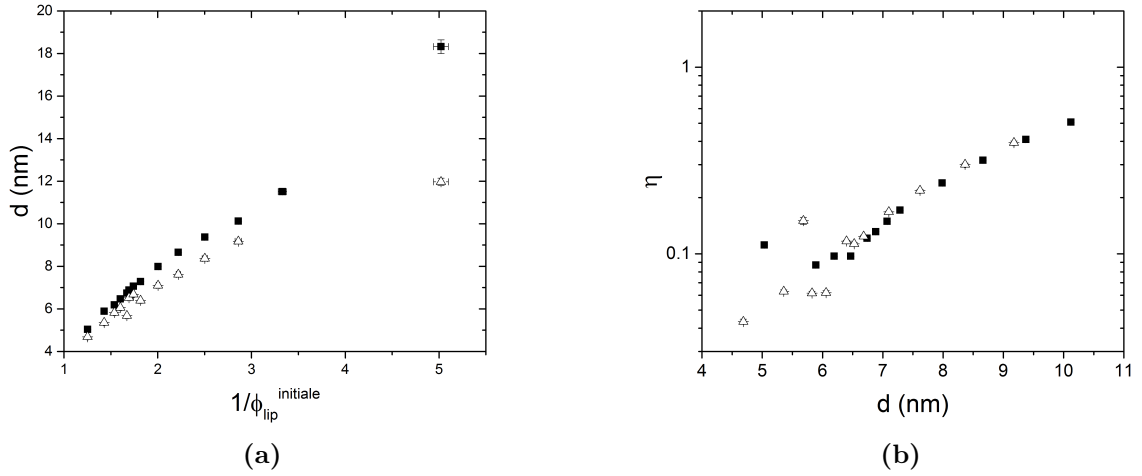


Figure 6.1.2 – Etude des propriétés structurales et élastiques de la pâte cisailée. Comparaison entre (a) les périodicités d et (b) les paramètres de Caillé η d'un empilement lamellaire avant (■) et après (Δ) cisaillement pour différents états initiaux caractérisés par la fraction volumique en lipide $\phi_{lip}^{initiale}$. Les bicouches sont composées de 30% de Lécithine et de 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$].

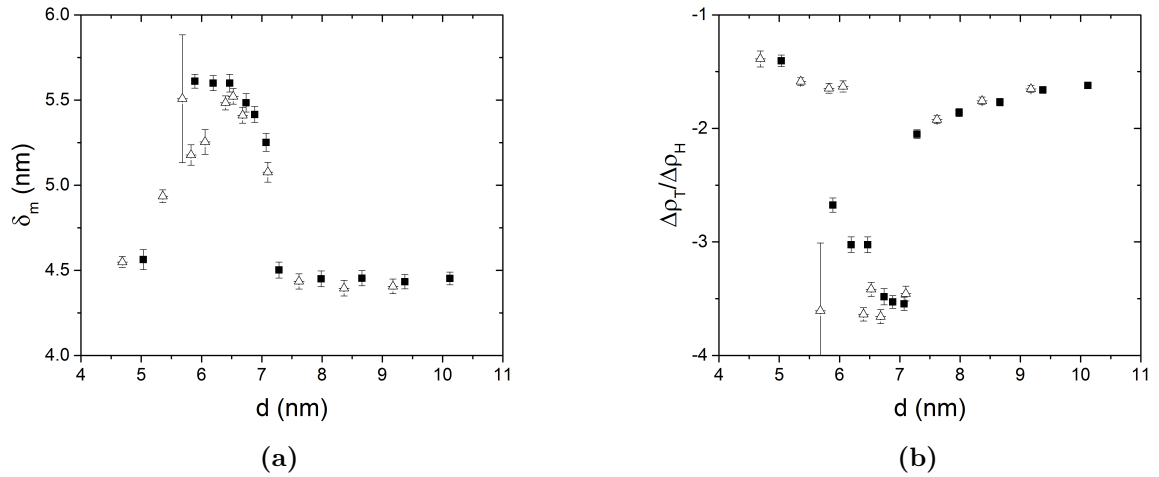


Figure 6.1.3 – Etude des propriétés de la bicouche de la pâte cisailée par contraste de densité électronique. Comparaison entre les épaisseurs de membranes δ_m (a) et les rapports des contrastes de densité électronique $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$ (b) d'un empilement lamellaire avant (■) et après (Δ) cisaillement pour différentes périodes d'empilement d . Les bicouches sont composées de 30% de Lécithine et de 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$].

membranes et du régime d'hydratation.

6.2.1 Multilamellarité vésiculaire et densité de greffage membranaire

6.2.1.1 Vésicules multilamellaires

Après avoir effectué le cisaillement de la phase lamellaire, de l'eau pure est ajoutée à la pâte cisailée de telle sorte que les vésicules soient dispersées au sein d'un volume de solvant à environ 15% de la phase lamellaire initiale ($\phi_{\text{vésicule}} \sim 0.15 * \phi_{\text{lip}}$) pour les caractérisations par diffusion de rayons X et à environ 0.2% pour les caractérisations par diffusion dynamique de la lumière, voir les conditions expérimentales définies à la Section 2.1.4.1. Un gonflement de la phase lamellaire a alors lieu, associé à un déplacement du premier pic de Bragg vers les petits vecteurs d'onde, illustré pour les membranes composées à 5%, Figure 6.2.1a, et à 30%, Figure 6.2.1b, de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. Cette diffusion des molécules d'eau à l'intérieur de l'empilement des bicouches résulte de la différence de pression osmotique entre la phase purement aqueuse ajoutée et la pâte cisailée. Le caractère multilamellaire des vésicules est donc conservé pour ces compositions de membranes enrichies en Lécithine, identifié par la présence de deux ordres de Bragg qui subsistent bien qu'ils soient atténués en intensité.

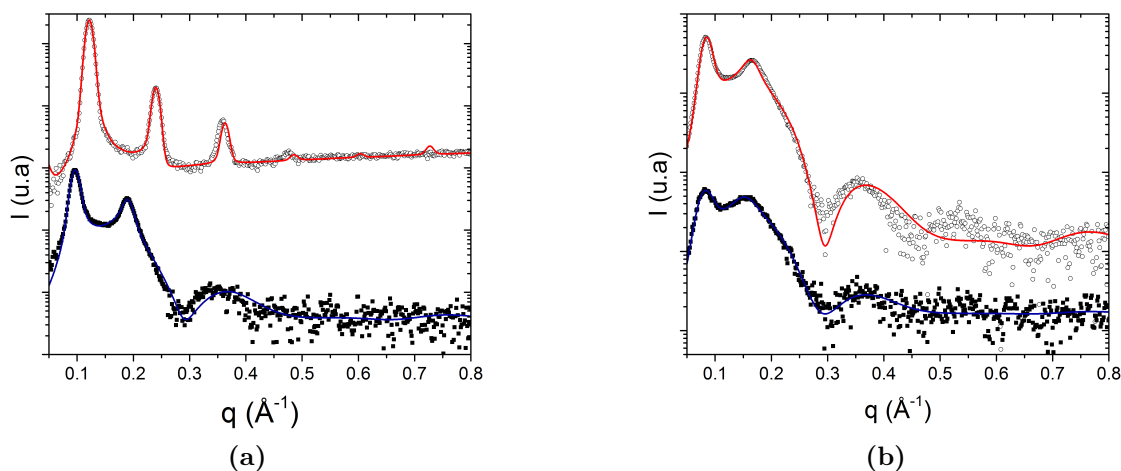
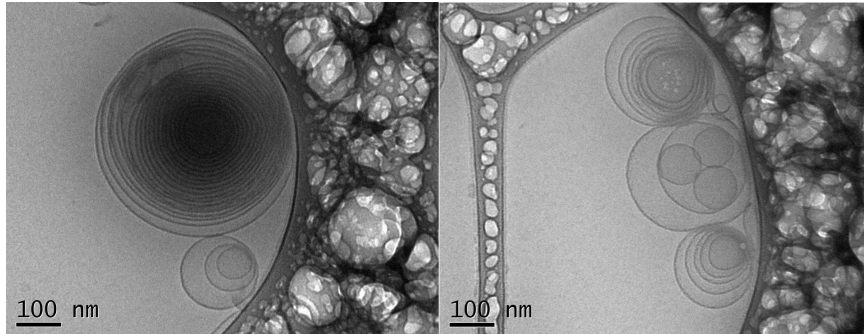
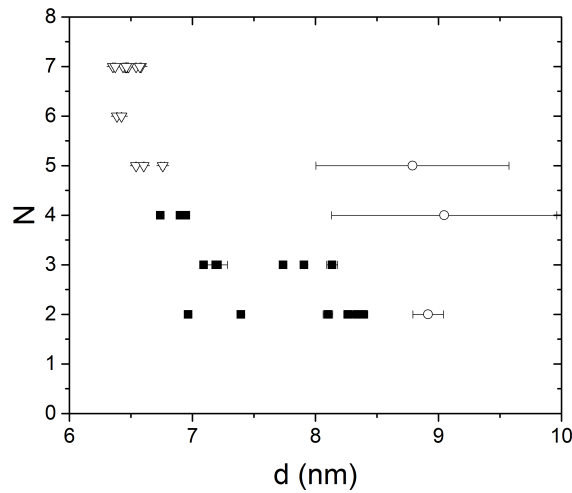


Figure 6.2.1 – Caractérisation par diffusion de rayons X des oignons multilamellaires après dispersion. Comparaison de diffractogrammes de l'empilement lamellaire initial (\circ) et de l'ognon après cisaillement puis dispersion (\blacksquare) pour des bicouches composées (a) à 5% de Simulsol [Ac. O, $n=6$] ($\phi_{\text{lip}}^{\text{initiale}} = 0.70$) et (b) à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$] ($\phi_{\text{lip}}^{\text{initiale}} = 0.40$). Les courbes représentent les ajustements par le modèle de Nallet.

6.2 La thermodynamique de l'empilement lamellaire initial induit des propriétés physiques spécifiques des oignons dispersés au maximum à 15%



(a)



(b)

Figure 6.2.2 – Détermination expérimentale du caractère multilamellaire des oignons. (a) Image d'ogons multilamellaires dispersés et observés par microscopie électronique à transmission à une température cryogénique (Cryo-TEM). A gauche, exemple d'un oignon représentant un nombre important de lamelles ($\phi_{lip}^{initiale} = 0.40$). A droite, exemple d'un oignon constitué de plusieurs noyaux vésiculaires ($\phi_{lip}^{initiale} = 0.30$). Les bicouches sont composées à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. (b) Nombre moyen N de lamelles, au sein d'ogons multilamellaires, estimé par le modèle de Nallet en fonction de la période d'empilement d . Les bicouches sont composées (∇) à 5%, (\blacksquare) à 30% et à (\circ) à 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$].

A l'aide de la technique de microscopie électronique à transmission utilisée à des températures cryogéniques (Cryo-TEM), l'observation directe de vésicules dispersées multilamellaires est possible, Figure 6.2.2a. Pour une même composition de membrane, ces vésicules ne présentent pas de manière systématique la même morphologie et le même nombre de lamelles N , en atteste la diversité des vésicules obtenues qui peuvent contenir un ou plusieurs cœur(s) de solvant (image de droite) et un nombre de lamelles varié pouvant atteindre en ordre de grandeur la vingtaine de couches (image de gauche). Néanmoins, la caractérisation des tailles et du nombre de lamelles reste difficile *via* cette méthode puisqu'il y a une sélection de certaines vésicules qui résulte des contraintes expérimentales. Il est alors nécessaire de la coupler avec la diffusion de rayons X et la diffusion dynamique de la lumière afin d'avoir accès à une population statistique.

Le modèle utilisé pour les ajustements des diffractogrammes de rayons X permet d'avoir accès à un nombre moyenné de couches qui sont corrélées au sein de ces vésicules. Bien que la valeur N déterminée par cette procédure soit également constructivement corrélée à la résolution expérimentale, il semble *a priori* possible, tout du moins en ordre de grandeur, de donner une estimation représentative pour un faible nombre de lamelles corrélées. Cette valeur de N est représentée, sur la Figure 6.2.2b, selon le régime de gonflement lamellaire illustré par la périodicité d , pour trois compositions de membranes différentes en teneur de co-tensioactif (5%, 30% et 70%). Globalement, les bicouches plus enrichies en Lécithine présentent un nombre N de lamelles au sein des vésicules légèrement plus important, accompagné d'une période d'empilement plus faible comme cela est déjà commenté à la Section 3.1.4.1. Le nombre de lamelles N demeure, malgré le changement de membranes, de l'ordre de l'unité voire de l'ordre de la dizaine d'unités.

Si l'on s'intéresse aux propriétés élastiques des bicouches qui forment ces vésicules multilamellaires, on remarque un comportement similaire à celui de la pâte cisailée. L'élasticité de l'empilement au sein des vésicules, illustré par le paramètre de Caillé, suit une évolution commune à celui de la phase purement constituée d'empilements lamellaires lorsque ceux-ci se gonflent sous l'effet de l'augmentation de l'hydratation, représentée pour une composition de membrane (30% de Simulsol [Ac. O, n=6]) sur la Figure 6.2.3.

À partir du gonflement observé, la périodicité lamellaire d des vésicules se voit donc être différente de celle de l'empilement lamellaire dont elles sont issues après cisaillement puis dispersion. Les vésicules ont, par conséquent, tendance à atteindre la limite de dilution de l'empilement des bicouches d_{lim} , discutée Section 3.1.3, et spécifiquement bien illustré pour des bicouches composées à 5% de Simulsol [Ac. O, n=6], Figure 6.2.4a. Il s'avère que ce n'est pas systématiquement le cas *via* la méthode utilisée et que cette périodicité vésiculaire dépend, en réalité, de la composition membranaire et du régime d'hydratation de l'empilement lamellaire initial, Figure 6.2.4b. On remarque alors, pour une membrane composée à 30% de Simulsol [Ac. O, n=6], que la limite de dilution n'est atteinte que pour le régime d'hydratation dilué de l'empilement initial. Un minimum dans les valeurs de la période d'empilement des vésicules est, de plus, mis en évidence. Ce minimum semble

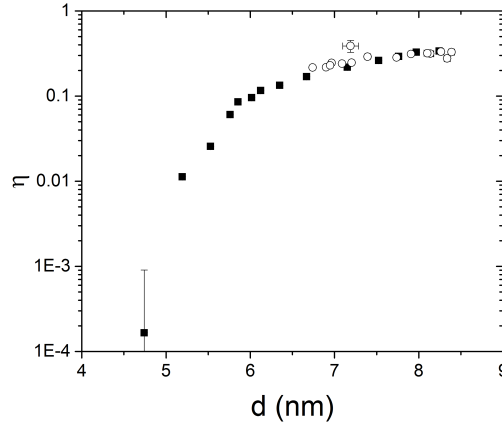


Figure 6.2.3 – Etude des propriétés élastiques des oignons dispersés multilamellaires. Comparaison des paramètres de Caillé η (■) de l'empilement lamellaire initial et (○) des oignons dispersés suivant la période d'empilement d . Les bicouches sont composées à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$].

relié à la transition de phase entre les empilements lamellaires « concentré » et « dilué » qui apparaît pour le confinement (d_2, Σ_{12}) , voir Section 3.1.4.1. En effet, en prenant en considération le séchage de la phase lamellaire après cisaillement, une corrélation semble se dégager entre le régime d'hydratation pour lequel on obtient une plage de valeurs minimales de la périodicité vésiculaire ($1.5 \lesssim \frac{1}{\phi_{lip}^{initiale}} \lesssim 1.75$) et le régime d'hydratation intermédiaire qui est délimité par les confinements (d_1, Σ_{12}) et (d_2, Σ_{12}) de la pâte cisailée avant dispersion (comparaison non représentée). Cette dépendance de la période d'empilement vésiculaire avec le régime d'hydratation de la phase lamellaire est renforcée par la création de vésicules multilamellaires uniquement aux alentours du confinement (d_2, Σ_{12}) de la pâte cisailée pour une membrane composée à 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$], Figure 6.2.4c. Ainsi, il apparaît que la structure et l'élasticité vésiculaires sont dépendantes des membranes lipidiques originelles.

6.2.1.2 Vésicules uni-lamellaires

Pour des bicouches fortement enrichies en Simulsol [Ac. O, $n=6$], les vésicules, créées par une même procédure, perdent la plupart du temps leur caractère multilamellaire. Comme il est représenté sur la Figure 6.2.5a, seul le facteur de forme de la bicouche est observé sur les diffractogrammes des vésicules unilamellaires contrairement à la présence des ordres de Bragg qui est notée pour caractériser l'empilement lamellaire initial.

La microscopie électronique à transmission utilisée à des températures cryogéniques permet d'observer directement ces vésicules unilamellaires, Figure 6.2.5b. On voit ainsi

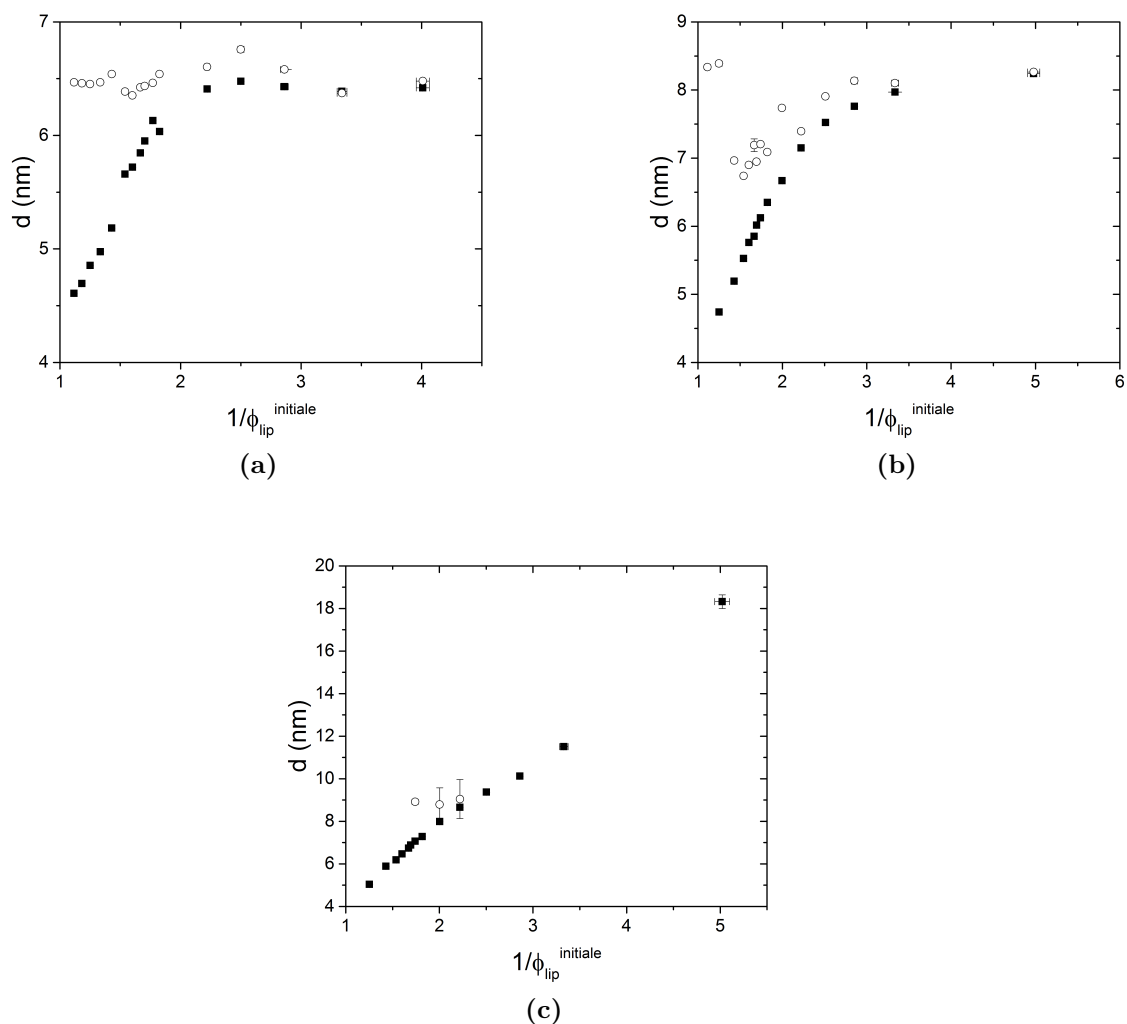


Figure 6.2.4 – Effet du régime d'hydratation de l'empilement lamellaire sur la distance inter-membranaire au sein des oignons multilamellaires. Comparaison des périodes d'empilements entre (■) l'empilement lamellaire initial et (○) les oignons multilamellaires dispersés pour des bicouches composées (a) à 5%, (b) à 30% et (c) à 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. Le régime d'hydratation est caractérisé par la fraction volumique en lipides de l'empilement lamellaire à l'état initial $\phi_{lip}^{initiale}$.

une certaine polydispersité des tailles du noyau vésiculaire.

Le choc de pression osmotique qui a lieu lors de la dispersion de la pâte cisailée, apparentée à une texture d'oignons, entraîne, par conséquent, un « épluchage » de ces vésicules. Cet « épluchage » semble alors plus conséquent pour des membranes plus enrichies en co-tensioactifs, ce qui laisse supposer soit une différence de pression osmotique plus importante soit une cohésion plus faible entre les molécules amphiphiles pour ce type de membranes. La différence de pression osmotique serait donc dépendante à la fois de la composition de la membrane et du régime d'hydratation de l'empilement de bicouche à l'état initial. Il convient donc de maîtriser cette différence de pression osmotique afin de contrôler la multilamellarité des vésicules et de pouvoir effectuer une comparaison mieux adaptée entre les différents types de bicouches.

6.2.1.3 Contrôle de la pression osmotique

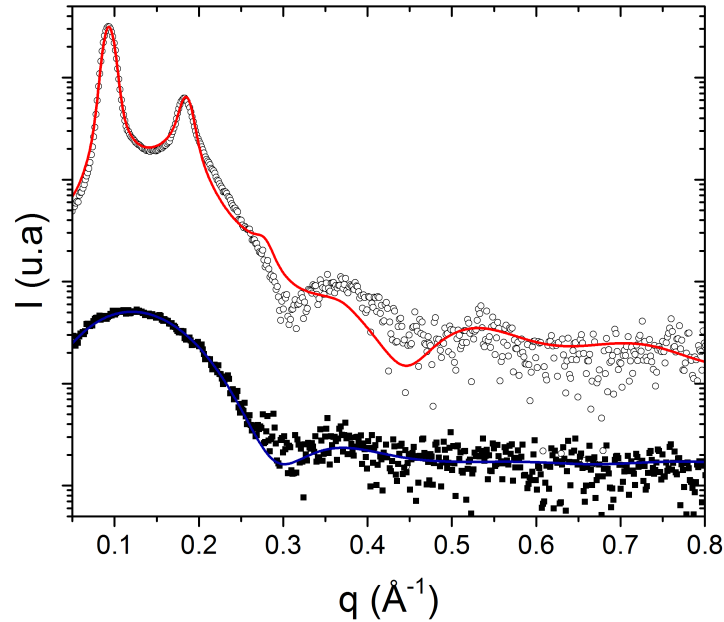
Après cisaillement de la phase lamellaire, la pâte cisailée est, cette fois-ci, dispersée dans une eau chargée en polymères dont la pression osmotique est connue et fixée, voir Section 2.1.4.1. Par cette approche, il est alors possible de contrôler la différence de pression osmotique et donc le confinement des bicouches au sein des vésicules.

Pour des bicouches composées à 5% de Simulsol [Ac. O, n=6], une périodicité lamellaire $d_{osm} = 5.5 \text{ nm}$ est ainsi imposée au sein des vésicules, indépendamment du régime d'hydratation de l'empilement lamellaire à l'état initial (pour tout ϕ_{lip}), alors que sans aucune maîtrise de la pression osmotique les vésicules atteignent une périodicité plus élevée en limite de dilution $d_{lim} = 6.5 \text{ nm}$, Figure 6.2.6a. Par cette incrémentation de la pression osmotique, le nombre de lamelles des vésicules semble alors renforcé (non représenté). Cette augmentation suit une évolution avec la période d'empilement qui est similaire à celle exposée Figure 6.2.2b.

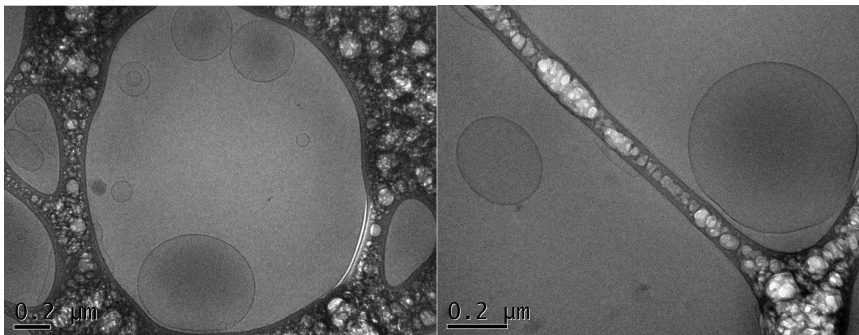
Pour des bicouches composées à 70% de Simulsol [Ac. O, n=6], une périodicité lamellaire relativement proche est obtenue, $d_{osm} = 5.8 \text{ nm}$, valeur toujours indépendante du régime d'hydratation de l'empilement lamellaire à l'état initial, Figure 6.2.6b. On remarque alors une forte modification par rapport au système non contrôlé osmotiquement, Section 6.2.1.2. Les vésicules ne demeurent alors plus unilamellaires mais apparaissent multilamellaires après la dispersion. Ainsi, le contrôle de la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules permet une maîtrise de l'effet « d'épluchage » de ces oignons, pour chaque composition de bicouche.

6.2.2 Influence des régimes d'hydratation de la phase lamellaire initiale sur le diamètre hydrodynamique des vésicules

Le caractère multilamellaire des vésicules est donc maîtrisé mais leur taille nécessite toujours d'être caractérisée. Cette taille dépend bien entendu du nombre de bicouches empilées en moyenne au sein des vésicules, mais elle dépend aussi du diamètre du noyau



(a)



(b)

Figure 6.2.5 – Caractérisations expérimentales des oignons unilamellaires dispersés. (a) Comparaison de diffractogrammes de l'empilement lamellaire initial (\circ) et de l'ogon après cisaillement puis dispersion (\blacksquare) pour des bicouches composées à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. Les courbes représentent les ajustements par le modèle de Nallet. (b) Images d'ogons unilamellaires dispersés et observés par microscopie électronique à transmission à une température cryogénique (Cryo-TEM). ($\phi_{lip}^{initiale} = 0.33$). Les bicouches sont composées à 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$].

6.2 La thermodynamique de l'empilement lamellaire initial induit des propriétés physiques spécifiques des oignons dispersés au maximum à 15%

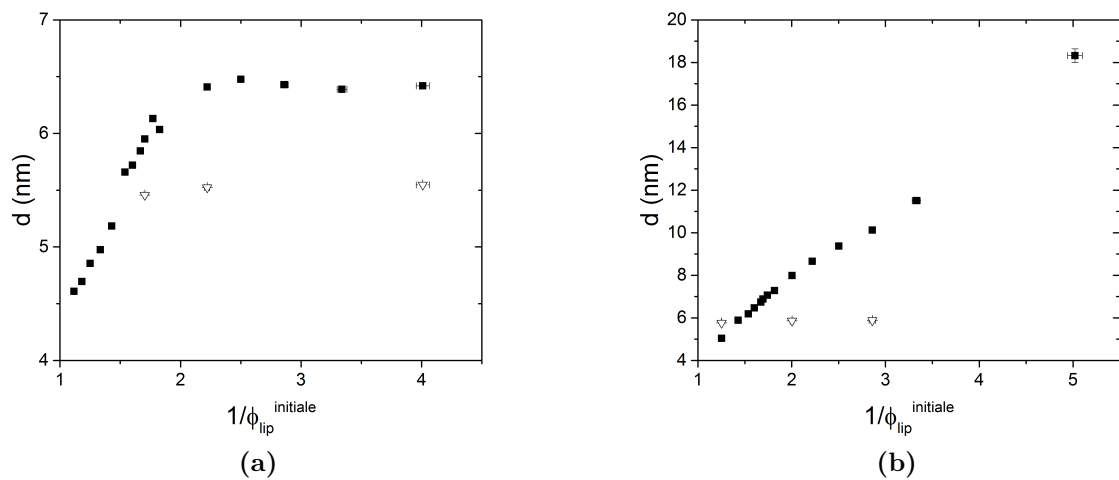


Figure 6.2.6 – Effet du contrôle de la pression osmotique sur la distance inter-membranaire au sein d’oignons multilamellaires dispersés. Comparaison des périodes d’empilements entre (■) l’empilement lamellaire initial et (○) les oignons multilamellaires dispersés avec contrôle de la pression osmotique pour des bicouches composées (a) à 5% et (b) à 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. Le régime d’hydratation est caractérisé par la fraction volumique en lipides de l’empilement lamellaire à l’état initial $\phi_{lip}^{initiale}$. La pression osmotique appliquée est $\Pi \simeq 1,6 \cdot 10^6$ Pa.

vésiculaire tels que commenté à la Section 1.1.4.2. Afin d'avoir accès à une population statistique au sein du volume, la diffusion dynamique de la lumière est privilégiée, dans des conditions qui sont détaillées à la Section 2.3. Grâce à l'utilisation de cette technique, le diamètre hydrodynamique moyen d_H des vésicules est extrait pour trois densités de greffage en co-tensioactif polymérique et pour tout le domaine d'hydratation de l'empilement lamellaire de bicouches à l'état initial, Figure 6.2.7. Un aperçu de la polydispersité et de la morphologie de ces vésicules est alors déduit sommairement par la largeur de la distribution des tailles obtenue pour différents angles de diffusion. En effet, les petites tailles ressortent statistiquement mieux aux plus grands angles de diffusion et réciproquement pour les grandes tailles associées aux petits angles de diffusion.

Pour des bicouches composées seulement à 5% de Simulsol [Ac. O, n=6], les vésicules ont une taille importante avec un diamètre d_H qui varie de $1\ \mu m$ à $3\ \mu m$. La variation de ce diamètre hydrodynamique apparaît alors liée au régime d'hydratation de l'empilement lamellaire initial, caractérisé par la fraction volumique en lipides initiale $\phi_{lip}^{initiale}$, et donc à la différence de pression osmotique au moment de la dispersion telle que discutée précédemment. Dans le régime d'hydratation dilué, un diamètre constant de vésicules ($d_H \simeq 2.3\ \mu m$) est obtenu pour $\frac{1}{\phi_{lip}^{initiale}} \geq 3$, associée à une variation de taille d'environ 20%. Cette valeur délimite la limite de dilution à partir de laquelle l'empilement lamellaire initial ne gonfle plus ni verticalement ni latéralement. La différence de pression osmotique au moment de la dispersion est donc identique, ce qui induit un diamètre des vésicules qui demeure inchangé. Lorsque l'empilement lamellaire initial se concentre, on remarque un minimum dans la distribution de tailles des vésicules ($d_H \simeq 0.8\ \mu m$) qui intervient dans le domaine d'hydratation intermédiaire, pour $\frac{1}{\phi_{lip}^{initiale}} \sim 2$. Ce minimum pourrait concorder avec la transition de phase entre les empilements lamellaires « concentré » et « dilué » qui a lieu pour le confinement (d_2, Σ_{12}), bien qu'il soit difficile de le certifier à cause de la mauvaise distinction entre chaque domaine d'hydratation pour cette composition spécifique de la bicouche, voir Figure 3.1.10a. La polydispersité demeure alors équivalente (15% – 20%). Enfin, un gonflement de ces vésicules est observé lorsque l'empilement lamellaire initial est très concentré jusqu'à atteindre une taille $d_H \sim 2.5\ \mu m$.

Pour des bicouches composées de 30% de Simulsol [Ac. O, n=6], il est nettement plus difficile de faire ressortir une évolution du diamètre hydrodynamique qui résulterait du régime d'hydratation de l'empilement lamellaire initial, Figure 6.2.7b. Néanmoins, un léger gonflement, cette fois-ci, semble ressortir aux alentours de $\frac{1}{\phi_{lip}^{initiale}} \sim 1.7$ ce qui correspondrait, de même, au confinement (d_2, Σ_{12}) pour cette composition. Cette faible augmentation de taille est donc accompagnée d'une diminution de la périodicité d'empilement, Section 6.2.1.1. La principale information, qui est mise en évidence, est la diminution flagrante de la taille des vésicules avec la diminution de la teneur en Lécithine, avec un diamètre moyen qui se situe aux alentours de $d_H \simeq 400\ nm$ accompagnée d'une variation en taille de l'ordre de 40%.

Pour des bicouches composées de 70% de Simulsol [Ac. O, n=6], la taille globale des vé-

6.2 La thermodynamique de l'empilement lamellaire initial induit des propriétés physiques spécifiques des oignons dispersés au maximum à 15%

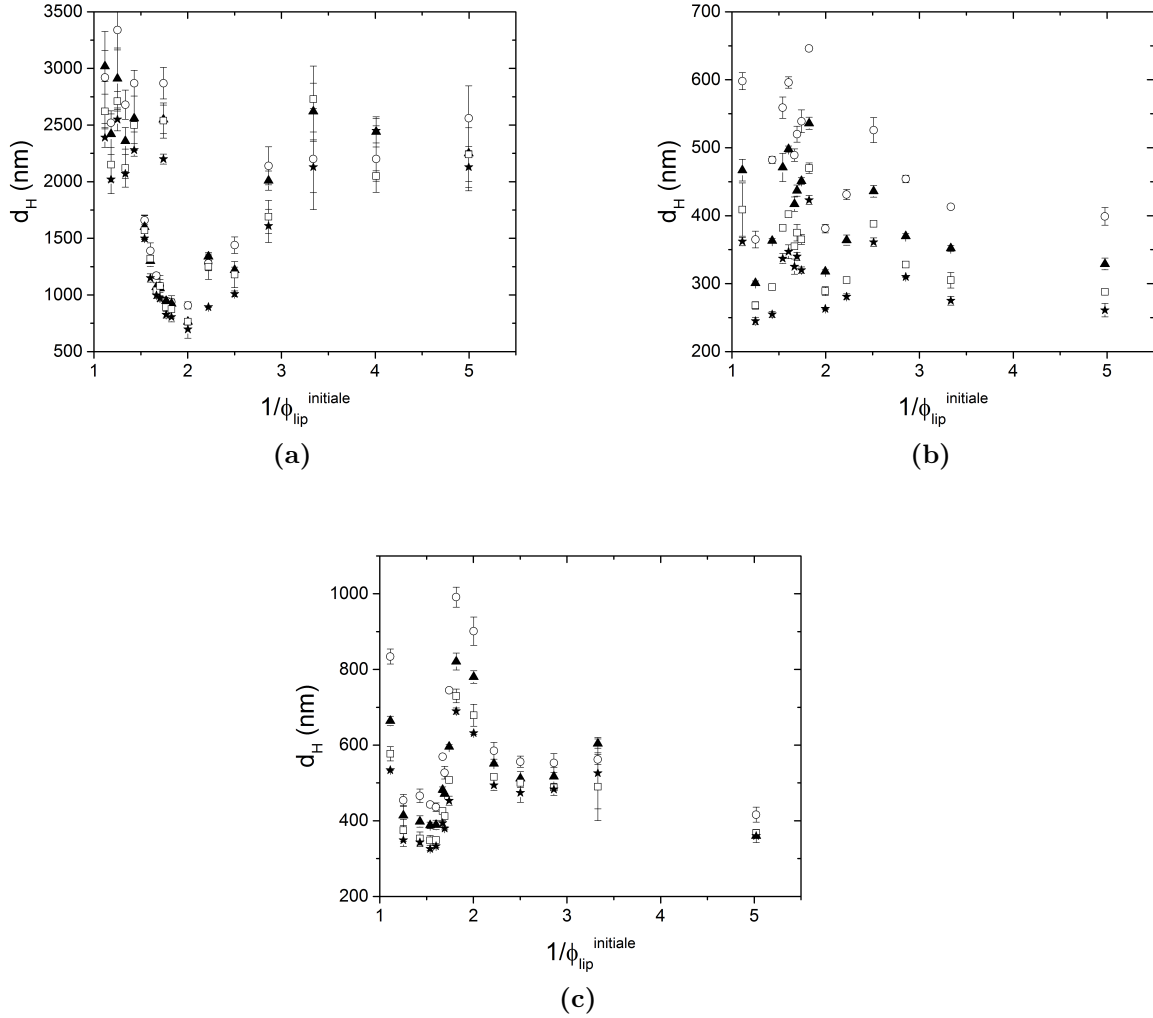


Figure 6.2.7 – Effet du régime d’hydratation de l’empilement lamellaire sur les tailles des oignons dispersés. Evolution du diamètre hydrodynamique d_H des oignons dispersés, obtenu par diffusion dynamique de la lumière, selon le régime d’hydratation de l’empilement lamellaire à l’état initial, caractérisé par la fraction volumique en lipides $\phi_{lip}^{initiale}$. Les bicouches sont composées (a) à 5%, (b) à 30% et (c) à 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. Le diamètre hydrodynamique est obtenu pour les angles de diffusions : (○) 60° , (▲) 75° , (□) 90° et (★) 105° .

sicules se situe aux alentours de $d_H \sim 550 \text{ nm}$ se situant ainsi, de façon surprenante, entre les tailles des vésicules composées à 5% et à 30% de Simulsol [Ac. O, n=6]. L'augmentation de la teneur en Simulsol [Ac. O, n=6] n'a donc pas pour conséquence systématique un gonflement ou un rétrécissement des vésicules formées. Puisque ces vésicules sont, pour la plupart, sous forme unilamellaire, on observe ici un gonflement avéré du noyau vésiculaire. A l'instar des autres compositions précédemment caractérisées, on observe une évolution remarquée du diamètre hydrodynamique avec le régime d'hydratation de l'empilement lamellaire à l'état initial. Dans le régime dilué, une taille constante est obtenue pour une diamètre hydrodynamique $d_H \simeq 520 \text{ nm}$. En revanche, un important gonflement des vésicules a lieu aux alentours de $\frac{1}{\phi_{lip}^{initiale}} \sim 1.9$ avec un diamètre $d_H \simeq 780 \text{ nm}$. Prenant toujours en considération le séchage de la phase lamellaire au moment du cisaillement, ce gonflement apparaît pour un confinement (d_2, Σ_{12}) de la pâte cisailée. Dans ce domaine d'hydratation, les vésicules sont donc davantage gonflées et sont aussi multilamellaires, voir Section 6.2.1.1. Une diminution de la taille des vésicules a ensuite lieu dans le régime concentré de l'empilement lamellaire initial, qui reste constante avec une valeur de diamètre plus faible $d_H \simeq 400 \text{ nm}$.

Sur la Figure 6.2.8a, une comparaison du diamètre hydrodynamique est représentée, évoluant avec le régime d'hydratation de l'empilement lamellaire, pour chacune des trois compositions de membranes, observées sous un angle de diffusion de 90° . Un fort changement, relié à la transition de phase entre les empilements lamellaires « concentré » et « dilué » au confinement (d_2, Σ_{12}), a donc lieu systématiquement aux alentours $\frac{1}{\phi_{lip}^{initiale}} \sim 1.7 - 2$, indépendamment de la composition de la membrane. En revanche, on observe dans ce domaine d'hydratation un rétrécissement des vésicules composées à 5% de Simulsol [Ac. O, n=6], tandis qu'un gonflement est indiqué pour des bicouches composées à 30% et à 70% de Simulsol [Ac. O, n=6]. Cette transition dans le gonflement des vésicules peut sans doute résulter de l'hypothétique transition « brosse » - « champignon » dans la conformation de la tête polaire du co-tensioactif polymérique, qui est discutée brièvement à la Section 3.1.4.2. Lorsque les « copolymères » sont dans une conformation « champignon », c'est-à-dire qu'il n'y a que peu d'interactions latérales entre les chaînes éthoxylées, les tailles des vésicules sont dominées par les interactions entre les molécules de Lécithine et apparaissent ainsi plus importantes.

Connaissant, grâce à la diffusion de rayons X, le nombre de lamelles N et la périodicité de l'empilement d , si les vésicules sont multilamellaires, il est possible de donner une estimation du diamètre du noyau vésiculaire de solvant à l'aide de la relation 1.1.3. Si les vésicules sont unilamellaires, le diamètre du noyau de solvant est estimé par la relation 1.1.4. L'évolution de la taille de ce noyau vésiculaire est ainsi représentée sur la Figure 6.2.8b pour chacune des compositions membranaires étudiées. Par comparaison avec la Figure 6.2.8a, il apparaît alors évident que la taille des vésicules résulte majoritairement de la taille du noyau de solvant et que, par conséquent, l'extension de la taille des vésicules par l'empilement des lamelles y est négligeable, quelle que soit la composition des bicouches.

6.2 La thermodynamique de l'empilement lamellaire initial induit des propriétés physiques spécifiques des oignons dispersés au maximum à 15%

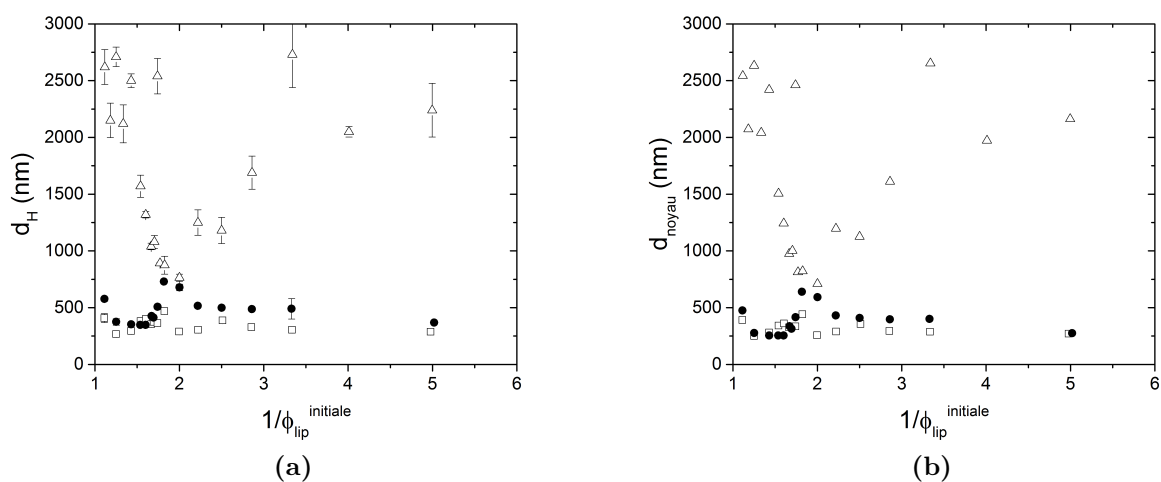


Figure 6.2.8 – Effet de la composition membranaire sur la taille des oignons dispersés. Comparaison (a) du diamètre hydrodynamique d_H des oignons dispersés et (b) du diamètre du noyau de solvant d_{noyau} pour des bicouches composées (Δ) à 5%, (\square) à 30% et (\bullet) à 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. L'évolution des tailles est indiquée selon le régime d'hydratation de l'empilement lamellaire à l'état initial, caractérisé par la fraction volumique en lipides $\phi_{lip}^{initiale}$. Le diamètre du noyau d_{noyau} est déduit des relations 1.1.3 et 1.1.4. L'angle de diffusion est de 90° .

6.3 Contrôle de la stabilité et de la géométrie des oignons

La taille et le nombre de lamelles au sein des vésicules sont contrôlées, d'une part, par la différence de pression osmotique au moment de la dispersion de la pâte cisailée et, d'autre part, par les interactions intra et inter-membranaires qui varient selon le régime d'hydratation de l'empilement lamellaire de bicouches à l'état initial et de la composition membranaire. En perspective d'éventuelles applications, une étude de la stabilité de ces vésicules semble nécessaire. De plus, dans une même optique, il est possible de contrôler la taille de ces vésicules à l'aide de dispositifs expérimentaux différents tels que la méthode de l'extrusion.

6.3.1 Etude cinétique

Dans le but d'étudier la stabilité des vésicules créées via la dispersion de la pâte multilamellaire cisailée, des expériences de diffusion de rayons X et de diffusion dynamique de la lumière sont entreprises sur certains échantillons, de manière systématique, sur une période s'étendant jusqu'à 40 à 50 jours. Sur la Figure 6.3.1a, le gonflement entre les lamelles de vésicules multilamellaires est observé au cours du temps. Pour une composition à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$], un léger gonflement est noté au bout de 50 jours, et tend ainsi vers la limite de dilution des bicouches empilées. Ce gonflement semble alors moins important pour les bicouches les plus confinées.

La taille des vésicules, représentée Figure 6.3.1b pour une bicouche composée à 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$], est stable au cours du temps sur une période de 40 jours. On remarque, en effet, que le diamètre hydrodynamique ne varie pas temporellement, quel que soit le régime d'hydratation de l'empilement lamellaire initial. Le noyau de solvant, qui constitue la partie prépondérante des vésicules formées, maintient alors ses dimensions géométriques.

Les vésicules tendent, par conséquent, à rester dans l'état où elles ont été créées, comme cela fut déjà observé pour d'autres systèmes [57].

6.3.2 Méthode de l'extrusion

Afin de contrôler la taille des vésicules, il est possible de maîtriser la pression osmotique lors de la dispersion de la pâte cisailée multilamellaire. Cependant, diverses techniques mécaniques offrent aussi cette capacité. C'est le cas de la méthode de l'extrusion. Celle-ci consiste à ce que la pâte lamellaire traverse les pores d'une membrane sous l'effet d'une pression appliquée, voir Section 2.1.4.2.

Une comparaison entre les méthodes de cisaillement puis dispersion et de l'extrusion est effectuée sur la Figure 6.3.2 pour une bicouche composée à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$]. Le diamètre hydrodynamique d_H y est ainsi confronté pour divers procédés testés d'extrusion des vésicules pour des domaines distincts d'hydratation de l'empilement

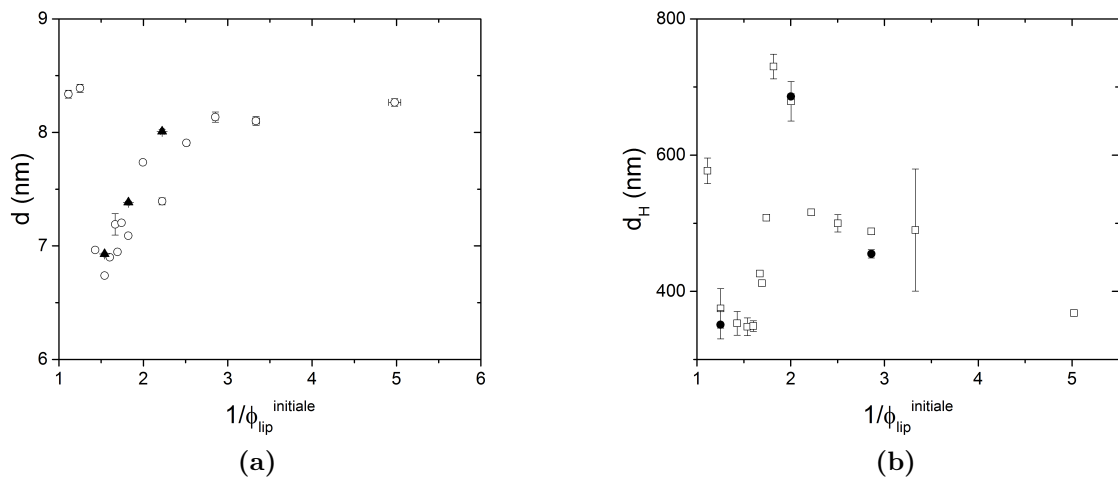


Figure 6.3.1 – Etude de la stabilité des oignons dispersés au cours du temps. (a) Comparaison de la période d'empilement d d'ogons dispersés, composés à 30% de Simulsol [Ac. O, $n=6$], (\circ) à $t = 0$ j et (\blacktriangle) à $t = 50$ j. (b) Comparaison du diamètre hydrodynamique d_H d'ogons dispersés, composés à 70% de Simulsol [Ac. O, $n=6$], (\square) à $t = 0$ j et (\bullet) à $t = 40$ j. Les tailles structurales sont représentées en fonction du régime d'hydratation de l'empilement lamellaire à l'état initial, caractérisé par la fraction volumique en lipides $\phi_{lip}^{initiale}$.

lamellaire initial : (1) une pâte cisailée est extrudée une fois à travers les pores de la membrane, (2) une pâte cisailée est extrudée, cette fois-ci, 11 fois et enfin (3) une pâte lamellaire non cisailée est extrudée 11 fois.

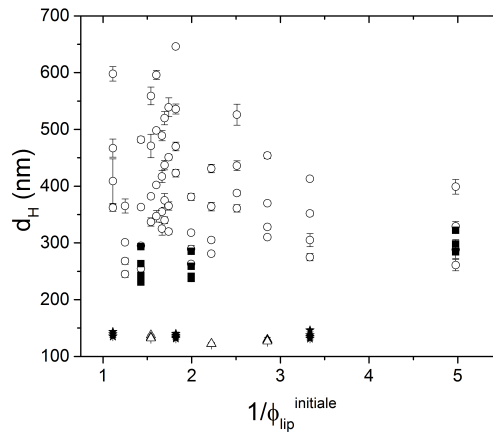


Figure 6.3.2 – Contrôle de la taille des oignons par la méthode d’extrusion. Le diamètre hydrodynamique d_H des oignons dispersés est comparé avec (\circ) la méthode « classique » de cisaillement de l’empilement lamellaire puis dispersion pour différents procédés d’extrusion : (\blacksquare) cisaillement puis extrusion, (\star) cisaillement puis extrusion répétée 11 fois et (\triangle) extrusion répétée 11 fois sans cisaillement au préalable. Le régime d’hydratation de l’empilement lamellaire à l’état initial est alors caractérisé par la fraction volumique en lipides $\phi_{lip}^{initiale}$. Les angles de diffusions sont de 60° , 75° , 90° et 105° et sont représentés sans aucune distinction mais demeurent à l’image de la Figure 6.2.7b.

Lorsque la pâte cisailée multilamellaire est extrudée une fois à travers ces pores de la membrane de petite taille, les vésicules créées voient leur taille diminuée (environ de 15%) par rapport à la méthode classique, de cisaillement puis dispersion, et perdent leur caractère multilamellaire. La polydispersité des vésicules qui en résulte est alors plus faible.

Si l’extrusion est alors répétée 10 fois supplémentaires, les vésicules atteignent une taille aux alentours de $d_H \simeq 140 \text{ nm}$ qui correspond approximativement à la taille des pores l de la membrane utilisée ($l \simeq 100 \text{ nm}$), valeur indépendante du régime d’hydratation de l’empilement des bicouches. Les vésicules unilamellaires apparaissent ainsi monodisperses. De même, cette méthode présente des effets similaires lorsque la pâte lamellaire est directement extrudée sans l’étape de cisaillement par le dispositif de Couette. Le cisaillement induit par le passage de la pâte lamellaire à travers le pore de la membrane est alors suffisant pour créer les vésicules.

On obtient donc des tailles de vésicules « calibrées », car davantage monodisperses, par la méthode de l’extrusion. Plus on extrude la pâte lamellaire, plus on « épuche » la vésicule pour tendre vers une taille minimale correspondant à la taille des pores de la

membrane utilisée. Ainsi, pour une calibration optimisée, il convient d'estimer la taille des vésicules créées par cisaillement puis dispersion et de choisir une taille de pores qui correspond afin de limiter le phénomène « d'épluchage » et d'obtenir une distribution monodisperse de la taille escomptée des vésicules multilamellaires.

6.4 Conclusion

Le cisaillement appliqué, à l'aide d'un dispositif de type Couette, aux empilements de bicouches, constituées de Lécithine et de Simulsol [Ac. O, n=6], permet la formation d'une pâte cisailée présentant une texture d'ognons multilamellaires. Lors du cisaillement, un léger séchage de la phase lamellaire a lieu mais les propriétés structurales et élastiques de l'empilement de bicouches à périodicité égale sont conservées indépendamment de sa physico-chimie.

La dispersion à 15% au maximum de cette pâte cisailée multilamellaire entraîne un gonflement des oignons qui repose sur un contrôle osmotique délicat. Si le choc osmotique, qui dépend de la composition membranaire et du régime d'hydratation de l'empilement lamellaire à l'état initial, est trop important, l'état structural des oignons en est altéré. Les tailles structurales des oignons ainsi créés, c'est-à-dire le diamètre hydrodynamique du noyau de solvant et la période d'empilements des bicouches, en sont affectées, tout comme l'est le nombre de lamelles qui repose sur un phénomène « d'épluchage » des oignons. Bien que la structure des oignons soit sensiblement dépendante de cette différence de pression osmotique, les propriétés élastiques de la membrane sont, elles, conservées. Les oignons paraissent, de plus, stables au cours du temps, tout du moins sur une période de 50 jours. La polydispersité qui est alors mise en évidence par cette méthode de cisaillement puis de dispersion des oignons peut finalement être calibrée par une méthode d'extrusion optimisée.

L'encapsulation de nano-objets tels que les bâtonnets d'ADN ou des principes actifs au sein de ces oignons « poilus » peut, par conséquent, être envisagée dans le cadre d'une vectorisation.

« So, at the end of it all, what
do we have?
No glory. No money. No love.
None of the things that make life
bearable.
We have honor.
I can live with that.
For honor, then.

Still, a little money would be
nice. »"

(*D'artagnan, Aramis, Porthos,
Athos.*)

Conclusion générale et perspectives

Rappel des objectifs

Ce travail de thèse est entrepris dans l'idée d'améliorer la compréhension des interactions et de la thermodynamique intervenant au sein d'un empilement lamellaire de bicouches « poilues ». Ces bicouches, ou membranes sont électriquement neutres et composées d'un mélange de lécithines et de co-tensioactifs, ces derniers s'apparentant à de (courts) copolymères diblocs. Dans cette optique, différents paramètres physico-chimiques sont variés tels que l'hydratation du système, la nature chimique du co-tensioactif (bloc hydrophobe comme bloc hydrophile) et la teneur de ce co-tensioactif au sein de la membrane. L'auto-assemblage de ces systèmes lipidiques, qui parviennent à confiner des macromolécules d'ADN, est présumé être issu de deux mécanismes distincts. Le premier est un mécanisme entropique, lié à l'élasticité de courbure membranaire, et le second est un mécanisme interfacial, relatif à des interactions spécifiques à l'interface membrane-membrane ou membrane-ADN probablement médiées par les « poils » hydrophiles du co-tensioactif.

Bilan des travaux effectués

À l'aide de techniques de diffusion de rayons X, il est mis en évidence que l'empilement lamellaire est soumis à un confinement de faible amplitude (soft confinement), qui se sépare en deux composantes : l'une, verticale (définie par la période d'empilement d) et l'autre, latérale (caractérisée par l'aire moléculaire à l'interface bicouche-eau Σ). Le gonflement lamellaire et l'extension latérale de la membrane sont alors contrôlés par l'hydratation du système, la teneur en co-tensioactif et par la longueur, notamment hydrophile, du co-tensioactif. Trois principaux régimes d'hydratation de l'empilement lamellaire ressortent, et se distinguent soit par une restructuration membranaire, soit par la conformation des têtes polaires, que ce soient les groupes phosphate choline ou bien les chaînes de groupements d'oxyde d'éthylène. Ces différents régimes se définissent par des évolutions bien particulières de la période d'empilement, de l'aire moléculaire et de l'épaisseur de la bicouche, obtenue par contraste de densité électronique. Ainsi, chaque domaine d'hydratation des lipides repose sur un couplage délicat entre des enchevêtrements verticaux ou latéraux des têtes polaires.

Le co-tensioactif modifie la flexibilité de la bicouche mais a aussi un impact consé-

quent sur le contrôle des interactions inter- et intramembranaires. En effet, les interactions entre les blocs hydrophiles sont plus spécifiques et interviennent latéralement à la surface d'une même membrane ou bien verticalement à l'interface membrane-membrane. Elles dépendent alors de la longueur de la chaîne éthoxylée et de la teneur en co-tensioactif au sein de la bicouche. La composition hydrophobe du tensioactif possède, de même, un effet sur le gonflement lamellaire mais permet surtout de contrôler la fluidité membranaire *via* une courte chaîne carbonée ou *via* la présence d'une insaturation. Dans le domaine concentré, des coexistences entre des phases lamellaires ou non lamellaires apparaissent notamment lorsque l'on augmente les interactions stériques entre blocs hydrophiles (augmentation de la longueur de la chaîne éthoxylée) ou lorsque la membrane est dans un état de phase cristallisé, associé à une longue chaîne carbonée et saturée du bloc hydrophobe de co-tensioactif.

Par compétition entre les répulsions stériques et les attractions présumées de van der Waals, une transition de décrochage est caractérisée entre des empilements lamellaires « liés », présentant une limite de dilution, et des empilements lamellaires « non liés », gonflant théoriquement de manière « infinie ». Un modèle thermodynamique est établi pour décrire, de manière pertinente, l'empilement lamellaire de bicouches lorsqu'un faible couplage a lieu entre les variations verticales, donc de la période d'empilement, et latérale, c'est-à-dire de l'aire de la tête polaire des lipides. Il permet ainsi de globalement caractériser l'élasticité de l'empilement, à l'aide du paramètre de Caillé qui est extrait des diffractogrammes de rayons X, et la transition de décrochage, bien illustrée par la variation de la pression osmotique. De plus, il offre un cadre conceptuel pour décrire des transitions de phases, notamment lamellaire-lamellaire, grâce à la prédiction de décompositions spinodales. Cependant, le modèle apparaît encore fortement limité pour décrire des variations latérales importantes (extension de l'aire polaire), notamment lorsque le système est enrichie en lécithines.

Comme E. R. T da Silva l'avait déjà décrit dans sa thèse [22], ces édifices lipidiques réussissent à encapsuler des bâtonnets d'ADN au sein des couches aqueuses, en particulier dans un régime concentré en ADN. Grâce aux interactions provenant des chaînes éthoxylées du co-tensioactif, que cela soit par augmentation de la densité de greffage ou de la longueur des chaînes, différentes organisations des bâtonnets d'ADN sont stabilisées sur de larges domaines d'hydratation. Ces différentes structures se succèdent alors par augmentation du confinement dès lors que les interactions interfaciales membrane-ADN sont suffisamment intenses, auxquels cas des coexistences multiphasiques apparaissent. On a, ainsi, accès à l'organisation isotrope L_{α}^I , l'agencement nématique L_{α}^N et l'arrangement hexagonal L_{α}^H des bâtonnets d'ADN au sein d'un empilement lamellaire auxquels s'ajoute, spécifiquement dans un régime très confiné, une structure hexagonale de micelles lipidiques inverses H_{II}^C encapsulant l'ADN en leur cœur. Ces différentes organisations sont alors régies par les interactions verticales et latérales qui s'appliquent sur la bicouche, au même titre que les différents régimes d'hydratation de l'empilement en l'absence d'ADN.

Une forte corrélation est alors mise en évidence entre les transitions de régimes d'hydratation de la bicouche, donc de la « nature » de la membrane, et les transitions de phases entre les différentes organisations des bâtonnets d'ADN.

Dans une optique d'ouverture du projet, des oignons lipidiques sont créés par cisaillement, à l'aide d'un dispositif de type Couette, puis dispersés. La maîtrise de la différence de pression osmotique, entre l'empilement lamellaire non cisailée et les oignons dispersés, apparaît primordial pour contrôler la taille des oignons et le nombre de lamelles qui peut diminuer à cause d'un phénomène « d'épluchage ». Cette pression osmotique dépend alors de l'hydratation de l'empilement des bicouches mais aussi de la composition de la membrane. Les oignons ainsi formés sont, à l'échelle microscopique, élastiquement équivalents aux empilements lamellaires concentrés, sont stables (sur une période d'au moins 50 jours) et présentent une polydispersité qui peut, néanmoins, être contrôlée par une méthode d'extrusion bien « calibrée » - au prix, toutefois, d'une réduction du nombre de bicouches empilées.

Apports, limites et perspectives

La procédure mise en place laisse ainsi entrevoir une possibilité d'encapsulation et de vectorisation de principes actifs. Des collaborations avec des entreprises ont, par ailleurs, commencé dans cette optique. De plus, ces systèmes lipidiques sont sensibles à la température qui apparaît être un paramètre supplémentaire dans le contrôle de la transition de phases entre les différents empilements lamellaires de bicouches, comme le suggèrent quelques expériences effectuées à titre préliminaire.

L'étude fondamentale de ces bicouches empilées de lipides peut progresser grâce à une amélioration de la modélisation thermodynamique. En effet, les limites rencontrées devraient pouvoir être surmontées par l'insertion d'une plus grande flexibilité du modèle, liée à l'extension latérale de la membrane *via* les aires polaires des lipides. Cette approche a d'ores et déjà été initiée.

Enfin, afin de compléter l'étude des propriétés des empilements lamellaires contenant de l'ADN, il serait intéressant de se concentrer sur la modélisation des diffractogrammes de rayons X. À partir d'une caractérisation des facteurs de forme et de structure de l'ADN concentré en phase aqueuse, il serait intéressant de construire un modèle adapté permettant une analyse des diffractogrammes de rayons X des empilements lamellaires de bicouches qui confinent de l'ADN (L_α^I , L_α^N et L_α^H). Il deviendrait alors possible de comparer, de manière quantitative, l'élasticité membranaire *via* le paramètre de Caillé et la représentation de la membrane par contraste de densité électronique avec les mêmes propriétés des empilements dénués d'ADN.

Annexes

Annexe A

Substantial abstract in english

A.1 Introduction

A.1.1 Motivation and goals

From mixture of lipids and water, multilamellar systems may naturally emerge. In such self-assembled systems, lipid bilayers are periodically stacked and separated by a layer of water. This stack of lipid bilayers may exhibit the symmetry of a smectic A phase, and is then called lamellar L_α , when bilayers are in their "fluid" state, showing no in-plane order. For uncharged membranes, "hydration forces" [76], membrane undulations [49] and van der Waals attraction [104] are mechanisms usually invoked as leading to self-assembly.

Multilamellar hosts with DNA macromolecules guests, *i.e* long anionic polyelectrolytes, have been studied within gene therapy as an objective. Based on electrostatic interactions, first cationic lipoplexes have been characterized experimentally [117, 65, 66] and described theoretically [47, 92]. Despite the advantage to electrostatically bind themselves to the anionic membranes of specific cells (lipofection) [68, 16], these complexes may present a cytotoxicity due to their positive charges [131, 25]. However, the confinement of DNA charged molecules remains possible in an electrically-neutral lamellar structure [116, 20, 115, 26, 23]. Indeed, it has been shown that lyotropic lamellar phases, made of lecithin with a very small amount of helper surfactants, manage to encapsulate dispersed rods of DNA [116, 115]. A Flory model exhibits a transition between DNA-depleted and DNA-enriched lamellar phases related to the isotropic-nematic transition of the binary system comprising DNA rods dispersed in water [20]. For a similar complex [26, 23, 22], E. R. Teixeira da Silva investigated, during his PhD work, the effect of the confinement applied on the nanorods by changing the hydration of the system. By doing so, a rich polymorphism occurs involving isotropic (L_α^I), nematic (L_α^N), rectangular (L_α^R) and hexagonal (L_α^H) phases of DNA within the lipid lamellar stack, schematically described in Figure A.1. But since DNA is actually not confined between rigid plates, the key role of

the membranes on the organization of the rods has also to be taken into account in such poorly hydrated systems.

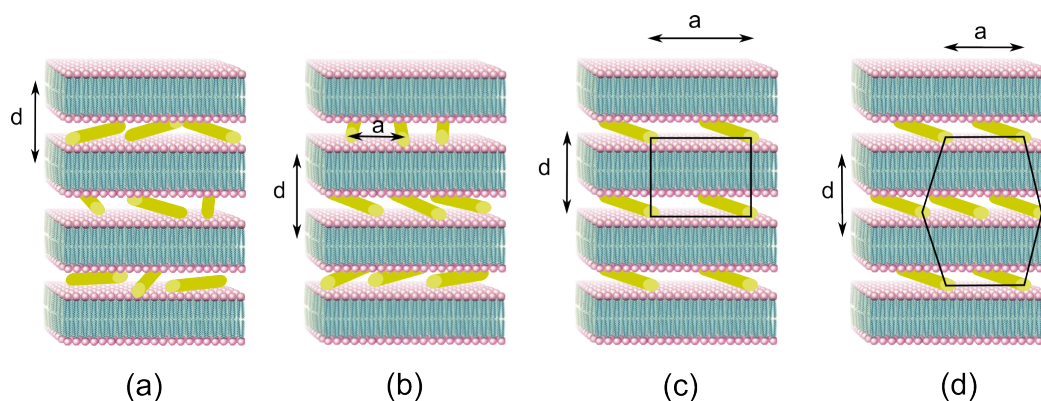


Figure A.1 – DNA organizations inside a lamellar stack of bilayers. (a) Isotropic DNA organization, nanorods are completely disoriented. (b) Nematic organization of DNA nanorods. Inside a same layer of water, nanorods have a common orientation and are laterally separated by a mean distance a . There is no orientational or positional order between layers. (c) Rectangular DNA organization. Each rod is separated laterally by a mean distance a and vertically by a distance d , the bilayers stacked period. (d) Hexagonal DNA organization. DNA rods have a 2D hexagonal symmetry with a lattice parameter a .

Thus, this thesis project is involved in the characterization of the interactions occurring in the self-assembly of lipid complexes. Entropic and interfacial mechanisms are considered. A co-surfactant, similar to a diblock copolymer in its structure, is added to the lecithin membranes in order to modify both membrane elasticity and specific interactions occurring between adjacent bilayers or at the bilayer-DNA interface, since the co-surfactant hydrophilic part is longer than the lecithin one. By varying hydration and bilayer composition, depending on the co-surfactant content or its chemical nature, the interplay between vertical and lateral confinements is controlled. Thanks to small angle X-ray scattering techniques and modelizations, coupled to microscopy observations, we explore the phase diagram and investigate the membrane fluidity, confinement and the "unbinding" transition of the lamellar stacks. The phase transitions in the DNA organization are delimited by particular confinements which are then associated to specific structural and elastic properties of the bilayer. Polymer-type interactions, resulting from ethoxylated chains of the co-surfactant, reveal their huge impact on the stabilization and on the confinement of these structures governed by the hydration of the system.

A.1.2 "Bound" or "unbound" lamellar phases

For flexible enough bilayers, repulsive steric interactions overcome the other inter-bilayers attractive interactions leading to an "unbound" state of the lamellar stack, cha-

racterized by Helfrich [49]. In a more general description, interactions occurring between stacked bilayers can be summarized by a competition between, in one hand, electrostatic, hydration and entropic repulsions and in the other hand, van der Waals and entropic attractions. This implies that, for a finite amount of solvent, the system may reach a limit of hydration for which attractive and repulsive interactions compensate each other. At this point, if the hydration is increased, the lamellar stack cannot swell anymore, leading to a "bound" state, and a phase coexistence with pure water appears. The "unbinding" transition has been theoretically described by Leibler and Lipowsky [79, 72, 73] and then by Podgornik and Parsegian [114].

For a thermodynamic description of the lamellar stack, two equations of state are needed [6] and they result from the expression of the excess free energy density f_{exc} . The lamellar stack equation of state is associated to the perpendicular swelling, *i.e* the evolution of the lamellar periodicity d , and it is defined by the osmotic pressure Π , given by the expression :

$$\Pi = \phi_{lip} \frac{\partial f_{exc}}{\partial \phi_{lip}} - f_{exc} \quad (\text{A.1.1})$$

where ϕ_{lip} represents the lipid volume fraction. In the case of a "bound" lamellar stack, the limit of dilution d_{lim} is reached when the osmotic pressure takes a zero value : $\Pi(\phi_{lip}^*) = 0$.

The bilayer equation of state aims to describe the lateral extension of the membrane and rules the variation of the lipid molecular area Σ at the interface bilayer-solvent. It results from the minimization of the excess free energy with respect to fluctuations of the molecular area Σ or fluctuations of the stack period d , as :

$$\frac{\partial f_{exc}}{\partial d} = 0 \quad (\text{A.1.2})$$

The excess free energy depends then on three variables (Σ , d , ϕ_{lip}). Considering homogeneous and flat bilayers, these parameters are coupled in the following geometric equation :

$$d = 2 \frac{v}{\Sigma \cdot \phi_{lip}} \quad (\text{A.1.3})$$

with v the lipid molecular volume which is constant, and the membrane thickness defined as $\delta_m = \frac{2v}{\Sigma}$. However, this expression is no longer true if some structural defects are present within the bilayer or if undulations are too important.

For electrically-neutral bilayers, interactions in the lamellar stack are decomposed in Helfrich undulations [49], attractions being taken into account in a perturbative way defined by Milner and Roux [99] and intra-bilayer interactions described by the thermodynamic of a van der Waals bidimensional fluid [90, 122], far from its liquid-gas "unbound" transition. The excess free energy volume density is then expressed as :

$$f_{exc} = \frac{3\pi^2}{128} \frac{(k_B T)^2}{\kappa_c (d - \delta_m)^2} - k_B T \chi \phi_{lip}^2 + \frac{k_B T}{\Sigma} \cdot \ln \left[\frac{\xi^2}{e(\Sigma - \Sigma_0)} \right] + \frac{k_B T}{2} \frac{b_2}{\Sigma^2} \quad (\text{A.1.4})$$

with $k_B T$ the thermal energy, κ_c the bilayer curvature constant, χ a second virial coefficient, Σ_0 the excluded area corresponding to a maximal density of the van der Waals fluid, ξ a length similar to the 2D de Broglie thermal wavelength, b_2 an intra-bilayer interaction parameter. In this representation, vertical effects inside the bilayer are neglected as for protrusions or pores.

A.2 Materials and Methods

A.2.1 Samples preparation

Lipid membranes are composed of a mixture of two components, a soya lecithin and a nonionic co-surfactant named Simulsol and which have a chemical composition that can be changed. Soya lecithin (from Sigma-Aldrich) is a double-chained phosphatidylcholine (PC) mostly composed of linoleic acid (64%) for its fatty acid component, but with also some palmitic, oleic, linolenic and stearic acids. On its polar head, lecithin bears a choline group, with a negative charge, opposed to a phosphate group, with a positive charge, in such a way that lecithin is considered as a zwitterionic molecule. Simulsol (graciously provided by Seppic) is a surfactant, somehow similar to a diblock copolymer, composed of n-ethoxylated monomers (ethylene glycol) and an aliphatic chain which can comprise an oleic acid (Ac. O), a stearic acid (Ac. S) or a lauric acid (Ac. L). The different Simulsols, represented on Figure A.1, are distinguished as following : Simulsol [Ac. O, n=6], Simulsol [Ac. S, n=6], Simulsol [Ac. L, n=6], Simulsol [Ac. O, n=16], Simulsol [Ac. S, n=15] and Simulsol [Ac. L, n=15]. Another commercial co-surfactant, Simulsol 2599PHA (mainly composed of Simulsol [Ac. O, n=10]), is added to the comparison because of former studies [26, 23, 42]. In order to get homogeneous lipid mixture (designed as lip), lecithin and Simulsol are cosolubilized and lyophilized until the complete evaporation of the solvent. "Binary" systems, opposed to "ternary" systems containing DNA molecules, are prepared by addition of pure water to the lipid mixture in appropriate proportions, defined by a lipid volume fraction ϕ_{lip} .

Calf thymus DNA fibers (provided by Sigma-Aldrich) are ultrasonicated at low temperature to cut them into rigid nanorods of diameter $\Phi \simeq 2 \text{ nm}$ and contour length $L_C \approx 50 \text{ nm}$, corresponding to their persistence length in physiological conditions. DNA are then marked with a YOYO fluorophore (provided by Fisher Scientific/Molecular Probes) in order to observe by fluorescence microscopy the DNA repartition inside samples.

"Ternary" systems are composed of lipid mixture, DNA nanorods and pure water. Since this study consists to compare the properties of "binary" and "ternary" systems, it relies

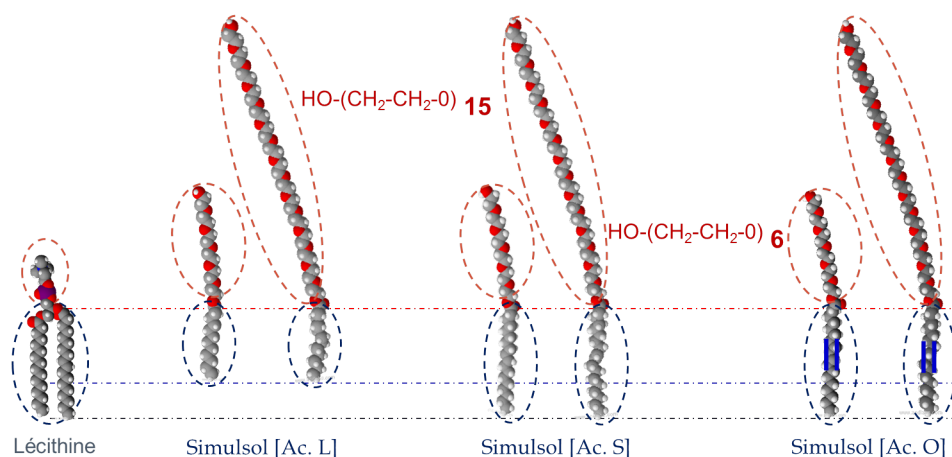


Figure A.1 – *Amphiphilic molecules used in the bilayers composition.*

on E. R. T. da Silva results obtained during his PhD project [22]. Da Silva brought out different organizations of DNA nanorods inside lipid lamellar stack occurring in large monophasic domain in hydration, especially for a dilution line characterized by a volume ratio $\rho_v = \frac{\phi_{lip}}{\phi_{DNA}} \simeq 3.4$. It is the reason why this volume ratio is kept constant for all "ternary" formulations.

Samples are often centrifuged and conserved at 4°C until they reach homogeneity checked mainly by macroscopic observations (during around one week for "binary" systems and one month for "ternary" systems).

A.2.2 Microscopic observations

For each sample, images have been recorded in polarized light microscopy, as lamellar phases should be optically anisotropic, and in epifluorescence microscopy, to see DNA repartition within different phases. For that, an Olympus BX 51 microscope (for "binary" system) and a Leica DMIRE2 confocal laser scanning microscope (for "ternary" system) are used. An Argon laser illuminates samples at $\lambda = 488 \text{ nm}$ which is close to the excitation peak of YOYO ($\lambda = 491 \text{ nm}$) and a pair of crossed polarizers is placed along the optical axis to observe birefringence. For the observations, samples are sandwiched, without any control of the optical path, between a glass slide and a coverslip and then sealed by means of a UV-curing glue to prevent water evaporation.

A.2.3 X-ray scattering

Small angle X-ray scattering (SAXS) experiments are mainly performed on a Bruker Nanostar machine equipped with a Hi-Star detector (Bruker). A Copper source (Siemens) produces a radiation at $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ selected by a crossed coupled pair of Göbel mirrors

(Bruker). The incident beam is collimated by a 3-pinhole system, with a FWHM at sample position *ca.* 0.43 nm in both vertical and horizontal directions. Two sample-to-detector distances are calibrated, using a Silver Behenate as standard, at 0.25 m and 1.05 m reaching a wave vectors range extending from 0.01 \AA^{-1} to 0.8 \AA^{-1} . The resolution width (FWHM) is estimated thanks to the gaussian width of the first order Bragg peak, for the two distances as, respectively, $\Delta q \approx 1.10^{-2}\text{ \AA}^{-1}$ and $\Delta q \approx 5.10^{-3}\text{ \AA}^{-1}$. Wide angle X-ray scattering (WAXS) experiments are performed on a custom-made instrument with a mar345 image plate detector (marXperts GmbH). As for the Nanostar machine, a similar system is used for the selection of the radiation and for the collimation of the beam coming from a Copper rotating-anode-based setup. But here, only the collimation flight path is evacuated. Equilibrated samples are introduced into flamesealed cylindrical quartz capillaries with a nominal diameter 1.5 mm . Temperature is controlled during X-ray experiments thanks to a water circulation system and fixed at $20^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$. The 2D detector images obtained are azimuthally-averaged, since samples are often unoriented, substrated from the scattering signal of a reference (water) capillary for SAXS experiments and normalized by the acquisition time.

A.2.4 Nallet model

X-ray diffractograms of "binary" systems are fitted with a model developed by Nallet *et al.* [100]. Fittings are optimized thanks to C. L. Pinto de Oliveira procedure [106]. The scattering intensity is given by the following relation :

$$I(q) = 2\pi \frac{V}{d} \frac{P(q)\tilde{S}(q)}{q^2} \quad (\text{A.2.1})$$

where $P(q)$ is the bilayer form factor, $\tilde{S}(q)$ is the stack structure factor convoluted with the experimental resolution function, V the irradiated sample, d the periodicity and q the wavevector.

The structure factor describes the structural organization of bilayers by taking into account the displacement fluctuations u . It is given by the relation :

$$\tilde{S}(q) = 1 + 2 \sum_1^{N-1} \frac{(1 - \frac{n}{N})}{\sqrt{1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n)}} \cos\left(\frac{qdn}{1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n)}\right) \exp\left(-\frac{2q^2 d^2 \alpha(n) + \Delta q^2 d^2 n^2}{2(1 + 2\Delta q^2 d^2 \alpha(n))}\right) \quad (\text{A.2.2})$$

where $\alpha(n) = \langle (u_n - u_0)^2 \rangle = \frac{\eta}{2\pi^2} (\ln(\pi n) + \gamma) d^2$ is the smectic correlation function, η the Caillé parameter, N the number of correlated bilayers, γ the Euler constant and Δq the experimental resolution.

The elasticity of the lamellar stack is estimated by the Caillé parameter η , relying on the bending modulus K and the layer compressibility modulus at constant chemical potential \bar{B} , and given by :

$$\eta = \frac{q_0^2 k_B T}{8\pi \sqrt{K \cdot B}} \quad (\text{A.2.3})$$

The form factor $P(q)$ describes the bilayer in terms of its electronic density contrast with the solvent as it is represented on Figure A.2. It is finally given by the relation :

$$P(q) = \frac{4}{q^2} (\Delta\rho_H)^2 \left\{ \sin(q(\delta_H + \delta_T)) - \sin(q\delta_T) \left(1 - \frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H} \right) \right\}^2 \quad (\text{A.2.4})$$

with δ_H the hydrophilic thickness, δ_T the hydrophobic thickness, $\frac{\Delta\rho_T}{\Delta\rho_H}$ the ratio of the electronic contrast (hydrophobic over hydrophilic).

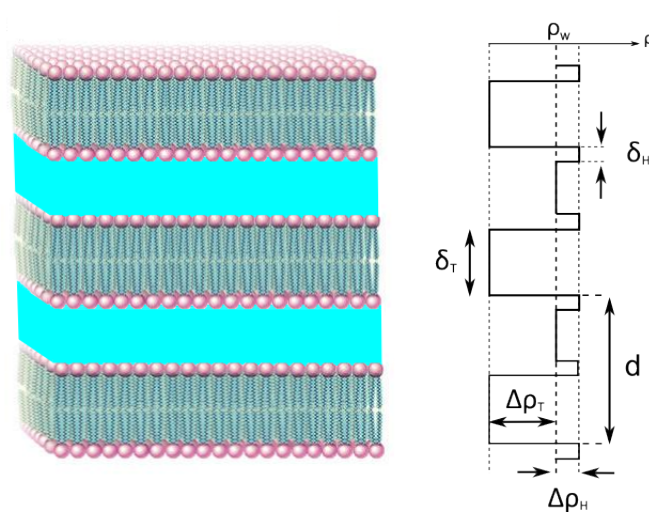


Figure A.2 – Schematic representation of the bilayer form factor described by Nallet's model. δ_T and δ_H indicate hydrophobic and hydrophilic thicknesses of the monolayer. ρ_s corresponds to the solvent electronic density. $\Delta\rho_T$ and $\Delta\rho_H$ are respectively the hydrophobic and hydrophilic electronic density contrasts compared to the solvent electronic density. d is the bilayers stacked period.

A.3 Interfacial effects in complexes DNA-lipid bilayers-water

Following the E. R. Teixeira da Silva PhD work on the DNA confinement inside a lipid lamellar structure [26, 23, 22], we investigate the effect of interfacial interactions, coupled to the confinement, on the phase diagram describing the different DNA organizations.

In this context, bilayers are composed of a mixture of lecithin and Simulsol [Ac. O]. In order to modify the interfacial interactions occurring between adjacent stacked membranes (vertical and lateral repulsions), or at the interface of the membrane (lateral repulsion) or between DNA nanorods and membranes (vertical and lateral attractions), the cosurfactant content and its hydrophilic length are both varied.

A comparison between different phase diagrams is represented on Figure A.1 in order to show the effect of Simulsol [Ac. O, n=6] content on the DNA organizations. Phase diagrams describe lipid structures of complexes, composed of respectively 30% (Figure A.1a) and 77% (Figure A.1b) of Simulsol [Ac. O, n=6] content, with the variation of hydration, illustrated by the lipid volume fraction ϕ_{lip} . Complexes are then characterized by structural parameters, *i.e.* lamellar periodicities and mean distance between DNA nanorods, which permit to highlight phase coexistences (biphasic or multiphasic domains) or monophasic domains. When the Simulsol [Ac. O, n=6] content is increased, well defined phase transitions appear in numbers. Isotropic (L_α^I), nematic (L_α^N) and hexagonal (L_α^H) arrangements of DNA in biphasic coexistence, in the diluted domain, and other undefined structures in multiphasic coexistence, in the more confined domain, are present for bilayers composed of 30% of Simulsol [Ac. O, n=6]. Whereas for bilayers composed of 77% of Simulsol [Ac. O, n=6] content, phase transitions are shown, by diminution of hydration, between isotropic (L_α^I), nematic (L_α^N), and hexagonal (L_α^H) arrangements of DNA inside lipid lamellar structures, cylindrical lipid micelles in 2D hexagonal geometry (H_{II}^C) and hydrated Simulsol phase. The second major point is that large monophasic domains (in hydration) are brought out with this increase of Simulsol [Ac. O, n=6] content. Nematic arrangement of DNA nanorods (L_α^N) are stabilized over a confinement domain which is defined from $\phi_{lip} \sim 0.3$ to $\phi_{lip} \sim 0.53$ (Figure A.1b). 2D hexagonal symmetry of DNA nanorods inside a lipid lamellar structure (L_α^H) are characterized in a monophasic domain which is defined from $\phi_{lip} \sim 0.58$ to $\phi_{lip} \sim 0.65$ and cylindrical lipid micelles in 2D hexagonal symmetry (H_{II}^C) from $\phi_{lip} \sim 0.65$ to $\phi_{lip} \sim 0.71$.

In complexes, interfacial interactions coming from ethoxylated chains help to enrich the polymorphism in the DNA organizations and to stabilize the different structures in large confinement domains. This conclusion is reinforced by the effect of the Simulsol [Ac. O] length when this work is compared to E. R. Teixeira da Silva one. Indeed, he investigated the phase diagram of complexes made of lecithin (70%) and Simulsol [Ac. O, n=10] (30%) [23], a cosurfactant with a longer hydrophilic length. With this composition of the bilayer, the phase diagram exhibits phase transitions, globally similar to the ones shown on Figure A.1b, namely L_α^I , L_α^N , and L_α^H structures where nematic and hexagonal organizations of DNA can be defined in monophasic domains. However, bilayers at the same molecules content, but with a shorter cosurfactant (Simulsol [Ac. O, n=6]), fail to stabilize monophasic structures pointing out the key role of ethoxylated chains to interact with DNA molecules.

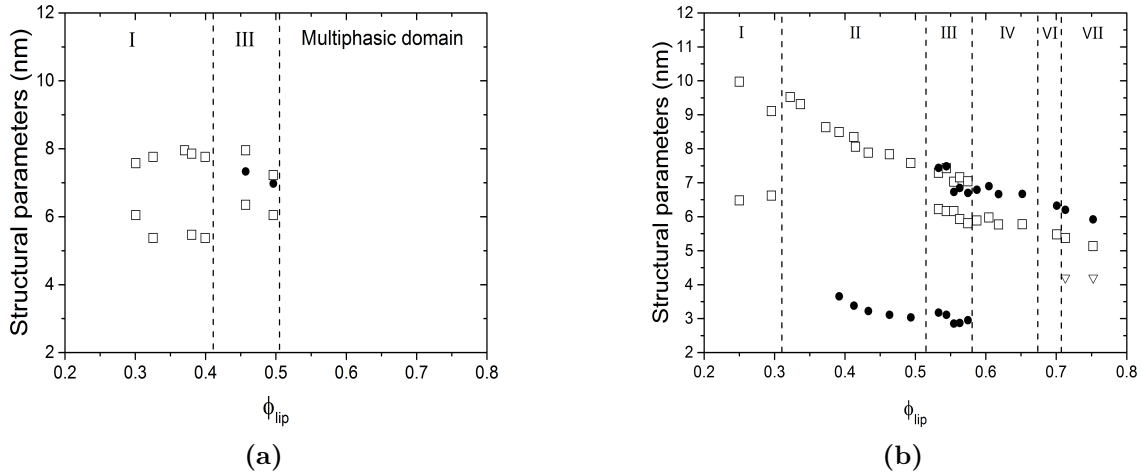


Figure A.1 – Effect of Simulsol content on the complex phase diagram. Comparison of the phase diagram of DNA nanorods confined inside lipid structures composed of Lecithin and Simulsol [Ac. O, $n=6$] in (a) 30% and in (b) 77% cosurfactant molar content. (\square) Stacking period. (\bullet) Mean distance between DNA nanorods. (∇) Structural size of hydrated Simulsol phase. Domain I : $L_{\alpha}^I + L_{\alpha}^N$. Domain II : L_{α}^N . Domain III : $L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^H$. Domain IV : L_{α}^H . Domain VI : H_{II}^C . Domain VII : $H_{II}^C +$ hydrated Simulsol.

A.4 Interfacial mechanisms in a lamellar matrix of lipid bilayers

Interfacial interactions seem to have a huge impact on the structure of DNA-lipid bilayers-water complexes. It is then necessary to understand the interfacial mechanisms which results in the complex formation and how they occur. To do so, an in-depth study of the lamellar host matrix has been established. The experimental approach consists in a variation of the physicochemical properties of the lamellar stack. By doing so, the hydration, the two-component composition of the bilayer, the hydrophilic length and the hydrophobic composition of the cosurfactant are modified. In this extended abstract, the attention is focused on the main results obtained for a specific hydrophobic composition (Simulsol [Ac. O]). The experimental approach is finally coupled to a theoretical one thanks to a thermodynamic modelization of the lamellar stack of lipid bilayers.

A.4.1 Highly hydrated domain : "Unbinding" transition

A.4.1.1 Description in terms of Vertical and Lateral confinements

For all the studied samples, the mixed lipid-surfactant bilayer is in its fluid (L_α) state, as evidenced by the presence of a broad peak in scattered intensity centered at $q = 1.4\text{\AA}^{-1}$ (WAXS), characteristic of the disordered packing of aliphatic chains at the molecular scale (data not shown). Using small angle X-ray scattering technics, it is possible to describe the swelling law of the stacked bilayers, for different Lecithin-Simulsol [Ac. O, n=6] mixtures, on Figure A.1a. The vertical confinement applied on the lamellar stack, illustrated by the stacking period $d = \frac{2\pi}{q_0}$ (with q_0 the first-order Bragg peak), is represented along the hydration of the system, quantified by the lipid volume fraction ϕ_{lip} . The value of the lamellar periodicity increased with the hydration of the system meaning that bilayers are less confined which is quite obvious. But the lamellar swelling is also sensitive to the Simulsol [Ac. O, n=6] content inside the bilayers. Indeed, when the cosurfactant content increased, for a given lipid volume fraction, the lamellar phase appears less confined. The balance, in the vertical direction, between van der Waals attractions, in one hand, and repulsive Helfrich undulations combined to interfacial repulsions, in another hand, is altered. Two swelling behaviors can then be distinguished. For a membrane composed of less than 73% of Simulsol [Ac. O, n=6] content, a limit of the lamellar periodicity is reached at a given hydration (ϕ_{lip}) depending on the membrane composition. The lamellar stack is thus in a "bound" state. Despite a global diminution of the intensity of the interactions with the amount of water, attractions are therefore, in proportion, strong enough to compensate repulsions between membranes and to maintain a stabilized structure. From this limit of dilution, an increase of the hydration results in a phase coexistence between the lamellar stack of bilayers and a water phase. For a membrane composed of more than 73% of Simulsol [Ac. O, n=6] content, a continuous linear increase of the lamellar swelling is defined which can be described by a simple geometric modelization at one dimension. The lamellar stack is now in an "unbound" state. Whatever the hydration is, repulsions always dominate and the limit of dilution seems to be "infinite". The unbinding transition observed for the lamellar stack of lipid bilayers may be compared, qualitatively speaking, to the phase transition between a liquid phase (analogous to a "bound" state) and a gas state (analogous to an "unbound" state). For molecules (analogous to bilayers) inside a liquid, there is enough attraction to keep cohesion between them whereas for the molecules inside a gas, entropic repulsion is dominating. The analogy is reinforced if we look at the pressure, inside a liquid or a gas, in function of the separation distance between molecules and we compare its evolution to the osmotic pressure one, inside a lamellar stack in a "bound" state or an "unbound" state, in function of the stacking period [122]. Their evolution seems to be qualitatively similar.

The lamellar stack of bilayers cannot be characterized only in the stacking direction (vertical direction to bilayers) but it has also to be described in the bilayer plan (lateral

directions to bilayers). For this purpose, the lateral confinement is evidenced by the mean molecular area of lipids at the solvent-bilayer interface Σ allowing a description for the bilayer lateral extension. In the case of Lecithin-Simulsol mixed bilayers, its definition has to be slightly modified from the relation A.1.3 by taking into account the molecules contents. A mean molecular volume $v = x.v_S + (1 - x).v_L$ is defined (with x the molar proportion in Simulsol [Ac. O, n=6], v_S the molecular volume of Simulsol [Ac. O, n=6] and v_L the molecular volume of Lecithin) and so is a mean molecular area $\Sigma = x.\Sigma_S + (1 - x).\Sigma_L$ (with Σ_S the molecular area of Simulsol [Ac.O, n=6] and Σ_L the molecular area of Lecithin). The coupling between the mean molecular area Σ and the stacking period d , when hydration and/or Simulsol [Ac. O, n=6], is represented on Figure A.1b. Different hydration domains can be seen which are defined by different couplings between lateral and vertical confinements, especially for "bound" lamellar stacks. When bilayer composition is altered, these couplings are modified as are interfacial interactions. The unbinding transition occurs, since the Simulsol [Ac. O, n=6] content is increased, between a "bound" lamellar stack which undergoes a strong coupling between lateral and vertical confinements, in particular in its diluted regime, and an "unbound" lamellar stack which swells only in its vertical direction (negligible variations of Σ whatever the hydration is).

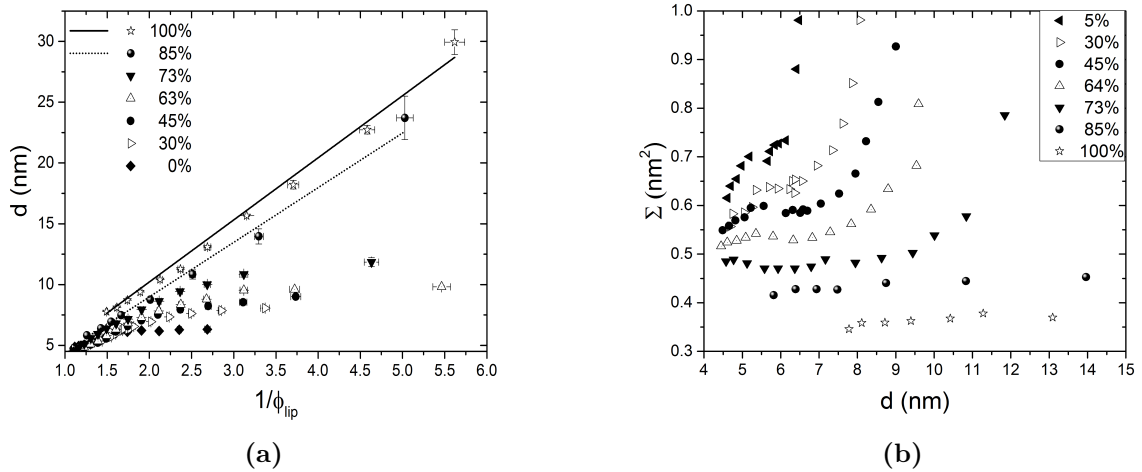


Figure A.1 – Unbinding transition brought out by the vertical and lateral confinements applied on bilayers lamellar stack composed of different Simulsol [Ac. O, n=6] molar content. (a) Swelling laws of bilayers in lamellar stack. Lines represent fittings thanks to a geometric description, $d = \frac{\delta_m^{geo}}{\phi_{lip}}$, with d the lamellar periodicity, δ_m^{geo} the membrane thickness and ϕ_{lip} the volume fraction in lipids. $\delta_m^{geo} = 5.0$ nm (100%) and $\delta_m^{geo} = 4.5$ nm (85%) are the membrane thicknesses obtained. (b) Experimental coupling between the mean molecular area Σ at solvent-bilayer interface (lateral confinement) and the stack period d (vertical confinement).

The coupling between hydration and bilayer composition, in one hand, and vertical and lateral confinements, in another hand, for a "bound" lamellar stack in its diluted regime, is illustrated on a schematic representation at scale on Figure A.2. For a given bilayer composition, the variation of hydration leads to a modification of both vertical and lateral confinements. With another approach, by varying both hydration and bilayer composition, it is possible to control the coupling between confinements in order to get only a variation of the vertical confinement, for instance. The intensity of Helfrich undulations, van der Waals attractions and interfacial interactions are then dependent on the hydration and the bilayer composition.

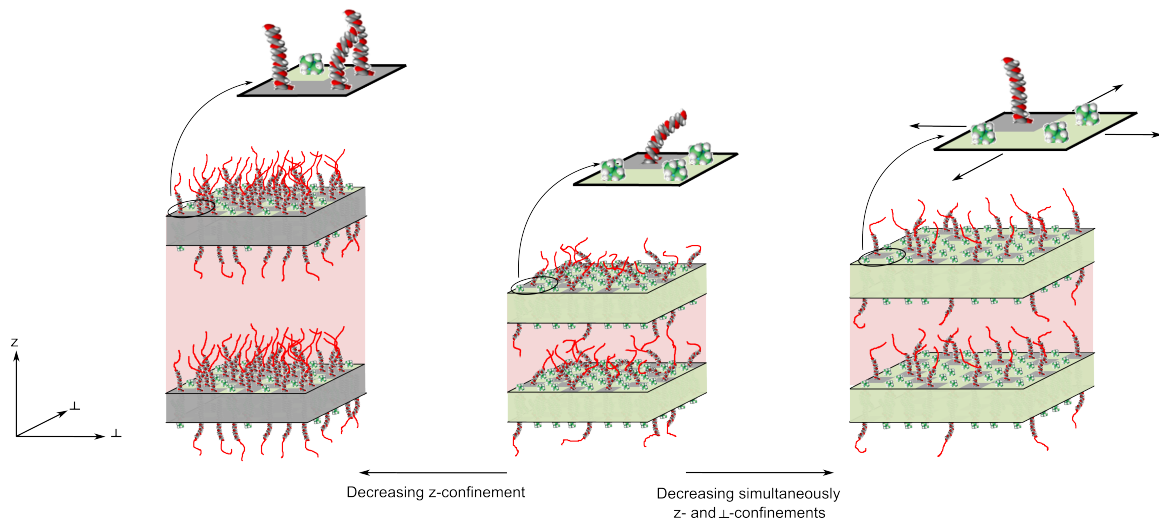


Figure A.2 – Lateral and vertical confinements controlled by a coupling between the hydration and the cosurfactant grafting density. Molecular representation indicates the hydrophilic length given by the electronic density modelization. Draw at scale.

A.4.1.2 "Unbound" state

One can have experimentally access to the stack flexibility coupled to the interactions occurring between bilayers with the Caillé parameter, equation A.2.3, extracted from the modelization of the X-ray diffractograms, Section A.2.4. Thanks to the equation A.1.4, which defines the volume free energy density of the lamellar stack, the theoretical behavior of the Caillé parameter can also be obtained. The "unbound" state, for enriched bilayers in Simulsol [Ac. O, n=6], corresponds to a lamellar stack of bilayers where vertical repulsions are dominating. Thereby, the Caillé parameter evolution along the vertical confinement, on Figure A.3a, is quantitatively well described by only repulsive Helfrich undulations which determine the following expression : $\eta = \frac{4}{3} \left(1 - \frac{\delta_m}{d}\right)^2$ ($\delta_m^{Caillé} \simeq 4.7 \text{ nm}$ for pure Simulsol [Ac. O, n=6] bilayers). The "unbound" state is therefore characterized by a domination

of steric vertical repulsions, modulated by the bilayer curvature elastic constant κ_c , and by negligible variations of lateral interactions (variation of Σ) which are kept constant in this thermodynamic description, identified on Figure A.3b.

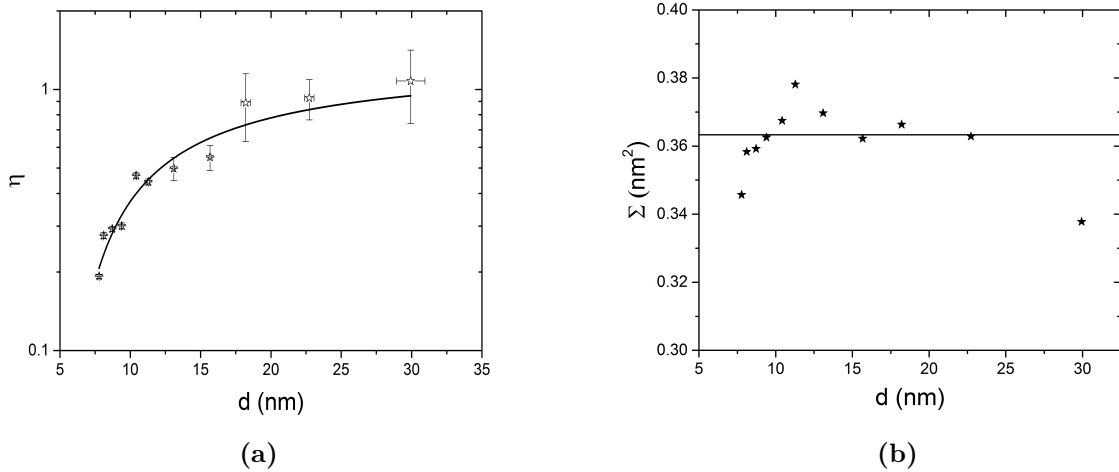


Figure A.3 – *Thermodynamic description of the lamellar unbound state. (a) Lateral (Σ) and vertical (d) confinements applied on the unbound state. Line represents a constant mean value of the molecular interfacial area Σ . (b) Evolution of the Caillé parameter η along the confinement. Curve describing a domination of the Helfrich undulations. Bilayers are composed of Simulsol [Ac. O, $n=6$].*

A.4.1.3 "Bound" state

The "bound" state, for lower Simulsol [Ac. O, $n=6$] content ($\lesssim 75\%$), corresponds to a lamellar stack of bilayers where different interactions are involved. Unlike to the "unbound" state, vertical attractions are quite intense as it is proved by the presence of the dilution limit in highly hydrated domain. Lateral interactions are also present in such systems since there is a variation of the mean molecular area of lipids Σ with the hydration or with the bilayer composition. The thermodynamic of the "bound" lamellar stack is thus defined by the whole equation A.1.4 and so, not only by repulsive Helfrich undulations. Lateral interactions are characterized by the "liquid" cohesion with the b_2 parameter in the analogy with the 2D van der Waals fluid for the bilayer description. Van der Waals attractions and repulsive interfacial interactions are taken into account with the χ parameter in the Milner-Roux approach [99]. On Figure A.4a, the Caillé parameter variation is qualitatively described by this thermodynamic description. In this approach, the coupling between lateral and vertical confinements applied to the bilayer have to be simultaneously described, with the Caillé parameter, as it is shown on Figure

A.4b. However, some limitations appear from this thermodynamic model, especially in the understanding of the important extension of the mean molecular area Σ in the diluted domain. In order to modify the coupling between lateral and vertical interactions in this modelization, two hypotheses may be questioned. In the bilayer equation of state, there is no distinction between Lecithin and Simulsol [Ac. O, n=6] molecules. A way to improve the lateral description of the bilayer is to distinguish the Lecithin molecular area Σ_L at the interface bilayer-solvent from the Simulsol [Ac. O, n=6] one Σ_S . The other possible improvement is to consider a coupling between the lateral confinement and the bilayer curvature elastic constant κ_c which is kept constant with the hydration. By varying hydration, the mean molecular area Σ is altered and this might have some impact on the elasticity of the bilayer.

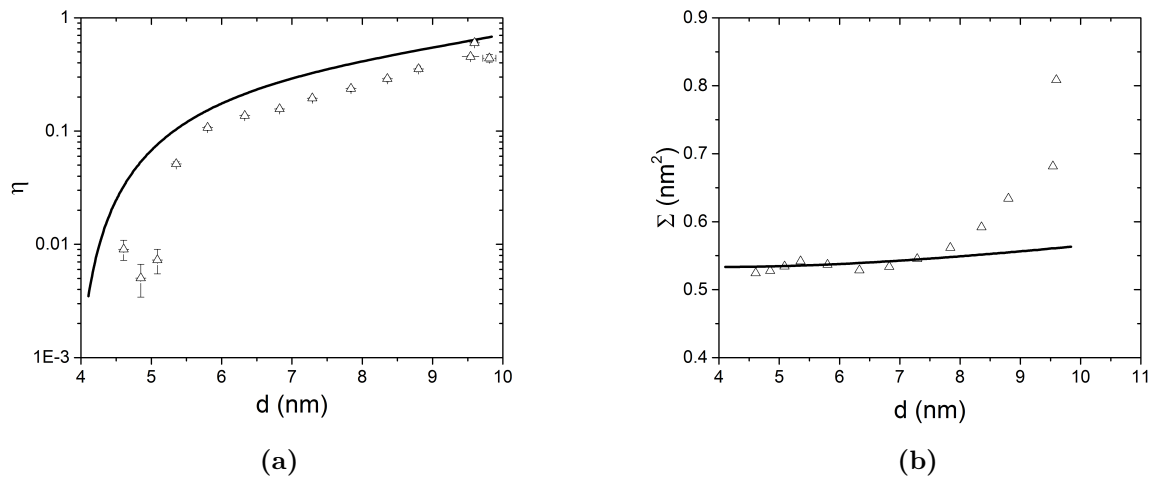


Figure A.4 – *Thermodynamic description of the lamellar bound state. (a) Lateral (Σ) and vertical (d) confinements applied on the bound state. (b) Evolution of the Caillé parameter η along the confinement. Curves represent a fitting extracted from the equation A.1.4. Bilayers are composed of Lecithin (27%) and Simulsol [Ac. O, n=6] (63%). Parameters are : $v = 1.04 \text{ nm}^3$ (from volume density measurement), $\Sigma_0 = 0.53 \text{ nm}^2$, $k_c = 7.10^{-4} k_B T$, $b_2 = -4.7 \text{ nm}^2$ et $\chi = 20 \text{ nm}^{-3}$.*

A.4.2 Poorly hydrated domain : Lamellar-Lamellar transition

A.4.2.1 Phase coexistence

In the hydrated domain, the modification of the interfacial interactions, coming from ethoxylated chains thanks to the variation of the cosurfactant content, leads to an "un-binding" transition of the lamellar stack of bilayers. In the concentrated domain, the

modification of interfacial interactions, thanks to the variation of cosurfactant hydrophilic length, leads to a lamellar-lamellar phase coexistence as it is shown on Figure A.5a. For a certain confinement (in both vertical and lateral directions), the system exhibits a transition between a "confined" and a "diluted" lamellar phases. As the number of ethylene oxide groups from the Simulsol [Ac. O] is increased, the phase coexistence between these two lamellar stacks appears over a larger hydration domain. X-ray scattering techniques bring out some differences between these two lamellar phases. The "confined" lamellar phase is experimentally described by the presence of 3 or 4 Bragg peaks showing a predominance of the structure factor. The "diluted" lamellar phase is characterized by one or two Bragg peaks and by the presence of a broad hump resulting from the form factor (data not shown). The flexibility of these lamellar phases is also different as it is evidenced by the Caillé parameter with distinct values. The thermodynamic modelization seems to bring an interesting particularity in order to quantitatively describe the lamellar-lamellar phase transition. Indeed, as it is illustrated with some *ad hoc* parameters on Figure A.5b, the model allows spinodal decompositions. This specificity lets some great perspectives in the aim of analyzing the lamellar-lamellar phase transition.

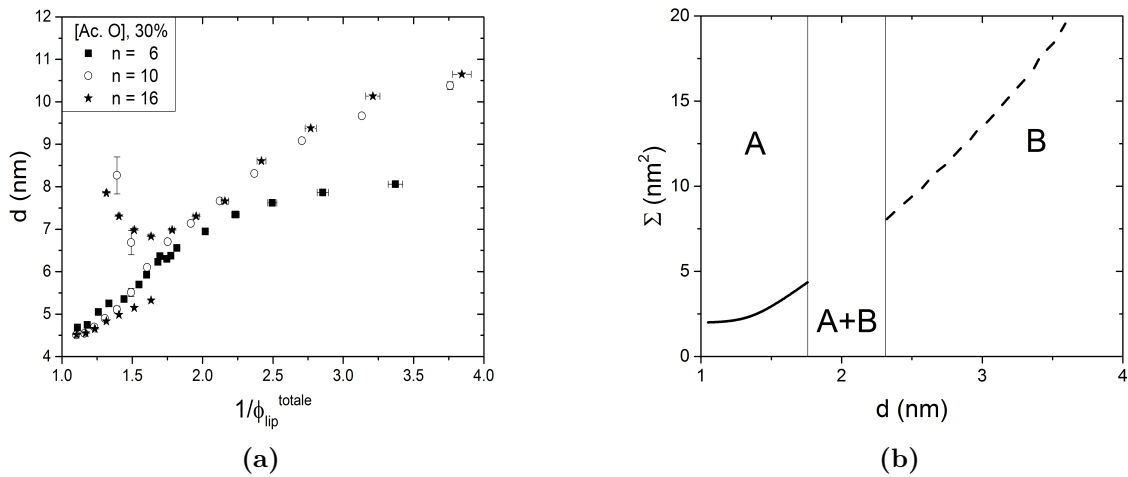


Figure A.5 – Lamellar-lamellar phase transition. (a) Phase coexistence brought out with the Simulsol length. Bilayers are composed of Lecithin ($\sim 70\%$) and Simulsol [Ac. O] ($\sim 30\%$). (b) Spinodal decomposition predicted by the thermodynamic model, equation A.1.4. Parameters *ad hoc* : $v = 1 \text{ nm}^3$, $\Sigma_0 = 2 \text{ nm}^2$, $k_c = k_B T$, $b_2 = -0.5 \text{ nm}^2$ et $\chi = 3 \text{ nm}^{-3}$.

A.4.2.2 Molecular reorganization

From X-ray scattering modelization, the membrane thickness δ_m is accessible by electronic density contrast with the solvent A.2.4. For a given bilayer composition, this membrane

thickness is going to slightly change with the hydration of the system, as it is represented on Figure A.6. In a global way, three different hydration domains can be distinguished for "bound" lamellar stacks. In the diluted domain, the membrane thickness seems to reach a constant value δ_m^{lim} at the dilution limit. In this hydration domain with high values of the stacking period, bilayers are far enough from each other to induce only weak interactions between them. This may explain the constant value observed for the membrane thickness. However, when the confinement is increased, meaning that bilayers get closer from each other, interfacial interactions increase between ethoxylated chains of adjacent membranes. A molecular shrinkage of the hydrophilic part takes place in the vertical direction to the lamellar stack, leading to a decrease of the membrane thickness. For a critical confinement applied on bilayers (d_2, δ_m^2), the membrane has no choice but to undergo a molecular reorganization to face a more intense confinement. This is highlighted by the unexpected increase of the membrane thickness values (δ_m^1) when hydration of the system decrease. In fact, this critical confinement (d_2, δ_m^2) points the lamellar-lamellar phase transition which thus results from a molecular reorganization. This experimental evidence furthermore questions a hypothesis made in the thermodynamic modelization to describe the lamellar stack of lipid bilayers. The model needs to distinguish Lecithin molecules from Simulsol ones in order to possibly explain this molecular reorganization.

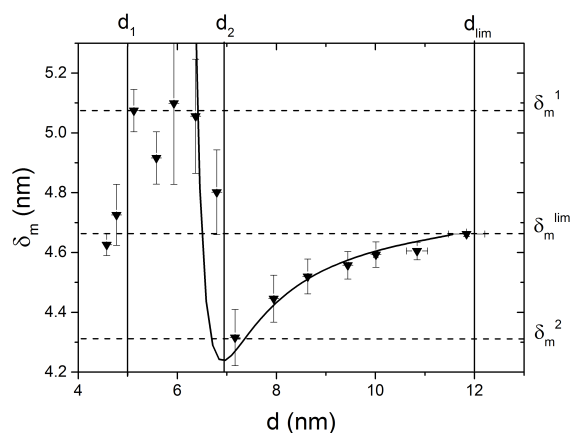


Figure A.6 – Variation of the bilayer thickness, characterized by electronic density contrast, for different hydration domains. Lamellar-lamellar transition occurs at (d_2, δ_m^2). Bilayers are composed of Lecithin (27%) and Simulsol (Ac. O, $n=6$) (73%). Curve represents only a guide for the eyes.

A.5 Interfacial mechanisms : comparison between the lamellar matrix and the complexes

The study of the host lamellar matrix brings out two major effects of the interfacial interactions on the lamellar stack properties, through mainly the interactions occurring between ethylene oxide groups of the cosurfactants. In the highly hydrated domain, the variation of the ethoxylated chains grafting density at the bilayer interface leads to an "unbinding" transition of the lamellar stack. In the poorly hydrated domain, the variation of the ethoxylated chains length explicitly highlights lamellar-lamellar phase coexistence between a "confined" lamellar stack of bilayers and a "diluted" one. Moreover, these transitions and the variation of the interactions in general can be characterized by the lateral and vertical confinements applied on the lamellar stack, which differ with the bilayer composition and the hydration of the system. The interfacial effects have also a huge impact on the DNA-lipids-water complexes. Indeed, they participate to enrich and to stabilize the different organizations of the DNA nanorods inside the lipid structures. Therefore, interfacial mechanisms involved in complexes might be described thanks to a correlation between the properties of the host lamellar matrix and the complexes ones.

A.5.1 Nematic-Hexagonal transition

The membrane thickness δ_m evolution in the lamellar matrix, obtained by electronic density contrast, provides a useful representation to point the lamellar-lamellar phase transition. Thereby, the host matrix properties are correlated to the phase diagram of complexes with the same bilayer composition on Figure A.1. The minimum of the bilayer thickness δ_m indicates the lipid volume fraction for which the transition occurs between the "confined" lamellar stack and the "diluted" lamellar stack. This minimum seems to be correlated to the transition between a $L_\alpha^N + L_\alpha^H$ biphasic domain and the L_α^H monophasic domain. In a qualitative way, the dominance of the nematic organization of the DNA nanorods L_α^N in the phase diagram appears to result from the interactions with the membrane of the "diluted" lamellar stack whereas the hexagonal organization of DNA in a lamellar stack L_α^H results from the interactions with the membrane of the "confined" lamellar stack. By increasing the confinement of the system, membrane reorganization takes place inside the bilayer and modifies the interfacial interactions (from ethoxylated chains) with the DNA nanorods, which qualitatively explains the transition between the nematic and the hexagonal organizations of the DNA nanorods. Nevertheless, a precise conclusion cannot be settled from this comparison since the electronic membrane thickness is obtained from the host matrix system and not from the complex system. A modelization of the X-ray scattering for the complexes is needed for that, and it is not yet available. In order to have a quantitative comparison between the lamellar matrix and the complexes, it is possible to compare the vertical and lateral confinements applied on the bilayers for

both systems.

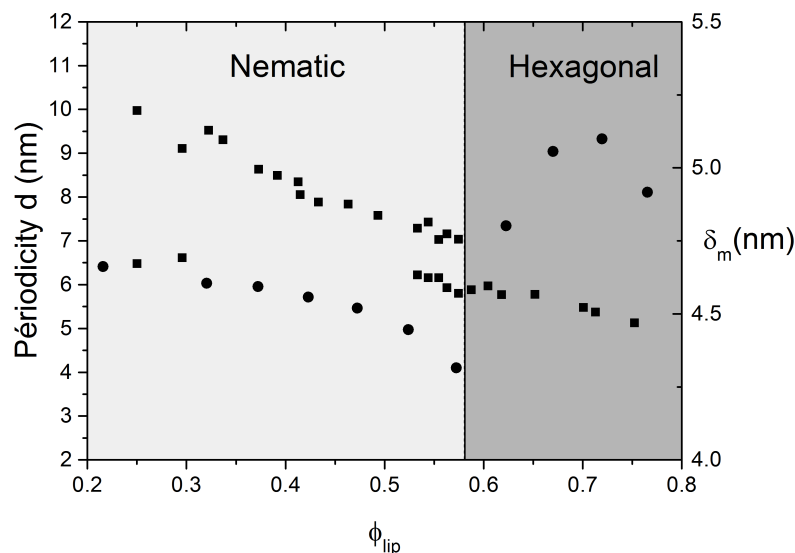


Figure A.1 – Nematic-hexagonal phase transition in complexes induced by the lamellar-lamellar transition in the host. Membrane thickness evolution (Figure A.6) of the lamellar host is represented with the phase diagram of DNA nanorods confined inside a lipid structure, for bilayers composed of Lecithin (23%) and Simulsol [Ac. O, $n=6$] (77%). The hydration domain is defined by the lipid volume fraction ϕ_{lip} . The line points the minimum in the membrane thickness evolution correlated to the transition to the hexagonal monophasic domain for complexes.

A.5.2 Organizations & Confinements

The evolution of the mean molecular area Σ at the interface bilayer-solvent is represented in function of the periodicity d , on Figure A.2, for both lamellar host and complex systems with mixt bilayers composed of 77% in Simulsol [Ac. O, $n=6$]. The confinements of the lamellar matrix can be globally separated in two domains. The "confined" domain associated to the "confined" lamellar stack extends from ($\Sigma \simeq 0.52 \text{ nm}^2$, $d \simeq 4.4 \text{ nm}$) to ($\Sigma \simeq 0.52 \text{ nm}^2$, $d \simeq 6.9 \text{ nm}$). The "diluted" domain associated to the "diluted" lamellar stack extends from ($\Sigma \simeq 0.52 \text{ nm}^2$, $d \simeq 6.9 \text{ nm}$) to ($\Sigma \simeq 0.8 \text{ nm}^2$, $d \simeq 12.0 \text{ nm}$) at the dilution limit. The "confined" domain is mainly characterized by only a variation of the vertical confinement on bilayers whereas the "diluted" domain is associated to a coupling

between the variation of both vertical and lateral confinements on bilayers. In the "diluted" domain, the lamellar stack swells in the vertical direction but its membrane also laterally extends.

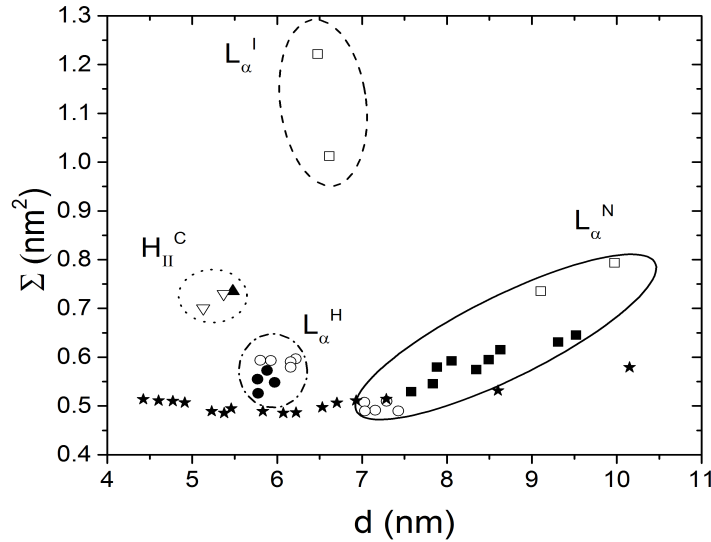


Figure A.2 – Comparison of confinements applied on bilayers between the lamellar host and the complexes with DNA. Bilayers are composed of Lecithin (23%) and Simulsol [Ac. O, $n=6$] (77%). Ternary system lipid-DNA-water : (□) $L_{\alpha}^I + L_{\alpha}^N$ coexistence, (○) $L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^H$ coexistence, (▽) $H_{II}^C +$ Hydrated Simulsol coexistence, (■) L_{α}^N , (●) L_{α}^H , (▲) H_{II}^C . Binary system lipids-water : (★).

The different organizations of DNA nanorods in complexes are distinguished with distinct domains of confinements. Since interfacial interactions, occurring between membranes and DNA nanorods, are strong enough an organization of the DNA nanorods takes place with the nematic arrangement in a lipid lamellar stack of bilayers L_{α}^N . The monophasic domain of the L_{α}^N extends from ($\Sigma \simeq 0.54 \text{ nm}^2$, $d \simeq 7.5 \text{ nm}$) to ($\Sigma \simeq 0.65 \text{ nm}^2$, $d \simeq 9.6 \text{ nm}$). Consequently, the L_{α}^N phase is defined with a strong coupling between the vertical and the lateral confinements which can be qualitatively associated to the "diluted" lamellar stack of the host. Membranes in the "diluted" domain, for the lamellar matrix, and in the L_{α}^N phase, for complexes, seem to be quite similar. When the confinement increases, the complex system undergoes a phase transition with a $L_{\alpha}^N + L_{\alpha}^H$ biphasic domain for a confinement around ($\Sigma \simeq 0.52 \text{ nm}^2$, $d \simeq 7.1 \text{ nm}$, lateral confinement is calculated with a volume equidistribution of the components between the two phases). This confinement corresponds to the confinement applied on bilayers when the "confined"- "diluted" lamellar phase transition takes place in the host. The $L_{\alpha}^N - L_{\alpha}^H$ phase transition in complexes thus results of the membrane reorganization from the "diluted" domain to the "confined" do-

main. Because of the membrane reorganization, interfacial interactions, occurring at the interface between DNA nanorods and bilayers, are modified and induce a new structure of the DNA nanorods.

The monophasic domain of the L_α^H extends from ($\Sigma \simeq 0.58 \text{ nm}^2$, $d \simeq 5.9 \text{ nm}$) to ($\Sigma \simeq 0.52 \text{ nm}^2$, $d \simeq 5.8 \text{ nm}$). The $L_\alpha^N - L_\alpha^H$ phase transition leads to an increase of the vertical confinement (decrease of the periodicity d) but enables a relaxation of the lateral confinement (increase of the mean molecular area Σ). Moreover, the increase of the confinement of the system only allows an increase of the lateral confinement in the L_α^H phase since the stacking period d remains constant. For a lateral critical confinement ($\Sigma \simeq 0.52 \text{ nm}^2$) a new phase transition occurs between a L_α^H phase and a H_{II}^C phase. This lateral confinement corresponds to the confinement applied on the lamellar matrix for a same vertical confinement but is also similar to the critical lateral confinement characteristic of the $L_\alpha^N - L_\alpha^H$ phase transition.

The phase of inverted cylindrical micelles of lipid molecules, encapsulating DNA nanorods, structured with a 2D hexagonal symmetry H_{II}^C is defined for a confinement around ($\Sigma \simeq 0.74 \text{ nm}^2$, $d \simeq 5.5 \text{ nm}$). This phase transition in complexes once more implies an increase of the vertical confinement but simultaneously a huge relaxation of the lateral confinement with a mean molecular area Σ close to the lamellar matrix one in its dilution limit $\Sigma_{lim} \simeq 0.8 \text{ nm}^2$.

A.6 Conclusion

This PhD work focuses on the understanding of interactions and thermodynamic involved in a lamellar stack of "hairy" bilayers. These bilayers, or membranes, are electrically neutral and composed of a mixture between lecithins and cosurfactants, which are similar to (short) diblock copolymers. The experimental approach consists to vary different physico-chemical parameters such as hydration of the system, chemical nature of cosurfactant (hydrophobic block and hydrophilic block) and the cosurfactant content inside the lipid membrane. The self-assembly of the lipid systems, which manages to confine DNA molecules, is presumed to result from two distinct mechanisms. The first one is an entropic mechanism, related to the curvature elasticity of the membrane, and the second is an interfacial mechanism, resulting from specific interactions occurring at the membrane-membrane interface or at the membrane-DNA interface probably mediated by the cosurfactant hydrophilic hairs made of ethoxylated chains.

The main results demonstrate the key role of interfacial interactions to drive the DNA organization inside lipid-DNA-water complexes. These interfacial mechanisms are evidenced thanks to a description of the vertical and lateral confinements applied on the stacked bilayers, respectively highlighted by the lamellar periodicity d and the mean molecular area at the interface membrane-solvent Σ . It is then possible to tune the DNA organizations which are directly correlated to the physical properties of the bilayers. By expe-

perimentally varying the physical-chemistry of the lamellar host, a lamellar-lamellar phase transition is brought out in the host lamellar system and leads to a nematic-hexagonal phase transition in the DNA nanorods organization inside this lipid lamellar structure.

Interfacial mechanisms control the lamellar host properties and they occur at different levels of hydration. In the highly hydrated domain, an "unbinding transition" appears. In the poorly hydrated domain, a lamellar-lamellar phase transition emerges resulting from a membrane molecular reorganization. A thermodynamic modelization of the lamellar host is set up and allows a quantitative description of the "unbinding transition". Moreover, a prediction of spinodal decompositions arises and lets some hopes in order to describe the lamellar-lamellar phase transition with some model improvements.

However, some limits remains as an understanding of the membrane organization in the confined domain despite preliminary and further studies of the bilayer textures by freeze-fracture (data not shown). Improvements on the thermodynamic model are also needed to describe the lamellar-lamellar phase transition in the host system. In order to achieve to such purpose, two hypotheses may be considered. A two-component composition might be added to the description of the van der Waals bidimensional fluid (bilayer-solvent interface) to take into account this huge variation of the lipid molecular area with the hydration of the system. Another approach would consist in considering a feedback of the lateral confinement (variation of the molecular area Σ) over the bilayer bending elastic constant κ_c .

Bibliographie

- [1] Product information. product number p7443. Technical report, Sigma-Aldrich.
- [2] Abidi, W., Pansu, B., Krishnaswamy, R., Beaunier, P., Remita, H., and Imperor-Clerc, M. (2011). Gold nanoparticles confined in lamellar mesophases. *RSC Advances*, 1 :434–439.
- [3] Alexander, S. (1977). Adsorption of chain molecules with a polar head. a scaling description. *Journal de Physique*, 38 :983–987.
- [4] Andelman, D. (1995). *Chapter 12 of Handbook of Biological Physics*. Elsevier Science B.V.
- [5] Artzner, F., Zantl, R., Rapp, G., and Radler, J. O. (1998). Observation of a rectangular columnar phase in condensed lamellar cationic lipid-dna complexes. *Physical Review Letters*, 81(22) :5015.
- [6] Bauduin, P. and Zemb, T. (2014). Perpendicular and lateral equations of state in layered systems of amphiphiles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19 :9–16.
- [7] Beneut, K., Constantin, D., Davidson, P., Dessombz, A., and Chaneac., C. (2008). Magnetic nanorods confined in a lamellar lyotropic phase. *Langmuir*, 24 :8205–8209.
- [8] Berne, B. J. and Pecora, R. (2000). *Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. General Publishing Company.
- [9] Bilalov, A., Olsson, U., and Lindman, B. (2011). Dna-lipid self-assembly : phase behavior and phase structures of a dna-surfactant complex mixed with lecithin and water. *Soft Matter*, 7 :730–742.
- [10] Bougis, K., Rubim, R. L., Ziane, N., Peyencet, J., Bentaleb, A., Fevrier, A., Oliveira, C. L. P., de Oliveira, E. A., Navailles, L., and Nallet, F. (2015). Stabilising lamellar stacks of lipid bilayers with soft confinement and steric effects. *Eur. Phys. J. E*, 38 :78.
- [11] Brochard, F. and Gennes, P.-G. D. (1975). *Pramana Suppl.*, 1 :1.

- [12] Brooks, J. T. and Cates, M. E. (1993). The role of added polymer in dilute lamellar surfactant phases. *J. Chem. Phys.*, 99 :1.
- [13] Brunet, A., Tardin, C., Salome, L., Rousseau, P., Destainville, N., and Manghi, M. (2015). Dependence of dna persistence length on ionic strength of solutions with monovalent and divalent salts : A joint theory-experiment study. *Macromolecules*, 48 :3641–3652.
- [14] Caille, A. (1972). Remarques sur la diffusion des rayons x dans les smectiques a. *C. R. Hebdo. Acad. Sc. Paris B*, 274 :891.
- [15] Calladine, C. R., Drew, H. R., Luisi, B. F., and Travers, A. A. (2004). *Understanding DNA. The molecule and how it works*. Elsevier Academic Press.
- [16] Caracciolo, G., Marchini, C., Pozzi, D., Caminiti, R., Amenitsch, H., Montani, M., and Amici, A. (2007a). Structural stability against disintegration by anionic lipids rationalizes the efficiency of cationic liposome/dna complexes. *Langmuir*, 23 :4498–4508.
- [17] Caracciolo, G., Pozzi, D., Caminiti, R., Mancini, G., Luciani, P., and Amenitsch, H. (2007b). Observation of a rectangular dna superlattice in the liquid-crystalline phase of cationic lipid/dna complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 129 :10092–10093.
- [18] Castro-Roman, F. and Ligoure, C. (2001). Lateral stretching of fluid membranes by grafted polymer brushes. *Europhysics Letters*, 53 :483–489.
- [19] Castro-Roman, F., Porte, G., and Ligoure, C. (2001). Smectic phase of fluid membranes decorated by amphiphilic copolymers. *Langmuir*, 17 :5045–5058.
- [20] Colin, A. and Roux, D. (2002). Incorporating dna in a lamellar phase : A flory model. *European Physical Journal E*, 8 :499–506.
- [21] Courbin, L., Delville, J. P., Rouch, J., and Panizza, P. (2002). Instability of a lamellar phase under shear flow : Formation of multilamellar vesicles. *Physical Review Letters*, 89(14).
- [22] da Silva, E. R. T. (2011). *Structure and dynamics of DNA confined in-between non-cationic lipid membranes*. PhD thesis, Universite de Bordeaux (France) et Universite de Sao Paulo (Bresil).
- [23] da Silva, E. R. T., de Oliveira, E. A., Fevrier, A., Nallet, F., and Navailles, L. (2011). Supramolecular polymorphism of dna in non-cationic l(alpha) lipid phases. *European Physical Journal E*, 34 :83.

-
- [24] Daoud, M. and Gennes, P. D. (1977). Statistics of macromolecular solutions trapped in small pores. *Journal de Physique*, 38 :85–93.
- [25] Dass, C. R. (2002). Cytotoxicity issues pertinent to lipoplex-mediated gene therapy in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54 :593–601.
- [26] de Oliveira, E. A., da Silva, E. R. T., Fevrier, A., Grelet, E., Nallet, F., and Navailles, L. (2010). Confinement-induced phase transition in a dna-lipid hydrated complex. *Europhysics Letters*, 91(28001).
- [27] Deshmukh, R. D., Liu, Y., and Composto, R. J. (2007). Two-dimensional confinement of nanorods in block copolymers domains. *Nano Letters*, 7(12) :3662–3668.
- [28] Diat, O., Roux, D., and Nallet (1993). Effect of shear on a lyotropic lamellar phase. *J. Phys. II France*, 3 :1427–1452.
- [29] Diat, O., Roux, D., and Nallet, F. (1995). "layering" effect in a sheared lyotropic lamellar phase. *Physical Review E*, 51(4) :3296–3300.
- [30] Dolan, A. K. and Edwards, S. (1974). Theory of stabilization of colloids by adsorbed polymer. *Proc. R. Soc. Lond.*, 337 :509–516.
- [31] Durand, D., Doucet, J., and Livolant, F. (1992). A study of the structure of highly concentrated phases of dna by x-ray diffraction. *J. Phys. II France*, 2 :1769–1783.
- [32] Evans, E. and Skalak, R. (1979). Mechanics and thermodynamics of biomembranes. *CRC Critical Reviews in Bioengineering*, 3 :181–418.
- [33] Ewert, K. K., Evans, H. M., Zidovska, A., Bouxsein, N. F., Ahmad, A., and Safinya, C. R. (2006). *J. Am. Chem. Soc.*, 128 :3998–4006.
- [34] Feig, M. and Pettitt, B. M. (1998). A molecular simulation picture of dna hydration around a- and b-dna. *Biopolymers*, 48 :199–209.
- [35] Felici, M. D., Felici, R., Ferrero, C., Tartari, A., Gambaccini, M., and Finet, S. (2008). Structural characterization of the human cerebral myelin sheath by small angle x-ray scattering. *Phys. Med. Biol.*, 53 :5675–5688.
- [36] Flory, P. (1971). Principles of polymer chemistry. *Cornell University Press*.
- [37] Freyssingéas, E., Roux, D., and Nallet, F. (1996). *J. Phys. : Condens. Matter*, 8 :2801.
- [38] Gaillard, C. and Douliez, J. P. (2012). *Cryo-TEM and AFM for the characterization of vesicle-like nanoparticle dispersions and self-assembled supramolecular fatty-acid-based structures : a few examples.*, volume 912-922. Formatex, current microscopy contributions to advances in science and technology. edition.

- [39] Gau-Racine, J., Lal, J., Zeghal, M., and Auvray, L. (2007). Peo-ppo block copolymer vectors do not interact directly with dna but with lipid membranes. *J. Phys. Chem. B*, 111 :9900–9907.
- [40] Gelbart, W. M., Bruinsma, R. F., Pincus, P. A., and Parsegian, V. A. (2000). Dna-inspired electrostatics. *Physics Today*, 53 :38.
- [41] Gennes, P. D. (1979). Scaling concepts in polymer physics. *Cornell University Press*.
- [42] Gerbelli, B. B., Rubim, R. L., da Silva, E. R. T., Nallet, F., Navailles, L., Oliveira, C. L. P., and de Oliveira, E. A. (2013). Steric-induced effects on stabilizing a lamellar structure. *Langmuir*, 29 :45.
- [43] Godeau, G., Navailles, L., Nallet, F., Lin, X., McIntosh, T. J., and Grinstaff, M. (2012). From brittle to pliant viscoelastic materials with solid state linear polyphosphonium-carboxylate assemblies. *Macromolecules*, 45 :2509–2513.
- [44] Golubovic, L. and Lubensky, T. C. (1989). Smectic elastic constants of lamellar fluid membrane phases : Crumpling effects. *Physical Review B*, 39(16) :12110.
- [45] Gompper, G. and Kroll, D. M. (1989). Steric interactions in multimembrane systems : a monte carlo study. *Europhysics Letters*, 9 :59–64.
- [46] Gregory, J. (1981). Approximate expressions for retarded van der waals interaction. *Journal of colloid and interface science*, 83 :138–145.
- [47] Harries, D., May, S., Gelbart, W. M., and Ben-Shaul, A. (1998). Structure, stability, and thermodynamics of lamellar dna-lipid complexes. *Biophysical Journal*, 75 :159–173.
- [48] Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers : Theory and possible experiments. *Z. Naturforsch*, 28 :693–703.
- [49] Helfrich, W. (1978). Steric interaction of fluid membranes in multilayer systems. *Z. Naturforsch*, 33a :305–315.
- [50] Helfrich, W. and Servuss, R. M. (1984). Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *IL NUOVO CIMENTO D*, 3(1) :137–151.
- [51] Hiemenz, P. C. and Rajagopalan, R. (1997). *Principles of colloid and surface chemistry*. New York : Mercel Dekker, Inc.
- [52] Hiergeist, C. and Lipowsky, R. (1996). *J. Phys. II*, 6 :1465.
- [53] Hofland, H. E. J., Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Spies, F., Talsma, H., and Junginger, H. E. (1993). Nonionic surfactant vesicles : A study of vesicle formation, characterization, and stability. *Journal of colloid and interface science*, 161 :366–376.

-
- [54] Hristova, K. and Needham, D. (1994). The influence of polymer-grafted lipid on the physical properties of lipid bilayers : a theoretical study. *Journal Colloid Interface Sci.*, 168 :302–314.
- [55] Huin, C., Gall, T. L., Barteau, B., Pitard, B., Montier, T., Lehn, P., Cheradame, H., and Guegan., P. (2011). Evidence of dna transfer across a model membrane by a neutral amphiphilic block copolymer. *J. Gene Med*, 13 :538–548.
- [56] Israelachvili, J. N. (1972). The calculation of van der waals dispersion forces between macroscopic bodies. *Proc. R. Soc. Lond. A.*, 331 :39–55.
- [57] Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and Surface Forces*. Elsevier Academic Press, 3 edition edition.
- [58] Israelachvili, J. N., Marcelja, S., and Horn, R. G. (1980). Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. Biophys.*, 13 :121–200.
- [59] Israelachvili, J. N. and Mitchell, D. J. (1975). *Biochimica et Biophysica Acta*, 389 :13–19.
- [60] Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., and Ninham., B. W. (1976). *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 72 :1525–1568.
- [61] Jelinek, R. and Kolusheva, S. (2001). Polymerized lipidi vesicles as colorimetric biosensors for biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 19 :109–118.
- [62] Juliano, R. L. and Akhtar, S. (1992). Lliposome as a drug delivery system for anti-sense oligonucleotides. *Antisense Research and Development*, 2 :165–176.
- [63] Kekicheff, P., Cabane, B., and Rawiso, M. (1984). Macromolecules dissolved in a lamellar lyotropic mesophase. *Journal of Colloid and Interface Science*, 102(1) :51–70.
- [64] Kleinert, H. (1999). Fluctuation pressur of membrane between walls. *Physics Letters A*, 257 :269–274.
- [65] Koltover, I., Salditt, T., Radler, J. O., and Safinya, C. R. (1998). An inverted hexagonal phase of cationic liposome-dna complexes related to dna release and delivery. *Science*, 281 :78.
- [66] Koltover, I., Salditt, T., and Safinya, C. R. (1999). Phase diagram, stability, and overcharging of lamellar cationic lipid-dna self-assembled complexes. *Biophysical Journal*, 77 :915–924.
- [67] Koynova, R. and Caffrey, M. (1998). Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376 :91–145.

- [68] Koynova, R., Wang, L., Tarahovsky, Y., and MacDonald, R. C. (2005). Lipid phase control of dna delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 16(6) :1335.
- [69] Kurtisovski, E. (2007). *Relation structure-proprietes dans les bicouches gonflees de phases lamellaires*. PhD thesis, Universite Pierre et Marie Curie, Paris.
- [70] Laggner, P., Lohner, K., Degovics, G., Muler, K., and Schuster, A. (1987). Structure and thermodynamics of the dihexadecylphosphatidylcholine water-system. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44 :31–60.
- [71] Leal, C., Wadso, L., Olofsson, G., Miguel, M., and Wennerstrom, H. (2004). The hydration of a dna-amphiphile complex. *J. Phys. Chem. B*, 108 :3044–3050.
- [72] Leibler, S. and Lipowsky, R. (1987a). Complete unbinding and quasi-long-range order in lamellar phases. *Phys. Rev. B*, 35 :7004.
- [73] Leibler, S. and Lipowsky, R. (1987b). Extreme swelling of lamellar phases. *Phys. Rev. Lett.*, 58 :1796.
- [74] Leikin, S., Parsegian, V. A., Rau, D. C., and Rand, R. P. (1993). Hydration forces. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 44 :369–395.
- [75] LeNeveu, D. M., Rand, R. P., and Parsegian, V. A. (1976). *Nature*, 259 :601.
- [76] LeNeveu, D. M., Rand, R. P., Parsegian, V. A., and Gingell, D. (1977). *Biophys. J.*, 18 :209.
- [77] Li, F. and Pincet, F. (2007). Confinement free energy of ssurface bearing end-grafted, polymers in the mushroom regime and local measurement of the polymer density. *Langmuir*, 23 :12541–12548.
- [78] Lifshitz, E. M. (1956). The theory of molecular attractive forces between solids. *Soviet Physics JETP*, 2(1) :73–83.
- [79] Lipowsky, R. and Leibler, S. (1986). Unbinding transitions of interacting membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 56 :2541.
- [80] Livolant, F. (1991a). Ordered phases of dna in vivo and in vitro. *Physica A*, 176 :117–137.
- [81] Livolant, F. (1991b). Supramolecular organization of double-stranded dna molecules in the columnar hexagonal liquid crystalline phase. *J. Mol. Biol.*, 218 :165–181.
- [82] Livolant, F. and Leforestier, A. (1996). Condensed phases of dna :structures and phases transitions. *Prog. Polym. Sci.*, 21 :1115–1164.

-
- [83] Livolant, F., Levelut, A. M., Doucet, J., and Benoit, J. P. (1989). The highly concentrated liquid-crystalline phase of dna is columnar hexagonal. *Nature*, 339 :724–726.
- [84] Mahanty, J. and Ninham, B. W. (1976). *Dispersion forces*. New York : Academic Press.
- [85] Marsh, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286 :183–223.
- [86] Marsh, D. (2001). Elastic constants of polymer grafted lipid membranes. *Biophys. J.*, 81 :2154–2162.
- [87] Marsh, D., Bartucci, R., and Sportelli, L. (2003). Lipid membranes with grafted polymers : physicochemical aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- [88] Masui, T., Imai, M., and Nakaya, K. (2004). Inter-lamellar interaction mediated by amphiphilic triblock copolymer. *AIP Conference Proceedings*, 708 :108.
- [89] Masui, T., Imai, M., Nakaya, K., and Taniguchi, T. (2006). Effects of grafted polymer chains on lamellar membranes. *Journal of Chemical Physics*, 124.
- [90] Maxwell, J. (1874). van der waaks on the continuity of the gaseous and liquid states. *Nature*, 10 :477.
- [91] May, S. and Ben-Shaul, A. (2004). *Curr. Med. Chem.*, 11 :151–167.
- [92] May, S., Harries, D., and Ben-Shaul, A. (2000). The phase behavior of cationic lipid-dna complexes. *Biophysical Journal*, 78 :1681–1697.
- [93] McManus, J. J., Radler, J. O., and Dawson, K. A. (2003a). *Langmuir*, 19 :9630–9637.
- [94] McManus, J. J., Radler, J. O., and Dawson, K. A. (2003b). *Journal of Physical Chemistry B*, 107 :9869–9875.
- [95] Mezei, M. and Gulasekharam, V. (1980). Liposome- a selective drug delivery system for the topical route of administration. *Life Sciences*, 26 :1473.
- [96] Milner, S. and Witten, T. (1988). Bending moduli of popolymer surfactant interfaces. *J. Phys.*, 49 :1951–1962.
- [97] Milner, S., Witten, T., and Cates, M. (1988a). A parabolic density profile for grafted polymers. *Europhysics Letters*, 5 :413–418.
- [98] Milner, S., Witten, T., and Cates, M. (1988b). Theory of the grafted polymer brush. *Macromolecules*, 21 :2610–2619.

- [99] Milner, S. T. and Roux, D. (1992). Flory theory of the unbinding transition. *J Phys I France*, 2(9) :1741–1754.
- [100] Nallet, F., Laversanne, R., and Roux, D. (1993). Modeling x-ray or neutron scattering spectra of lyotropic lamellar phases : interplay between form and structure factors. *J. Phys. II France*, 3 :487–502.
- [101] Nallet, F., Roux, D., and Prost, J. (1989). Hydrodynamics of lyotropic smectic : a dynamic light scattering study of dilute lamellar phases. *J. Phys. France*, 50 :3147–3165.
- [102] Netz, R. R. and Lipowsky, R. (1995). Stacks of fluid membranes under pressure and tension. *Europhysics Letters*, 29 :345–350.
- [103] Nikolelis, D. P., Hianik, T., and Krull, U. J. (1999). Biosensors based on thin lipid films and liposomes. *Electroanalysis*, 11(1) :7–15.
- [104] Ninham, B. W. and Parsegian, V. A. (1970). Van der waals forces special characteristics in lipid-watersystems and a general method of calculation based on the lifshitz theory. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 10 :646.
- [105] Odriozola, G., Jimenez-Angeles, F., and Lozada-Cassou, M. (2006). Effect of confinement on the interaction between two like-charged rods. *Physical Review Letters*, 97(018102).
- [106] Oliveira, C. L. P., Gerbelli, B. B., da Silva, E. R. T., Nallet, F., Navailles, L., de Oliveira, E. A., and Pedersen, J. S. (2012). Gaussian deconvolution : a useful method for a form-free modeling of scattering data from mono- and multilayered planar systems. *Journal of Applied Crystallography*, 45 :1278–1286.
- [107] Oosawa, F. (1968). *Biopolymers*, 6 :1633.
- [108] Parsegian, V. A. (2006). *Van der Waals forces : a handbook for biologists, chemists, engineers, and physicists*. New York : Cambridge University Press.
- [109] Parsegian, V. A., Fuller, N., and Rand, R. P. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76 :2750.
- [110] Parsegian, V. A. and Zemb, T. (2011). Hydration forces : Observations, explanations, expectations, questions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16 :618–624.
- [111] Petrache, H. I., Tristram-Nagle, S., Harries, D., Kucerka, N., Nagle, J. F., and Parsegian, V. A. (2006a). Swelling of phospholipids by monovalent salt. *Journal of Lipid Research*, 46 :302–309.

-
- [112] Petrache, H. I., Zemb, T., Belloni, L., and Parsegian, V. A. (2006b). Salt screening and specific ion adsorption determine neutral-lipid membrane interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21) :7982–7987.
- [113] Plano, R. J., Safinya, C. R., Sirota, E. B., and Wenzel, L. J. (1993). X-ray couette shear cell for nonequilibrium structural studies of complex fluids under flow. *Review of Scientific Instruments*, 64 :1309–1318.
- [114] Podgornik, R. and Parsegian, V. A. (1992). Thermal-mechanical fluctuations of fluid membranes in confined geometries : the case of soft confinement. *Langmuir*, 8 :557–562.
- [115] Pott, T., Colin, A., Navailles, L., and Roux, D. (2003). Dna intercalation in neutral multilamellar membranes : Experiments and theory. *Interface Science*, 11 :249–257.
- [116] Pott, T. and Roux, D. (2002). Dna intercalation in neutral multilamellar membranes. *FEBS Letters*, 511 :150–154.
- [117] Radler, J. O., Koltover, I., Salditt, T., and Safinya, C. R. (1997). Structure of dna-cationic liposome complexes : Dna intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*, 275 :810.
- [118] Rau, D. C. and Parsegian, V. A. (1992). Direct measurement of temperature-dependent solvation forces between dna double helices. *Biophys. J.*, 61 :260–271.
- [119] Richetti, P., Kekicheff, P., Parker, J. L., and Ninham, B. W. (1990). *Nature*, 346 :252.
- [120] Rill, R. L., Strzelecka, T. E., Davidson, M. W., and van Winkle, D. H. (1991). Ordered phases in concentrated dna solutions. *Physica A*, 176 :87–116.
- [121] Roux, D., Nallet, F., Freyssingeas, E., Porte, G., Bassereau, P., Skouri, M., and Marignan, J. (1992). *Europhysics Letters*, 17 :575.
- [122] Rubim, R. L., Gerbelli, B., Bougis, K., de Oliveira, C. P., Navailles, L., Nallet, F., and de Oliveira, E. A. (2016). Water activity in lamellar stacks of lipid bilayers : "hydration forces" revisited. *Eur. Phys. J. E*, 39 :3.
- [123] Sackmann, E. (1996). *Science*, 271 :43.
- [124] Saenger, W., Hunter, W. N., and Kennard, O. (1986). Dna conformation is determined by economics in the hydration of phosphate groups. *Nature*, 324 :385–388.
- [125] Safinya, C. R. (2001). Structures of lipid-dna complexes : supramolecular assembly and gene delivery. *Current Opinion in Structural Biology*, 11 :440–448.
- [126] Safinya, C. R., Ewert, K., Majzoub, R. N., and Leal, C. (2014). Cationic liposome-nucleic acid complexes for gene delivery and gene silencing. *New J. Chem.*, 38 :5164.

- [127] Safinya, C. R., Roux, D., Smith, G. S., Sinha, S. K., Dimon, P., Clark, N. A., and Bellocq, A. M. (1986). Steric interactions in a model multimembrane system : A synchrotron x-ray study. *Physical Review Letters*, 57(21) :2718.
- [128] Safinya, C. R., Sirota, E. B., Roux, D., and Smith, G. S. (1989). *Phys. Rev. Lett.*, 62 :1134.
- [129] Salditt, T., Li, C., Spaar, A., and Mennicke, U. (2002). *Eur. Phys. J. E*, 7 :105.
- [130] Scolan, G. (2012). *Applications nanobiotechnologie et thérapeutiques des membranes en bicouches lipidiques*. Pharmacie, UNIVERSITE JOSEPH FOURIER, Grenoble, France.
- [131] Senior, J. H., Trimble, K. R., and Maskiewicz, R. (1991). Interaction of positively-charged liposomes with blood : implications for their application in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1070 :173–179.
- [132] Silva, B. F. B., Marques, E. F., and Olsson, U. (2007). Lamellar miscibility gap in a binary catanionic surfactant-water system. *J. Phys. Chem. B*, 111 :13520–13526.
- [133] Slyusarenko, K., Constantin, D., and Davidson, P. (2014). A two-dimensional nematic phase of magnetic nanorods. *The Journal of Chemical Physics*, 140 :104904.
- [134] Stern, O. (1924). The theory of the electrolytic double-layer. *Z. Elektrochemie und Angewandte Physikalische Chemie*, 30 :508.
- [135] Strey, H. H., Parsegian, V. A., and Podgornik, R. (1997). Equation of state for dna liquid crystals : fluctuation enhanced electrostatic repulsion. *Physical Review Letters*, 78 :895–898.
- [136] Strey, H. H., Podgornik, R., Rau, D. C., and Parsegian, V. A. (1998). Dna-dna interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 8 :309–313.
- [137] Strey, R., Schomacker, R., Roux, D., Nallet, F., and Olsson, U. (1990). *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 86 :2253.
- [138] Szleifer, I., Kramer, D., Benshaul, A., Gelbart, W., and Safran, S. (1990). Molecular theory of curvature elasticity in surfactant films. *J. Chem. Phys.*, 92 :6800–6817.
- [139] Tsapis, N., Ober, R., Chaffotte, A., Warschawski, D. E., Everett, J., Kauffman, J., Kahn, P., Waks, M., and Urbach, W. (2002). Modification of the elastic constants of a peptide-decorated lamellar phase. *Langmuir*, 18 :4384–4392.
- [140] Tsapis, N., Urbach, W., and Ober, R. (2001). Dramatic rigidification of a peptide-decorated lamellar phase. *Physical Review E*, 63(041903).

- [141] Verwey, E. J. W. and Overbeek, J. T. G. (1948). *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Amsterdam : Elsevier.
- [142] Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171 :737.
- [143] Waugh, R. E., Song, J., Svetina, S., and Zeks, B. (1992). Local and nonlocal curvature elasticity in bilayer membranes by tether formation from lecithin vesicles. *Biophys. Journal*, 61 :974–982.
- [144] Wolf, B. and Hanlon, S. (1975). Structural transitions. of deoxyribonucleic acid in aqueous electrolyte solutions. ii. the role of hydration. *Biochemistry*, 14 :1661–1670.
- [145] Wurger, A. (2000). Bending elasticity of surfactant films : The role of the hydrophobic tails. *Physical Review Letters*, 85(2) :337.

Interactions et fluctuations en situation de nano-confinement anisotrope

La structure et les interactions qui stabilisent des empilements lamellaires lyotropes de bicouches lipidiques "poilues" (et dépourvues de charge électrique nette) dans leur état fluide sont principalement étudiées par diffusion de rayons X aux petits angles. Les empilements lamellaires sont utilisés comme matrices hôtes afin de confiner et d'encapsuler des nano-bâtonnets d'ADN qui s'auto-assemblent en différentes structures en fonction du confinement réalisé. L'objectif fixé est de comprendre l'origine des mécanismes qui sont responsables de la formation de tels assemblages supramoléculaires. Dans ce but, on s'intéresse aux mécanismes entropiques et interfaciaux, sensibles expérimentalement à la physico-chimie du système, cette dernière affectant notamment le caractère "lié" ou "non lié" des systèmes lamellaires à haute dilution. Un modèle thermodynamique est utilisé afin d'interpréter la décroissance exponentielle "classique" observée dans les profils de pression osmotique en fonction de l'hydratation, sans faire appel à la force "d'hydratation". Une transition structurale est mise en évidence, à faible hydratation, entre deux phases lamellaires "liées". Le changement structural de la bicouche est discuté en termes de couplage entre confinements vertical et latéral. La caractérisation de la matrice lamellaire hôte autorise finalement une description des organisations des bâtonnets d'ADN qui semblent directement corrélées aux propriétés physiques des bicouches, faisant ainsi apparaître quelques perspectives pour leur encapsulation au sein "d'ognons".

Mots clés : phase lamellaire, diffusion de rayons X, transition de décrochage, interactions interfaciales, ADN, confinement, transition de phase.

Interactions and fluctuations under anisotropic nano-confinement conditions

Structure and interactions stabilizing the lyotropic lamellar stack of (electrically-neutral) mixed "hairy" lipid bilayers in their fluid state are mainly investigated by means of small-angle X-ray scattering. The lamellar stacks are used as hosts to confine and encapsulate DNA nanorods which organize themselves into different structures depending on the confinement. The challenge here is to understand the mechanisms responsible for the formation of these supramolecular assemblies. In this aim, we are interested in entropic and interfacial mechanisms which are both experimentally sensitive to the physical-chemistry of the system, changing in particular the "bound" or "unbound" character of the water-swollen systems. A thermodynamic model is then used for interpreting the "classical" exponential decay obtained in osmotic profiles as a function of hydration, without resorting to "hydration forces". A structural transition between two different "bound" lamellar phases is brought out at low hydration. The bilayer structural changes are discussed as resulting from a coupling between lateral and vertical confinements. The lamellar host characterization finally allows a description of the DNA nanorods organizations which seem to be directly correlated to the physical properties of the bilayers, leaving some perspectives for the encapsulation inside "onions".

Keywords: lamellar phase, X-ray scattering, "unbinding" transition, interfacial interactions, DNA, confinement, phase transition.