

Fabrice Cousin

Laboratoire Léon Brillouin (CEA-CNRS)
CEA Saclay

Matière molle et diffusion de neutrons : Quelques variations sur le contraste

Habilitation à Diriger des Recherches de l'Université Paris-Sud

*Soutenue publiquement le **13 mai 2016** devant le jury constitué de :*

François BOUE, *Directeur de Recherches au CNRS*

Joao CABRAL, *Professeur associé à l'Imperial College (Royaume-Uni)*

Christophe CHASSENIEUX, *Professeur à l'Université du Mans*

Olivier DIAT, *Directeur de Recherches au CEA*

Brigitte PANSU, *Professeur à l'Université d'Orsay*

Régine PERZYNSKI, *Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie*

Michel RAWISO, *Directeur de Recherches au CNRS*

Examineur

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Présidente

Rapporteur

Table des matières

Avant-propos	5
Prologue : Une brève introduction sur la variation de contraste	9
P.1 Principe général d'une expérience de diffusion élastique des neutrons	9
P.2 Notion de contraste et approximation « petits angles »	10
P.3 Les stratégies de la variation de contraste	12
Chapitre I. Variation de contraste en solution : Mécanismes de formation de complexes de protéines et de polyelectrolytes de charge opposées	17
I.1 Quelques mots d'introduction sur le sujet	17
I.2 Des mécanismes de complexation régis par des paramètres physicochimiques variés	17
I.3 De l'intérêt de choisir la DNPA pour répondre à quelques questions ouvertes	19
I.4 De l'intérêt de choisir le système PSS/lysozyme comme système modèle	20
I.5 Préparation des échantillons et diagramme d'état du système	22
I.6 Détermination qualitative des trois types de structures grâce à la variation de contraste « classique »	23
<i>Le gel turbide : un réseau homogène de chaînes de PSS réticulées par les protéines</i>	24
<i>Les solutions liquides turbides : des globules de taille finie organisés en amas fractals à grande échelle</i>	26
<i>Les solutions limpides : un réseau homogène de chaînes de PSS décorées de protéines dépliées</i>	27
I.7 Une proposition de description des mécanismes de formation des complexes globulaires	28
<i>Détermination ultrafine des structures pour $[-]/[+]_{intro} \sim 1$</i>	28
<i>Sur l'origine de la taille finie des complexes</i>	32
<i>Agrégation à grande échelle et métastabilité des solutions</i>	33
I.9 Une démonstration expérimentale du relargage des contre-ions	34
I.10 A l'origine de la transition fluide/gel, l'état de dilution des chaînes après interaction avec les protéines.....	35
I.11 Bilan : quelques éléments de compréhension des mécanismes de complexation entre protéines et PEL de charges opposées	37
<i>Coacervation complexe ou précipitation ?</i>	39
Chapitre II. Variation de contraste dans un fondu polymérique : Nanocomposites à base de nanoparticules magnétiques	41
II.1 La problématique du renforcement mécanique dans les nanocomposites	42
<i>Le LLB, une usine à systèmes modèles</i>	43
II.2 $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, PS et DMAc, les trois ingrédients d'un système modèle	43
II.3 Synthèse des briques de base et transfert en solvant organique polaire	44
II.4 Dispersion des charges dans les matrices polymériques de PS : un large éventail de structures	48
II.5 Couronne hydrogénée et matrice deutérée : une mesure directe de la conformation des brosses dans les objets greffés.....	51
II.6 Conformation des chaînes du fondu dans les nanocomposites au repos	52
II.7 Evolution de la microstructure des renforts et de la conformation des chaînes sous étirement uniaxial	55
<i>Un peu de mécanique</i>	55
<i>Les spectres de diffusion 2D d'échantillons trempés : des instantanés de l'évolution de la structure sous étirement</i>	57
II.8 Et pour conclure.....	60

Chapitre III. Variation de contraste en couches minces : Quelques exemples utilisant la réflectivité de neutrons	61
III.1 Des brosses ultradenses de polystyrène dont la capacité à diffuser les neutrons gardent la mémoire de leur procédé de synthèse	61
III.2 Pénétration de l'eau dans la silice sous contrainte : mise en évidence d'une couche de D ₂ O fossilisée à la surface du verre.....	62
III.3 Signal de neutrons diffusés par une mousse : réflectivité ou diffusion aux petits angles ?	64
III.4 Monocouches de copolymères PS-PAA à l'interface air/eau : variation de contraste en NR et diffusion des rayons X aux petits angles en incidence rasante	67
Chapitre IV. Projets : Et si l'on continuait à s'amuser avec les neutrons.....	73
IV.1 Métallisation d'auto-assemblages de copolymères en volume et en surface	73
IV.2 Impact du chemin de formulation sur la complexation de colloïdes inorganiques avec des polyelectrolytes de charges opposées	74
IV.3 Formulation de matrices alimentaires enrichies en fer à base de polysaccharides	75
IV.4 Imagerie neutronique, tomographie et variation de contraste	76
IV.5 Mousses et émulsions : des architectures complexes faciles à contraster	78
Bibliographie	81

Avant-propos

Ce manuscrit est destiné à l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches et retrace une partie de la recherche que j'ai effectuée au Laboratoire Léon Brillouin (LLB) depuis mon arrivée en 2001, d'abord en stage post-doctoral puis comme membre permanent depuis 2003. Dans un centre de diffusion neutronique comme le LLB, un des motifs principaux pour mon embauche était bien évidemment l'accueil d'utilisateurs, à la fois pour des expériences de *réflectivité de neutrons*, une technique pour laquelle j'étais complètement néophyte à mon arrivée et sur laquelle je me suis spécialisé depuis, ainsi que pour des expériences de *diffusion de neutrons aux petits angles*, une technique qui m'avait permis à la fois d'obtenir les plus beaux résultats de mon travail de doctorat et de faire une rencontre très importante, celle de François Boué, puisque c'est lui qui m'a proposé de rejoindre le laboratoire après ma thèse. Les autres motifs d'embauche étaient la participation aux missions d'éducation du laboratoire, une tâche à laquelle je me suis attelé avec un très grand plaisir car j'aime l'enseignement, et, bien sûr, un travail de recherche propre¹.

En ce qui concerne les thématiques que je devais développer pour cette recherche, on m'a laissé dès le départ une très grande liberté, ce dont je suis particulièrement reconnaissant envers mes « chefs » de l'époque, Alain Menelle et François Boué, car elle s'accordait bien avec mon caractère. J'ai alors choisi, par goût et au gré de rencontres scientifiques et humaines toujours enrichissantes, de travailler sur des sujets variés dont je dresse ici l'inventaire à la Prévert : Complexes de protéines et de polyelectrolytes, nanocomposites « magnétiques », alliages colloïdaux, auto-assemblages d'acides gras, métallisation de copolymères auto-organisés aux interfaces, suspensions de colloïdes inorganiques magnétiques, polymères aux interfaces, assemblages de nanocristaux de cellulose et d'hémicellulose... Tous ces sujets présentent cependant deux dénominateurs communs. Le premier est leur appartenance au monde de la *matière molle*². Ils mêlent d'ailleurs souvent comme briques de base les polymères, des objets qui m'étaient pratiquement inconnus à mon arrivée et sur lesquels j'ai eu la chance de me former dans un laboratoire de très grande tradition³, et les colloïdes, des objets que je connaissais par contre très bien pour avoir tenté de les apprivoiser pendant mon doctorat et sur lesquels j'espère avoir apporté quelques éclairages à mes nouveaux collègues. Le second est que la technique expérimentale de choix pour l'étude structurale de tous ces systèmes est la *diffusion de rayonnement de neutrons aux petits vecteurs de diffusion q* , c'est-à-dire permettant de sonder de « grandes » échelles, par comparaison à la diffraction, parfaitement adaptées aux tailles caractéristiques des objets constituant les briques élémentaires de la matière molle. Cette mesure de diffusion peut se décliner soit dans une géométrie de transmission dénommée la diffusion aux petits angles, qui permet de sonder la structure des objets en volume, soit en géométrie de réflexion dénommée réflectivité pour

¹ Pour mémoire, je rappelle que le Laboratoire Léon Brillouin est le seul des grands centres de diffusion de rayonnement situé sur le sol français ayant pour mission de développer sa propre recherche car il est à la fois un laboratoire de recherche et un laboratoire d'accueil.

² La matière molle est un domaine scientifique à la frontière de la physique, de la chimie et de la biologie dont les contours sont assez flous et la définition peu aisée. Ce terme de *matière molle* a été popularisé par Pierre-Gilles de Gennes lors de son discours pour la remise de son prix Nobel du 9 décembre 1991 [124]. Il y décrit notamment en introduction les objets caractéristiques qui la constituent, et que l'on retrouvera pour la plupart dans la suite de ce manuscrit : «[...] *one of the outgrowths is soft matter, based on polymers, surfactants, liquid crystals and also on colloidal grains* ». Je n'ai pas pour but ici de la décrire plus avant mais j'incite le lecteur désireux d'en connaître ma vision à consulter le chapitre introductif à l'ouvrage *Neutrons et Matière Molle* que nous avons commis avec quelques camarades il y a quelques années [125].

³ Le Laboratoire Léon Brillouin est en effet un laboratoire internationalement et unanimement reconnu pour la physique des polymères depuis l'âge d'or des années 70 au cours desquelles furent faites des avancées significatives dans le domaine, grâce notamment à l'apport décisif de Jean-Pierre Cotton pour le développement des mesures de contraste.

sonder la structure d'objets aux interfaces⁴. La spécificité de cette technique vient du fait qu'elle sonde des échelles minimales de l'ordre du nm, dix fois supérieures à celle des atomes, et que la variable de contraste pertinente pour la diffusion n'est pas la longueur de diffusion cohérente des atomes eux-mêmes⁵ mais la valeur moyennée sur le volume de ces longueurs de diffusion appelée densité de longueur de diffusion ρ . La valeur de cette densité de longueur peut alors être modulée très fortement *via* des substitutions isotopiques⁶, ce qui ouvre le champ aux expériences élégantes de *variation de contraste* dans lesquelles on éteint ou on révèle sélectivement le signal d'un composant donné d'un échantillon dans des conditions de contraste *ad hoc*⁷.

Cette technique de variation de contraste m'a toujours fascinée et j'avais pu apprécier toute sa puissance lors de ma thèse lorsque j'avais déterminé l'arrangement spatial de quelques nanoparticules magnétiques nageant au sein d'une mer de plaquettes d'argiles dont le signal était éteint [1]⁸. J'ai depuis lors toujours cherché à en exploiter toute la richesse, en la déclinant sous des formes qui vont au-delà de la simple extinction du signal d'un composant dans un mélange binaire ou d'une mesure de conformation de polymère dans un fondu, car elle est, à mon sens, sous-utilisée. *Ce sont ces quelques variations sur le contraste que je me propose de relater ici et qui serviront de fil rouge à ce manuscrit.* J'ai en effet choisi de montrer comment il est possible de répondre à des questions de physique pertinentes sur un système donné à partir d'une description extrêmement fine de sa structure, obtenue grâce à la mise en œuvre de stratégies de variation de contraste dédiées et basées sur un choix initial judicieux des composants du système du point de vue du contraste neutronique. Ce choix est motivé, d'une part, par ma volonté de ne pas aborder toutes les thématiques de la liste à la Prévert présentée plus haut, dont l'énumération complète aurait été fastidieuse et qui ne m'aurait permis d'aborder chaque sujet que de façon elliptique, et, d'autre part, pour montrer que j'ai toujours cherché à valoriser tout le potentiel des techniques neutroniques au cours de ma recherche propre. Je pense que ce dernier point est important quand on travaille dans une source nationale comme le LLB, car un de nos rôles est de proposer de nouvelles idées d'expériences à la communauté des utilisateurs afin de la faire vivre dans un contexte qui est actuellement très concurrentiel pour la neutronique du fait des progrès impressionnants des techniques de microscopie et du développement des synchrotrons de troisième ou quatrième génération. J'espère, qu'au final, ce choix donnera une cohérence à l'ensemble de ma recherche depuis mon arrivée au LLB.

Je traiterai plus spécifiquement de deux thématiques : la complexation de protéines et de polyelectrolytes de charges opposées et les mécanismes de renforcement dans des nanocomposites formés de matrices polymériques dopées par des nanoparticules magnétiques. Ce sont deux thématiques qui ont été originellement développées au laboratoire et qui ont donné lieu à deux des quatre thèses que j'ai co-encadrées dans ma carrière⁹, celle de Jérémie Gummel sur les complexes

⁴ Il existe également une géométrie de mesure mêlant ces deux techniques appelée *Diffusion aux petits angles en incidence rasante* dont le principe « avec les mains » est le suivant : la géométrie de réflectivité est utilisée pour projeter le signal aux petits angles d'objets organisés sur une surface, et ce afin de caractériser leur organisation dans le plan de l'interface.

⁵ *Id est*, leur probabilité de diffuser les neutrons.

⁶ Les neutrons interagissent en effet avec le noyau des atomes et non avec leur cortège électronique. La longueur de diffusion diffère alors d'un isotope à l'autre. Le cas le plus important est bien évidemment celui de l'hydrogène dont la longueur de diffusion est de $-3,74$ fm alors que celle du deutérium est de $6,67$ fm, et sans quoi les neutrons ne seraient probablement pas concurrentiels par rapport aux rayons X pour les études de matière molle.

⁷ J'ai d'ailleurs pu très vite vérifier que le fameux aphorisme « tout est bon dans le neutron » n'est pas un vain mot...

⁸ Les plaquettes d'argiles étaient en concentration cent fois supérieure à celle des nanoparticules magnétiques. L'extinction de leur signal était tellement parfaite qu'il avait fallu compter près de cinq heures chaque échantillon sur le spectromètre D11 à l'ILL, probablement le plus performant du monde à l'époque, pour obtenir le signal des nanoparticules avec une statistique correcte. Et je n'avais pu mesurer que quatre échantillons sur le temps de faisceau alloué....

⁹ Il est en effet opportun de démontrer ma capacité à l'encadrement de doctorants en vue d'obtenir l'Habilitation à Diriger des Recherches. Je laisse d'ailleurs au lecteur le soin de méditer sur l'ironie de ce diplôme et que connaissent bien tous les

avec François Boué et celle d'Anne-Sophie Robbes sur les nanocomposites avec Jacques Jestin et Florian Meneau du synchrotron Soleil. De plus, certaines des expériences que nous avons effectuées lors de ces deux études sont, de mon point de vue, les plus belles que j'ai jamais faites au cours de ma carrière, tant du point de vue de l'utilisation poussée du contraste neutronique que des réponses qu'elles ont permis d'apporter à des questionnements de physique variés. Elles constitueront les deux premières parties de ce manuscrit, après une brève introduction dédiée à la notion de contraste en diffusion neutronique. Je présenterai ensuite une troisième partie dans laquelle je décrirai brièvement quelques exemples de l'utilisation que j'ai pu faire de la variation de contraste en réflectivité de neutrons. Ceci me permettra de donner un aperçu rapide des deux autres thèses que j'ai co-encadrées, celle d'Anne-Laure Fameau avec Jean-Paul Douliez de l'INRA de Nantes et celle de Zineb Guennouni avec Michel Goldmann de l'INSP Paris. Je terminerai en donnant quelques éléments de projet de recherche pour les années à venir.

Avant qu'il aille plus avant dans la lecture de ce manuscrit, je veux donner ici au lecteur quelques éléments sur son contenu. J'ai volontairement placé un grand nombre de précisions expérimentales, bibliographiques ou techniques en notes, ainsi que quelques digressions, afin de permettre deux vitesses de lecture. Un lecteur pressé pourra ainsi s'en tenir au texte principal qui contient tous les points essentiels, alors qu'un lecteur désireux d'en savoir plus pourra trouver dans les notes tous les détails qui ne sont pas strictement indispensables à la compréhension du manuscrit. J'ai par ailleurs écrit ce manuscrit tantôt à la première personne du singulier, tantôt à la première personne du pluriel. Cette transition du « je » vers le « nous » se fera à chaque fois que je parlerai des résultats obtenus, ainsi que des stratégies expérimentales mise en œuvre pour les obtenir, car ils résultent toujours d'un travail collectif. Je pourrai ainsi rendre hommage à toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler sur ces sujets, en particulier les thésards Jérémie, Anne-Sophie, Anne-Laure et Zineb et les co-encadrants, à l'origine des sujets, François, Jacques, Jean-Paul et Michel.

Prologue : Une brève introduction sur la variation de contraste

Avant d'entrer dans le cœur du manuscrit proprement dit, je fais ici quelques brefs rappels sur la notion de contraste en diffusion neutronique pour les cas spécifiques de la DNPA et de la réflectivité de neutrons afin que le lecteur puisse bien appréhender les stratégies expérimentales d'études structurales fines qui seront décrites par la suite. Le propos n'est pas de présenter un cours exhaustif sur ces techniques, pour lesquelles il existe nombre d'ouvrages de référence d'excellente qualité auxquels le lecteur pourra se référer [2][3][4][5][6][7][8][9][10]¹⁰.

P.1 Principe général d'une expérience de diffusion élastique des neutrons

Pour mémoire, le principe d'une expérience de diffusion de neutrons consiste à envoyer un faisceau monochromatique de neutrons sur un échantillon et à mesurer la probabilité que les neutrons soient diffusés dans un angle solide donné à l'aide d'un détecteur. Chaque neutron incident est considéré comme une onde plane de vecteur d'onde \vec{k}_i ¹¹ qui, lorsqu'elle interagit avec un atome de l'échantillon, est diffusée dans toutes les directions et réémet une ondelette sphérique. En DNPA et réflectivité, on fera l'hypothèse que cette diffusion est élastique, *id est* que le neutron n'échange pas d'énergie avec l'échantillon¹². La probabilité qu'un neutron soit diffusé par un atome donné i est alors proportionnelle à l'aire de la surface d'interaction entre le neutron et l'atome σ_i appelée *section efficace de diffusion*, qui peut aussi s'écrire comme $\sigma_i = b_i^2$, où b_i est la longueur de diffusion cohérente, caractéristique de la portée de l'interaction entre le neutron et l'atome. L'échantillon étant constitué de n différents atomes, les n ondelettes sphériques diffusées par ces atomes **vont interférer** et au final, l'amplitude de l'onde diffusée résultante en un point de l'espace va être la superposition des amplitudes de toutes ces ondelettes, pondérée par les *différences de phase* entre les différentes ondelettes. Le déphasage $\Delta\Phi$ de l'ondelette de vecteur d'onde \vec{k}_f diffusée par un atome situé à \vec{r} de la position origine est de $\vec{r} \cdot (\vec{k}_f - \vec{k}_i)$ (comme illustré sur la figure P.1 pour le cas de deux atomes). L'observable pertinente pour décrire la diffusion est alors le **vecteur de diffusion** $\vec{q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i$, de norme $\|\vec{q}\| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$ où θ est l'angle de diffusion. Le nombre de neutrons comptés dans un angle solide du détecteur¹³ Ω par unité de flux incident étant proportionnel au carré de l'amplitude de l'onde résultante, il permet de mesurer la *section efficace différentielle de diffusion* $\frac{d\sigma}{d\Omega}(q)$, qui s'écrit comme :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(q) = \sum_i^n \sum_j^n b_i b_j e^{i\vec{q} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j)}$$

(1)

¹⁰ Pour les lecteurs francophones désireux de se former aux différents aspects de la Neutronique, je conseille la série de cours de la *Collection SFN* [126], issue des écoles organisées par la Société Française de Neutronique, qui paraissent dans la langue de Molière jusqu'à un passé récent. J'ai personnellement commis dans un des volumes les plus récents deux cours, respectivement sur la DNPA [127] et la réflectivité[128], dans la langue de Shakespeare que m'a imposé l'air du temps. Un lecteur curieux de connaître ma vision personnelle de ces techniques pourra ainsi les consulter, en espérant qu'il n'y trouvera pas trop d'erreurs...

¹¹ Le neutron est considéré comme une onde plane monochromatique ayant une cohérence spatiale de l'ordre du micromètre. Le module de son vecteur d'onde dépend uniquement de sa longueur d'onde λ via $\|\vec{k}\| = 2\pi/\lambda$.

¹² De manière plus générale, cette hypothèse de *diffusion élastique* est faite pour tous les types d'expériences pour lesquels on cherche à obtenir une information uniquement structurale, telle que la diffraction, la DNPA ou la réflectivité. Expérimentalement, lors des mesures de DNPA ou réflectivité, il n'est pas possible de déterminer si un neutron mesuré par le détecteur a été diffusé de façon élastique ou inélastique par l'échantillon. Néanmoins, en pratique, la très grande majorité des neutrons étant diffusés aux petits angles de façon élastique, l'hypothèse est valide. Mesurer les effets inélastiques, ce qui permet d'accéder à des informations sur la *dynamique* des systèmes, nécessite de discriminer diffusion élastique et inélastique afin d'extraire la faible part des neutrons diffusés de façon inélastique, ce que permettent les techniques neutroniques de 3-axes, de Temps de Vol ou de spectroscopie à écho de spin.

¹³ En pratique, le détecteur est situé à une distance de l'échantillon très supérieure à la taille de l'échantillon. L'angle de diffusion θ en un point du détecteur est donc le même pour tous les atomes de cet échantillon.

Cette section efficace de diffusion différentielle est donc *une mesure de la probabilité qu'un atome ayant une longueur de diffusion cohérente b_i se trouve à une position $\vec{r}_i - \vec{r}_j$ d'un autre atome de longueur de diffusion b_j et permet donc in fine de décrire complètement la structure d'un échantillon donné*¹⁴.

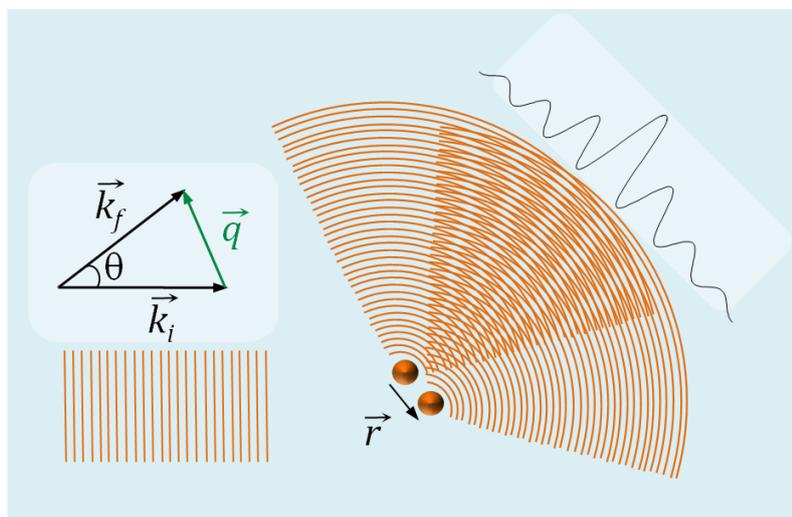


Figure P.1 : Principe d'un expérience de diffusion et définition du vecteur de diffusion \vec{q} . La diffusion de l'onde plane incidente de module $\|\vec{k}\| = 2\pi/\lambda$ (représentée en orange) par un atome donné provoque l'émission d'une ondelette sphérique. La figure d'interférence résultant des interférences entre les ondelettes émises par les deux atomes permet d'évaluer la distance $\|\vec{r}\|$.

P.2 Notion de contraste et approximation « petits angles »

Le point clé des techniques de diffusion de neutrons aux petits angles et de réflectivité provient du fait qu'elles sondent des échelles spatiales beaucoup plus grandes que les distances entre atomes au sein d'une molécule et *qu'elles ne permettent ainsi pas de décrire les détails moléculaires*. En effet, aux angles très faibles de mesure de la DNPA, les ondes diffusées par les différents atomes d'une molécule donnée n'interfèrent pas car elles sont pratiquement en phase, aussi leurs amplitudes s'ajoutent¹⁵. Dans cette *approximation aux petits angles*, la molécule est ainsi vue comme un seul et même diffuseur ponctuel, communément appelé diffuseur élémentaire (Figure P.2). Sa longueur de diffusion caractéristique, appelée **densité de longueur de diffusion ρ** , est alors la somme des longueurs de diffusion cohérente des différents atomes qui la constituent, moyennée sur son volume¹⁶. Il faut bien évidemment que la taille caractéristique du diffuseur élémentaire soit significativement inférieure à la plus petite taille sondée lors de l'expérience, qui est de l'ordre de $1/q_{\max}$, pour que cette approximation aux petits angles soit valide. Cette limite étant expérimentalement d'environ 10 Å, la notion de diffuseur élémentaire n'est pas nécessairement

¹⁴ En pratique la variable intensive pertinente est la section efficace de diffusion différentielle par unité de volume $\frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega}(q)$, que l'on nommera *intensité diffusée* par la suite, homogène à l'inverse d'une longueur et usuellement obtenue en cm^{-1} .

¹⁵ Il vient en effet que $\vec{q} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j) \rightarrow 0$ quels que soient les couples (i,j) , et que donc $e^{i\vec{q} \cdot (\vec{r}_i - \vec{r}_j)} \sim 1$. Finalement $\frac{d\sigma}{d\Omega}(q) = \sum_i^n \sum_j^n b_i b_j = \sum_i^n b_i \sum_j^n b_j = (\sum_i^n b_i)^2$

¹⁶ La densité de longueur de diffusion se calcule très simplement dans le cas des solides cristallins ou amorphes avec $\rho = \frac{\sum_i^n b_i}{V}$, où les b_i sont les longueurs de diffusion cohérente des atomes constitutifs du diffuseur élémentaire et V son volume. Pour les liquides, ce calcul reste valable s'il n'y a pas de fluctuations de densité à des tailles inférieures à q^{-1} , auquel cas ρ présenterait elle-même des fluctuations spatiales et temporelles. Dans le cas de liquides simples, cette hypothèse se vérifie car ces liquides sont typiquement incompressibles aux échelles des petits angles. Elle n'est par contre pas nécessairement vraie pour des mélanges de deux liquides du fait de possibles fluctuations de concentration.

limitée à une molécule unique, mais peut s'étendre à un groupe de petites molécules comme dans le cas d'un solvant¹⁷.

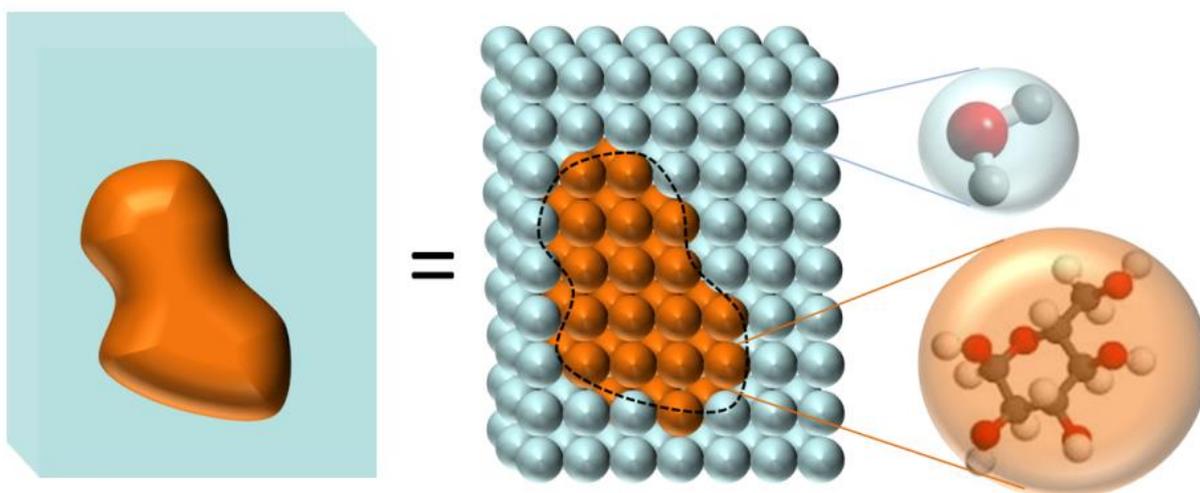


Figure P.2. Illustration de la notion de diffuseur élémentaire pour le cas d'un objet quelconque dispersé dans un milieu continu. L'objet est composé de diffuseurs élémentaires tous identiques, du point de vue de la composition chimique et isotopique, en l'occurrence un sucre, de même que le milieu continu, pour lequel tous les diffuseurs élémentaires sont des molécules d'eau.

Si, de prime abord, cette approximation aux petits angles pourrait apparaître comme un inconvénient puisque ne permettant que d'obtenir des affinements structuraux « basse résolution », elle constitue en fait le fondement même des **expériences de variation de contraste** quand on la combine aux possibilités de marquage par substitution isotopique. En effet, puisque les neutrons interagissent directement avec les noyaux¹⁸, la longueur de diffusion cohérente d'un atome diffère d'un de ses isotopes à l'autre. *Il est alors possible de moduler la densité de longueur de diffusion d'un diffuseur élémentaire donné en jouant sur la composition des isotopes des atomes qui le constitue, sans changer ni sa structure chimique, ni pratiquement ses propriétés physiques*¹⁹. Or, lors d'une expérience, le terme de l'intensité diffusée décrivant les corrélations spatiales entre deux types de diffuseurs élémentaires de l'échantillon contient un pré-facteur de contraste qui est le carré de la différence entre leurs densités de longueur de diffusion respectives. Moduler la densité de longueur de diffusion d'un des composants permet ainsi de *jouer sur ce pré-facteur de contraste afin d'exalter ce terme d'intensité, ou au contraire de le minimiser, voire de l'annuler*, au gré des informations que l'expérimentateur cherche à obtenir. Le fait que le pré-facteur de contraste fasse intervenir le carré de la différence des ρ permet de faire varier très fortement l'intensité mesurée avec une faible modification du ρ d'un des diffuseurs de l'échantillon. Ceci rend les expériences de variation de contraste particulièrement sensibles et expérimentalement relativement faciles à mettre en place.

Bien que le procédé de substitution isotopique soit en principe applicable à tous les atomes, il concerne en pratique essentiellement l'atome d'hydrogène pour les expériences de diffusion

¹⁷ Dans le cas d'un solvant composé de deux types de molécules, la densité de longueur de diffusion est moyennée sur les longueurs de diffusion pondérées de leurs fractions volumiques respectives. Le cas classique correspond au mélange d'un solvant hydrogéné et de son homologue deutéré. La notion de diffuseur élémentaire implique aussi qu'un ion très solvaté ait une densité de longueur de diffusion très proche de celle du solvant puisque on intègre essentiellement des molécules de solvant dans le calcul de cette dernière.

¹⁸ Contrairement aux photons qui interagissent, eux, avec le cortège électronique des atomes.

¹⁹ Les propriétés d'un atome étant essentiellement liées à son numéro atomique, on postule généralement qu'une substitution isotopique ne modifie pas la physique d'un système. Ceci n'est pas toujours vrai, en particulier quand la masse joue un rôle sur ces propriétés. Ceci est évidemment vrai pour la gravité mais pas uniquement. Par exemple, l'intensité de la liaison hydrogène diffère de l'eau légère à l'eau lourde et certaines propriétés physiques de l'eau changent alors d'un isotope à l'autre, comme le point de fusion (0°C pour H₂O versus 3,81°C pour D₂O), le maximum de densité (4°C pour H₂O versus 11,6°C pour D₂O) ou le pH à 25°C (7,0°C pour H₂O versus 7,4 pour D₂O) [129].

neutronique car le ^1H possède une longueur de diffusion dont la valeur est très différente de celle du deutérium ^2H , qui est, quant à elle, très proche de celle du carbone et de l'oxygène, et relativement proche de celle de l'azote²⁰. La densité de longueur d'un diffuseur élémentaire *organique* est donc essentiellement dépendante de sa teneur en ^1H . Elle est ainsi continûment modulable dans le cas d'un solvant entre le ρ_{H} du solvant purement hydrogéné et le ρ_{D} du solvant deutéré, et peut prendre dans le cas d'une molécule toutes les valeurs discrètes associées aux remplacements partiels de tout ou partie de ses ^1H par des ^2H ²¹. Ceci rend les expériences de variations de contraste particulièrement adaptées à l'étude de la *matière molle* puisque les briques constitutives des objets qui la constituent étant majoritairement des composés organiques²², elles ont pratiquement toutes des densités de longueur de diffusion comprises entre celle de l'eau légère H_2O et celle de l'eau lourde D_2O , gamme dans laquelle sont également comprises les ρ des nanoparticules inorganiques les plus communément rencontrées dans le domaine²³.

P.3 Les stratégies de la variation de contraste

La souplesse de la variation de contraste permet d'envisager sa mise en œuvre avec différents types de stratégie du point de vue expérimental. La première de ces stratégies vise à *créer* un contraste suffisant au sein d'un échantillon donné afin de pouvoir réaliser une mesure avec une statistique correcte. Elle s'applique naturellement dans un système à deux composants pour lequel le contraste « naturel », *id est* la différence de ρ entre les deux composants hydrogénés, est faible²⁴.

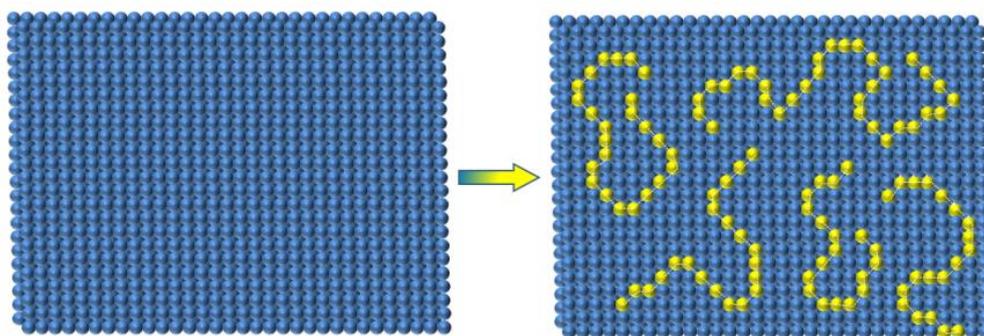


Figure P.3. Utilisation de la substitution isotopique pour créer du contraste dans le cas d'un fondu d'homopolymères. Le fondu est un milieu parfaitement homogène lorsque toutes les chaînes sont hydrogénées (panneau de gauche). Le « marquage » de certaines des chaînes par deutériation permet de les distinguer des autres chaînes et de caractériser leur conformation (panneau de droite).

Elle s'applique aussi, de façon plus intéressante, pour l'étude d'échantillons n'ayant intrinsèquement aucun contraste neutronique naturel car constitués de diffuseurs élémentaires chimiquement tous identiques mais appartenant à des objets différents, tels que les fondus d'homopolymères, puisqu'ils sont parfaitement homogènes à l'échelle des petits angles²⁵. Il suffit alors de remplacer certains des

²⁰ La longueur de diffusion de ^1H , négative, est de $-3,74$ fm, alors que celle de ^2H est de $6,67$ fm. Les b de C, O et N sont respectivement de $6,65$ fm, $5,80$ fm, et $9,36$ fm. Ces dernières valeurs sont des moyennes des b des différents isotopes des éléments considérés pondérés de leurs abondances naturelles [130].

²¹ Outre la molécule complètement hydrogénée, c'est en pratique généralement la molécule complètement deutérée qui est utilisée lors des expériences. La deutériation partielle et contrôlée d'une molécule nécessite soit de connaître un bon chimiste, soit d'avoir un portefeuille bien rempli...

²² C'est le cas pour la très grande majorité des polymères, des savons et des cristaux liquides.

²³ C'est par exemple le cas pour les nanoparticules de silice SiO_2 ($\rho \sim 3,4 \cdot 10^{10} \text{cm}^{-2}$ pour une densité de silice de $\sim 2,2$), des argiles (par exemple $3,65 \cdot 10^{10} \text{cm}^{-2}$ pour la laponite qui est une hectorite) ou les nanoparticules d'or, très utilisées en plasmonique ($\sim 4,50 \cdot 10^{10} \text{cm}^{-2}$), sachant que les ρ de H_2O et de D_2O sont respectivement de $-0,53 \cdot 10^{10} \text{cm}^{-2}$ et $6,38 \cdot 10^{10} \text{cm}^{-2}$.

²⁴ C'est par exemple le cas lors de la détermination de la morphologie d'auto-assemblages de savons à chaînes aliphatiques dans de l'eau légère. Ces savons, constitués majoritairement de groupements CH_2 ont toujours des ρ proches de H_2O puisqu'ils ont des densités peu éloignées de 1 et que $b_{\text{C}} \sim b_{\text{O}}$.

²⁵ Sous réserve bien sûr qu'ils ne présentent pas de fluctuations de densité à grande échelle, ce qui est vrai pour les fondus de polymère pratiquement incompressibles.

objets hydrogénés par leurs homologues chimiques deutérés pour obtenir un système à deux composants du point de vue neutronique, ce qui permet par exemple de mesurer la conformation moyenne des chaînes dans le cas des fondus d'homopolymères [11] (figure P.3). La diffusion de neutrons est alors l'*unique* technique permettant l'obtention d'une information structurale sur ce type d'échantillons.

La seconde stratégie s'applique lorsque l'on s'intéresse à caractériser un échantillon composé de trois types de diffuseurs élémentaires, ou plus. Si les ρ de ces diffuseurs élémentaires sont toutes différentes, il va être extrêmement difficile d'interpréter le spectre de diffusion mesuré expérimentalement puisque l'intensité est la somme d'au moins trois facteurs de structures partiels²⁶. On cherche alors à se ramener à un système à deux composants du point de vue du contraste neutronique pour obtenir une intensité censément aisément interprétable. Pour ce faire, il suffit d'ajuster la ρ d'un des diffuseurs à la valeur de celle d'un des autres composants pour annuler tous les facteurs de structure partiels provenant de ce second composant. Dans un système ternaire, on mesure alors directement l'intensité liée à la tierce espèce (Figure P.4). Si le ρ de ce diffuseur peut également être ajusté à celui du troisième composant²⁷, il est possible d'obtenir les 2 facteurs de structure *inter* $S_{ij}(q)$ ainsi que le facteur de structure croisé, par soustraction de ces termes à l'intensité obtenue lors d'une troisième mesure en contraste total, c'est à dire sans aucune annulation de contraste. Cette stratégie de *matching*²⁸ peut être étendue à un système à 4 composants mais est plus difficile à réaliser expérimentalement puisqu'elle nécessite que 3 de ces composants aient la même ρ .

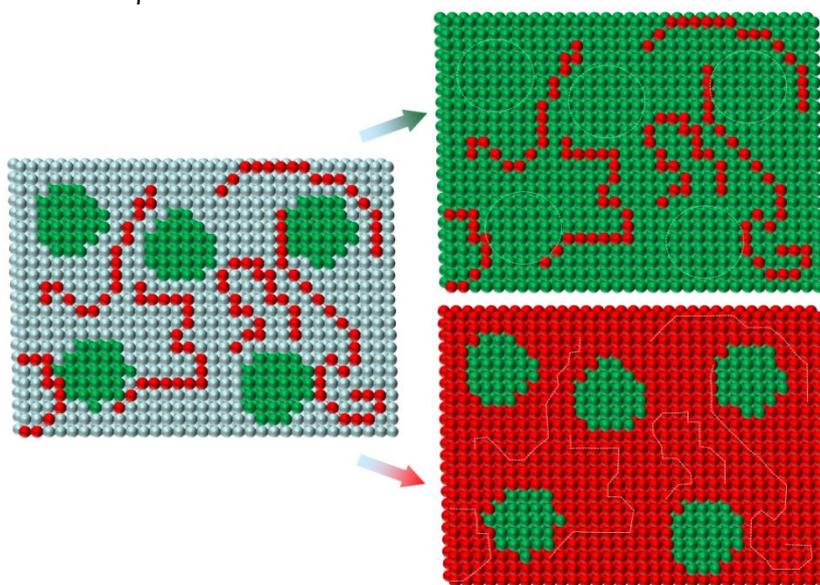


Figure P.4. Principe de l'annulation de contraste dans un système ternaire formé d'un mélange de colloïdes sphériques et de chaînes polymériques dans un milieu continu de densité de longueur de diffusion ajustable. Dans des conditions de contraste neutroniques quelconques, tous les objets sont visibles (*panneau de gauche*). Lorsque la densité de longueur de diffusion du solvant est ajustée à celle des colloïdes, seules les chaînes sont visibles (*panneau de droite en haut*). Réciproquement, lorsque la densité de longueur de diffusion du solvant est ajustée à celle des chaînes, seuls les colloïdes sont visibles (*panneau de droite en bas*).

Bien qu'elles soient de philosophie opposées – *création ou annulation de contraste* –, ces deux approches expérimentales peuvent être mixées lorsque l'on cherche à mesurer la conformation d'une chaîne dans un fondu polymérique au sein duquel ont été dispersées des particules. Il faut

²⁶ 3 dans un système à 3 composants ($S_{22}(q), S_{23}(q), S_{33}(q)$), 6 dans un système à 4 composants ($S_{22}(q), S_{23}(q), S_{33}(q), S_{24}(q), S_{34}(q), S_{44}(q)$), et cætera...

²⁷ C'est en pratique très facile à mettre en œuvre d'un point de vue expérimental lorsque ce composant est un solvant.

²⁸ En bon français !

alors créer le contraste nécessaire à la mesure de conformation tout en annulant tous les termes de diffusion liés aux particules, comme on le verra dans le chapitre 2.

Finalement, il existe une troisième stratégie d'utilisation de la variation de contraste, moins usitée expérimentalement, visant à extraire de façon rigoureuse les termes respectifs de *facteur de forme* $P(q)$ et de *facteur de structure* $S(q)$ ²⁹ de l'intensité diffusée dans un système d'objets dispersés dans une phase continue, et ce quelle que soit la forme des objets et leur concentration³⁰. Il apparaît en effet que, dans le cas général, cette intensité est la somme de la contribution de $P(q)$, qui est linéaire au nombre d'objets n et de celle de $S(q)$, qui est quant à elle proportionnelle au carré de n ³¹. La seule façon de découpler les 2 termes serait donc de faire varier la concentration ... mais dans ce cas le $S(q)$ serait modifié d'une mesure à l'autre! Il existe heureusement deux cas pour lesquels ce découplage peut se faire de façon simple : (i) lorsque les systèmes sont dilués³² et (ii) lorsque les objets sont rigides et centro-symétriques, ce qui est généralement une hypothèse valide pour les colloïdes, car il est alors possible de montrer que l'intensité peut se récrire sous la forme d'un produit de $P(q)$ et de $S(q)$ pour des raisons de symétrie [3]. Dans tous les autres cas, en particulier pour l'étude des polymères, seule une méthode dénommée **extrapolation à concentration nulle** permet de découpler forme et structure grâce à un élégant artifice de variation de contraste. L'idée est de faire des mesures successives avec des mélanges d'objets deutérés et hydrogénés, en proportions H/D variables mais à nombre d'objets constant. Si la ρ de la phase continue est ajustée à celle de l'objet hydrogéné, on dilue progressivement le système du point de vue neutronique quand on fait croître le taux d'objets H, et ce *sans* modifier le $S(q)$ puisque tous les échantillons sont similaires du point de vue de la physique (Figure P.5). Pour une proportion donnée en objets deutérés x_D , l'intensité diffusée par ce système s'écrit alors simplement comme³³ :

$$\frac{I(q)(cm^{-1})}{\Phi_D} = k_D^2(P(q) + \Phi_D S(q)) \quad (2)$$

avec k_D le terme de contraste entre les objets D et le mélange de contraste homogène formé du milieu continu et des objets H, et Φ_D la fraction volumique en objets deutérés, telle que $\Phi = x_D \Phi_D$ où Φ est la fraction volumique en objets. Les facteurs de forme et de structure sont donc obtenus *par un ajustement linéaire réalisé à partir des différentes mesures pour chaque vecteur de diffusion*, ce qui nécessite que ces mesures aient été faites très soigneusement.

²⁹ $P(q)$ est un terme *intra* qui somme les corrélations entre diffuseurs élémentaires d'un objet donné, et renseigne donc sur sa forme, alors que $S(q)$ est un terme *inter* qui somme les corrélations entre diffuseurs élémentaires d'objets distincts, et renseigne ainsi sur l'organisation spatiale moyenne des objets, la mesure donnant une image structurale intégrée sur toutes les configurations adoptées par le système lors de l'acquisition. Ce facteur de structure permet de formuler des hypothèses sur les interactions existantes entre objets ayant mené le système à adopter une telle organisation.

³⁰ En considérant évidemment que ces objets sont tous identiques.

³¹ En effet, si le système est formé de n objets constitués de N diffuseurs élémentaires, il existe $(nN)^2$ termes dans l'intensité diffusée, nN^2 provenant d'interférences intra objets et $(n-1)nN^2$ provenant d'interférences inter objets (soit $\approx n^2N^2$ puisque n est très grand) et l'équation (1) peut se récrire comme :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(q) = (\rho_{obj} - \rho_{milieu})^2 v_{obj}^2 \left(n \sum_{i,j} e^{i\vec{q} \cdot (\vec{r}_i^\alpha - \vec{r}_j^\alpha)} + n^2 \sum_{i,j,\alpha \neq \beta} e^{i\vec{q} \cdot (\vec{r}_i^\alpha - \vec{r}_j^\beta)} \right)$$

avec ρ_{obj} et ρ_{milieu} les densités de longueur respectives de l'objet et du milieu et v_{obj} le volume moléculaire de l'objet. Le premier terme est le facteur de forme et le second le facteur de structure.

³² On postule alors que la pression osmotique Π du système se réduit à un développement du Viriel limité au second ordre A_2 du fait de la faible concentration. Il vient alors que $\left(\frac{\partial \Pi}{kT \partial \rho}\right)_T = \frac{1}{S(0)} \approx 1 + 2\rho A_2 + o(\rho^2)$, avec k la constante de Boltzmann, T la température et ρ la densité, soit $S(0) \approx \frac{1}{1+2\rho A_2} \approx 1 - 2\rho A_2$ puisque $\rho \ll 1$. On peut alors découpler forme et structure en faisant une étude en concentration dans la région des petits q , puisque $S(0)$ est linéaire à ρ .

³³ En effet dans un mélange de chaînes H et D, l'intensité s'écrit comme la somme de 3 termes : $I(q) = k_H^2 S_{HH}(q) + 2k_H k_D S_{HD}(q) + k_D^2 S_{DD}(q)$ avec $k_i = b_i - b_{sol} \frac{v_i}{v_{sol}}$. Quand k_H est nul, l'intensité se réduit à $I(q) = k_D^2 S_{DD}(q)$, et donc à l'équation 2 d'après l'équation générale de la note 31.

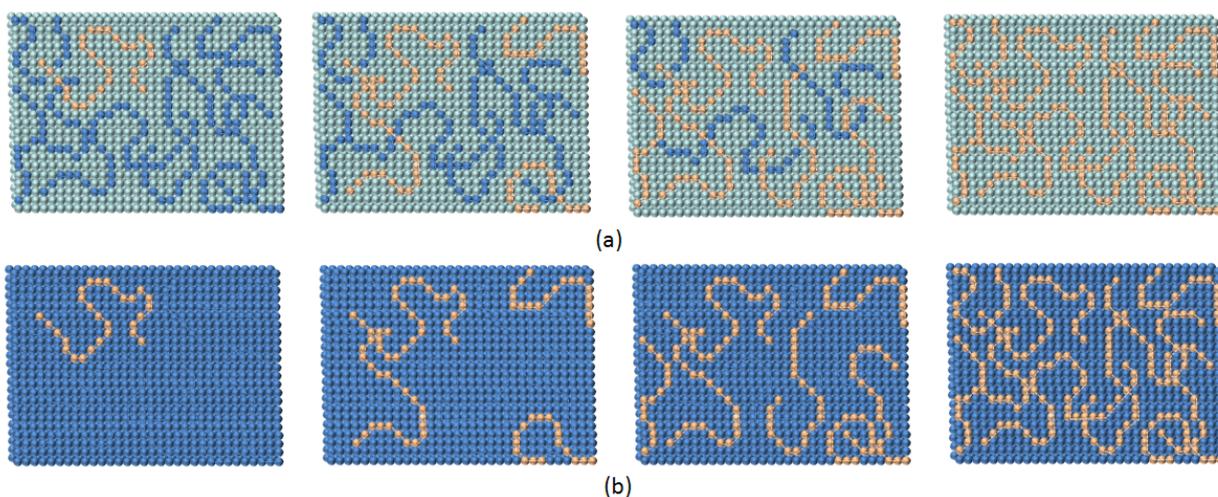


Figure P.5 Principe de la méthode de l'extrapolation à concentration nulle. (a) Plusieurs échantillons sont réalisés avec des mélanges de chaînes deutérées et hydrogénées de densités de longueur respectives ρ_H et ρ_D , à nombre de chaînes total constant mais de proportions en chaînes deutérées variables. (b) Lorsque la densité de longueur de diffusion de la phase continue ρ_{cont} est ajustée à ρ_H , seul le terme $S_{DD}(q)$ reste visible. Le facteur de structure s'éteint alors progressivement lorsque le taux de chaînes deutérées décroît. Il est bien évidemment possible de faire l'expérience symétrique consistant à ajuster ρ_{cont} à ρ_D , pour ne laisser que le terme $S_{HH}(q)$ visible.

Cette stratégie de mélanges d'objets H et D peut se décliner d'une autre manière, à mon sens encore plus élégante, lorsque l'expérimentateur n'est intéressé que par l'obtention du facteur de forme. Il ne s'agit plus d'ajuster le ρ du solvant à celui d'un des objets mais à une valeur telle que la somme de tous les termes d'amplitude liés au facteur de structure soit nulle, de sorte à ce que l'intensité se réduise au seul facteur de forme. Ceci est rendu possible par le fait que tous les termes d'amplitudes inter-objets sont similaires, aux pré-facteurs de contraste près, selon que l'on sonde les corrélations H/H, H/D ou D/D, puisque les objets sont tous identiques. Ces termes de pré-facteurs de contraste se factorisent alors dans l'écriture de l'intensité³⁴, et s'annulent aux **conditions de contraste moyen nul**, c'est à dire lorsque $(1 - x_D)k_H + x_D k_D = 0$ ³⁵ :

$$\frac{I(q)}{\Phi} = \left((1 - x_D)k_H^2 + x_D k_D^2 \right) P(q) + \Phi \left((1 - x_D)k_H + x_D k_D \right)^2 S(q) \quad (3)$$

La force de cette stratégie provient évidemment du fait qu'elle ne nécessite qu'une seule et même mesure et donne directement accès au résultat souhaité. Elle doit néanmoins être appliquée avec précaution car l'annulation des termes de structure repose sur l'exactitude supposée des conditions de contraste moyen nul, qui est *de facto* postulée et ne peut être vérifiée. De possibles écarts à ces conditions, induites par exemple par une estimation erronée des densités de longueur des objets³⁶, peuvent alors donner des termes de structure parasites dans l'intensité qui altèrent la qualité de la mesure.

³⁴ Développons l'intensité du système ternaire de la note précédente $I(q) = k_H^2 S_{HH}(q) + 2 \cdot k_H k_D S_{HD}(q) + k_D^2 S_{DD}(q)$ en récrivant chaque terme à partir de l'équation générale de la note 31. Le terme S_{HD} ne contient que des corrélations *inter* : $S_{HD}(q) = x_D(1 - x_D)\Phi^2 S(q)$; alors que les termes S_{HH} et S_{DD} contiennent des termes *intra* : $S_{HH}(q) = (1 - x_D)\Phi P(q) + (1 - x_D)^2 \Phi^2 S(q)$ et $S_{DD}(q) = x_D \Phi P(q) + x_D^2 \Phi^2 S(q)$.

³⁵ Ces conditions sont aisées à obtenir puisqu'il suffit juste que la densité de longueur de diffusion de la phase continue soit comprise entre celles des objets H et D, le contraste n'ayant qu'à être ajusté en fonction du x_D choisi.

³⁶ Ce qui peut arriver fréquemment lors de l'étude de polymères en solution pour lesquels le volume molaire partiel peut varier très fortement d'un solvant à l'autre du fait de la solvatation. J'ai à ce propos fait récemment une expérience amusante avec C. Le Cœur et C. Robin (Clémence et Clément!) de l'IMPCE à Thiais sur du PolyMethylAcrylate en solution aqueuse. Ce polyelectrolyte faible transite d'une conformation globulaire à une conformation étendue lorsqu'il se charge au-dessus de son pKa. A bas pH, le signal du polymère se mesure aisément, alors qu'il disparaît *complètement* à haut pH, et ce quelle que soit la teneur en eau lourde de la solution, car la chaîne se gaine littéralement d'eau dans la conformation étendue.

Chapitre I. Variation de contraste *en solution* : Mécanismes de formation de complexes de protéines et de polyelectrolytes de charge opposées

Cette première partie traite des mécanismes de complexation entre protéines et polyelectrolytes (PEL) de charges opposées. C'est un sujet sur lequel j'ai commencé à travailler lors de mon séjour post-doctoral en 2002 avec François Boué qui était alors neuf au laboratoire et que nous avons poursuivi jusque vers fin 2009, la période la plus fructueuse en résultats ayant été celle de la thèse de Jérémie Gummel, soutenue en 2006.

I.1 Quelques mots d'introduction sur le sujet

Les complexes entre protéines et PEL de charges opposées ont commencé à intéresser la communauté scientifique dans les années 1950, lorsque Morawetz et Hugues ont étudié la possibilité de purifier des protéines en les complexant sélectivement par des PEL en fonction de leur point isoélectrique [12]. C'est aussi à cette époque que s'est posée la question des mécanismes menant à la coacervation complexe³⁷, originellement introduite par de Jong *et al* [13], et à propos de laquelle les descriptions théoriques successives se sont accordées sur le fait que la formation de complexes en solution est un préalable nécessaire [14]. Ces complexes ont ensuite été pratiquement oubliés pendant plus de deux décennies pour être redécouverts au milieu des années 90, comme le racontent, dans une revue récente et extrêmement complète, Paul Dubin, un des pères fondateurs du domaine, et ses collaborateurs [15], jusqu'à devenir un domaine scientifique en très fort développement à l'heure actuelle. Il paraît d'ailleurs aujourd'hui environ 20 papiers par an sur le sujet, contre moins de 5 dans les années 90, avec un taux de citations annuel total de 250, soit le double de 2005³⁸. Cet engouement est dû par les nombreuses possibilités d'applications de ces systèmes dans le domaine de l'agroalimentaire³⁹ et la pharmacologie, en solution ou en géométrie confinée, telles que le relargage contrôlé [16], les biopuces [17], le fractionnement de protéines [18], la stabilisation d'émulsions [19], l'immobilisation de protéines sur des particules colloïdales [20][21]. Il est également poussé par le développement récent de nouvelles architectures PEL telles que les multicouches polyelectrolytes [22] ou les dendrimères de polyelectrolytes [23].

I.2 Des mécanismes de complexation régis par des paramètres physicochimiques variés

Je n'ai pas la prétention de présenter ici une bibliographie parfaitement à jour sur le sujet. Je propose au lecteur désireux d'en savoir plus sur le sujet de se référer à l'excellente revue déjà citée plus haut [15], qui met particulièrement l'accent sur les avancées sur le domaine lors de ces dix dernières années. Je propose de donner plutôt un aperçu du domaine au moment où nous avons débuté nos travaux, tout en me limitant au cas des solutions de protéines globulaires et des PEL en solution. Il se base sur quelques excellentes revues, certaines assez générales [24][25] ou se focalisant plus sur les systèmes protéines-polysaccharides [26] ou les simulations [27], qui montrent que le domaine était alors en plein essor et dont la lecture permet d'avoir un panorama complet de l'état de l'art à cette époque.

³⁷ Il est parfois difficile de discuter de ce qu'est la coacervation, simple ou complexe, car ce terme semble recouvrir plusieurs définitions dans la littérature. A toutes fins utiles, nous nous basons sur les définitions de l'*International Union of Pure and Applied Chemistry* que je rappelle ici. La coacervation est une séparation de phase entre deux phases liquides dans des systèmes colloïdaux et la coacervation complexe est une classe particulière de coacervation résultante de l'interaction entre deux colloïdes de charges opposées [131].

³⁸ Ces statistiques sont effectuées à partir des bases de données *Web of Knowledge* et *Google Scholar*.

³⁹ Je rappelle en effet que les polysaccharides, qui jouent un rôle prépondérant dans l'agroalimentaire, sont souvent des polyelectrolytes.

La difficulté à décrire avec précision les mécanismes de complexation provient de la multiplicité des paramètres physicochimiques qui sont mis en jeu dans le système. Outre les paramètres évidents que sont les *concentrations* respectives des deux composants interviennent des paramètres géométriques, à savoir le *rapport de taille* entre les deux composants, la *flexibilité*, la *longueur* et la *polydispersité* de la chaîne polymérique et les paramètres influant sur les interactions. Si, dans certains cas, les interactions hydrophobes ou les liaisons hydrogènes peuvent jouer un rôle important [28][29], les interactions prédominantes sont bien évidemment les **interactions électrostatiques**. Les paramètres les plus importants sont donc ceux qui modulent ces interactions électrostatiques : *pH*, *force ionique* I , *densité linéique de charge* des chaînes PEL et *distribution des charges à la surface* des protéines⁴⁰. La présence de résidus chargés positivement et négativement à la surface des protéines rend d'ailleurs la description des interactions électrostatiques plus difficile que dans celui d'objets chargés de manière homogène tels que des colloïdes ou des micelles [28]. Les expériences et les simulations ont en effet montré que la présence de ces hétérogénéités de charges favorise la complexation et permet qu'elle se produise « *on the wrong side of pl* »⁴¹, c'est-à-dire lorsque les protéines et PEL ont globalement la même charge nette, dès lors que les PEL commencent à interagir avec les résidus de charge opposée sur la protéine [30][31][32]. La portée des interactions électrostatiques est donc un élément crucial dans le système puisque les deux types d'objets peuvent s'attirer sur des échelles très locales et se repousser, en moyenne, sur des échelles plus grandes. Dans ce contexte, le paramètre pertinent est bien évidemment *la longueur de Debye* κ^{-1} ($\sim l^{1/2}$), caractéristique de la distance d'écrantage de ces interactions. Les conditions requises pour que la complexation se produise sont d'ailleurs intimement liées à cette longueur, puisqu'il a été montré qu'elles dépendent à la fois des densités de charges des deux types d'objets et de κ^{-1} [33]. De fait, lorsque la force ionique est trop élevée, l'écrantage des attractions électrostatiques est tel qu'il ne permet plus la formation de complexes [28][34][35]. Outre le rôle évident qu'elles jouent directement sur les interactions électrostatiques, la force ionique et la densité de charge du PEL modulent également les conditions critiques de complexation en contrôlant la rigidité de la chaîne⁴², l'adsorption d'un macroion sphérique – micelle ou protéine – sur un PEL décroissant à mesure de l'augmentation de la rigidité de ce dernier [35][36][37].

Lorsque la complexation a lieu, il a été montré expérimentalement sur de nombreux systèmes que le taux d'agrégation est maximal lorsque les charges positives et négatives portées par les deux types d'objets sont en conditions de concentrations stœchiométriques [31][30][38][39]. Ce caractère général a d'ailleurs été confirmé par les simulations [32]. D'un point de vue thermodynamique, la complexation peut revêtir un caractère soit exothermique [40][41], soit endothermique [39], comme l'ont montré des mesures calorimétriques. Lorsque les effets entropiques sont dominants, le moteur principal supposé de la complexation est le relargage des contre-ions condensés sur les espèces, le gain entropique translationnel très élevé associé à ce relargage contrebalançant la perte d'entropie configurationnelle des PEL, comme proposé théoriquement [42][43]. Cet effet serait alors d'autant plus fort que la densité linéique de charge du PEL est élevée, le nombre de contre-ions condensés étant plus important du fait de la condensation de Manning [44].

Les descriptions structurales des complexes font émerger, aux échelles locales (de 10 à 1000 Å), deux types de structures distinctes de densité très différentes : La complexation peut mener soit

⁴⁰ La distribution des résidus ionisables à la surface d'une protéine peut varier très fortement d'une protéine à l'autre, allant d'une répartition relativement homogène dans le cas du lysozyme à une répartition très asymétrique dans le cas de la BSA [28], qui est pratiquement un dipôle près de son pI.

⁴¹ D'après l'expression popularisée par Paul Dubin... Le pH seuil à partir duquel la complexation opère est appelé pH_c .

⁴² La longueur de persistance l_p d'un chaîne PEL est en effet la somme de sa longueur de persistance intrinsèque liée à la flexibilité intrinsèque du squelette de la chaîne et d'une partie électrostatique [132][133] provenant des répulsions entre charges adjacentes le long de la chaîne qui tendent à rigidifier cette dernière.

à la formation de gels [45] [46], soit à la formation d'agrégats denses globulaires de quelques centaines d'angströms [30] [31][38] [39]. La longueur de la chaîne PEL doit être un paramètre jouant un rôle prépondérant dans les mécanismes menant à la formation d'un de ces deux types de structures en contrôlant son régime de dilution, la formation d'un gel laissant supposer que le PEL est en régime enchevêtré au sein de cette structure. La structure globulaire est commune à tous les systèmes impliquant des PEL et des boules de charges opposées telles que les micelles [47] [48] ou les nanoparticules inorganiques [49]. Elle a également été observée par des simulations qui ont notamment montré que la compacité des agrégats est d'autant plus forte que les protéines portent une densité surfacique de charge élevée. Sur des échelles supérieures ($> 1000 \text{ \AA}$), le système peut présenter différents aspects, en particulier dans le cas des globules : phases homogènes, précipitation totale ou partielle, coacervation. Quand les échantillons séparent de phase, leur évolution cinétique peut être très lente, voire pratiquement figée dans un état métastable. Le système n'est donc généralement pas à l'équilibre thermodynamique. De manière générale, la précipitation est plutôt observée pour des systèmes fortement chargés et la coacervation pour des systèmes plus faiblement chargés [50]⁴³. Par ailleurs, la coacervation doit être favorisée par la formation de complexes neutres car elle est maximale lorsque les charges apportées par les espèces sont en concentrations stœchiométriques.

I.3 De l'intérêt de choisir la DNPA pour répondre à quelques questions ouvertes

Si l'ensemble des études que je viens de mentionner avaient apporté des éléments de réponses clairs à la problématique de la complexation, en précisant notamment les conditions de complexation et les propriétés thermodynamiques et rhéologique des complexes⁴⁴, il restait cependant un grand nombre de questions en suspens lorsque nous avons commencé à nous intéresser au sujet. Ceci était essentiellement lié au fait que la description structurale des complexes demeurait par contre assez pauvre, celle-ci n'ayant été abordée que par le biais de la diffusion de la lumière⁴⁵. Ce manque de description fine des structures ne permettait pas, d'une part, de les confronter aux structures obtenues par simulations de type Monte-Carlo qui se développaient fortement à l'époque [37][34][32][35][51][52], ni, d'autre part, de répondre aux questions sous-jacentes suivantes : Quelle est la forme, la taille exacte, la composition précise interne et la compacité des complexes globulaires formés ? Ces complexes globulaires sont-ils neutres ou bien chargés ? S'ils sont chargés, les charges sont-elles réparties uniformément au sein des complexes ou uniquement à leur surface ? Et surtout, pourquoi ces complexes ont-ils une taille *finie* ? Les contre-ions sont-ils effectivement relargués lors de la complexation ? Quelle est l'organisation structurale exacte des espèces au sein des gels ? Ces derniers sont-ils homogènes ou hétérogènes ? Quels sont

⁴³ Cette observation a notamment été faite par de Kruijff *et al* dans une excellente revue sur la coacervation de systèmes protéines/polysaccharides dans laquelle les auteurs comparent les résultats observés sur plus de 25 systèmes proches et susceptibles de transiter de phase par un mécanisme de coacervation. Ils donnent d'ailleurs le postulat suivant : "if one of the polyions is a strong polyelectrolyte a precipitate is formed rather than a liquid coacervate phase » [50].

⁴⁴ Ces conclusions ont été obtenues par des techniques d'investigation expérimentales variées. La complexation a historiquement été sondée par des mesures turbidimétriques quantitatives, un échantillon présentant une turbidité non nulle dès la formation de complexes diffusant la lumière. Les propriétés thermodynamiques ont été étudiées par des techniques calorimétriques, DSC et plus récemment ITC, et les propriétés rhéologiques par des mesures de viscoélasticité. La taille des complexes a été étudiée par diffusion statique ou dynamique de la lumière. Des mesures spectroscopiques (infra-rouge ou dichroïsme) ont permis de sonder la conformation des protéines. Plus récemment, des mesures de FRAP et de RMN [134] ont permis de déterminer la dynamique individuelle des composants dans les complexes.

⁴⁵ Les solutions de complexes étant généralement très turbides à haute concentration, la diffusion de lumière n'est applicable qu'en régime dilué et n'est pas adaptée à l'étude des gels. La diffusion statique ne permet évidemment pas de distinguer les espèces au sein des complexes et sondent des échelles généralement supérieures à celles des complexes, ne donnant au mieux qu'une mesure de leur rayon de giration. La diffusion dynamique de la lumière nécessite, elle, de travailler de façon très précautionneuse avec une analyse sur plusieurs angles pour une étude de dynamique propre. Il y a en effet généralement plusieurs temps caractéristiques dans le système, qui ne sont pas nécessairement tous diffusifs, associés à la dynamique des complexes et/ou à celle des composants individuels non complexés, ainsi qu'à des modes lents de réorganisation interne.

les mécanismes menant à la formation d'un gel ou de complexes globulaires ? Les complexes ont-ils des structures différentes selon que suspensions précipitent ou qu'elles coacervent ?

Ce sont à toutes ces questions que nous avons cherché à répondre en utilisant la DNPA pour tenter de proposer une description inégalée des complexes. Outre qu'elle est non invasive et non destructive pour des objets fragiles comme les protéines⁴⁶, la DNPA est en effet vraiment une technique de choix puisqu'elle permet une étude structurale fine des complexes sur un échantillonnage statistique représentatif aux trois échelles pertinentes du système : (i) aux échelles locales ($\sim 10 \text{ \AA} - \sim 100 \text{ \AA}$), plus petites que celles des complexes mais de l'ordre de celles des composants individuels, afin de sonder leur structure interne; (ii) aux échelles de l'ordre de taille des complexes ($\sim 100 \text{ \AA} - \sim 1000 \text{ \AA}$), ce qui permet de déterminer avec précision leurs caractéristiques morphologiques (forme, taille caractéristique, polydispersité éventuelle); et enfin (iii) aux échelles supérieures ($\sim 1000 \text{ \AA} - \sim 10000 \text{ \AA}$), ce qui permet de remonter aux interactions entre complexes en solution.

I.4 De l'intérêt de choisir le système PSS/lysozyme comme système modèle

Notre stratégie expérimentale était donc la suivante : tenter de déterminer les mécanismes de complexation entre protéines et PEL de charges opposées à partir d'une description structurale extrêmement fine des structures formées, en faisant varier de façon exhaustive tous les paramètres physico-chimiques influant sur les interactions dans le système indépendamment les uns des autres. Nous avons ainsi choisi de nous concentrer sur un seul système expérimental modèle plutôt que d'étudier l'influence de tel ou tel paramètre sur plusieurs systèmes protéines/PEL⁴⁷. Il était donc crucial de choisir ce système de telle sorte qu'il permette à la fois de *découpler tous les paramètres physicochimiques qui jouent sur les interactions*, et *d'utiliser la variation de contraste en DNPA de façon extensive* pour résoudre, dans une situation physicochimique donnée, toutes les structures d'intérêt, à savoir : (i) l'organisation des protéines dans les complexes; (ii) l'organisation des chaînes PEL dans les complexes; (iii) le facteur de forme des protéines pour déterminer si elles gardent leur conformation native ou si elles se déplient en présence des PEL; (iv) la conformation moyenne adoptée par les chaînes PEL au sein des complexes; (v) la localisation des contre-ions.

Les trois premières de ces informations structurales peuvent être obtenues par DNPA de façon relativement simple en utilisant la variation de contraste « classique », c'est-à-dire en éteignant soit le signal de la protéine, soit le signal du PEL, dans des mélanges H₂O/D₂O de densité de longueur de diffusion $\rho_{\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}}$ adaptés, la seule condition requise pour le succès de l'expérience étant que la densité de longueur de diffusion de la protéine ρ_{prot} soit suffisamment différente de celle du PEL ρ_{PEL} (figure P.4)⁴⁸. Les deux dernières informations nécessitent par contre d'éteindre *simultanément* le signal des chaînes de protéines et le signal des chaînes de PEL, afin d'accéder au signal d'un troisième type d'espèces diffusantes. Cette dernière espèce peut correspondre soit à un troisième type d'espèces chimiques, par exemple des ions, soit à des chaînes du même PEL marquées

⁴⁶ Ce qui n'est le cas de la diffusion de rayonnement de rayons X aux petits angles (DPAX). Nous avons d'ailleurs essayé de faire de la diffusion anormale de rayons X sur des complexes protéiques à l'ESRF, une technique qui est le pendant de la variation de contraste pour les rayons X basée sur la sélectivité de l'absorption du rayonnement d'un élément chimique en fonction de la longueur d'onde. Les expériences nécessitant des temps de pose importants, nous avons littéralement *brûlé* nos protéines.

⁴⁷ Il aurait évidemment été plaisant de donner un caractère universel à l'étude en faisant une étude exhaustive sur plusieurs systèmes mais il aurait fallu user quelques thésards et consommer pas mal de neutrons...

⁴⁸ Les protéines globulaires étant des objets centro-symétriques, le signal obtenu sur les mélanges lorsque les chaînes PEL sont éteintes peut s'écrire sous la forme $I_{\text{prot}}(q) = \Phi_{\text{prot}} \Delta \rho^2 P_{\text{prot}}(q) S_{\text{prot}}(q)$. Une mesure aux très grands vecteurs de diffusion, pour lequel le facteur de structure est ~ 1 , donne donc directement accès au facteur de forme des protéines. Il est alors possible de déterminer si ce facteur de forme décroît en q^{-4} , signature d'un facteur de forme d'objet globulaire, signifiant que la structure native est préservée, ou s'il décroît avec une pente d'exposant plus faible, signature d'un dépliement partiel ou total.

différemment du point de vue du contraste neutronique, ce qui permet de déterminer ainsi le facteur de forme par la méthode d'extrapolation à concentration nulle explicitée dans le prologue de ce manuscrit (figure P.5). Il faut donc pouvoir moduler la densité de longueur de diffusion du PEL, via la deutériation totale ou partielle des chaînes, de telle sorte qu'elle puisse être ajustée à celle de la protéine et qu'elle puisse prendre deux valeurs significativement différentes pour la mesure de conformation. C'est ce qui nous a poussé à choisir le **PolyStyrèneSulfonate (PSS)** comme PEL car, dans sa version hydrogénée, son contraste peut être annulé dans un mélange 43%D₂O/57%H₂O qui est le mélange annulant le contraste des protéines globulaires [53]⁴⁹ (figure 1.1). En ce qui concerne la protéine, nous avons choisi le **lysozyme**, la « protéine du physicien », car il est possible de se la procurer avec une pureté élevée à coût modéré. Ceci était un prérequis indispensable à la réalisation d'une étude exhaustive de la complexation car l'établissement des diagrammes d'état et la menée des expériences de DNPA consomment de grandes quantités d'objets⁵⁰.

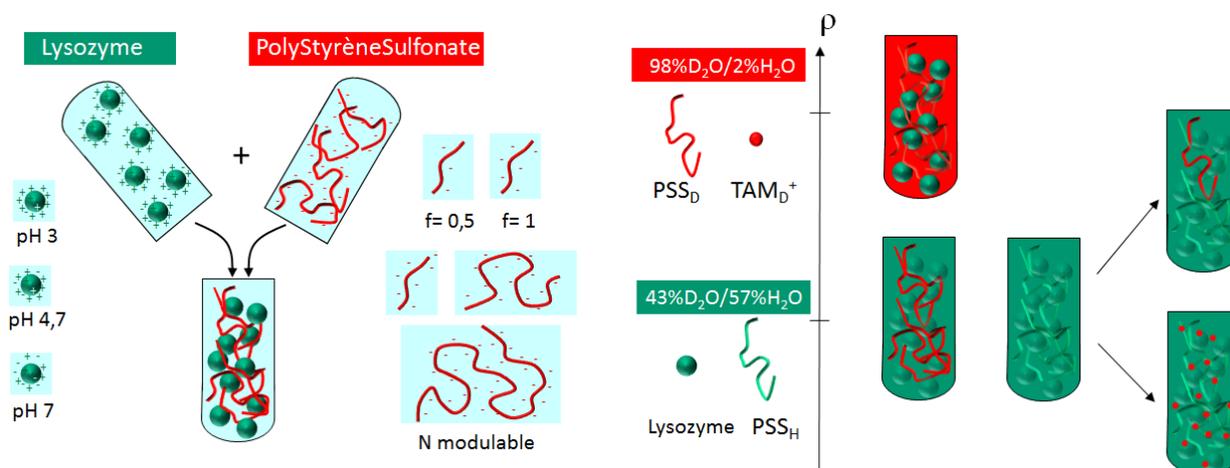


Figure 1.1 : Système modèle Lysozyme/PolyStyrèneSulfonate. Représentation des paramètres physicochimiques pouvant être modulés sur un des composants sans changer les propriétés du second (gauche); Echelle des densités de longueur de diffusion des composants utilisés dans ce chapitre et représentation des contrastes selon que le solvant aqueux est un mélange 43%D₂O/57%H₂O, schématiquement représenté en vert, ou 98%D₂O/2%H₂O, schématiquement représenté en rouge (droite).

Ce système PSS/Lysozyme présentait également l'avantage de pouvoir moduler facilement tous les paramètres susceptibles de jouer sur les interactions de façon indépendante, en particulier la densité de charge des deux objets (figure 1.1.a). Le lysozyme est en effet une petite protéine globulaire positivement chargée dont le point isoélectrique est très élevé, ce qui permet de moduler la valeur de sa charge nette sur une large gamme en jouant sur le pH⁵¹. Le PSS, quant à lui, est un

⁴⁹ Les protéines globulaires solubles ont en effet pratiquement toutes la même densité de longueur de diffusion puisqu'elles ont pratiquement la même composition chimique moyenne. Cette densité de longueur de diffusion dépend par ailleurs fortement de la fraction d'eau lourde présente dans la solution du fait des nombreux hydrogènes labiles présents sur les acides aminés.

⁵⁰ Si on veut explorer convenablement l'espace des phases, il faut en effet établir les diagrammes d'état en fonction de tous les paramètres physicochimiques d'intérêt. La DNPA, quant à elle, nécessite de travailler sur des volumes minimums de quelques centaines de µl (on utilise en effet des collimations larges permettant d'éclairer des échantillons de surface importante pour compenser la faiblesse des flux de neutrons) et à des concentrations relativement élevées (même en dégradant la résolution, il est difficile d'obtenir un signal propre d'une solution de protéine de concentration inférieure au g/L...). En choisissant le lysozyme et le PSS, qui est lui aussi extrêmement accessible puisque issu du polystyrène (PS), nous avons ainsi évité les inconvénients d'études préliminaires fastidieuses telles que la purification de protéines ou la synthèse de polymères.

⁵¹ Le lysozyme de blanc d'œuf de poulet possède une structure simple et bien documentée qui en fait un outil de choix pour les études physicochimiques sur les protéines. C'est une petite protéine globulaire de masse moléculaire M_w de 14298 g/mol et d'environ 17 Å de rayon de giration. Sa forme est un ellipsoïde dont les dimensions cristallographiques sont de 30×30×45 Å composés de deux lobes. Jérémie la qualifiait d'ailleurs de « pac-man » pendant sa thèse. Elle porte 28 groupes ionisables, qui peuvent s'ioniser en 18 charges positives à bas pH et en 10 charges négatives à haut pH. Elle a de ce fait un point isoélectrique élevé (pH 10,7) et est positivement chargé pour des pH inférieurs. De ce fait, elle ne forme ni oligomères ni agrégats à bas pH [135]. La distribution de ses résidus ionisables à la surface de la protéine est relativement homogène

polyelectrolyte fort négativement chargé dont la densité linéique de charge ne dépend pas du pH, mais peut être fixée lors de la synthèse par le contrôle du taux de sulfonation f . Ce taux f permet également de moduler son hydrophobicité. Il possède par ailleurs un squelette très flexible, sa longueur de persistance en solution dépend donc essentiellement de sa composante électrostatique et peut être ainsi variée par la force ionique⁵².

1.5 Préparation des échantillons et diagramme d'état du système

Les échantillons ont toujours été préparés selon le même protocole⁵³ : dans un premier temps, le lysozyme et les chaînes de PSS étaient dissouts dans un tampon fixant le pH et la force ionique choisis pour l'étude en deux solutions mères séparées⁵⁴, puis deux volumes équivalents de ces solutions mères étaient mélangés et homogénéisés par une agitation légère⁵⁵. Nous avons fait varier les paramètres-physicochimiques sur une très large gamme en étudiant 4 pHs différents (3, 4,7, 7 et 10), 4 forces ioniques de tampon (50 mM, 100mM, 200mM et 500mM), 5 masses moléculaires de chaînes PSS allant de chaînes très courtes à des chaînes longues (N=50, N=100, N=330, N=630 et N=800) et deux taux de sulfonation f de chaînes ($f = 0,5$ et $f = 1$). Enfin, nous avons fait varier les concentrations des espèces de 10 g/L à 40 g/L pour le lysozyme et de 0,03 mol/L (~6 g/L) à 0,3 mol/L (~60 g/L) pour les chaînes de PSS, ces concentrations relativement élevées permettant d'obtenir de bons signaux lors des expériences de DNPA.

[136]. Sa charge nette est de +17 à pH 3, +11 à pH 4.7 et de +8 à pH 7 et il n'y a pratiquement aucun résidu négatif dissocié à pH 3 alors qu'il y en a beaucoup à pH 7 : elle possède donc une surface homogène sans patches à bas pH et une surface hétérogène avec des patches de charges opposées à pH intermédiaire

⁵² Le PSS est également un excellent système expérimental pour qui cherche à travailler sur les polyelectrolytes et a d'ailleurs souvent été considéré comme un système modèle pour des études pionnières dans le domaine des polyelectrolytes en solution [67]. Il est obtenu à partir d'une modification chimique simple et très facile à mettre en œuvre du polystyrène, un des polymères les plus courants dont la polymérisation est parfaitement maîtrisée. Il peut donc être obtenu avec une polydispersité extrêmement faible jusqu'à des M_w/M_n de ~1,01, en version hydrogénée ou deutériée avec des masses variant de quelques dizaines d'unités de répétition jusqu'à quelques milliers d'unités de répétition. Son squelette est très flexible avec une longueur de persistance intrinsèque L_0 de 12 Å. Sa longueur de persistance $l_p = L_0 + l_{elec}$ [133] sera ainsi essentiellement fixée par sa partie électrostatique et pourra donc être contrôlée par la force ionique. C'est un polyelectrolyte fort négativement chargé, avec une densité linéique de charge important car chaque unité de répétition sulfonée porte une charge négative. Il est insensible au pH puisqu'étant le sel d'un acide fort. Le taux de sulfonation, f , peut être facilement modulé durant l'étape de sulfonation des chaînes de polystyrène de 0.4 à 1. En deçà de cette valeur de 0.4, les chaînes de PSS ne sont plus solubles en solution aqueuse. Ceci permet de changer à la fois la densité linéique de charge des chaînes de PSS ainsi que son hydrophobicité car les chaînes partiellement sulfonées présentent un comportement hydrophobe partiel [137]. Il n'est par contre pas clairement établi qu'il possède un caractère hydrophobe pour $f=1$. La distance entre segments est de 2,05 Å, très inférieure à la longueur de Bjerrum (7,3 Å à température ambiante). Il y a donc toujours un nombre de contre-ions condensés important sur les chaînes du fait de la condensation de Manning.

⁵³ Nous avons uniquement varié ce protocole pour certaines expériences spécifiques qui avaient pour but de tester si les structures formées sont susceptibles de se réorganiser si l'on modifie un paramètre physicochimique *in situ* [14][64], et qui ne seront pas présentées dans ce manuscrit. Les échantillons étaient alors préparés en deux étapes distinctes : des échantillons de complexes étaient préparés dans un premier temps selon le protocole décrit en corps de texte principal, laissés deux jours au repos, puis on leur ajoutait une solution contenant un paramètre que nous voulions modifier *a posteriori* (force ionique, chaînes de PSS, ou simplement le tampon pour tester les effets de dilution).

⁵⁴ Ces solutions mères ont été préparées selon le « matériel et méthodes » suivant : (i) Nous nous sommes procuré le lysozyme chez *Sigma* et l'avons utilisé sans purification ultérieure. (ii) Toutes les chaînes de PSS ont été préparées par nos soins par post-sulfonation de chaînes de polystyrène de très faible polydispersité ($M_w/M_n \sim 1.03$, provenant de *Polymer Standard Service*) en suivant la méthode de Makowski, en version soit hydrogénée, soit deutériée. Dans le cas du $f = 0,5$, la distribution des deux types d'unités styrène et styrène sulfonate est statistique. Nous avons vérifié la valeur du taux de sulfonation des chaînes ($f = 0,5$ ou $f = 1$) par des mesures de position du pic polyelectrolyte en DNPA [61]. Les contre-ions des chaînes étaient des ions Na^+ , sauf lors d'expériences spécifiques visant à mesurer la distribution des contre-ions dans les complexes pour lesquelles nous avons remplacé ces ions sodium par des ions deutérés tetramethylammonium $(CD_3)_4N^+$. (iii) Nous avons utilisé 4 types de tampons différents pour fixer le pH à des concentrations de $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$: $CH_2ClCOOH/CH_2ClCOO^-$ à pH 3; CH_3COOH/CH_3COO^- à pH 4,7; $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ à pH 7; $OHCH_2CH_2NH_2^-/OHCH_2CH_2NH_3$ à pH 10. Lorsque nous avons travaillé à des forces ioniques supérieures à $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, nous avons simplement ajouté du NaCl pour augmenter la force ionique jusqu'à la valeur désirée.

⁵⁵ Une agitation trop brusque aurait pu mener au dépliement des protéines. Nous ne voulions pas battre les blancs d'œuf en neige...

Quelles que soient les conditions expérimentales choisies, une solution fortement turbide est obtenue dès que les deux composants sont mélangés, ce qui indique que des objets ayant une taille suffisamment importante pour diffuser la lumière sont formés dès les premiers instants. Selon les conditions utilisées, l'aspect des échantillons change ensuite progressivement avec le temps. Le temps caractéristique de cette évolution varie de quelques minutes à quelques dizaines de jours, et est essentiellement modulé par le rapport de concentration entre espèces [PSSNa]/[Lysozyme], noté r par la suite. A bas r , *id est* à fortes concentrations en protéines, les échantillons restent turbides pendant plusieurs semaines. Pour des r intermédiaires, le comportement est différent : le système démixe entre un surnageant clair et une phase blanche composés d'agrégats macroscopiques qui sédimentent au fond des piluliers. Cette phase turbide s'éclaircit progressivement avec le temps pour devenir complètement limpide après un temps écoulé variant de deux heures à trois semaines. Enfin, pour des rapports r élevés, *id est* de fortes concentrations en chaînes PSS, les échantillons s'éclaircissent extrêmement rapidement, sans passer par l'étape de coexistence de phases. Il est alors possible de définir une frontière entre états turbides et états limpides dans les diagrammes d'état⁵⁶ (diagrammes que l'on peut retrouver dans les publications [54] et [14]). Il apparaît que cette frontière dépend fortement du pH [14], et donc des interactions électrostatiques puisque le pH ne module que la densité surfacique de charge des protéines dans notre système. Si l'on retrace ces diagrammes d'état en fonction *du taux de charge introduit en solution* $[-]/[+]_{intro}$ qui est la variable la plus pertinente pour quantifier les effets liés à l'électrostatique⁵⁷, ils *se fondent alors sur un seul diagramme d'état maître, ce qui démontre que les interactions électrostatiques jouent un rôle clef dans le système*. La frontière est alors située à une valeur de $[-]/[+]_{intro}$ d' ~ 5 , indépendamment de la longueur des chaînes utilisées.

Si l'on se focalise sur la partie du diagramme d'état pour lequel les suspensions sont turbides, il apparaît deux comportements distincts d'un point de vue rhéologique selon la concentration en chaînes PSS et la longueur de ces chaînes. *A basse concentration, les suspensions sont liquides alors qu'elles forment un gel à haute concentration*. Ce gel forme une phase homogène turbide sur l'ensemble du volume de l'échantillon, sans séparation de phases, et qui ne coule pas lorsque l'on retourne l'échantillon (figure 1.2). La transition entre ces régimes « liquide » et « gel » est pratiquement indépendante de la concentration en protéines, mais dépend par contre fortement de la longueur de la chaîne PSS : elle est décalée vers les faibles concentrations en PSS lorsque la longueur de chaîne augmente⁵⁸. Il est finalement intéressant de noter que nous n'avons jamais observé sur ce système de transition liquide – liquide, caractéristique de séparation de phase de type coacervation complexe, et ce quelles que soient les conditions physicochimiques testées.

1.6 Détermination qualitative des trois types de structures grâce à la variation de contraste « classique »

Nous déterminons dans cette partie les trois types de structures formées dans le système grâce à la variation de contraste en nous basant sur une description qualitative des spectres de

⁵⁶ Le système restant hors d'équilibre, nous préférons décrire les diagrammes comme des *diagrammes d'état* plutôt que comme des *diagrammes de phase*. Nous avons choisi de tracer ces diagrammes d'état trois semaines après la réalisation du mélange, car nous n'avons plus observé d'évolution macroscopique sur des échelles de temps plus longues (sous réserve de prendre quelques précautions pour le stockage des échantillons, pour éviter notamment la contamination bactérienne).

⁵⁷ Ce taux de charge introduit en solution $[-]/[+]_{intro}$ correspond au rapport de la concentration en charges négatives apportée par les chaînes PSS sur la concentration en charges positives apportées par les lysozymes. Il est calculé à partir de la charge nette portée par la protéine.

⁵⁸ Ceci suggère que la cette transition peut être liée à l'état de dilution des chaînes, puisque la concentration de recouvrement des chaînes c^* diminue à mesure de l'augmentation de la masse de ces dernières.

diffusion [54]⁵⁹. Toutes les mesures ont été effectuées avec des chaînes de PSS deutérées et nous avons systématiquement fait deux mesures pour chaque échantillon, l'une dans un mélange 43%D₂O/57%H₂O réalisant l'extinction protéines et l'autre dans un mélange 98%D₂O/2%H₂O réalisant l'extinction des chaînes de PSS⁶⁰. Les paramètres physicochimiques ont été choisis de sorte que les échantillons étudiés soient représentatifs des trois régions des diagrammes d'état⁶¹.

Le gel turbide : un réseau homogène de chaînes de PSS réticulées par les protéines

Nous commençons par l'étude de la structure des gels turbides qui est celle pour laquelle les deux composants du mélange gardent au sein de ce mélange une structure très proche de celle qu'ils avaient en solution individuelle. La figure 1.2 compare les spectres respectifs des objets dans le mélange avec le facteur de forme de la protéine d'une part, et le signal d'une solution de chaînes de PSS de même concentration d'autre part.

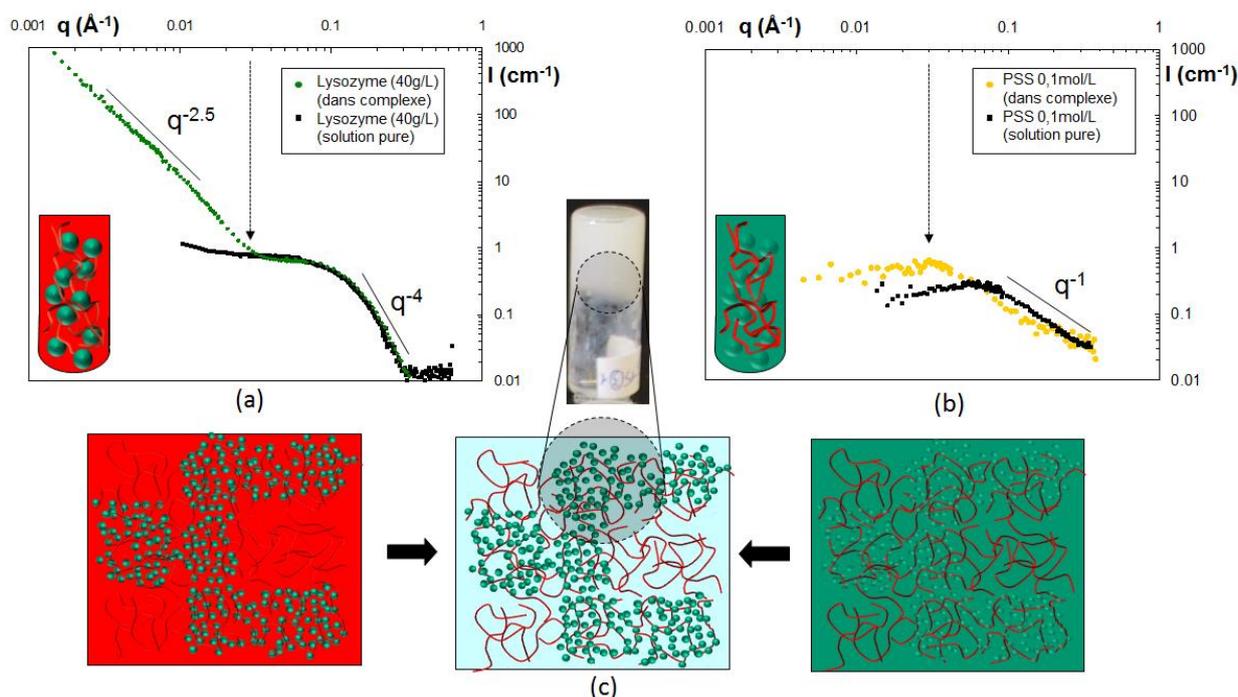


Figure 1.2 : Structure de gel turbide ($C_{\text{lyso}} = 40 \text{ g/L}$, $C_{\text{PSS}} = 0,1 \text{ mol/L}$, $N = 660$, $\text{pH} = 4,7$, $I = 50\text{mM}$). (a) Spectre DNPA du système dans un mélange 98%D₂O/2%H₂O, comparé au facteur de forme du lysozyme pur mesuré sur une solution diluée à 10 g/L (haut) et représentation schématique de l'organisation des protéines dans les complexes (bas); (b) Spectre DNPA du système dans un mélange 43%D₂O/57%H₂O, comparé au spectre d'une solution pure à 0,1 mol/L (haut) et représentation schématique de l'organisation des chaînes dans les complexes (bas); (c) photographie de l'échantillon macroscopique (haut) et représentation schématique de la structure du système couplant les mesures dans les deux contrastes (bas).

Le spectre de diffusion du PSS seul présente les caractéristiques classiques d'un polyelectrolyte en solution (figure 1.2.b)⁶². Les chaînes, rigidifiées localement par les fortes répulsions entre charges

⁵⁹ Cette étude a été présentée dans la référence [54], la première que nous ayons publiée sur le sujet et qui est à ce jour notre référence la plus citée dans le domaine.

⁶⁰ Nous avons vérifié que les diagrammes d'état ne sont modifiés ni par le fait que l'on réalise les mélanges dans de l'eau lourde ou de l'eau légère, ni par le fait que les chaînes de PSS soient hydrogénées ou deutérées. Ceci provient du fait que les interactions dominantes dans le système sont les interactions électrostatiques, insensibles à la deutériation, et non les liaisons hydrogène qui sont au contraire influencées par la deutériation.

⁶¹ Les densités de charges des objets et la force ionique sont les mêmes dans les trois cas ($I = 50\text{mM}$, $\text{pH} = 4,7$ et $f = 1$). Pour les échantillons turbides, nous avons utilisé des concentrations similaires pour les gels et les liquides ($C_{\text{lyso}} = 40 \text{ g/L}$, $C_{\text{PSS}} = 0,1 \text{ mol/L}$), avec des chaînes longues dans le cas du gel ($N = 660$) et des chaînes courtes pour le liquide ($N = 40$). Pour les échantillons limpides, nous avons utilisé des échantillons beaucoup plus concentrés en chaînes ($C_{\text{lyso}} = 20 \text{ g/L}$, $C_{\text{PSS}} = 0,3 \text{ mol/L}$) avec des chaînes de longueur intermédiaire ($N = 100$). Dans ce régime « limpide », nous avons vérifié que la longueur de chaîne n'influe pas sur la structure finale.

⁶² A grands q , la diffusion est en q^{-1} , caractéristique d'un facteur de forme de type bâton. Ceci est lié au fait que les fortes répulsions entre les charges le long du squelette de la chaîne rigidifie fortement cette dernière. Lorsque le taux de charge est

adjacentes le long du squelette, forment un réseau transitoire homogène sans fluctuations de densité à grande échelle car elles se repoussent fortement. Au sein du mélange, ce spectre présente les mêmes caractéristiques générales qu'avant mélange, la structure des chaînes n'est donc pas fortement altérée par la présence des protéines. Le seul changement notable concerne la position du pic polyelectrolyte q^* qui a été fortement décalé vers les faibles valeurs de q (de $0,05 \text{ \AA}^{-1}$ à $0,03 \text{ \AA}^{-1}$). La taille moyenne de la maille du réseau ξ a donc augmenté de près d'un facteur 2 ! Cette forte augmentation de la maille implique une forte contraction des chaînes aux échelles locales, du fait de la conservation de la matière. Cette contraction indique que les protéines se sont collées aux chaînes. La longueur de persistance des chaînes a donc diminué en moyenne, même si une partie des segments des chaînes PSS doit rester en conformation étirée car la diffusion reste en q^{-1} à grands q . Ce sont donc les répulsions entre ces parties de chaînes non complexées qui maintiennent le réseau et évitent son effondrement. Le spectre des protéines au sein du mélange se superpose quant à lui parfaitement avec le facteur de forme des protéines⁶³ pour des $q > 0,03 \text{ \AA}^{-1}$ ($\sim 200 \text{ \AA}$ dans l'espace direct). Il n'y a donc aucune organisation spatiale particulière des protéines aux échelles locales. Aux petites valeurs de q , l'intensité varie très fortement avec une décroissance en loi de puissance en $q^{-2,5}$. Les protéines sont donc organisées de façon fractale aux petites échelles avec un exposant D^f de 2.5. Ce sont ces très fortes fluctuations de concentration de protéines au sein du gel qui diffusent la lumière et lui donnent son aspect turbide. Le changement de régime de diffusion intervient, de façon remarquable, *exactement* à la position du pic polyelectrolyte q^* du réseau de chaînes. Le fait que ces hétérogénéités de concentrations n'apparaissent qu'à une échelle supérieure à la taille du réseau signifie que le nombre de protéines dans une maille est très variable d'une maille à l'autre. On peut alors prendre une description manichéenne et représenter le gel avec deux types de mailles, l'un avec une distribution dense de protéines et l'autre sans protéines, comme sur la figure 1.2.c. Ce sont donc ces parties denses qui réticulent tout le réseau de chaînes PSS et permettent la formation d'un gel.

Cette première étude révèle toute la puissance de la technique de la variation de contraste. Elle permet en effet de montrer que l'extinction d'un composant au sein du mélange peut être réalisée de façon très propre, ce qui est un prérequis nécessaires à la conception d'expériences utilisant la façon de contraste de façon plus ambitieuse. Sur la figure 1.2, l'intensité du signal des protéines, chaînes éteintes, atteint en effet une valeur près de 1000 fois supérieure à celle du signal des chaînes, protéines éteintes, dans la région des petits q alors que les contrastes sont équivalents par symétrie. Par ailleurs, elle permet de montrer que deux systèmes peuvent coexister au sein d'un mélange avec des distributions très différentes, l'une très homogène et l'autre très hétérogène, toute en partageant des caractéristiques structurales communes.

égal à 0,5 la décroissance est plus forte (de l'ordre de q^{-2}) car les parties hydrophobes peuvent induire la formation de perles, le signal est un mélange de facteurs de forme de bâton (q^{-1}) et de boules (q^{-4}). A petits q , les caractéristiques de l'intensité diffusée (faible valeur, décroissance du signal lorsque l'on va vers les faibles valeurs de q) démontrent que compressibilité osmotique du système est très faible du fait des fortes répulsions électrostatiques entre chaînes. Ces fortes répulsions organisent les chaînes en un réseau transitoire homogène et il apparaît un pic de corrélation fortement marqué aux q intermédiaires, le « pic polyelectrolyte », dont la position q^* est liée à la taille de la maille du réseau transitoire ξ ($q^* = 2\pi/\xi$). En régime semi-dilué, la position de q^* varie avec la concentration c en $c^{1/2}$ et avec le taux de charge f en $f^{2/7}$ [138][139]. En régime dilué, ce taux de charge n'a plus d'influence sur la position du pic qui varie alors en $c^{1/3}$.

⁶³ Le signal de ce facteur de forme a été mesuré sur une solution diluée (10g/L) dans les mêmes conditions physicochimiques que le mélange. Il est pratiquement plat jusque dans le domaine des grands q , où il décroît en q^{-4} , signature de la diffusion par une interface qui démontre que les objets sont globulaires. Il ne présente pas les oscillations caractéristiques du facteur de forme d'une boule, les objets n'étant pas sphériques. Il peut néanmoins être ajusté par un facteur de forme de ce type en introduisant artificiellement une certaine polydispersité sur le rayon des boules, et ce bien que les protéines n'aient pas, par définition, de distribution en taille. La symétrie du système étant sphérique, le signal de diffusion peut s'écrire sous la forme d'un produit de facteur de forme et de facteur de structure. La mesure présentée ayant été effectuée pour des concentrations suffisamment faibles en objets et des teneurs en sel suffisamment fortes pour que les interactions entre objets soient négligeables, le facteur de structure a donc une valeur uniformément égale à 1 sur toute la gamme de q .

Les solutions liquides turbides : des globules de taille finie organisés en amas fractals à grande échelle

La Figure 1.3 présente les spectres de diffusion des deux composants du mélange pour un échantillon liquide turbide formé exactement dans les mêmes conditions physicochimiques que dans le cas du gel turbide précédent, à l'exception de la longueur de la chaînes qui est très courte ici (cf note 61). Une première observation rapide des spectres des deux composants permet de tirer les conclusions suivantes : (i) ils n'ont plus aucun rapport avec ceux des composants mesurés individuellement⁶⁴ et (ii) présentent tous les deux les mêmes caractéristiques structurales. Ceci montre que la complexation a mené à un nouveau type de structure au sein de laquelle les deux types d'objets sont organisés exactement de la même façon.

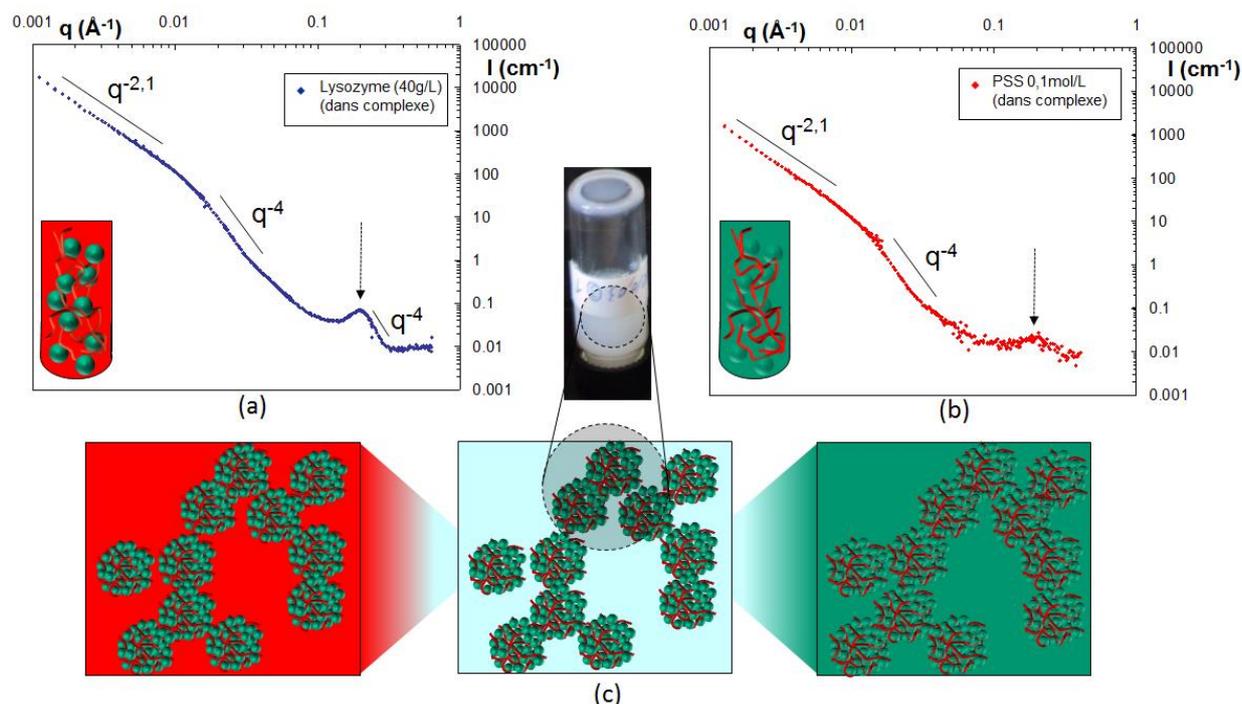


Figure 1.3 : Structure de complexes dans les liquides turbides ($C_{lyso} = 40$ g/L, $C_{PSS} = 0,1$ mol/L, $N = 40$, pH 4.7, $I = 50$ mM). (a) Spectre DNPA du système dans un mélange 98%D₂O/2%H₂O (haut) et représentation schématique de l'organisation des protéines dans les complexes (bas); (b) Spectre DNPA du système dans un mélange 43%D₂O/57%H₂O, et représentation schématique de l'organisation des chaînes dans les complexes (bas); (c) photographie de l'échantillon macroscopique (haut) et représentation schématique de la structure du système couplant les mesures dans les deux contrastes (bas).

Cette structure peut se décrire qualitativement de la façon suivante : il existe aux grands q un pic de corrélation très marqué à $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ correspondant, dans l'espace direct, à la distance de contact entre deux protéines. Les protéines sont donc fortement agrégées les unes avec les autres dans cette structure. Ce pic reste visible dans le contraste dans lequel le signal de ces dernières est éteint. Ceci montre que les chaînes de PSS sont fortement complexées aux protéines. En décorant ces dernières, elles révèlent ainsi une taille caractéristique entre protéines « fantômes ». Aux q intermédiaires, l'intensité décroît en q^{-4} , ce qui correspond à la diffusion de la surface d'un objet dense tridimensionnel que nous appellerons par la suite *complexe primaire*. Protéines et chaînes de PSS forment donc des agrégats denses à cette échelle. Enfin, aux plus petits q , l'intensité décroît en $q^{-2,1}$. Ces complexes primaires sont donc organisés de manière fractale à une échelle supérieure. La dimension fractale observée, 2,1, est caractéristique d'un mode d'agrégation de type agrégation colloïdale limitée par la réaction (RLCA) [55][56]. Le rayon des complexes primaires peut être estimé

⁶⁴ A la seule exception de la partie grands q du spectre des protéines dans le mélange, qui se superpose avec celle du facteur de forme du lysozyme, et montre que les protéines gardent leur conformation native.

grossièrement faite *via* la valeur de vecteur de diffusion pour laquelle se fait le changement entre les deux régimes de décroissance⁶⁵. Il est ici d'une centaine d'angströms, ce qui permet de faire la représentation schématique de la figure 2.3.c Les caractéristiques structurales de ces complexes seront finement détaillées dans la partie suivante.

Les solutions limpides : un réseau homogène de chaînes de PSS décorées de protéines dépliées

La Figure 2.4 présente enfin les spectres de diffusion des deux composants du mélange pour un échantillon limpide formé avec un rapport r plus élevé que dans les précédents (*cf* note 61). Le spectre des chaînes PSS dans le mélange est pratiquement inchangé par rapport à celui des chaînes en concentration hors mélange, si ce n'est un léger décalage du pic polyelectrolyte vers les petits q .

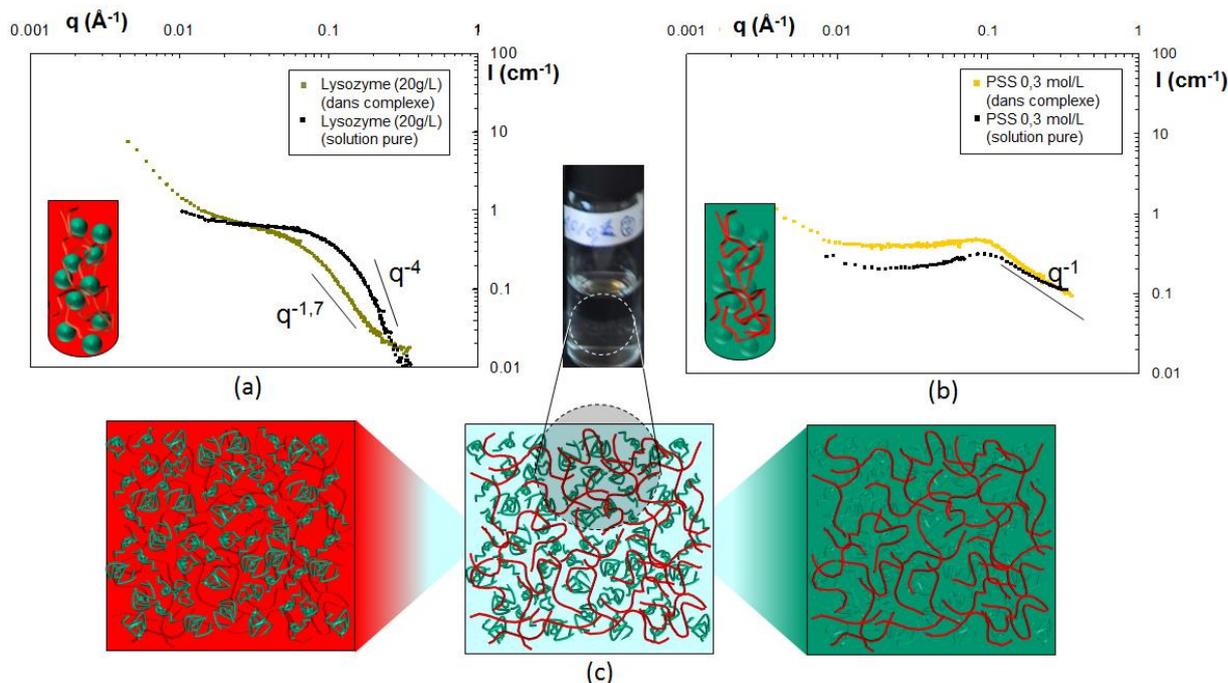


Figure 1.4 : Structure de complexes dans les solutions limpides ($C_{lyso} = 20$ g/L, $C_{PSS} = 0,3$ mol/L, $N = 100$, pH 4.7, $I = 50$ mM). (a) Spectre DNPA du système dans un mélange 98%D₂O/2%H₂O, comparé au facteur de forme du lysozyme pur mesuré sur une solution diluée à 10 g/L (haut) et représentation schématique de l'organisation des protéines dans les complexes (bas); (b) Spectre DNPA du système dans un mélange 43%D₂O/57%H₂O, comparé au spectre d'une solution pure à 0,3 mol/L (haut) et représentation schématique de l'organisation des chaînes dans les complexes (bas); (c) photographie de l'échantillon macroscopique (haut) et représentation schématique de la structure du système couplant les mesures dans les deux contrastes (bas).

Les chaînes PSS forment toujours un réseau transitoire et se sont légèrement contractées aux échelles locales, la taille de maille du réseau ξ ayant augmentée d'un facteur 1,33. Le signal des protéines au sein du mélange diffère par contre radicalement de celui de du facteur de forme des protéines, puisque la diffusion dans le domaine *des grands* q ne décroît plus en q^{-4} mais en $q^{-1.7}$. Cet exposant de diffusion correspond à un nouvel élément diffuseur de type chaîne à volume exclu, qui est la conformation qu'adopte les protéines lorsqu'elles sont complètement dénaturées [57] [58]. Cela signifie donc que les protéines de lysozyme se sont dépliées sous l'action d'une forte concentration de chaînes PSS⁶⁶. Le spectre des protéines présente un plateau à q intermédiaire et une légère remontée à petits q , probablement liée à la présence de d'inhomogénéités à grandes

⁶⁵ Plus précisément, lorsque le spectre est tracé en $I(q^4)$ versus q , il apparaît un pic à un vecteur de diffusion q_{comp} dont la valeur est reliée au rayon du complexe R_{comp} via la relation : $R_{comp}q_{comp} = 4\pi/4,53$. Avec une valeur $q_{comp} \approx 0,03$ Å⁻¹, ce rayon de complexe primaire R_{comp} est de l'ordre de 92 Å [54].

⁶⁶ Nous avons vérifié ce dépliement par spectroscopie infra-rouge en observant le déplacement d'un pic d'absorption de la liaison amide N-H qui passe de 1654 cm⁻¹ pour une conformation en hélice à 1645 cm⁻¹ pour une conformation aléatoire [140].

échelles dans la solution⁶⁷. L'épaulement du plateau se trouve par ailleurs pratiquement exactement à la position du pic polyelectrolyte des chaînes PSS [59]. La structure formée est donc un réseau mixte de deux types de chaînes en solution, les chaînes de PSS d'une part et les protéines dépliées d'autre part, qui interagissent partiellement puisque le réseau des chaînes s'est contracté. Cependant, le fait que les deux objets ne possèdent pas la même structure aux échelles locales (chaîne à volume exclu pour la protéine *versus* bâton pour le PSS) prouve que ces objets ne peuvent se décorer l'un l'autre.

Ce dépliement des protéines induit par les chaînes de PSS, spécifique de ce polyelectrolyte⁶⁸, est probablement lié à la nature chimique hydrophobe du squelette PS des chaînes qui, lorsque les deux types d'objets sont en forte interaction, permet la dénaturation en stabilisant les patchs hydrophobes des protéines. Il est cependant remarquable que les interactions électrostatiques pilotent un processus qui est par nature lié aux interactions hydrophobes. La formation de complexes dans lesquels les chaînes s'enroulent fortement autour des protéines est en effet un prérequis indispensable au dépliement⁶⁹, qui n'intervient que pour $[-]/[+]_{\text{intro}} > 5$.

1.7 Une proposition de description des mécanismes de formation des complexes globulaires

Détermination ultrafine des structures pour $[-]/[+]_{\text{intro}} \sim 1$

Je montre dans cette partie comment une comparaison soignée des intensités absolues obtenues dans les deux conditions de contraste de la partie précédente, *id est* chaînes éteintes ou protéines éteintes, couplée à des modélisations simples du signal, permet une caractérisation ultrafine de la structure globulaire : taille, polydispersité, compacité, présence éventuelle d'une couronne de chaîne de PSS autour des complexe ainsi que l'obtention d'un paramètre extrêmement important, le rapport de charge au sein même du complexe $[-]/[+]_{\text{intra}}$ [60][61]. La littérature ayant montré que la complexation était maximale lorsque le rapport de charge introduit $[-]/[+]_{\text{intro}}$ est de 1, nous avons travaillé sur une gamme de proche de cette valeur (typiquement $0,5 \leq [-]/[+]_{\text{intro}} \leq 3,33$) et avons fait varier le pH, le taux de sulfonation, la force ionique du tampon et la concentration totale d'espèces.

La première étape de la caractérisation consiste à déterminer si toutes les espèces sont effectivement complexées dans les globules décrits plus hauts ou s'il reste des espèces libres en solution. Les courbes de diffusion suggèrent en effet qu'il reste des protéines libres en solution coexistant avec les globules dès que $[-]/[+]_{\text{intro}} < 1$ et des chaînes libres lorsque $[-]/[+]_{\text{intro}} > 2$ ⁷⁰ (figure 2.5). Nous avons vérifié cette hypothèse par spectroscopie UV⁷¹, qui permet un dosage quantitatif de ces espèces en excès et de soustraire leur contribution des spectres de diffusion.

⁶⁷ Les fluctuations au sein de l'échantillon restent cependant modérées puisque les échantillons ne diffusent pas la lumière.

⁶⁸ Nous avons vérifié que le PSS déplie d'autres protéines à température ambiante. Le dépliement du lysozyme peut être induit par d'autres polyelectrolytes, mais à des températures très supérieures [29].

⁶⁹ Afin de vérifier si le dépliement n'était pas uniquement piloté par la nature chimique du PSS et non par le $[-]/[+]_{\text{intro}}$ de l'échantillon, nous l'avons testé en remplaçant le PSS par du toluène sulfonate, le corollaire chimique du PSS en version non polymérisée, et nous n'avons jamais observé de dépliement, et ce quel que soit le $[-]/[+]_{\text{intro}}$. Ce résultat intéressant mériterait d'ailleurs d'être publié...

⁷⁰ Dans le contraste « protéine », les spectres sont tous similaires à petits q mais le trou de corrélation situé juste en dessous de $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ n'est plus visible lorsque $[-]/[+]_{\text{intro}} < 1$. La forme du signal est alors pratiquement similaire au facteur de forme de la protéine. Dans le contraste « PEL », il apparaît une bosse à q intermédiaire pour $[-]/[+]_{\text{intro}} \sim 2$, réminiscente du pic polyelectrolyte, qui n'est pas présente sur les autres spectres.

⁷¹ Nous avons d'abord centrifugé les solutions de complexes à 5000g pour séparer les complexes denses du surnageant contenant les espèces libres. Une mesure d'absorption UV dans la gamme de longueur d'onde 240–320 nm permet alors de doser le lysozyme qui possède des acides aminés absorbant à 275 nm (tyrosine), à 281 et 291 nm (tryptophane) ainsi que le PSSNa, dont le groupement aromatique couplé à la fonction sulfonate absorbe à quatre longueurs d'onde dans la gamme choisie : 255, 261, 267 et 271 nm.

L'analyse des courbes proprement dite se focalise sur la description des complexes primaires. Or, nous avons vu dans la partie précédente qu'il existe dans le spectre de diffusion à q intermédiaire un régime en q^{-4} jusqu'à environ $0,05 \text{ \AA}^{-1}$, caractéristique de la diffusion interfaciale de ces complexes primaires. Pour des q inférieurs, on ne distingue plus les détails à l'intérieur même des complexes, qui sont homogènes à ces échelles d'observation et de contraste moyen ρ_{comp} . Le signal diffusé ne provient alors plus des différences de contraste existant entre ces complexes et le solvant environnant. Nous pouvons alors refaire l'équivalent d'une approximation « petits angles », mais sur des plus petites valeurs de q qu'en DNPA classique, pour décrire le signal de diffusion de la façon suivante :

$$I(q) = \Phi_{comp} \Delta\rho_{comp}^2 V_{comp} P_{comp}(q) S_{comp}(q) \quad (4)$$

où Φ_{comp} est la fraction volumique de complexes, V_{comp} leur volume, P_{comp} leur facteur de forme et S_{comp} leur facteur de structure.

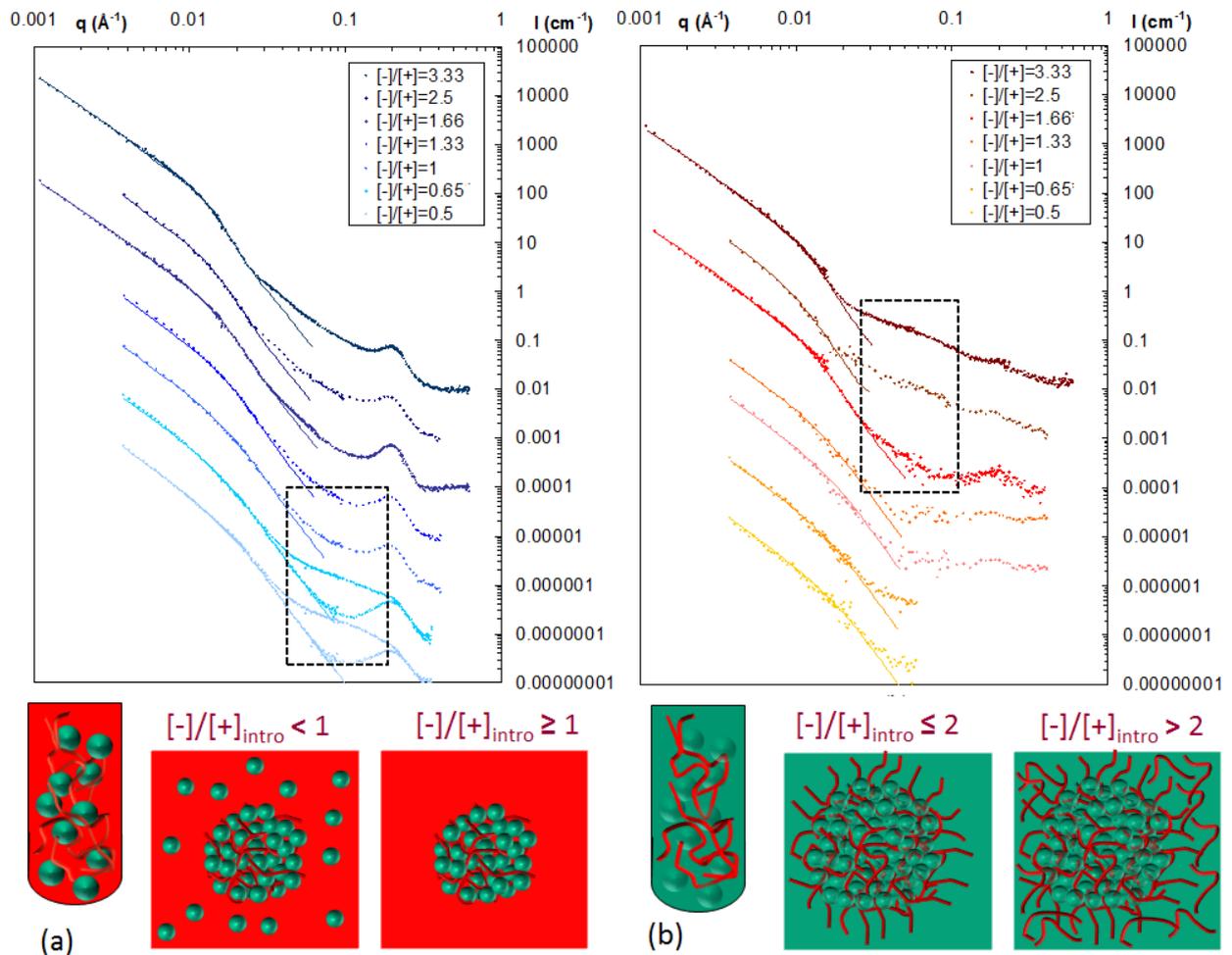


Figure 1.5 : Evolution de la structure des complexes globulaires avec $[-]/[+]_{intro}$ ($C_{lyso} = 40 \text{ g/L}$, C_{PSS} variable, $N = 40$, $\text{pH} = 4.7$, $I = 50 \text{ mM}$) [60][61]. (a) Mesures DNPA dans le mélange 98% D_2O /2% H_2O masquant les chaînes PSS. Les courbes sont successivement décalées d'un facteur 10 de l'une à l'autre par souci de clarté (la courbe à $[-]/[+]_{intro} = 3,33$ est en intensité absolue). Les courbes pour $[-]/[+]_{intro} < 1$ sont présentées avec et sans soustraction des protéines de lysozyme non complexées. Les traits pleins correspondent aux meilleurs ajustements par le modèle décrit dans le texte. Le rectangle pointillé focalise sur la partie de la courbe permettant de déceler la présence de protéines libres, comme représenté sur les schémas sous la figure; (b) Mesures DNPA dans le mélange 43% D_2O /57% H_2O masquant les protéines. Les courbes sont successivement décalées d'un facteur 10 de l'une à l'autre par souci de clarté (la courbe à $[-]/[+]_{intro} = 3,33$ est en intensité absolue). Les traits pleins correspondent aux meilleurs ajustements par le modèle décrit dans le texte. Le rectangle pointillé focalise sur la partie de la courbe permettant de déceler la présence de chaînes libres, comme représenté sur les schémas sous la figure.

Le terme $\Delta\rho_{\text{comp}}^2$ est un point clef de l'analyse. Il peut en effet être réécrit, dans le contraste « lysozyme », en fonction de la fraction volumique en protéines au sein du complexe $\Phi_{\text{intra_lyso}}$: $\Delta\rho_{\text{comp}}^2 = \Phi_{\text{intra_lyso}}^2 \Delta\rho^2$, où $\Delta\rho^2$ est le contraste usuel entre la protéine et le solvant⁷². Symétriquement, dans le contraste « PSS », $\Delta\rho_{\text{comp}}^2 = \Phi_{\text{intra_PSS}}^2 \Delta\rho^2$. La première opération de l'analyse consiste à diviser les intensités obtenues dans les deux contrastes, ce qui permet de déterminer si les deux objets sont effectivement organisés *exactement* de la même façon dans les complexes. Lorsque c'est le cas, $I_{\text{PSS}}(q)/I_{\text{lyso}}(q)$ se réduit à une simple constante de valeur $\Phi_{\text{intra_PSS}}^2/\Phi_{\text{intra_lyso}}^2$. C'est ce que nous avons observé quand $[-]/[+]_{\text{intro}} \leq 1$ (figure 1.6.a). Au contraire, pour $[-]/[+]_{\text{intro}} > 1$, $I_{\text{PSS}}(q)/I_{\text{lyso}}(q)$ *versus* q est une fonction continûment décroissante (figure 1.6.b). Le rayon des complexes est alors plus important du point de vue des chaînes PSS que du point de vue des protéines : les complexes sont décorés d'une couronne de chaînes PSS. Quand $I_{\text{PSS}}(q)/I_{\text{lyso}}(q)$ est constant, l'obtention de $\Phi_{\text{intra_PSS}}^2/\Phi_{\text{intra_lyso}}^2$ permet une détermination directe et précise de $[-]/[+]_{\text{intra}}$. La mesure est très sensible puisque $I_{\text{PSS}}(q)/I_{\text{lyso}}(q)$ est proportionnelle au carré de sa valeur⁷³. Ce rapport est toujours très proche de 1, comme le montre la figure 1.6.a. Le cœur des complexes est donc neutre. La variation de contraste montre encore ici toute sa force puisqu'elle nous a permis d'extraire des informations riches *indépendamment de toute modélisation*.

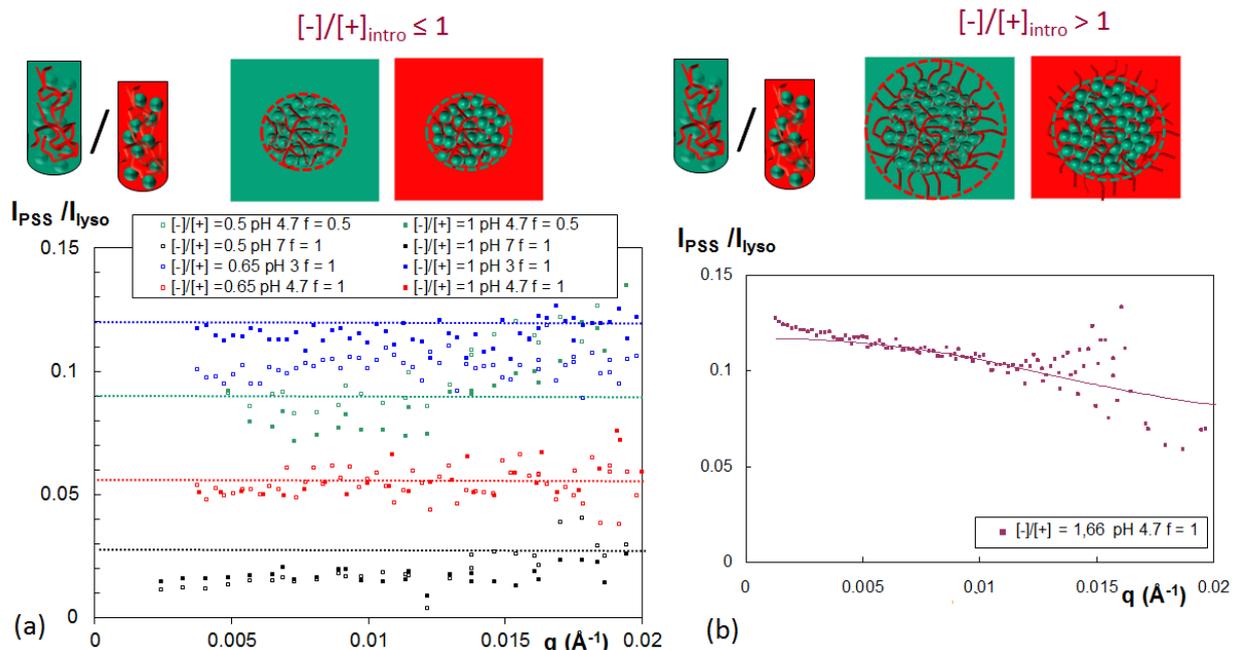


Figure 1.6 : Comparaison directe des intensités à petits q diffusées respectivement par les protéines de lysozyme et par les chaînes PSS dans les contrastes symétriques réalisant l'extinction de l'un ou l'autre des composants ($C_{\text{lyso}} = 40$ g/L, C_{PSS} variable, $N = 40$, $l = 50$ nm) [60][61] : (a) Comportement pour $[-]/[+]_{\text{intro}} \leq 1$: La valeur constante de $I_{\text{PSS}}(q)/I_{\text{lyso}}(q)$, égale à $\Phi_{\text{intra_PSS}}^2/\Phi_{\text{intra_lyso}}^2$, prouve que le rayon des complexes primaires est le même du point de vue des protéines ou de celui des chaînes (cf schéma du haut). Les traits pointillés correspondent aux valeurs calculées de $\Phi_{\text{intra_PSS}}^2/\Phi_{\text{intra_lyso}}^2$ telles que $[-]/[+]_{\text{intra}} = 1$ pour les différentes conditions physicochimiques testées. (b) Exemple de comportement pour $[-]/[+]_{\text{intro}} > 1$: La valeur continûment décroissante de $I_{\text{PSS}}(q)/I_{\text{lyso}}(q)$ prouve que le rayon des complexes primaires est plus élevé du point de vue des chaînes PSS que de celui des protéines ou de celui des chaînes (cf schéma du haut).

Un ajustement des données par l'équation (4) est par contre nécessaire pour aller plus avant dans l'analyse. Pour modéliser le facteur de forme des complexes $P_{\text{comp}}(q)$, nous avons considéré le modèle le plus simple possible, à savoir celui d'un facteur de forme de boules polydisperses en

⁷² Le complexe est formé de lysozyme de fraction volumique interne $\Phi_{\text{intra_lyso}}$ ainsi que de solvant et de polyélectrolyte de même densité de longueur de diffusion et de fraction volumique interne $(1 - \Phi_{\text{intra_lyso}})$. La densité de longueur du complexe s'écrit $\rho_{\text{comp}} = \rho_{\text{lyso}} \Phi_{\text{intra_lyso}} + \rho_{\text{solvant}} (1 - \Phi_{\text{intra_lyso}})$. On obtient donc : $\Delta\rho_{\text{comp}}^2 = (\rho_{\text{comp}} - \rho_{\text{solvant}})^2 = \Phi_{\text{intra_lyso}}^2 (\rho_{\text{lyso}} - \rho_{\text{solvant}})^2 = \Phi_{\text{intra_lyso}}^2 \Delta\rho^2$.

⁷³ Par exemple, du fait de la stœchiométrie de charge dans le complexe, une diminution de la charge nette du lysozyme de +17 (pH 3) à +11 (pH 4,7) divise le rapport $I_{\text{PSS}}(q)/I_{\text{lyso}}(q)$ par $(17/11)^2 = 2,4$.

considérant une distribution lognormale des rayons⁷⁴. Ce modèle permet un excellent ajustement de la courbe de diffusion dans la zone intermédiaire et d'obtenir le rayon des complexes R_{comp} , de l'ordre de 100 Å et la polydispersité σ , de l'ordre de 0,3. A petits q , les complexes primaires étant organisés en amas fractals de dimension 2,1, le facteur de structure $S_{comp}(q)$ peut être modélisé par une simple loi de puissance⁷⁵ [62]. Dans le contraste « lysozyme », Φ_{intra_lyso} peut être obtenu à partir

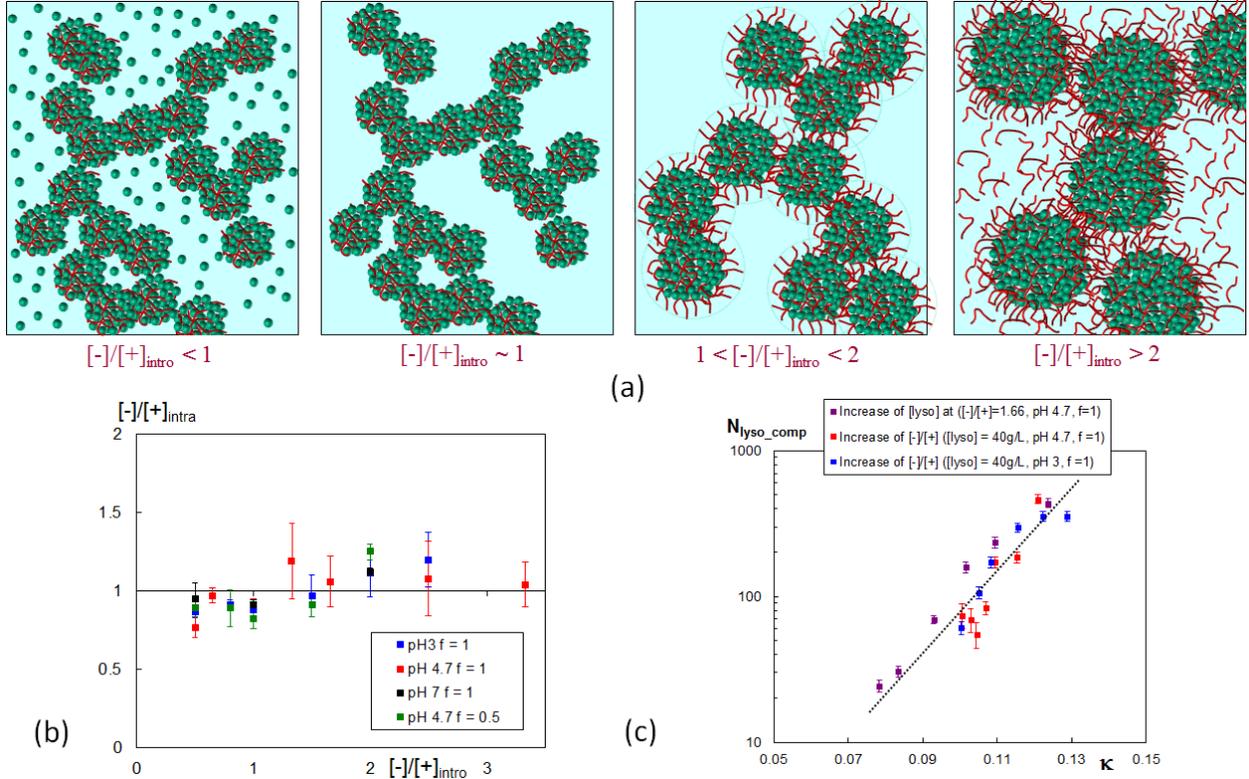


Figure 1.7 : Complexes globulaires dans les solutions liquides turbides : (a) Panorama des différentes structures formées en fonction de $[-]/[+]_{intra}$ [60]; (b) Démonstration de la stœchiométrie de la complexation à partir du récapitulatif de toutes les données de $[-]/[+]_{intra}$ versus $[-]/[+]_{intra}$ obtenues [61]. Les barres d'erreurs sont plus élevées pour $[-]/[+]_{intra} > 1$, lorsque $[-]/[+]_{intra}$ est obtenu à partir des modélisations des intensités dans les deux contrastes, que pour $[-]/[+]_{intra} \leq 1$, lorsque $[-]/[+]_{intra}$ est obtenu par simple lecture de $I_{PSS}(q)/I_{lyso}(q)$; (c) Démonstration du contrôle de la taille finie des complexes par la force ionique à partir du récapitulatif des données de N_{agg_comp} versus κ obtenues dans des conditions physicochimiques variées. κ est calculé en sommant les forces ioniques provenant respectivement du tampon et des contre-ions relargués lors de la complexation (*cf* texte) [61].

des *intensités absolues* des spectres. Φ_{comp} dépend en effet de la fraction volumique de protéines Φ_{comp_lyso} complexées en solution, déterminée à partir de la fraction d'objets complexés par dosage UV et de la quantité introduite dans l'échantillon Φ_{lyso} ⁷⁶, et de Φ_{intra_lyso} puisque $\Phi_{comp} = \Phi_{comp_lyso} / \Phi_{intra_lyso}$. Le terme de préfacteur des intensités $\Phi_{comp} \Delta \rho_{comp}^2$ peut ainsi se récrire sous la

⁷⁴ Le facteur de forme s'écrit alors :

$$V_{comp} P_{comp}(q) = \frac{\int_0^{\infty} 4\pi R^3 \left(3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right)^2 R^3 P(R) dR}{\int_0^{\infty} R^3 P(R) dR} \text{ avec } P(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma R} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} \left(\ln \frac{R}{R_{comp}} \right)^2 \right].$$

Le volume des complexes, tenant compte de la polydispersité est $V_{comp} = \frac{4\pi}{3} R_{comp}^3 \exp \left(-\frac{9}{2} \sigma^2 \right)$. La meilleure représentation des spectres lors de la modélisation est celle de Porod $I(q)q^4 = f(q)$ puisqu'elle fait apparaître un pic dont la position est directement liée au rayon. La forme de ce pic permet de déterminer σ .

⁷⁵ Le facteur de structure s'écrit ainsi : $S(q) = (q_c / q)^{Df}$ pour $q < q_c$; $S(q) = 1$ pour $q > q_c$ où q_c est le vecteur d'onde de diffusion à partir duquel la structure peut être considérée comme fractale. Cette valeur de q_c correspond à deux fois le diamètre des complexes ($q_c = 2\pi / 4R_{comp}$), puisqu'une structure fractale ne peut être définie sur de plus petites tailles.

⁷⁶ Pour travailler de façon propre sur les intensités absolues, il était fondamental de connaître proprement la densité de la protéine en solution pour faire le lien entre Φ_{lyso} et la concentration introduite C en g/cm^3 . Nous avons mesuré ainsi le volume du lysozyme à partir de la mesure de son facteur de forme à 10 g/L qui donne une valeur $I(0)$ de $0,15 \text{ cm}^{-1}$. Sachant que $\Delta \rho^2$ vaut $1,49 \cdot 10^{21} \text{ cm}^{-4}$ dans D_2O et que la masse molaire est de 14300 g/mol, il vient $V_{lyso} = 1,5 \cdot 10^{-20} \text{ cm}^3$, soit 15000 \AA^3 . Ceci donne $\Phi_{lyso} = 0,63C$.

forme $\Phi_{\text{comp_lyso}} \Phi_{\text{intra_lyso}} \Delta\rho^2$. La modélisation du contraste « PSS » n'est nécessaire que pour $[-]/[+]_{\text{intro}} > 1$. On obtient alors l'épaisseur de la couronne⁷⁷, de l'ordre de 20 à 30 Å, $\Phi_{\text{PSS_lyso}}$ et ainsi $[-]/[+]_{\text{intra}}$. La détermination conjointe de $\Phi_{\text{intra_lyso}}$ et de $\Phi_{\text{PSS_lyso}}$ donne accès à la compacité des complexes. Ces complexes sont très denses car ils contiennent toujours entre 25% et 40% de matière.

Au final, cette analyse permet de démontrer que la complexation est stœchiométrique, et que cette stœchiométrie pilote la structure finale des globules primaires. Les espèces introduites en excès du point de vue des charges restent en solution hors des globules. Dans le cas des chaînes PSS, cet excès se localise préférentiellement dans des couronnes décorant les complexes, les chaînes libres en solution n'apparaissant que pour des $[-]/[+]_{\text{intro}} \geq 2$ (figure 1.7.a). Il y a toujours pratiquement électroneutralité au sein des complexes, et ce quelles que soient les densités de charges des objets, comme le montre le tracé récapitulatif de $[-]/[+]_{\text{intra}}$ versus $[-]/[+]_{\text{intro}}$ de la figure 1.7.b⁷⁸. Les complexes possèdent cependant toujours un léger excès de charge, positif pour $[-]/[+]_{\text{intro}} < 1$ et négatif pour $[-]/[+]_{\text{intro}} > 1$, qui suggèrent que leur cœur est complètement neutre mais que leur surface reste chargée. Nous avons vérifié cette hypothèse par des mesures de potentiel ζ ⁷⁹.

Sur l'origine de la taille finie des complexes

La démonstration de la stœchiométrie de la complexation ne permet pas de répondre à la question centrale de l'origine de la *taille finie* des complexes puisque elle devrait mener *a priori* à la formation d'agrégats de taille infinie. Les interactions électrostatiques jouent cependant différents rôles dans le système, dont les effets peuvent être antagonistes. En effet, si les espèces de charges opposées s'attirent aux échelles locales, ce qui provoque la croissance des complexes, ces derniers se repoussent à des échelles supérieures du fait des charges résiduelles présentes à leur surface. On peut alors supposer que ce sont ces répulsions qui régissent les mécanismes stoppant la croissance des complexes. La taille des complexes doit alors être modulée par la force ionique puisque cette dernière contrôle à la fois l'intensité et la portée du potentiel électrostatique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tracé le nombre d'agrégation de protéines par complexe $N_{\text{agg_comp}}$ ⁸⁰ en fonction de κ pour un grand nombre de situations physicochimiques différentes. Pour calculer la force ionique, nous avons sommé les ions provenant du tampon avec les contre-ions des espèces⁸¹. De manière remarquable, tous les points se rassemblent sur *une courbe maîtresse qui montre une dépendance exponentielle de $N_{\text{agg_comp}}$ avec κ* (figure 1.7.c)[61].

Nous pouvons alors proposer le scénario suivant pour les mécanismes de formation des complexes, en nous appuyant sur le fait que l'organisation des complexes à grande échelle est caractéristique d'une agrégation de type RLCA. Cette agrégation apparaît classiquement dans les systèmes de colloïdes chargés lorsque ces colloïdes doivent franchir une barrière de potentiel électrostatique pour s'agréger sous l'action d'attractions à courte portée. Par analogie avec la théorie DLVO des colloïdes chargés, on peut écrire cette barrière de potentiel pour les complexes

⁷⁷ Par simple soustraction du rayon des complexes obtenu dans le contraste « protéines » de celui obtenu dans le cas du contraste « chaînes ».

⁷⁸ L'obtention de cette courbe maîtresse récapitulative aura nécessité la mesure de près de 50 spectres de diffusion sur 3 spectromètres différents (PAXY au LLB, V4 au HMI à Berlin, et D22 à l'ILL) !

⁷⁹ Les résultats montrent que $|\zeta|$ est plus élevé pour $[-]/[+]_{\text{intro}} > 1$ que pour $[-]/[+]_{\text{intro}} < 1$ car les chaînes pendantes de PSS de la couronne apportent plus de charges négatives que les lysozymes présentes à la surface des complexes [61]. Par ailleurs, la valeur de $|\zeta|$ ne dépend pas du pH pour $[-]/[+]_{\text{intro}} > 1$ puisque le PSS est un PEL fort. Pour $[-]/[+]_{\text{intro}} < 1$, $|\zeta|$ décroît à mesure que le pH est augmenté, en accord avec la diminution de la charge nette du lysozyme.

⁸⁰ Ce nombre d'agrégation est obtenu à partir de la modélisation. Il est évalué à partir de V_{comp} et de $\Phi_{\text{intra_lyso}}$.

⁸¹ La stœchiométrie de la complexation implique que toutes les charges structurales participent à la complexation et pas seulement les charges effectives du PEL prévues par la condensation de Manning. Il s'ensuit que l'ensemble des contre-ions ne sont plus attachés au PEL.

comme $\frac{V_{el}(r)}{kT} = Z_{comp}^2 L_B \frac{e^{-\kappa r}}{r}$, où Z_{comp} est la charge nette des complexes et L_B est la longueur de Bjerrum. Ainsi, à mesure de la croissance des complexes, les complexes se repoussent de plus en plus puisque ce potentiel augmente en $N_{agg_comp}^{4/3}$ ⁸². Lorsque ces répulsions sont suffisamment importantes, la croissance des complexes s'arrête. Il existe cependant également des attractions non électrostatiques entre complexes de courte portée, de type Van der Waals, qui ont fortement crû pendant l'étape de croissance puisqu'elles sont en R_{comp} ⁶. Ces attractions peuvent ainsi conduire à l'agrégation *entre* complexes lorsque la barrière répulsive est dépassée, typiquement lorsque le potentiel atteint une valeur $V_{el}^*(R_{comp})$ de quelques kT ⁸³. On se retrouve alors typiquement dans une situation de type RLCA, qui devient le processus dominant dans le système. C'est donc principalement ce V_{el}^* qui fixe la taille des complexes dans toutes les situations, ce qui explique la variation exponentielle de N_{agg_comp} *versus* κ ⁸⁴.

Agrégation à grande échelle et métastabilité des solutions

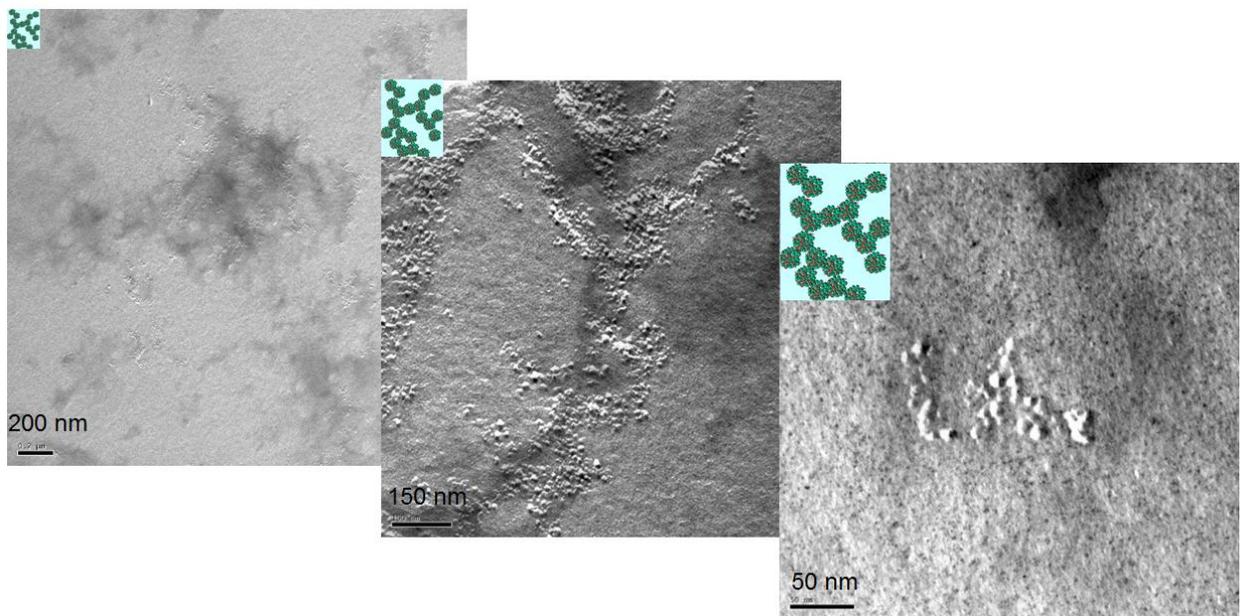


Figure 1.8 : Images à différents grossissements des structures des complexes globulaires à différentes échelles obtenues par microscopie électronique à transmission après cryofracture [63].

Pour parfaire la description structurale des solutions de globules, il était nécessaire d'imager les suspensions sur des échelles plus grandes que celles sondées par la DNPA, ce que nous avons fait grâce à des expériences de microscopie électronique à transmission après cryofracture⁸⁵ (figure 1.8)[63]. Il apparaît que les globules forment des amas fractals à toutes les échelles sondées jusqu'à des échelles microniques. Le processus RLCA a donc mené à la formation d'agrégats infinis. Ceci module la stabilité colloïdale des solutions. Lorsque les globules sont formés à haute concentration de matière⁸⁶, les amas fractals s'interpénètrent et sont proches de percoler⁸⁷. Le

⁸² En effet, en considérant que seules les espèces à la surface des complexes participent à la charge des complexes, il vient que $Z_{comp} \propto R_{comp}^2 \propto N_{agg_comp}^{2/3}$.

⁸³ Le potentiel répulsif est en effet maximal au contact entre complexes, pour $V_{el}(r) = V_{el}(R_{comp})$.

⁸⁴ Il apparaît que les valeurs sont légèrement décalées pour $f = 1$ à pH 7, quand le lysozyme porte de nombreuses charges négatives et pour $f = 0,5$, quand les chaînes sont légèrement hydrophobes. Le potentiel d'interaction entre complexes est donc légèrement modifié dans ces conditions.

⁸⁵ La forte turbidité des solutions empêchant la réalisation d'expériences de diffusion de lumière, nous avons choisi cette technique qui est très efficace pour imager des suspensions colloïdales puisqu'elle n'implique pas d'étape de séchage. Les mesures ont été effectuées par J.-M. Verbatatz du laboratoire LMTD (CEA Saclay).

⁸⁶ Ce qui a été le cas de toutes nos expériences de DNPA pour lesquelles on a majoritairement travaillé à $C_{lyso} = 40$ g/L. La métastabilité des solutions à ces concentrations implique que la concentration en espèces dans le volume illuminé par le

Le système est alors stable vis-à-vis de la sédimentation car il se crée un échafaudage de très grande taille dans l'échantillon. Sous l'effet de la dilution, cet échafaudage se brise, ce qui mène à la précipitation macroscopique des échantillons. Les échantillons dilués sont donc floculés, qu'ils soient formés directement à basse concentration de matière ou obtenus par dilution d'échantillons concentrés [64]⁸⁸.

1.9 Une démonstration expérimentale du relargage des contre-ions

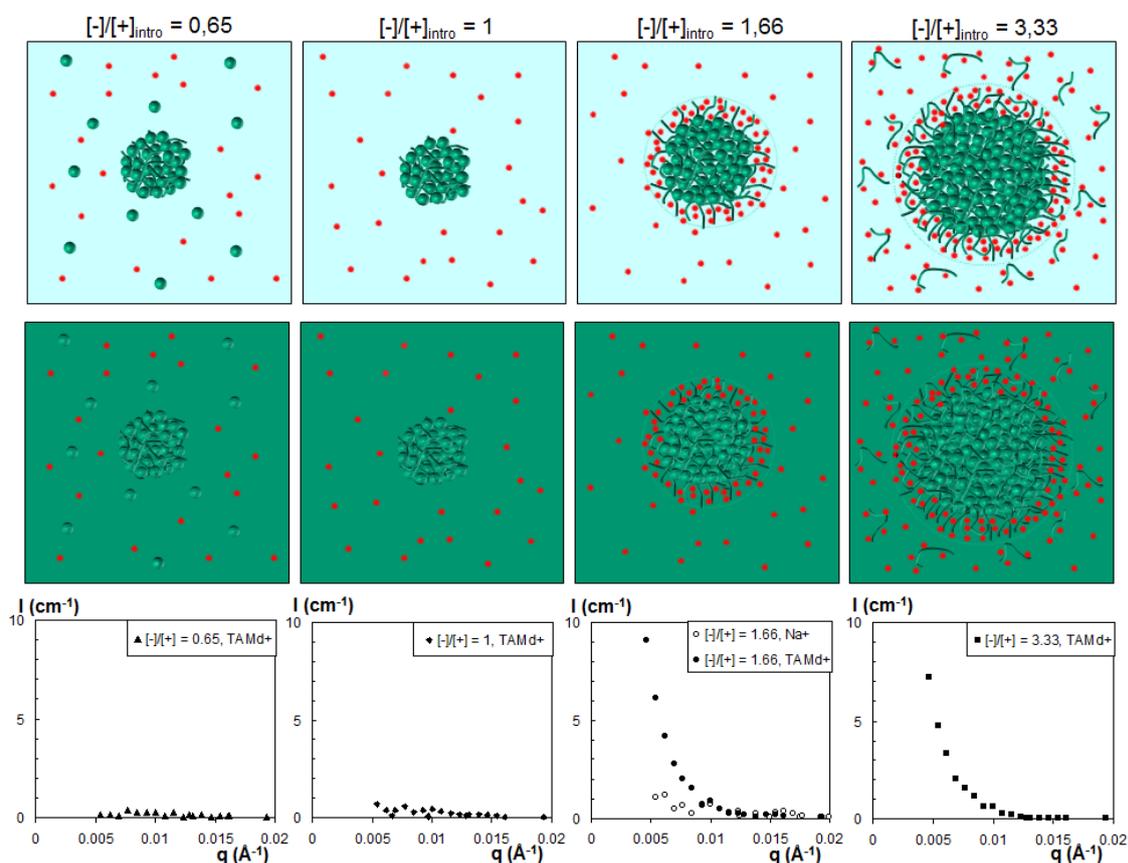


Figure 1.9 : Démonstration expérimentale du relargage des contre-ions ($C_{\text{lyso}} = 40 \text{ g/L}$, C_{PSS} variable, $N = 40$, $I = 50\text{mM}$). Les panneaux du haut représentent les structures formées en fonction de $[-]/[+]_{\text{intro}}$ dans l'hypothèse où les contre-ions sont relargués, lorsque les chaînes PSS sont hydrogénées et que les contre-ions sont des $(\text{CD}_4)_3\text{N}^+$ (TAMd⁺) dans un solvant aqueux de rapport $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ quelconque, les panneaux du centre représentent les mêmes structures dans un mélange 43%D₂O/57%H₂O et les panneaux du bas les mesures effectuées dans ce mélange 43%D₂O/57%H₂O. Pour $[-]/[+]_{\text{intro}} = 1,33$, une mesure témoin a été effectuée avec du Na^+ pour vérifier que l'intensité diffusée à petits q provient essentiellement des contre-ions $(\text{CD}_4)_3\text{N}^+$ lorsque $[-]/[+]_{\text{intro}} > 1$ [65].

Comme je l'ai rappelé en introduction, un des moteurs supposés de la complexation est le fort gain entropique associé au relargage des contre-ions. Si cette prédiction théorique avait été indirectement déduite expérimentalement de mesures calorimétriques, il n'existait pas de preuve structurale directe de ce relargage. Déterminer l'organisation d'objets dans un complexe n'est en effet pas une tâche aisée si ceux-ci ont disparu! Nous avons cependant pu en établir la première démonstration en tirant bénéfice de la possibilité d'extinction conjointe des chaînes PSS et du lysozyme et de l'évolution de la structure des complexes globulaires avec $[-]/[+]_{\text{intro}}$ [65]. Le principe

faisceau neutronique est le même que celui introduit en solution, ce qui est une hypothèse implicite de l'analyse des intensités absolues.

⁸⁷ Formellement ils ne doivent pas percoler. Si tel était le cas, les solutions ne seraient pas liquides d'un point de vue rhéologique.

⁸⁸ Dans ce dernier cas, nous avons vérifié que la précipitation n'affecte pas la structure des globules aux échelles locales [64].

de l'expérience, de type « blanc ou noir », est de vérifier qu'un signal de diffusion lié aux ions apparaît dès lors que les complexes portent une couronne de chaînes PSS (figure 1.9). En termes de contraste, nous avons utilisé des chaînes PSS hydrogénées dans un mélange 43%D₂O/57%H₂O et remplacé les contre-ions usuels Na⁺, dont la diffusion est généralement négligeable⁸⁹, par des contre-ions de type tétraméthylammonium deutérés (CD₄)₃N⁺ fortement contrastés par rapport au solvant⁹⁰. Ainsi, si les ions sont effectivement délocalisés du cœur du globule, celui-ci ne diffuse pas. La couronne, quant à elle, diffuse dans tous les cas car il reste un grand nombre de contre-ions condensés sur les chaînes, environ deux tiers d'après la théorie prévue par Manning ($\sim 1 - a/L_B$). Le signal de diffusion doit donc être nul lorsque les globules sont formés pour $[-]/[+]_{\text{intro}} \leq 1$, et non nul quand $[-]/[+]_{\text{intro}} > 1$, *exactement comme l'avons observé expérimentalement* (figure 1.9)⁹¹. Ce signal de diffusion provient effectivement des contre-ions (CD₄)₃N⁺ car une mesure témoin faite dans des conditions identique avec des ions Na⁺ ne montre aucune diffusion. Par ailleurs, le signal provenant des contre-ions (CD₄)₃N⁺ se superpose avec celui des chaînes à un préfacteur d'intensité d'environ 0,1, ce qui démontre que les contre-ions décorent bien la couronne avec le terme de contraste attendu⁹²[65].

1.10 A l'origine de la transition fluide/gel, l'état de dilution des chaînes après interaction avec les protéines

Je présente ici une mesure de la conformation des chaînes au sein des complexes dans la structure gel⁹³ qui nous a permis de déterminer l'origine de la transition entre la structure gel et la structure globulaire [66]. D'après les diagrammes d'état, celle-ci semblait liée à la concentration de recouvrement c^* des chaînes PSS puisque la concentration d'apparition de la phase gel était d'autant plus basse que la masse des chaînes était élevée. On pouvait alors imaginer que cette transition était liée au régime de dilution des chaînes après que celles-ci aient interagi avec les protéines : lorsque les chaînes sont interpénétrées, elles peuvent facilement être réticulées par les protéines et former un gel qui empêche alors l'effondrement du système en objets compacts, phénomène qui n'intervient plus en régime dilué et permet la formation des globules denses. Il était donc nécessaire de déterminer le c^* des chaînes dans les complexes pour vérifier cette hypothèse. Ce c^* ne dépend, dans une solution pure de chaînes de PEL, que de la masse des chaînes et de leur longueur de persistance l_p :

$$c^* = \frac{1}{4a^{3/2}N_a} \left(\frac{1}{N^{1/2}l_p^{3/2}} \right)$$

où a est la longueur d'une unité de répétition et N_a le nombre d'Avogadro⁹⁴.

⁸⁹ De manière générale, les petits ions monovalents ne diffusent pas en solution aqueuse, et ce quel que soit leur b cohérent, car ils sont extrêmement solvatés. Leur densité de longueur de diffusion neutronique est ainsi toujours proche de celle du solvant. La condensation ionique sur les PEL est donc généralement étudiée par DPAX avec des ions lourds.

⁹⁰ Nous avons vérifié que l'introduction de ce contre-ion partiellement hydrophobe n'affectait pas la structure des complexes.

⁹¹ Pour nous assurer de la validité des résultats, nous avons compté les spectres très longtemps, de l'ordre d'une quinzaine d'heure par échantillon sur PAXY au LLB, même dans le cas $[-]/[+]_{\text{intro}} \leq 1$. Passer des heures et des heures sur un spectromètre, et être heureux parce qu'on ne compte aucun neutron diffusé, était alors une expérience inédite pour moi !

⁹² Le signal des contre-ions (CD₄)₃N⁺, bien que très bruité car de faible intensité, se superpose parfaitement avec celui des chaînes PSS (obtenu dans ce cas dans un mélange H₂O/D₂O identique avec des chaînes deutérées) dans le domaine des petits q , ce qui prouve que $P(q)$ et $S(q)$ sont identiques dans les deux cas avec un facteur de normalisation d'environ 0,1. Un calcul rapide permet d'estimer l'ordre de grandeur de ce facteur. Comme les densités de longueur de diffusion des ions (CD₄)₃N⁺ et des chaînes deutérées sont proches, ce facteur est à peu près égal au carré des fractions volumiques des contre-ions condensés et des chaînes, soit $((1 - a/L_B)V_{c,i}/V_{PSS})^2$, où $V_{c,i}$ et V_{PSS} sont les volumes spécifiques d'un contre-ion et d'une unité de répétition PSS, qui donne une valeur égale à $\sim 0,1$ [65].

⁹³ Pour mémoire, nous avons également déterminé la conformation des chaînes dans la structure globulaire qui a montré que les chaînes n'adoptent plus une conformation de type vermiciforme dans cette structure. Les chaînes sont donc fortement collapsées autour des protéines [66].

⁹⁴ Ce calcul est obtenu à partir du rayon de giration d'une chaîne vermiciforme $R_g = \sqrt{2Na l_p}$. c^* apparaît quand la fraction volumique occupée par les chaînes $\Phi = R_g^3(c N_a / N)$ est de 1. c est ici la concentration monomérique.

Nous avons dans un premier temps identifié grossièrement la masse d'apparition de la phase gel pour une série d'échantillons réalisés à concentration en chaînes (0,1 mol/L) et force ionique (50 mM) constantes [66], conditions pour lesquelles la l_p des chaînes de PSS dans une solution pure était connue (50Å, d'après des mesures de ZAC [67]). La phase gel apparaissait pour des masses comprises entre $N = 330$ et $N = 630$ alors qu'une valeur de N^* évaluée avec une l_p de 50Å est de $N^* = 30$. Ceci suggérait que l'hypothèse de réduction de la l_p des chaînes après interaction avec les protéines était la bonne.

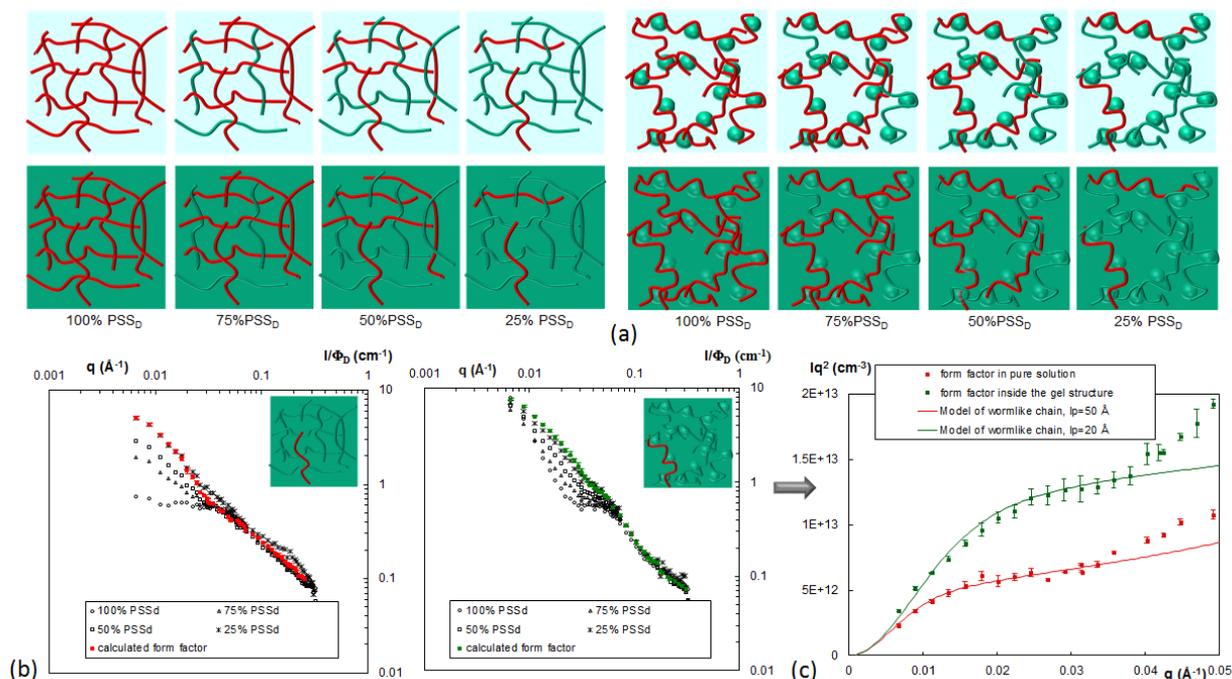


Figure 1.10 : Mesure de la conformation des chaînes par le principe de l'extrapolation à concentration nulle ($C_{PSS} = 0,1$ mol/L ; $I = 50$ mM ; $N=800$) [66]: (a) Principe de la mesure : les panneaux du haut représentent les structures formées pour des mélanges pures (gauche) et les gels formés à $C_{lyso} = 40g/L$ (droite) et les panneaux du bas les mêmes structures dans un mélange 43%D₂O/57%H₂O. (b) Intensités mesurées normalisées par la fraction en chaînes D pour les différents rapports de chaînes H/D et mesures extrapolées. (c) Comparaison des données extrapolées en représentation de Kratky. Les courbes continues sont les meilleurs ajustements obtenus par le modèle de chaîne vermiforme.

Pour mesurer cette nouvelle l_p des chaînes, nous avons mesuré leur conformation dans des complexes de type gel formé avec des chaînes longues⁹⁵ ($N=800$) par le principe de l'extrapolation à concentration nulle avec différents mélanges de chaînes H et chaînes D de même masse. Dans un solvant aqueux de composition H₂O/D₂O quelconque, nous mesurerions dans ce système à 4 composants les corrélations provenant de 6 couples de diffuseurs distincts⁹⁶. Or, dans le mélange 43%D₂O/57%H₂O, tous les termes de diffusion cohérente liés au lysozyme et aux chaînes H s'annulent et l'intensité se réduit à $I(q)(cm^{-1})/\Phi_D = (\rho_{chaîneD} - \rho_{solvant})^2(P(q) + \Phi_D S(q))$, où $P(q)$ est le facteur de forme intrachaîne et $S(q)$ le facteur de structure interchaîne (figure 1.10.b). L'extinction de $S(q)$ s'observe très bien sur les données expérimentales puisque le pic polyelectrolyte, lié au signal interchaînes, s'efface progressivement à mesure de la diminution de la fraction en chaînes deutérées (figure 1.10.b)⁹⁷.

⁹⁵ Le signal mesuré est en effet d'autant plus important que les chaînes sont de grande masse.

⁹⁶ Lysozyme/lysozyme, lysozyme/chaînes H, lysozyme/chaînes D, chaînes H/ chaînes H, chaînes H/ chaînes D, chaînes D/ chaînes D.

⁹⁷ En pratique, à 25% de chaînes D, le spectre s'identifie pratiquement au facteur de forme.

La figure 1.10.c compare le facteur de forme des chaînes dans les complexes avec celui des chaînes en solution, obtenu par nos soins avec la même méthode, dans une représentation de Kratky $I(q)q^2 = f(q)$. Dans le cas des complexes, le niveau d'intensité du plateau est plus élevé que dans le cas des solutions. La section moyenne des chaînes est donc plus grande, ce qui confirme qu'elles se sont contractées. Le q_{plat} d'apparition du plateau est quant à lui fortement décalé vers les grands q dans le cas des complexes, attestant d'une réduction importante de la longueur de persistance. Pour modéliser les courbes, nous avons utilisé un facteur de forme de chaînes vermiformes⁹⁸ qui permet d'ajuster les deux courbes en intensité absolue. Dans le cas des chaînes seules, nous retrouvons la valeur de l_p de la littérature de 50Å alors qu'elle n'est plus que de 20Å dans les complexes. Dans ce dernier cas, cette valeur moyenne résulte probablement de la somme de parties de chaînes fortement enroulées autour des protéines ayant une l_p proche de l_0 et de parties de chaînes libres ayant une l_p proche de celle des chaînes en solution. Elle permet cependant de recalculer le N^* en présence des protéines qui est de $N^* = 500$, et se situe exactement dans la gamme que nous avons déterminé expérimentalement. Ceci confirme donc que le gel apparaît en régime semi-dilué et les globules en dilué, après que les chaînes aient interagi avec les protéines, un mécanisme qui a également été observé sur des systèmes PEL/micelles sphériques [68]. Pour étayer ce scénario, nous avons également vérifié expérimentalement : (i) que la transition apparaît exactement à la concentration en chaînes c^* correspondant à celle calculée avec la l_p mesurée en présence de protéines; (ii) et que la valeur de c^* augmente avec la force ionique du fait de la diminution de la l_p ⁹⁹.

1.11 Bilan : quelques éléments de compréhension des mécanismes de complexation entre protéines et PEL de charges opposées

Au final, le choix du système modèle s'est révélé particulièrement heureux du fait de sa reproductibilité vis-à-vis de tous les paramètres que nous avons fait varier (C_{lyso} , C_{PSS} , pH, f , M_{WPSS} , l). Ceci nous a permis d'exploiter la technique de la DNPA au maximum de ses possibilités afin de proposer une description complète de toutes les structures issues de la complexation dans les différentes régions du diagramme d'état et de montrer comment ces paramètres modulent les transitions d'une structure à l'autre (cf figure 1.11 récapitulative¹⁰⁰). Nous avons d'ailleurs été les premiers à appliquer cette technique pour l'étude des complexes protéines/polyelectrolyte et, j'espère, à la populariser, puisque son utilisation s'est depuis fortement développée¹⁰¹, même si, de

⁹⁸ Aux petits q , l'expression s'écrit comme $S(q) = \frac{2(\exp(-x)+x-1)}{x^2} + \left[\frac{4}{15} + \frac{7}{15x} - \left(\frac{11}{15} + \frac{7}{15x} \right) \exp(-x) \right] \frac{2l_p}{L}$ avec $x = \frac{Lq^2 l_p}{3}$, L étant la longueur de la chaîne. Cette expression est valable tant que $ql_p < 4$ [141]. Lorsque $ql_p > 4$, le signal de diffusion suit une loi asymptotique $S(q) = \frac{\pi}{qL} + \frac{2}{3q^2 L l_p}$ [142].

⁹⁹ Ces deux expériences ont été faites avec des chaînes $N = 800$ avec $C_{lyso} = 40$ g/L. Dans la première, nous avons fait une série de mesures à force ionique constante (50 mM) en variant la concentration de chaînes de 0,015M à 0,1M. La transition est évaluée entre 0,05M et 0,08M alors que le calcul avec une l_p de 20Å donne 0,08M. Dans la seconde, nous avons fait une série de mesures à une concentration de chaînes de 0,1M en variant la force ionique de 50mM à 500 mM. La transition apparaît entre 100mM et 200mM. Le l_p^* est alors de 17Å. La diminution de l_p est donc de 3Å quand la salinité passe de 50 mM à 150 mM [66].

¹⁰⁰ Nous reportons en particulier la façon dont l'histoire des échantillons influe sur les structures finales des échantillons [64] lorsqu'on modifie un paramètre *a posteriori*. Lorsqu'on dilue une solution métastable de complexes, celle-ci précipite. Lorsqu'on ajoute du sel sur une solution de complexes globulaires, leur taille augmente sans que leur compacité change. Ceci peut ainsi modifier le seuil de métastabilité des solutions. Lorsqu'on ajoute du sel dans un gel, il est possible de passer sous le c^* pour former des globules. Enfin, lorsqu'on rajoute une forte concentration de chaînes PSS sur des échantillons globulaires jusqu'à atteindre des $[-]/[+]_{intro}$ pour lesquels les protéines devraient être complètement dépliées, la structure globulaire est en partie préservée. Le cœur des complexes globulaires est donc pratiquement gelé car il ne se réorganise que faiblement.

¹⁰¹ A ma connaissance, elle a servi à l'étude de mélanges BSA/PSS [143], lysozyme/pectine [69], β -lactoglobuline/pectine [144], agar/gélatine [145], BSA/chitosane [146], BSA/PDAMAC [46], PEI/PMA [147], lysozyme/hyaluronane [70], lipase/copolymères portant un bloc chargé [148]...

manière générale, les possibilités offertes par la variation de contraste n'ont pas été utilisées au mieux de leur potentiel.

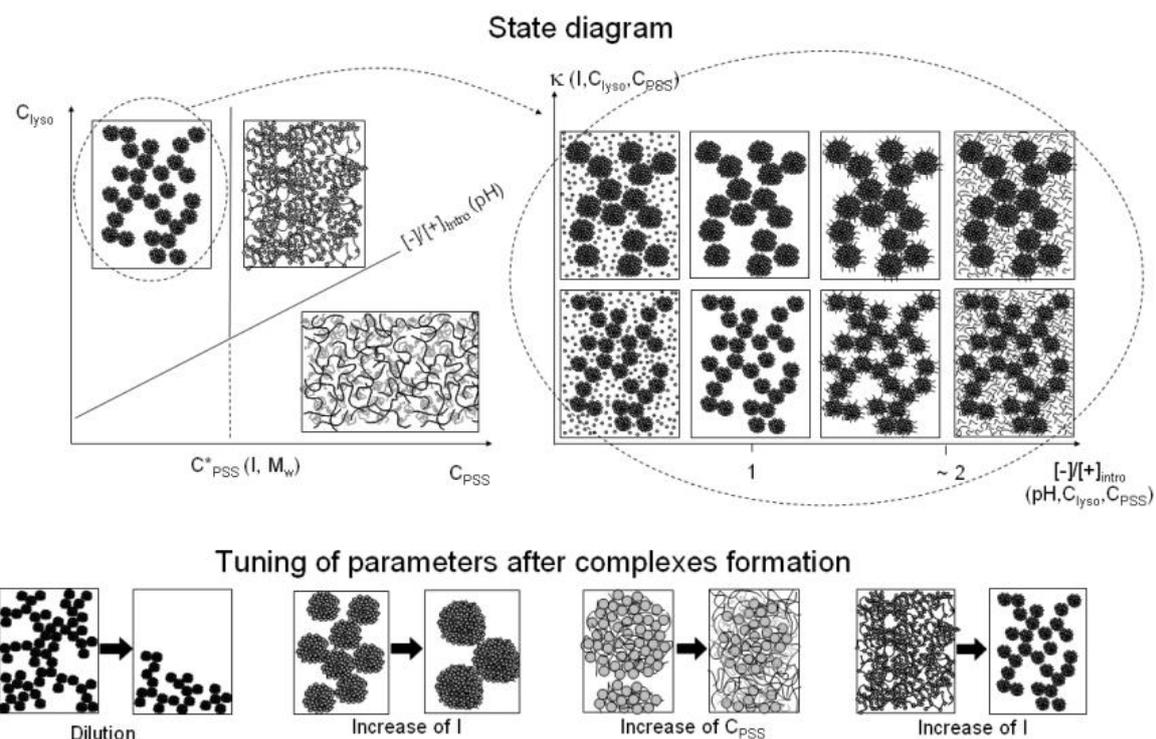


Figure 1.11 : Bilan récapitulatif des structures obtenues dans les différentes régions du diagramme d'état en fonction de tous les paramètres physicochimique d'intérêt (C_{lyso} , C_{PSS} , pH, f , M_{wPSS} , l), tiré de la référence [14]. Les panneaux du bas représentent l'évolution de ces structures lorsqu'un des paramètres est modifié *après* formation des complexes (*cf note 100*) [64].

Nous avons ainsi pu démontrer de façon très claire la prééminence des interactions électrostatiques dans le système au cours de cette étude, dont les résultats les plus marquants sont les suivants : (i) stoechiométrie de la complexation du point de vue des charges introduites avec formation de complexes primaires denses de cœur neutre, *i.e.* $[-]/[+]_{intra} \sim 1$ quel que soit $[-]/[+]_{intra}$, avec expulsion des espèces en excès en dehors des complexes, (ii) modulation de la taille finie des complexes primaires par κ et (iii) vérification du relargage des contre-ions condensés. La complexation est donc promue par ces interactions électrostatiques directes, en association avec le gain entropique lié au relargage des ions, qui fixent la structure initiale des complexes aux échelles locales lors du mélange. Les paramètres n'influent pas directement sur ces interactions (longueur et hydrophobicité des chaînes) n'interviennent que dans un second temps, lorsque les protéines sont complexées sur les chaînes. Ces derniers paramètres jouent cependant un rôle fondamental sur la structure finale des suspensions, et donc sur leur propriétés macroscopiques, en contrôlant la viscoélasticité dans le cas du M_w ou la conformation des protéines dans le cas de l'hydrophobicité des chaînes.

Enfin, si les comportements que nous avons identifiés sont certainement très représentatifs de ceux survenant lors de l'interaction de PEL *flexibles et fortement chargés* avec des protéines de charges opposées, et probablement même avec des objets sphériques de charges opposés tels que les nanoparticules ou les micelles, ils ne peuvent cependant être généralisés à l'ensemble des PEL au vu du large éventail de comportements macroscopiques reportés dans la littérature, en particulier la formation de coacervats.

Coacervation complexe ou précipitation ?

Pour finir cette partie, je donne quelques éléments de la réflexion que nous avons menée avec François Boué sur les mécanismes pouvant mener soit à la coacervation soit à la précipitation lors de la complexation [14]. Ils sont basés sur la comparaison des comportements respectifs de différents complexes à base de lysozyme, formés soit à partir de PSS, soit à partir de deux polysaccharides différents¹⁰², la pectine d'une part [69] et l'acide hyaluronique d'autre part [70]. Ces deux polysaccharides possèdent des squelettes rigides, avec des longueurs de persistance intrinsèque d'~ 70-80 Å dans les deux cas, et une densité linéique de charge peu élevée, trop faible pour permettre la condensation de Manning. La principale différence entre ces deux polysaccharides réside dans leur distribution de charges : si l'acide hyaluronique est un homopolymère régulièrement chargé, la pectine est en fait un copolymère statistique formé de motifs chargés et de motifs neutres et peut donc localement être très chargé.

Aux échelles locales, le système lysozyme/pectine est formé de complexes globulaires de taille plus élevée que les complexes lysozyme/PSS et de compacités plus faibles, de l'ordre de 10%¹⁰³. A bas pH, lorsque les chaînes sont très chargées, ces complexes s'organisent en amas fractals et les suspensions précipitent macroscopiquement, de façon similaire aux complexes lysozyme/PSS. Au contraire, à pH neutre, la DNPA révèle que les complexes interagissent via des attractions de faible intensité et, macroscopiquement, les suspensions peuvent alors séparer de phase par coacervation. Le système lysozyme/acide hyaluronique présente quant à lui une structure complètement différente aux échelles locales. Les complexes sont des structures extrêmement lâches formées de bâtons décorés de protéines dont l'extension est très supérieure à celle de la l_p intrinsèque des chaînes, pouvant s'organiser éventuellement en fagots. Macroscopiquement, les suspensions séparent de phase par coacervation.

La charge surfacique et la compacité des complexes primaires lysozyme/PEL diminuent donc à mesure que l'on augmente la rigidité du PEL ou que l'on abaisse sa densité de charge, ce qui favorise la coacervation. Ces changements structuraux influencent fortement la forme du potentiel d'interaction entre complexes primaires puisque les attractions de Van der Waals augmentent avec la densité des complexes et les répulsions électrostatiques augmentent avec la charge surfacique. On peut alors faire le parallèle avec les comportements de phase des colloïdes en solution. Lorsque le potentiel présente de faibles attractions à longue portée, avec une forme de type Lennard-Jones, le système peut démixer en deux phases fluides de densité différentes en coexistence¹⁰⁴, appelées « gaz » et « liquide » par référence aux systèmes atomiques [69][70]. Ce type de transition pourrait donc être à l'origine de la coacervation complexe. Au contraire, si les répulsions sont à longue portée, il ne peut apparaître qu'une seule phase fluide dans le système. Si la barrière de répulsion est franchie et que les attractions à courte portée sont fortes, ce système précipite.

¹⁰² Ces études relatives à la complexation de lysozyme et de polysaccharides anioniques furent le fruit de deux études réalisées en collaboration, l'une avec I. Schmidt et M. Axelos (unité BIA de Nantes) pour la pectine et l'autre d'un projet collaboratif porté principalement par I. Morfin (Laboratoire de Spectrométrie Physique, Grenoble) et impliquant également I. Grillo (ILL, Grenoble) et E. Buhler (MSC, Paris7).

¹⁰³ Cette compacité a été évaluée en DNPA sans variation de contraste par le biais de la loi de Porod en postulant que les complexes sont de forme sphérique. La surface spécifique de l'échantillon est d'abord déduite de la valeur du rayon puis injectée dans la loi de Porod pour évaluer le contraste entre les complexes et le solvant, et ce faisant la compacité.

¹⁰⁴ A basse concentration d'objets, c'est-à-dire en dessous des concentrations de cristallisation ou de vitrification.

Chapitre II. Variation de contraste dans un fondu polymérique : Nanocomposites à base de nanoparticules magnétiques

Cette seconde partie est consacrée à l'étude de systèmes « nanocomposites »¹⁰⁵ modèles formés de fondus de **polystyrène (PS)** dopés par des nanoparticules sphériques magnétiques de **maghémite $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$** , et qui a constitué le cœur de la thèse d'Anne-Sophie Robbes. C'est un sujet que nous avons proposé en 2008 avec Jacques Jestin et François Boué, qui développaient depuis quelques années un axe de recherche fort au Laboratoire Léon Brillouin autour de la thématique du renforcement dans les nanocomposites¹⁰⁶. L'idée était de tirer profit à la fois des propriétés magnétiques des nanoparticules, afin d'élaborer des systèmes possédant des morphologies anisotropes contrôlées¹⁰⁷, et du fait que la maghémite et le polystyrène deutéré ont *pratiquement* la même densité de longueur de diffusion, cette heureuse coïncidence permettant une détermination aisée de la conformation des chaînes polymériques dans le système. C'est une étude que nous avons faite en collaboration avec Florian Meneau, du synchrotron Soleil, car la stratégie de contraste que nous avons mise en œuvre pour déterminer les structures respectives des nanoparticules et des chaînes est basée sur la complémentarité parfaite entre rayons X et neutrons quand les échantillons contiennent des chaînes H et D (Figure 2.1) : du point de vue de la diffusion aux petits angles, ce sont des systèmes simples à deux composants, mais ces composants ne sont pas les mêmes selon que l'on considère le contraste électronique (nanoparticules *versus* chaînes) ou le contraste neutronique (chaînes H *versus* nanoparticules et chaînes D).

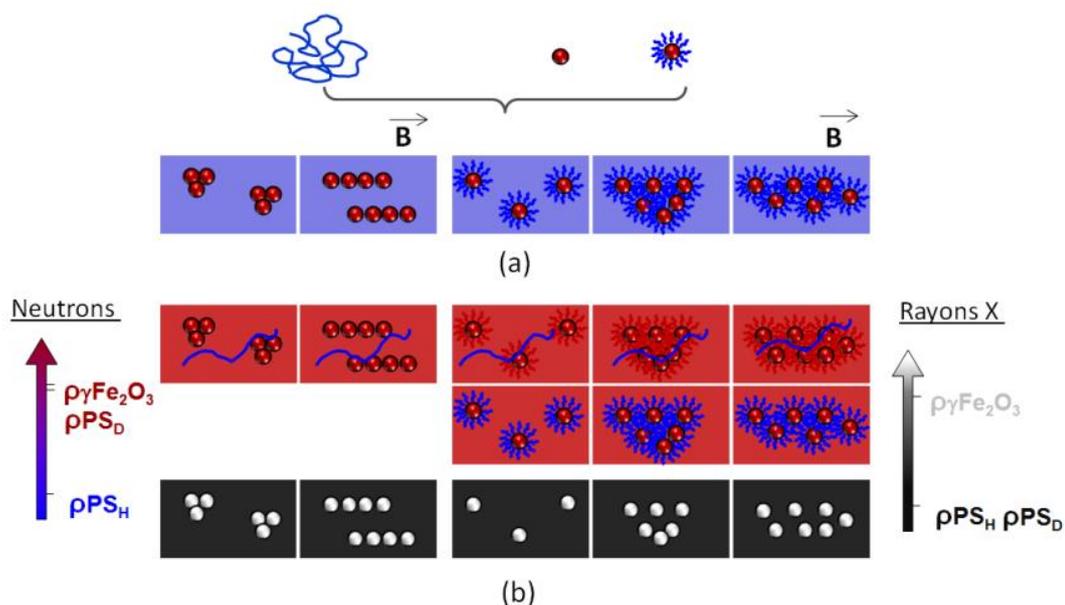


Figure 2.1 : Système modèle $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{PS}$: (a) Panorama des structures pouvant être obtenues; (b) Echelles des densités de longueur de diffusion (côtés) et représentations des systèmes lorsque la matrice est majoritairement constituée de PS_D du point de vue des neutrons (centre haut) ou de celui des rayons X (centre bas).

¹⁰⁵ Un matériau composite est un mélange hétérogène de deux composés non miscibles ayant une propriété physique supérieure à celles des composants individuels, par exemple la tenue mécanique. Le préfixe « nano » permet de spécifier la classe de composite pour lesquels les composants individuels ont des tailles nanométriques, ce qui permet d'exalter les effets d'interface.

¹⁰⁶ Cette thématique a démarré au laboratoire autour de François vers le milieu des années 1990 et s'est fortement accélérée avec les embauches successives de Julian Oberdisse et de Jacques pour développer cet axe de recherche, avec comme stratégie principale de développer des systèmes modèles à partir de nanoparticules de silice. Pour ma part, j'avais acquis une expertise sur les nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ au cours de ma thèse. J'ai donc pris le train des nanocomposites en marche afin d'associer mes compétences à celles de mes collègues...

¹⁰⁷ Nous avons déjà réussi à élaborer des nanocomposites renforcés de nanoparticules magnétiques en utilisant un latex comme matrice polymérique et à démontrer qu'il est possible d'organiser les nanoparticules de façon anisotrope au sein de la matrice, et ce faisant d'obtenir des propriétés mécaniques anisotropes [84]. Les échantillons évoluaient cependant avec le temps, en particulier parce que la T_g des nanolatex utilisés est proche de l'ambiante (35°C).

II.1 La problématique du renforcement mécanique dans les nanocomposites

Le contexte général dans lequel s'est placé ce travail concerne la description des mécanismes permettant d'expliquer l'amélioration des propriétés mécaniques de matrices polymériques, en termes de module et de résistance à la rupture, par l'inclusion de particules dures. Si ce procédé est connu et utilisé dans le monde industriel depuis plus d'un siècle¹⁰⁸, il n'est cependant en effet pas encore complètement compris, en dépit de l'abondante littérature traitant du sujet. Lorsque nous avons débuté l'étude, il était cependant communément admis que les propriétés mécaniques macroscopiques dépendent de deux contributions principales. La première de ces contributions ne fait intervenir que l'organisation structurale initiale des charges¹⁰⁹, et, surtout, la façon dont cette structure se réorganise sous sollicitation mécanique. L'augmentation de la résistance provient alors de mécanismes de limitation des déplacements des charges induits par des effets de gêne stérique liés à la présence des autres charges (glissement, rotations...) et/ou de ruptures, soit d'agrégats individuels, soit du réseau lorsque les charges forment un « squelette » continu sur tout l'échantillon. Par exemple, le module d'Young diverge au-dessus du seuil de percolation [73][74]. Outre les caractéristiques géométriques intrinsèques des charges elles-mêmes (taille, forme), les paramètres pertinents sont donc leur état de dispersion (individuelle ou en agrégats, homogène ou hétérogène) et leur concentration. La seconde contribution est liée aux modifications potentielles de la dynamique des chaînes induites par la présence des charges, par exemple une modification de la T_g ou de la densité d'enchevêtrements. Une des théories avancées pour expliquer le renforcement postule en effet que la mobilité des chaînes est ralentie au voisinage des charges, cette « couche vitreuse » intervenant alors comme une phase rigide supplémentaire dans le système [75][76][77]. Cette contribution est évidemment dépendante des interactions entre charges et polymère, qui peuvent mener par exemple à des phénomènes spécifiques d'adsorption ou de déplétion, et peut devenir très importante dans des systèmes *nano* de très grande surface spécifique puisqu'elle est de nature interfaciale.

Il est cependant difficile de faire la balance exacte entre ces deux contributions car elles sont *de facto* très interdépendantes. En effet, bien que la nature du polymère n'apparaisse pas explicitement dans la contribution structurale, elle impacte l'état de dispersion des charges lors de la formulation du nanocomposite, ainsi que les interactions hydrodynamiques entre charges lors de la déformation¹¹⁰. Réciproquement, une modification éventuelle de la dynamique des chaînes liée à des effets de confinement de chaînes au sein d'agrégats de charges pourrait dépendre de la morphologie de ces derniers, en particulier de leur compacité. Il apparaît ainsi une forte dépendance des résultats vis-à-vis des différents systèmes d'étude choisis expérimentalement, ce qui nourrit les controverses¹¹¹. L'élaboration d'un modèle général de renforcement passe donc par l'étude de systèmes modèles pour lesquels il est possible de faire varier de façon indépendante les deux contributions et, si possible, de faire une mesure de la conformation des chaînes polymères en

¹⁰⁸ L'exemple canonique d'utilisation est évidemment le pneu qui doit sa couleur noire à l'adjonction de noir de carbone aux élastomères utilisés pour la gomme.

¹⁰⁹ Le mot « charge » n'a pas ici le même sens que dans la première partie, quand il était utilisé au sens de la charge électrique ! C'est le terme d'usage en français pour désigner les objets dispersés dans la matrice quand on parle de composites, qu'on traduit en anglais par *filler*.

¹¹⁰ Les modèles les plus simples visant à faire la corrélation entre Module d'Young et concentration des charges, en régime dilué, sont des modèles hydrodynamiques. Le plus simple est la transposition aux polymères de l'augmentation de la viscosité d'un fluide par l'ajout de charges décrit par Einstein : $E = E_0 (1 + 2,5\Phi)$, avec E_0 le module de la matrice seule et Φ la fraction de charges [149][150], qui peut être étendu à des termes de concentrations supérieures pour des objets sphériques ($E = E_0 (1 + 2,5\Phi + 14,1\Phi^2$ [151]) ou anisotropes ($E = E_0 (1 + 0,67f\Phi + 1,62f^2\Phi^2$ [152]) avec f le rapport d'aspect des charges.

¹¹¹ Notamment entre les deux « chapelles » du renforcement, celle du *tout structural* ou celle du *tout vitreux*.

présence des charges, à la fois au repos et sous déformation, afin de déterminer si elle est affectée par la présence de ces dernières.

Le LLB, une usine à systèmes modèles

C'est autour de cette idée qu'avait été développée antérieurement au laboratoire toute une série de systèmes modèles (silice/latex [78][79], silice/PS[74][80][81], silice greffée de PS/PS[82][83], $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ /latex[84]) dans lesquels l'état de dispersion des charges (isotrope ou anisotrope) était contrôlé à l'échelle locale, soit par des paramètres physicochimiques simples tels le pH [78] [79] et la concentration [74], soit par le contrôle de l'interface charge/polymère par le greffage covalent de chaînes à la surface des nanoparticules et, *in fine*, par le contrôle du *rapport entre masse des chaînes greffées et masse des chaînes libres* $R_{N/p}$ ¹¹²[82], soit par l'application d'un champ magnétique extérieur [84]. Ces études avaient permis d'établir des corrélations claires entre état de dispersion et renforcement¹¹³, et de mesurer la conformation des chaînes dans certains cas [80][81][82]. En particulier, le système $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ /latex avait permis de faire la démonstration qu'une organisation des charges en agrégats anisotropes linéaires, orientés en moyenne selon une direction privilégiée sur l'ensemble de l'échantillon, permettait d'obtenir un renforcement macroscopique anisotrope. Cette voie d'organisation des charges nous semblait prometteuse pour une étude fine des mécanismes de réorganisation puisqu'elle permet de sonder deux situations distinctes sur un seul et même échantillon, à savoir les réponses respectives du système à une déformation uniaxiale imposée tantôt parallèlement aux agrégats linéaires tantôt perpendiculairement. Il est en effet beaucoup plus simple de découpler les effets de glissements/rotations des effets de rupture sur un système pré-aligné que sur un système isotrope. Le système $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ /latex présentant des défauts de vieillissement (cf note 107), nous avons alors choisi de travailler sur le système $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ /PS pour combiner les atouts de possibilité d'organisation sous champ magnétique¹¹⁴ et de contraste présentés en introduction en le déclinant soit avec des nanoparticules natives, soit avec des nanoparticules greffées d'homopolymères¹¹⁵ (Figure 2.1), tout en nous appuyant sur l'expérience acquise au laboratoire sur les nanocomposites à base de polystyrène.

II.2 $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, PS et DMAc, les trois ingrédients d'un système modèle

Avant d'entrer dans la description des résultats, je veux préciser ici quelques atouts des deux briques constitutives de notre nanocomposite, ainsi que du chemin de formulation que nous avons choisi pour les mélanger. En premier lieu, la morphologie des agrégats que peuvent former les

¹¹² Dans de tels systèmes, les deux paramètres clefs pour le contrôle de la dispersion sont ce rapport $R_{N/p}$ et la densité de greffage σ , comme le montrent les diagrammes d'état structuraux expérimentaux [153][154][155]. Pour de très fortes σ , ou réciproquement de très faibles σ , de gros agrégats se forment. Dans le cas de σ intermédiaires, qui nous intéressera plus loin, la dispersion ne dépend plus que de $R_{N/p}$. Lorsque les chaînes libres de la matrice sont plus petites que les chaînes greffées, il est favorable entropiquement qu'elles pénètrent la couronne, ce qui induit des répulsions effectives entre objets greffés et favorisent la dispersion. Dans le cas contraire, l'entropie de mélange est défavorable et les chaînes sont expulsées de la brosse, ce qui provoque la formation de gros agrégats denses. La transition entre les deux états, dite « wet to dry » dans la littérature en référence à l'état de gonflement des chaînes greffées, dépend alors de la valeur de $R_{N/p}$.

¹¹³ Par exemple, dans le cas du système silice/latex [79][78], que le facteur de renforcement est directement lié au nombre d'agrégation des agrégats formé par les charges, lui-même piloté par le pH; dans le cas du système silice/PS [74], qu'il apparaît une contribution élastique supplémentaire avec un temps terminal très long en rhéologie au-delà du seuil de percolation; dans le cas du système silice greffée de PS/PS [82], de vérifier que l'état de dispersion (dispersé ou fortement agrégé) dépend du rapport des masses entre chaînes greffées sur les charges et chaînes du fondu.

¹¹⁴ Une autre possibilité pour formuler des nanocomposites à structure anisotrope aurait été d'utiliser des nanoparticules de morphologie anisotropes, de type bâtonnets ou disques, une approche déjà envisagée dans la littérature avec des nanotubes de carbone [73], des whiskers de cellulose [156] ou des argiles [157]. Cependant, la possibilité de moduler l'anisotropie de l'organisation du réseau de charges via la modulation du rapport d'aspect de ces charges nécessite un travail colossal de synthèse (une par rapport d'aspect souhaité), et est tout simplement impossible dans le cas des charges d'origine naturelle.

¹¹⁵ Et ce afin de comparer les mérites respectifs d'être nu ou d'être à poil.

nanoparticules magnétiques de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ sous l'action de champs magnétiques faibles¹¹⁶ peut être *a priori* modulée depuis des structures pratiquement complètement isotropes jusqu'à des structures très anisotropes par une simple augmentation de leur diamètre de 6 nm à 10 nm¹¹⁷. Le polystyrène, quant à lui, est amorphe¹¹⁸ et possède une T_g élevée, de l'ordre de 100°C¹¹⁹. Ceci permet de faire des caractérisations structurales de nanocomposites étirés à température ambiante *post-mortem*. Pour ce faire, l'échantillon est étiré au-dessus de sa T_g jusqu'à l'élongation voulue, puis est refroidi brutalement, ce qui fige la structure et permet d'effectuer une mesure statique de la structure déformée. Cette stratégie s'applique aussi bien à la DPA qu'à la microscopie électronique à transmission (TEM)¹²⁰, technique que nous avons abondamment utilisée pour compléter les expériences de diffusion, afin notamment d'étendre la gamme d'échelles spatiales sondée. Outre ses propriétés physiques, le polystyrène, polymère archiconnu, présente bien évidemment également l'intérêt de pouvoir être synthétisé facilement et en quantité importante, que ce soit en version hydrogénée ou deutérée. Enfin, nous avons choisi une méthode de formulation basée sur l'évaporation lente du solvant d'une solution concentrée de nanoparticules et de chaînes de PS, plus « douce » que des procédés industriels de mélange mécaniques tels que l'extrusion ou le malaxage¹²¹. Le point clé est de trouver un solvant qui soit à la fois un bon solvant du polymère, qui puisse assurer la stabilisation colloïdale des nanoparticules et qui ait un point d'ébullition élevé. Pour le système silice/PS, il s'était avéré que le *Dimethylacetamide* (DMAc) présentait toutes les qualités requises¹²² et avait permis d'obtenir des échantillons parfaitement reproductibles à partir d'un protocole mis au point par N. Jouault [74]. Nous avons donc choisi de réutiliser ce solvant, ainsi que le protocole associé, pour élaborer nos échantillons.

II.3 Synthèse des briques de base et transfert en solvant organique polaire

Afin d'obtenir les nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, futures « briques de base » de nos nanocomposites, en grande quantité et avec un bon contrôle de leur caractéristiques morphologiques (taille, masse et densité des chaînes pour les objets greffés), nous avons choisi de les synthétiser nous-même. Nous nous sommes basés sur la très populaire méthode « Massart »¹²³ pour la synthèse initiale de ces nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ [85], à l'issue de laquelle on obtient des objets grossièrement sphériques, chargés positivement en milieu acide¹²⁴, dont le rayon moyen est

¹¹⁶ Lorsqu'elles sont dispersées sous forme de suspensions colloïdales, elles ont un caractère superparamagnétique et peuvent ainsi être orientées par des champs magnétiques faibles, de l'ordre de quelques centaines de Gauss.

¹¹⁷ Il a en effet été montré que lorsque les nanoparticules sont dispersées en solution aqueuse, les attractions isotropes de Van der Waals dominent les interactions magnétiques dipolaires, attractives en moyenne, pour des diamètres de ~ 6nm, alors que ce sont les attractions magnétiques qui dominent à 10 nm [158]. Cette gamme de taille de 6 à 10 nm de diamètre correspond *grosso modo* à la gamme de tailles que l'on obtient par le procédé de synthèse que nous avons utilisé [85].

¹¹⁸ Ce qui évite donc la formation de zones cristallines dans le nanocomposite, qui pourraient rendre le système hétérogène.

¹¹⁹ Cette valeur de T_g du PS est valable pour des M_w supérieures à 30000 g/mol. Pour des masses plus courtes, la T_g décroît jusque vers 40°C pour des très courtes masses de 3000g/mol [159].

¹²⁰ Les échantillons sont en effet relativement faciles à couper, si tant est que l'on travaille avec un microscopiste de talent qui maîtrise cet art, ce qui a été notre cas avec Florent Dalmas de l'ICMPE à Thiais.

¹²¹ Cette méthode présente quand même un défaut, à savoir qu'il est possible qu'il reste une faible quantité de solvant piégée dans l'échantillon à la fin du séchage, ce qui peut potentiellement modifier la plasticité du fondu.

¹²² Ce solvant miracle est un bon solvant du polystyrène, bien qu'il soit polaire ($\epsilon_r = 37,8$) et miscible à l'eau. Ces dernières propriétés permettent l'échange de solvants avec l'eau dans des systèmes colloïdaux stabilisés électrostatiquement en solution aqueuse, puis d'assurer la stabilisation même des systèmes après élimination de l'eau. Sa température d'ébullition est de 167°C, très supérieure donc à la T_g du PS. Il n'est malheureusement pas paré de toutes les vertus puisqu'il est toxique pour la santé.

¹²³ Cette méthode très robuste, dont le nom fait référence à son illustre inventeur, est un procédé en 2 étapes. Dans un premier temps, la coprécipitation de sels fer II et fer III en conditions stœchiométriques adéquates en milieu alcalin permet l'obtention de particules de magnétite Fe_3O_4 . Celles-ci sont ensuite oxydées en $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ en milieu acide. Les sels résiduels en excès sont éliminés par lavage. On obtient typiquement 2 litres de solution à une fraction volumique en nanoparticules de 2,5% en une journée.

¹²⁴ Le point de charge nulle des nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ est de ~ 7.2.

de l'ordre de 45Å. La polydispersité est alors relativement large, avec une distribution lognormale des rayons et un σ_0 de l'ordre de 0,4, mais elle peut être réduite par un procédé de fractionnement basé sur des transitions de phase type « gaz-liquide » permettant de séparer les petites nanoparticules des grosses [86]¹²⁵, procédé que nous avons appliqué pour obtenir 4 tailles d'objets, avec des rayons moyens variant de 37Å à 65Å¹²⁶.

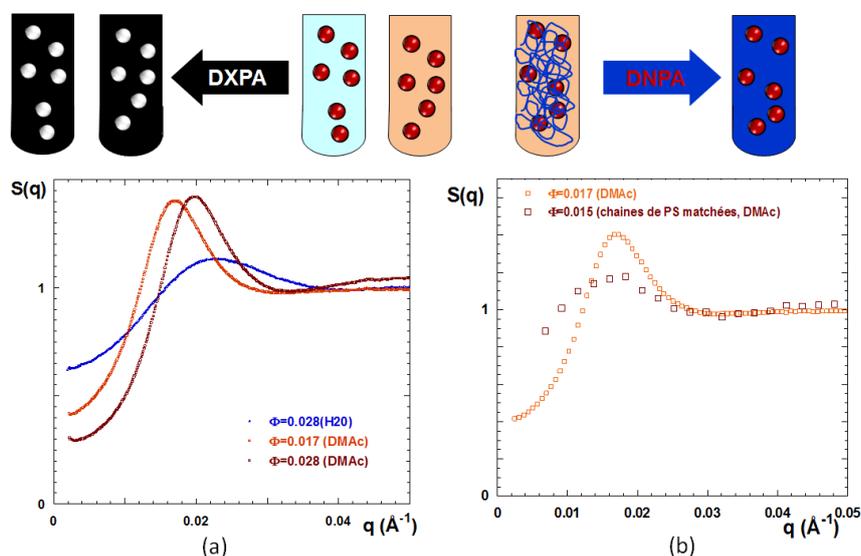


Figure 2.2 : Facteurs de structure des suspensions de nanoparticules nues en solution (obtenus après division du facteur de forme [87]) : (a) Comparaison des comportements en milieu aqueux et dans le DMAc (DXPA) (b) Evolution du comportement dans le DMAc après introduction de chaînes de PS (10%v/v) (DNPA).

Préalablement à la formulation de nanocomposites à base de nanoparticules « nues », il faut transférer ces dernières dans le DMAc et vérifier qu'elles restent stables en suspension après adjonction d'une forte quantité de chaînes de PS. Le DMAc étant miscible à l'eau en toutes proportions, nous avons effectué cette opération par des dialyses successives de la suspension initiale aqueuse dans ce solvant¹²⁷. L'échange entre solvants est alors progressif, ce qui permet de maintenir la stabilité colloïdale. Le facteur de structure est même plus répulsif au final dans le DMAc que dans l'eau (figure 2.2¹²⁸). En effet, bien que la dissociation des charges de surface soit moins forte dans le DMAc que dans l'eau¹²⁹, le fort abaissement de la force ionique lié à l'élimination des sels résiduels, couplé à la diminution de la permittivité relative ϵ_r , permet d'augmenter l'intensité des répulsions électrostatiques. L'introduction d'une forte quantité de chaînes de PS (10%v/v) dans une telle solution ne déstabilise pas les particules par déplétion car le facteur de structure reste répulsif. Si la caractérisation par DPA des suspensions de particules pures s'est faite naturellement

¹²⁵ Partant d'une solution fluide, on fait transiter la solution par ajout de sel. La transition apparaît lorsque les répulsions électrostatiques écrantées sont de l'ordre de grandeur des attractions dipolaires magnétiques et de Van der Waals. L'intensité de ces attractions augmentant très fortement avec le rayon des nanoparticules, le seuil de transition en sel est plus précoce pour les grosses particules que pour les petites, ce qui permet la séparation.

¹²⁶ Les caractéristiques de taille sont les suivantes, par ordre de taille croissante : $R_0 = 32\text{Å}$, $\sigma_0 = 0,3$ ($R_{\text{moy}} = 37\text{Å}$); $R_0 = 38\text{Å}$, $\sigma_0 = 0,32$ ($R_{\text{moy}} = 45\text{Å}$); $R_0 = 45\text{Å}$, $\sigma_0 = 0,35$ ($R_{\text{moy}} = 51\text{Å}$); $R_0 = 54\text{Å}$, $\sigma_0 = 0,3$ ($R_{\text{moy}} = 65\text{Å}$). Elles ont été obtenues par des mesures d'aimantation et de DXPA qui donnent des résultats similaires [92].

¹²⁷ Ceci ne permet évidemment pas d'éliminer toute l'eau. Le critère que nous avons retenu pour l'achèvement du transfert est la solubilité de chaînes de PS dans les réservoirs successifs de DMAc. Lorsque les chaînes ne flocculaient plus dans le réservoir, la teneur en eau était suffisamment faible pour pouvoir stopper les dialyses.

¹²⁸ Les facteurs de structure sont caractéristiques de systèmes répulsifs. Ils présentent une faible compressibilité osmotique à petits q et un fort pic de corrélation à q^* lié à la distance la plus probable entre objets. On peut vérifier l'homogénéité de la suspension en vérifiant que cette distance correspond à un pavage homogène de l'espace, *id est* $2\pi/q^* \sim (2R_{\text{moy}}/\pi 6\Phi)^{1/3}$. Le calcul donne ici 272Å et la mesure 285Å. La suspension est d'autant plus répulsive que l'intensité du pic de corrélation est forte et que la compressibilité est faible.

¹²⁹ Le potentiel ζ a été mesuré à + 60mV dans l'eau et à + 11mV dans le DMAc.

aux rayons X pour optimiser le contraste solvant/nanoparticule, ce sont les neutrons qui nous ont permis de mesurer ce dernier facteur de structure par *variation de contraste* dans un mélange DMAc_H85%/DMAc_D15% réalisant l'extinction du polystyrène (figure 2.2).

Concernant le greffage des chaînes de PS sur les nanoparticules, nous désirions atteindre des densités de greffage élevées pour un contrôle optimal de la dispersion future dans les nanocomposites et avons donc choisi une technique de « grafting from » plutôt que de « grafting onto »¹³⁰. Nous avons alors choisi une méthode initialement développée pour le greffage de PS sur des nanoparticules de SiO₂ négativement chargées dans le DMAc par polymérisation radicalaire en présence de nitroxydes (NMP)¹³¹ [88]. L'adaptation aux nanoparticules de γ Fe₂O₃ a nécessité une modification du procédé puisque nous partions de particules positivement chargées dans l'eau. Après quelques tâtonnements¹³², nous avons mis au point un protocole qui n'implique pas moins de 6 étapes : (i) inversion de la charge des nanoparticules par passage en milieu basique en présence d'ions TBA⁺; (ii) transfert dans le DMAc, (iii) silanisation des nanoparticules permettant l'ancrage de l'amorceur de polymérisation; (iv) surgreffage de l'amorceur; (v) polymérisation des chaînes; (vi) séparation des nanoparticules greffées et des chaînes libres par centrifugation/redispersion et/ou ultrafiltration [89]. Cette dernière étape de purification est généralement considérée comme un désagrément mais nous l'avons tournée à un avantage puisque la récupération des chaînes libres permet la formulation de nanocomposites ayant exactement un R_{N/P} de 1¹³³. Du fait de la relative lourdeur du procédé, nous ne l'avons appliqué qu'à une seule taille de nanoparticules (R₀ = 40Å, σ = 0,29) mais avec des monomères de styrène soit hydrogénés soit deutérés pour obtenir des couronnes dans ces contrastes respectifs, le M_n des chaînes greffées étant de 17000 pour les chaînes hydrogénées (IP ~ 1,8) et de 26000 pour les chaînes deutérées (IP ~ 1,7).

La caractérisation de ces objets greffés à *structure cœur/couronne* en solution se fait classiquement par DNPA en éteignant respectivement le signal du cœur puis celui de la couronne. Nous avons préféré ici profiter de la complémentarité entre X et neutrons pour faire cette caractérisation *sur un seul et même échantillon*, avec une couronne hydrogénée et diluée à 0,1%v/v en γ Fe₂O₃, dans un solvant DMAc_H5%/DMAc_D95%. Les contrastes sont tels que le signal de diffusion de DXPA provient uniquement du cœur alors que le signal de DNPA n'est dû qu'à la couronne¹³⁴. Les mesures sont présentées sur la figure 2.3. L'analyse du signal du cœur montre que les nanoparticules se sont faiblement agrégées, la courbe expérimentale s'ajustant parfaitement par un modèle d'agrégat linéaire de boules avec un nombre d'agrégation moyen de ~ 3 objets^{135 136}. Un suivi systématique de ce signal de cœur après chaque étape de la synthèse a montré que cette légère

¹³⁰ Cette technique de « grafting onto » est certes facile à mettre en œuvre et bien documentée pour les nanoparticules magnétiques [160] mais les densités de greffage maximales obtenues sont de l'ordre de 0,02 chaînes/nm².

¹³¹ Cette méthode basée sur la NMP avait été élaborée au laboratoire en collaboration avec D. Gigmes (CROPS Marseille) [88]. Par rapport aux autres techniques de polymérisation permettant le contrôle de la masse des chaînes telles que la RAFT ou l'ATRP, la NMP présente l'avantage de ne faire intervenir qu'une seule espèce chimique comme initiateur et contrôleur de polymérisation, ce qui limite l'introduction d'espèces en solution pouvant mener à la déstabilisation de la suspension colloïdale.

¹³² Et quelques « nervous breakdown » pour Anne-Sophie...

¹³³ Nous avons en effet vérifié que les masses des chaînes greffées et des chaînes libres sont similaires. Les mesures ont été effectuées par chromatographie d'exclusion stérique. Le dégreffage des chaînes a été effectué par dissolution des nanoparticules de γ Fe₂O₃ dans une solution d'acide chlorhydrique concentrée.

¹³⁴ Les densités des longueurs des objets sont (en 10¹⁰ cm⁻²) respectivement de 40,20 (γ Fe₂O₃), 9,68 (PSH), 8,80 (DMAc_H et DMAc_D) aux rayons X et 6,86 (γ Fe₂O₃), 1,43(PSH), 0,53 (DMAc_H) et 6,60 (DMAc_D) aux neutrons. Ceci donne donc un $\Delta\rho^2_{\text{cœur}}/\Delta\rho^2_{\text{couronne}}$ de ~ 1250 aux rayons X et un $\Delta\rho^2_{\text{couronne}}/\Delta\rho^2_{\text{cœur}}$ de ~ 75 aux neutrons (les $\Delta\rho^2$ sont calculés par rapport au solvant). En toute rigueur, il eût mieux valu faire la mesure dans du DMAc complètement deutéré pour que l'extinction de cœur soit la plus parfaite possible mais il aurait fallu faire toute la synthèse dans le DMAc_D. Nous avons préféré approcher le contraste du solvant de celui du DMAc_D par dilution.

¹³⁵ Ce modèle est dérivé du modèle d'agrégats fractals déjà présenté dans la partie 1 en note 75. Il faut prendre en compte en plus ici la taille finie des agrégats. A petits q, pour des tailles supérieures à celle de l'agrégat, l'intensité s'écrit I(q) =

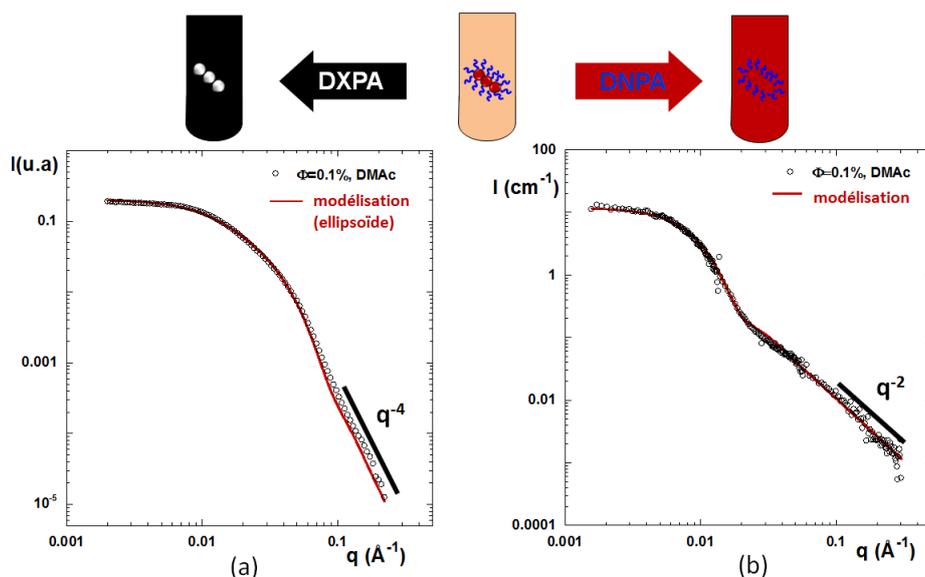


Figure 2.3 : Spectres de diffusion d'une suspension diluée d'objets greffés, identifiables au facteur de forme de l'objet. (a) Mesure par DXPA; (b) mesure par DNPA. Les lignes rouges continues correspondent aux meilleurs ajustements des spectres [89].

agrégation est apparue dès l'étape initiale d'inversion de charge des nanoparticules¹³⁷, aucune des étapes postérieures n'induisant d'agrégation supplémentaire. Le greffage des chaînes a donc eu lieu sur ces agrégats¹³⁸. Le signal des chaînes mesuré en DNPA est caractéristique d'objets polymériques greffés dispersés en contraste de cœur éteint. Le plateau à petits q atteste de l'absence d'agrégation, l'oscillation à q intermédiaire vers $\sim 0,02 \text{ \AA}^{-1}$ provient de l'extinction du facteur de forme de la coquille et la décroissance en q^{-2} aux grands q (contre q^{-4} en contraste « cœur ») est représentatif du signal des chaînes dont on sonde la conformation à ces échelles locales. L'exposant de -2 montre que cette conformation est de type gaussien, le DMAc étant en effet pratiquement un solvant θ pour le PS. Nous avons ajusté ce signal par un facteur de forme d'objets cœur/couronne dérivé d'un modèle initialement développé pour des micelles de copolymères par Pedersen *et alii* [90][91]¹³⁹ permettant de déduire la densité de greffage σ et le R_g des chaînes de la couronne. La σ est élevée ($0,13 \text{ chaînes/nm}^2$ ¹⁴⁰) et le R_g des chaînes est de 92 \AA , supérieur à celui des chaînes en solution (60 \AA). Ceci démontre que les chaînes sont en régime « brosse » et non « champignon » puisque la distance entre les points d'ancrage de ces chaînes sur l'objet est inférieure au R_g des chaînes en solution. L'épaisseur de cette couronne est compatible avec les lois d'échelles des

$\Phi \Delta \rho^2 N_{\text{agg}} P(q)$. L'agrégat ne peut évidemment être considéré comme fractal mais l'introduction d'un exposant D^f , en l'occurrence 1 dans le cas présent, permet de décrire sa morphologie.

¹³⁶ Cette courbe s'approche aussi très bien par le facteur de forme d'un ellipsoïde de révolution dont le petit axe est égal au rayon des nanoparticules et l'excentricité de 4. Ce facteur de forme est plus simple à réinjecter dans le facteur de forme de Pedersen des couronnes puisqu'il s'écrit sous une seule forme analytique.

¹³⁷ Du fait du PZC des nanoparticules de 7,2, les solutions sont floculées milieu basique pour $\text{pH} < 10$, et forment des agrégats plus ou moins larges entre $\text{pH} 10$ et $\text{pH} 12$, diagramme d'état établi avec des contre-ions TAM^+ [161]. Nous nous sommes placés à $\text{pH} 12,3$ avec des contre-ions TBA^+ . Il est possible que le pH d'apparition de ces agrégats soit légèrement décalé par le changement de contre-ions.

¹³⁸ Nous sommes partis du même lot de particules silanisées pour effectuer les polymérisations avec le styrène H ou le styrène D. Le cœur des objets cœur/couronne est donc similaire pour les objets greffés H ou D.

¹³⁹ Ce facteur de forme un peu pédestre, dont la formulation exacte peut être trouvée en appendice de la référence [89], est la somme de 4 termes, respectivement le facteur de forme du cœur, pour lequel nous avons repris le facteur de forme d'ellipsoïde mesuré par DXPA, le facteur de forme des chaînes gaussiennes décrit par la fonction de Debye, un terme de structure entre chaînes au sein de la couronne et un terme croisé décrivant les corrélations cœur/chaîne. Tous les termes faisant intervenir les chaînes ont en pré-facteur le nombre de chaînes N de la couronne. Celui-ci peut donc être évalué par l'ajustement des intensités absolues, permettant de remonter ainsi à σ .

¹⁴⁰ En accord avec des mesures thermogravimétriques qui donnent $0,15 \text{ chaînes/nm}^2$.

brosses de polymères neutres¹⁴¹. En régime concentré, le facteur de structure mesuré expérimentalement démontre l'existence de très fortes répulsions entre nanoparticules, induites par les contraintes stériques entre chaînes, qui assurent la stabilisation des suspensions [89].

II.4 Dispersion des charges dans les matrices polymériques de PS : un large éventail de structures

A partir des briques de bases obtenues dans la partie précédente, nous avons formulé les nanocomposites en utilisant le protocole mis au point au laboratoire basé sur le séchage très lent d'un mélange de chaînes de PS (à 10%v/v) et de nanoparticules co-solubilisées dans le DMac¹⁴². La concentration initiale très forte en chaînes assure une très bonne homogénéité des objets dans le mélange, la taille caractéristique ξ du blob du réseau semi-dilué (11Å) étant très inférieure à la taille des nanoparticules. Ce séchage se fait dans un four à une température de 130°C, c'est-à-dire très au-dessus de la T_g des chaînes de PS (~ 100°C) mais très en dessous de la température d'ébullition du DMac (167°C) pour une durée de 8 jours¹⁴³. La lenteur du processus limite autant que faire se peut les effets hydrodynamiques (instabilités, convection, effet Marangoni) qui pourraient induire des effets d'agrégation incontrôlés ou créer de larges hétérogénéités de concentration dans les échantillons finaux. Cette étape de séchage peut se faire le cas échéant dans des moules spécialement conçus pour imposer à l'échantillon un champ magnétique constant jusqu'à une valeur maximale de 600Gauss¹⁴⁴, une valeur suffisante pour orienter la majorité des nanoparticules dans la direction du champ lorsqu'elles sont dispersées en solution¹⁴⁵.

La caractérisation de l'organisation des nanoparticules dans les fondus après synthèse s'est faite en couplant systématiquement DXPA et TEM. Les mesures de diffusion de rayonnement ne présentant pas d'intérêt spécifique du point de vue de la variation de contraste puisque le système n'est qu'à deux composants ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ versus PS), je ne détaillerai pas les spectres DXPA¹⁴⁶ et me bornerai à une brève description des structures qui seront illustrées par les clichés de microscopie.

Dans le cas des nanoparticules nues, nous avons testé une grande variété de conditions expérimentale (4 tailles de nanoparticules pour une gamme de fraction volumique variant sur près de 4 décades de $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3} = 10^{-5}$ jusqu'à $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3} = 0,05$)¹⁴⁷. Lorsque le séchage n'est pas réalisé sous champ magnétique, les nanoparticules s'organisent en une structure hiérarchique, parfaitement reproductible d'un échantillon à l'autre, qui montre que les nanoparticules se sont agrégées selon

¹⁴¹ L'épaisseur n'est en fait pas facile à évaluer car elle dépend fortement de la courbure de l'interface qui n'est pas simple à appréhender dans le cas de nos agrégats linéaires. L'épaisseur de la couronne obtenue ($2 R_g$, soit 18nm) est cependant encadrée par celle attendue dans le cas d'une brosse plane de chaînes en solvant (40 nm, *via* $h \approx aN\sigma^{1/2}$ [162]) et celle obtenue si le greffage avait été réalisé sur les nanoparticules individualisées (11nm, *via* $h \approx N^{3/5}\sigma^{1/3}r_0^{2/5}$ ou r_0 est la courbure [163]).

¹⁴² Les chaînes de PS et les nanoparticules sont d'abord solubilisées en deux solutions séparées dans le DMac qui sont ensuite mélangées et vigoureusement vortexées afin d'obtenir un mélange homogène. La concentration en nanoparticules est fixée en fonction de la fraction volumique désirée dans l'échantillon final.

¹⁴³ A l'issue du séchage, il reste un peu de DMac résiduel dans les échantillons. La teneur en est de moins de 1%v/v.

¹⁴⁴ Le champ magnétique est imposé par deux plaques de fer aimantées par une série d'aimants permanents NeFeB insérée dans le moule. Le nombre d'aimants permet de faire varier la valeur du champ. Une cartographie des champs effectuée grâce à une sonde à effet Hall montre que le champ appliqué est très homogène, le champ ne variant que de $\pm 2,5\%$ sur la surface du moule (5x5 cm).

¹⁴⁵ Les nanoparticules portent toutes un moment magnétisme permanent. Puisqu'elles peuvent librement tourner en solution sous l'action du mouvement brownien, leur comportement est de type superparamagnétique. Leur courbe d'aimantation suit alors la première loi de Langevin. Pour 600 Gauss, les mesures d'aimantation montrent que près de 50% des nanoparticules sont orientées en moyenne pour les petites tailles de particules considérées. Pour les plus grosses, cette proportion monte à 80% [87].

¹⁴⁶ Le lecteur intéressé par la description des spectres et leur analyse pourra se référer aux publications suivantes : [87](nanoparticules nues hors champ), [92] (nanoparticules sous champ), [93] (objets greffés).

¹⁴⁷ Pour ces échantillons, la masse des chaînes de PS utilisée a toujours été la même : M_w 280 000 g/mol, $I_p = 2$ (Sigma-Aldrich).

un processus impliquant une agrégation en deux étapes distinctes, alors qu'elles étaient initialement parfaitement dispersées avant séchage [87]. Aux échelles locales, elles s'organisent en agrégats primaires denses de quelques dizaines de nanoparticules, et ce jusqu'aux plus faibles fractions de nanoparticules testées. De façon surprenante, la taille de l'agrégat primaire est indépendante de la

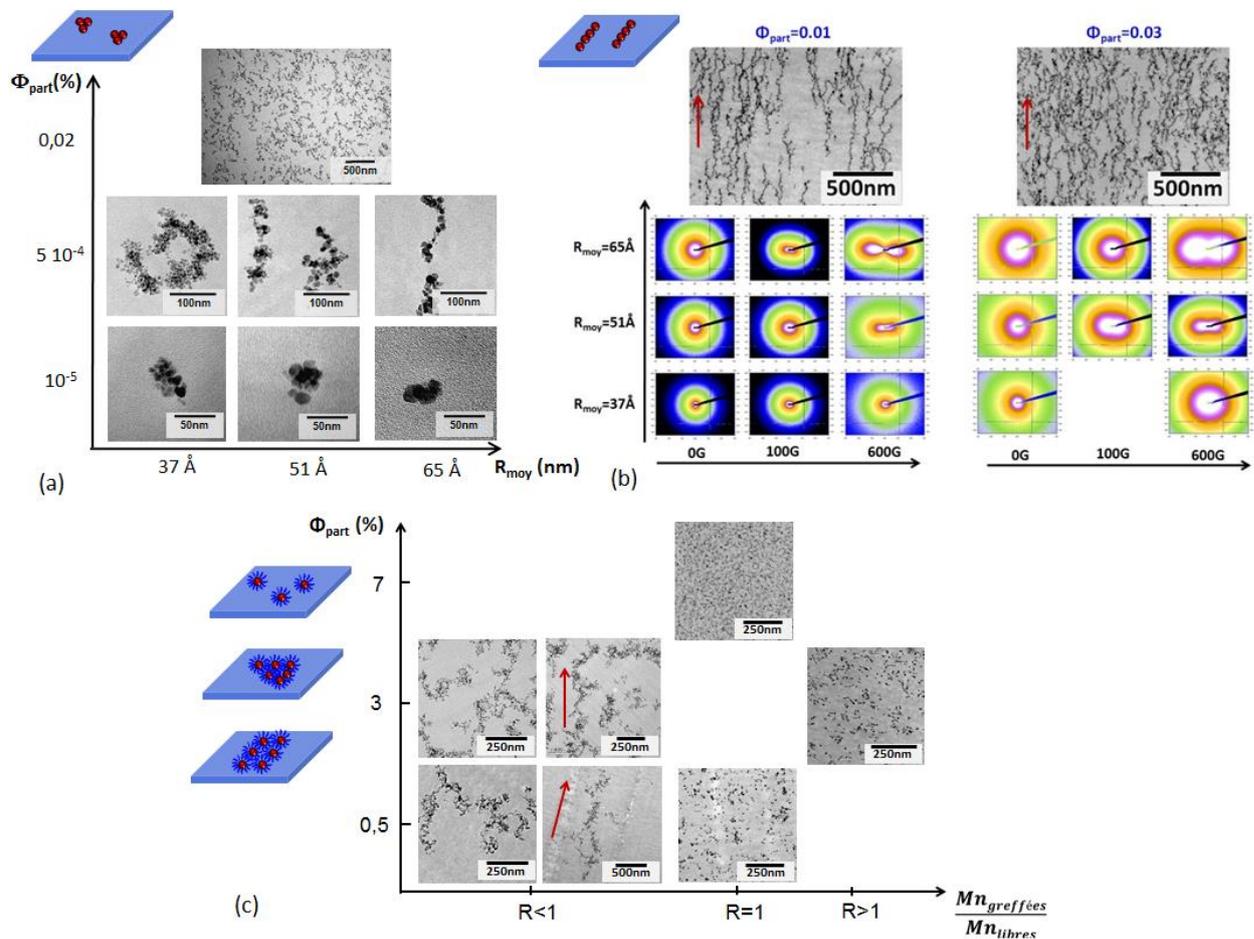


Figure 2.4 : Vue d'ensemble des structures obtenues. (a) *Nanoparticules nues sans champ magnétique* : Influence de R_{moy} et de $\Phi_{\gamma Fe_2O_3}$ (Images TEM)[87] ; (b) *Nanoparticules nues alignées par un champ magnétique* : Influence de R_{moy} et de la valeur du champ pour 2 $\Phi_{\gamma Fe_2O_3}$ (Images TEM et clichés 2D de DXPA) [92]; (c) *Nanoparticules greffées* : Influence de $R_{N/P}$, de $\Phi_{\gamma Fe_2O_3}$ et de l'application d'un champ de 600 Gauss (Images TEM) [93].

taille des nanoparticules ($R_{ag_prim} \sim 170 \text{ \AA}$, figure 2.4.a). Le système adapte ainsi le nombre d'agrégation pour aboutir à cette taille de rayon unique. A ce jour, l'origine de cette agrégation primaire reste mystérieuse¹⁴⁸. Aux échelles intermédiaires, pour $\Phi_{\gamma Fe_2O_3} > 10^{-4}$, ces agrégats primaires s'organisent en amas fractals de taille finie de près de 2000 \AA et de dimension D^f de 1,7. Cette dimension, caractéristique d'un processus d'agrégation de type *Diffusion Limited Aggregation*¹⁴⁹ suggère que la formation de ces amas ne s'est faite qu'au cours d'une seconde étape d'agrégation secondaire. La taille finie de ces amas provient de la divergence de la viscosité lors de l'évaporation progressive du DMAc qui entre en compétition avec ce processus DLA jusqu'à figer le système. Aux grandes échelles, la dispersion des agrégats est très homogène car les images de TEM à bas

¹⁴⁸ Cette agrégation doit intervenir assez rapidement car sa très grande reproductibilité suggère qu'elle n'est pas affectée par l'augmentation de viscosité au cours du séchage. Les attractions directes entre nanoparticules (Van der Waals, dipolaires magnétiques) semblent à exclure puisque la distance moyenne entre ces nanoparticules est supérieure à 40 fois leur diamètre dans les échantillons pour $\Phi_{\gamma Fe_2O_3} = 10^{-5}$. Ces interactions sont alors négligeables [164]. Les interactions de déplétion semblent à exclure puisque la taille du blob des chaînes de PS est très faible. Il n'y a par ailleurs pas de taille caractéristique dans le système initial avant séchage proche de ce rayon final. Si un lecteur a une idée, il peut nous contacter...

¹⁴⁹ La dimension fractale de colloïdes agrégés selon un processus de DLA est de 1,78 [56].

grossissement ne révèlent pas de fluctuations de densité. Une analyse fine des données SAXS permet de remonter à la fraction volumique effective occupée par ces agrégats¹⁵⁰ qui est de ~ 1 lorsque $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3} = 0,03$. Au-delà de cette valeur, les agrégats sont interpénétrés (Figure 2.4.a).

Lorsque le séchage est réalisé en présence d'un champ magnétique, il y a compétition entre les processus menant à la formation d'agrégats isotropes et les interactions dipolaires magnétiques qui tendent à former des chaînes de nanoparticules et croissent fortement à mesure de l'augmentation de la taille de la nanoparticule¹⁵¹ et/ou du champ magnétique imposé. En combinant judicieusement ces deux paramètres, il est alors possible de former une large palette de structures d'anisotropie ajustable, variant d'agrégats isotropes similaires jusqu'à des organisations très spectaculaires (figure 2.4.b) : pour les plus grosses des nanoparticules considérées, il est possible d'obtenir des chaînes 1-D de nanoparticules, distribuées de manière homogène à grande échelle, et toutes orientées dans le sens du champ¹⁵²!

Dans le cas des objets greffés (figure 2.4.c), nous avons sondé une large gamme de $R_{N/P}$ variant de 0,09 à 2,83 en passant par le cas $R_{N/P} = 1$ ¹⁵³ et avons obtenu les structures attendues entre 0,09 et 1, à savoir la formation d'agrégats lorsque $R_{N/P} < 1$ et une dispersion parfaite et extrêmement homogène pour $R_{N/P} = 1$ (cf note 112), et ce jusqu'à des concentrations très élevées en objets greffés¹⁵⁴. Les amas formés pour $R_{N/P} < 1$ sont composés de quelques dizaines à quelques centaines d'objets, avec une compacité variant fortement d'un échantillon à l'autre et sont organisés de façon très uniforme à grande échelle¹⁵⁵ [93]. La valeur du seuil $R_{N/P}^*$ de la transition « wet-to-dry » se situe entre 0,4 et 1, une valeur plus élevée que pour les mêmes types de systèmes formés à base d'objets greffés à cœur de silice ($R_{N/P}^* \sim 0\sim 24$ [82]). Nous avons attribué cette différence de comportement à des effets de courbure¹⁵⁶. Lorsque $R_{N/P} > 1$, la dispersion reste très bonne bien qu'imparfaite, de petits agrégats s'étant formés. Cet écart au comportement supposé, *id est* une dispersion parfaite, provient probablement du fait que nous avons été forcés d'utiliser des chaînes ayant une masse inférieure à la masse d'enchevêtrement du PS (18000 g/mol) pour atteindre de tels $R_{N/P}$. Il est alors possible que les défauts d'enchevêtrement aient conduit à cette agrégation partielle lors du séchage¹⁵⁷.

¹⁵⁰ On peut en effet exprimer la fraction volumique effective en fonction de la fraction introduite en fonction des rayons respectifs des agrégats primaires et secondaires et du nombre d'agrégation total.

¹⁵¹ Puisque le module du moment magnétique est proportionnel au volume de la nanoparticule.

¹⁵² En particulier, pour les plus hautes concentrations, il est possible qu'un réseau 1-D ait été formé, à savoir qu'il existe des chemins percolants à travers l'échantillon dans le sens d'application du champ magnétique, mais pas dans le sens transverse.

¹⁵³ Précisément nous avons testé les cas : $R_{N/P} = 0,09$ (M_n couronne 26000 g/mol, M_n matrice 285000 g/mol); $R_{N/P} = 0,26$ (M_n couronne 17000 g/mol, M_n matrice 65000 g/mol); $R_{N/P} = 0,40$ (M_n couronne 26000 g/mol, M_n matrice 65000 g/mol); $R_{N/P} = 1$ pour deux masses différentes (de M_n respectivement de 17000 et 26000 g/mol); $R_{N/P} = 1,21$ (M_n couronne 17000 g/mol, M_n matrice 14000 g/mol); $R_{N/P} = 2,83$ (M_n couronne 26000 g/mol, M_n matrice 9200 g/mol).

¹⁵⁴ Nous avons en effet travaillé jusqu'à $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3} = 0,07$. Si l'on postule que la couronne de chaînes greffées n'est pas collapsée, il est possible d'évaluer l'épaisseur de la couronne, et ce faisant la fraction volumique occupée par les objets greffés qui est de près de 50% pour les plus hautes $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$ considérées.

¹⁵⁵ La dimension fractale des échantillons varie en effet de 1,7 à $R_{N/P} = 0,09$ à 2,1 à $R_{N/P} = 0,40$ en passant par 2,6 à $R_{N/P} = 0,26$! Dans ce dernier cas, nous avons fait une mesure de la structure en DPAX jusqu'à des très petits q sur un montage Bonse-Hart, qui présente un très beau pic de corrélation entre amas et une diffusion qui décroît lorsque $q \rightarrow 0$, démontrant qu'il n'y a pas de fluctuations de densité en nanoparticules aux échelles mésoscopiques [93].

¹⁵⁶ Des simulations avaient en effet montré que la courbure décale le seuil $R_{N/P}^*$ vers les hautes valeurs $R_{N/P}$, jusqu'à 1 pour des brosses planes, comme discuté dans [93]. Or, comme indiqué au paragraphe précédent, le greffage ne s'est pas fait sur des nanobilles isolées mais plutôt sur des trimères linéaires, l'objet greffé a donc une courbure moins importante que les nanobilles de silice de la référence [83].

¹⁵⁷ Plus précisément, on pourrait imaginer que la cinétique du séchage de l'échantillon soit plus rapide, et de ce fait que d'éventuelles instabilités hydrodynamiques soient moins contrôlées ou qu'il existe des gradients de solvant, induisant *in fine* une agrégation partielle. Il est également possible que la diffusion des objets reste importante dans les derniers moments du séchage, relativement au cas où les chaînes sont enchevêtrées, favorisant ainsi d'éventuels mécanismes d'agrégation.

Dans le cas $R_{N/P} < 1$, nous avons testé la possibilité d'alignement des nanoparticules par le champ magnétique pendant le séchage. Il apparaît que les échantillons présentent une structure finale légèrement anisotrope, l'anisotropie demeurant néanmoins nettement moins marquée que dans le cas des échantillons formés à bases de billes nues. L'agrégation des nanoparticules greffées s'est en effet déroulée en deux étapes successives, avec la formation initiale d'agrégats au sein desquels les nanoparticules adoptent exactement la même structure que lorsque le champ n'est pas appliqué, suivie de la formation de chaînes de quelques agrégats¹⁵⁸. Nous avons donc démontré qu'il est possible d'exercer un double contrôle de la structure de la dispersion finale des objets dans le fondu en couplant le greffage chimique des objets et l'application d'un champ externe pendant l'élaboration des échantillons.

Au final, le choix des briques constitutives de notre système modèle s'est révélé judicieux puisqu'il nous a permis d'obtenir un éventail de structures extrêmement variées et reproductibles sur de vastes domaines de concentration, préalable indispensable à l'étude des modèles de renforcement.

II.5 Couronne hydrogénée et matrice deutérée : une mesure directe de la conformation des brosses dans les objets greffés

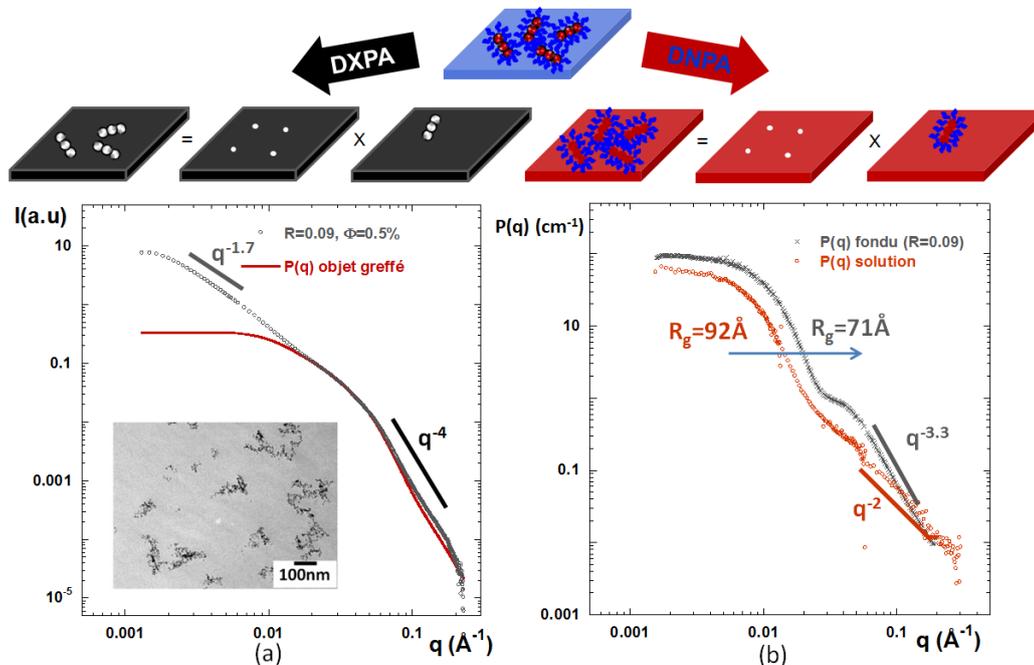


Figure 2.5 : Conformation des chaînes greffées pour $R_{N/P} = 0,09$ et $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3} = 0,005$. (a) Mesure DXPA de l'échantillon permettant l'obtention du facteur de structure décrivant l'organisation des centres de masse par division du facteur de forme des cœurs de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (insert : image TEM de l'échantillon) ; (b) Facteur de forme des chaînes de la couronne dans les nanocomposites obtenu après division du spectre de DNPA par le facteur de structure adimensionné, et comparé au facteur de forme des chaînes en solution dans le DMA_c [93].

Dans les systèmes d'objets greffés, il était postulé que le moteur contrôlant l'état de dispersion final est l'entropie de mélange entre chaînes greffées et chaînes de la matrice, un gonflement des chaînes à $R_{N/P} \geq 1$ favorisant la dispersion ou, à l'inverse, un effondrement des chaînes à bas $R_{N/P}$ menant à la formation d'agrégats. Or, si cette assertion avait été directement vérifiée pour le cas

¹⁵⁸ Ce scénario d'agrégation en deux étapes est étayé par la comparaison des spectres X des échantillons séchés respectivement hors champ et sous champ qui sont strictement similaires aux q grands et intermédiaires où l'on sonde la structure interne de l'agrégat. Ils ne diffèrent qu'aux petits q dans le domaine où l'on caractérise l'organisation des agrégats à grande échelle. Les agrégats ayant une structure fractale très peu compacte, ils ont une aimantation très faible et s'alignent donc difficilement sous champ magnétique.

dispersé [83]¹⁵⁹, elle n'avait été qu'indirectement démontrée dans le cas agrégé, à partir de valeurs d'épaisseur de couronne déduites de la mesure de la distance entre centres de masse des objets greffés [82]. C'est donc une mesure *directe* de la conformation que nous avons voulu effectuer dans ce cas, la mesure étant triviale par DNPA dans nos systèmes puisqu'il suffit d'utiliser une couronne hydrogénée et une matrice deutérée pour que l'intensité diffusée se réduise à celle des seules chaînes de la couronne. Les objets greffés étant organisés en amas, il faut néanmoins s'affranchir de la forte contribution du facteur de structure inter-objets à cette intensité pour obtenir proprement le facteur de forme des chaînes greffés¹⁶⁰. C'est la complémentarité X/neutrons qui a permis de faire simplement cette opération, les courbes de diffusion ayant été divisées du facteur de structure obtenu par DXPA¹⁶¹ (cf figure 2.5.b). Au final, il apparaît qu'aux grands q , l'intensité chute plus fortement que pour une chaîne gaussienne (respectivement $q^{-3,3}$ pour $R_{N/P} = 0,09$ et $q^{-2,6}$ pour $R_{N/P} = 0,4$), le rayon de giration des chaînes extrait des mesures¹⁶² étant pour sa part beaucoup plus faible que celui déterminé lorsqu'elles sont en solvant θ (71 Å à $R_{N/P} = 0,09$ et 76 Å à $R_{N/P} = 0,4$ contre 92 Å en solution). Ces résultats démontrent ainsi, pour la première fois dans la littérature par une mesure directe, que les chaînes des brosses sont bel et bien collapsées pour les faibles $R_{N/P}$.

II.6 Conformation des chaînes du fondu dans les nanocomposites au repos

Je présente dans cette partie les mesures de conformation de chaînes libres du fondu que nous avons effectuées sur nos échantillons au repos. Quand nous avons débuté cette étude, les comportements décrits à partir de simulations numériques de type Monte-Carlo étaient contrastés. Si certains travaux prédisaient que l'introduction des nanoparticules n'affectait pas les chaînes du fondu, d'autres prédisaient au contraire que la présence des nanoparticules pouvait induire une extension (pour $R_{part} < R_g$) ou une contraction (pour $R_{part} \approx R_g$) de ces chaînes. Les très rares mesures expérimentales tendaient à confirmer le premier scénario car aucune modification de la conformation des chaînes n'avait été observée lors de l'ajout de nanoparticules incompressibles dans des matrices de PS [94][80][95]¹⁶³. Notre objectif était de déterminer si l'on pouvait donner un caractère universel à ce résultat en explorant sur notre système modèle toutes les situations expérimentales qu'il est possible de rencontrer pour un couple particule/polymère donné (nanoparticules nues ou greffées d'homopolymères, dispersions parfaite ou formation d'agrégats, agrégats isotropes ou anisotropes et alignés¹⁶⁴).

Les mesures existantes avaient toutes été faites sur des systèmes d'objets non greffés par la méthode élégante du contraste moyen nul, dans laquelle le facteur de forme des chaînes est obtenu en une unique mesure sur un échantillon conçu du point de vue du contraste (*cf prologue*). Le fait de n'avoir qu'un seul spectre à mesurer expérimentalement fait évidemment toute la force de cette méthode mais est cependant également une faiblesse parce qu'il ne permet pas de vérifier que le

¹⁵⁹ Par DNPA, sur des systèmes de billes de silice et de chaînes libres de PS faites d'un copolymère statistique PSH/PSD ayant la même densité de longueur de diffusion que la silice, permettant ainsi l'extinction des cœurs de silice.

¹⁶⁰ Les spectres montrent évidemment de fortes remontées aux petits angles ne permettant d'évaluer ni la masse de la couronne ni le rayon de giration des chaînes. En outre, pour qui cherche à modéliser le facteur de forme des chaînes, la « pollution » de l'intensité diffusée par le facteur de structure est particulièrement importante dans la zone des q intermédiaires où apparaît un pic de corrélation marqué, lié au contact entre objets greffés.

¹⁶¹ Les objets greffés étant centro-symétriques, l'intensité s'écrit comme le produit du facteur de forme et d'un facteur de structure. Le facteur de forme des objets se réduisant à celui des cœurs de maghémite lors des mesures de DPAX, il est très simple d'extraire le $S(q)$ de ces mesures puis de le réinjecter dans le signal mesuré aux neutrons pour obtenir le facteur de forme des couronnes.

¹⁶² Pour évaluer ce rayon, nous avons modélisé la courbe utilisé le modèle de Pedersen décrit en note 139.

¹⁶³ Des changements de conformation avaient été observés sur des systèmes formés de matrice de PS renforcées de billes de PS réticulées [165][166]. Ces sphères molles ne sont pas représentatives de nos systèmes.

¹⁶⁴ Le cas anisotrope présente un intérêt particulier car si la distance entre chaînes est inférieure au R_g des chaînes, on se trouve dans une situation telle que $R_{part} < R_g$ perpendiculairement aux chaînes et $R_{part} > R_g$ parallèlement aux chaînes.

signal n'est pas pollué par des termes de structure résiduels non éteints. Certaines des mesures reportées présentaient en effet des caractéristiques (corrélations aux q intermédiaires ou remontée aux petits angles) qu'il était difficile d'assigner de façon certaine à un signal de conformation de chaîne [94][80] [95]. Afin d'améliorer la confiance que l'on peut avoir dans les résultats expérimentaux, Jouault *et alii* ont utilisé un procédé astucieux en rajoutant un quatrième composant dans l'échantillon constitué d'un copolymère statistique de PS composé d'unités monomériques hydrogénées et deutérées, ayant la même densité de longueur de diffusion que les nanoparticules [80]. Les conditions de contraste moyen nul restent valables puisqu'il n'y a toujours que trois composants en termes de contraste. Cet ajout permet de diluer les chaînes marquées et de minimiser l'impact d'éventuels écarts aux conditions idéales de contraste moyen nul. Outre le coût de synthèse, la contrepartie négative de ce procédé est qu'il faut s'assurer qu'il n'y a pas de blocs H ou D suffisamment longs dans le copolymère qui pourraient perturber la mesure. C'est pour nous affranchir de ces défauts inhérents à la méthode du contraste moyen nul que nous avons choisi de faire nos mesures par la méthode d'extrapolation à concentration nulle, plus robuste car permettant de vérifier l'extinction des termes de facteur de structure, et rendue possible par le fait que $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ et PS_D sont de même densité de longueur de diffusion. Il est par ailleurs intéressant de remarquer que les mesures de DNPA ne permettent pas de mesurer la conformation de chaînes libres dans des systèmes formulés avec des objets greffés d'homopolymères, et ce quelle que soit la méthode choisie, contraste moyen nul ou extrapolation à concentration nulle, car les termes de diffusion liés au signal du cœur et de la couronne ne peuvent être tous annulés simultanément, *sauf dans le cas où la couronne possède le même ρ que le cœur*. Cette condition particulière de contraste étant remplie naturellement dans notre système quand les couronnes sont deutérées, nous avons donc pu réaliser des mesures de conformation de chaînes libres dans des nanocomposites contenant des objets greffés, les premières de ce genre à notre connaissance¹⁶⁵.

La figure 2.6.a présente les résultats obtenus sur des échantillons de billes nues pour 5 rapports $\text{PS}_\text{H}/\text{PS}_\text{D}$ (à $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3} = 3\%$ dans des matrices de chaînes de PS de $M_w \sim 130000 \text{ g/mol}$ ¹⁶⁶). Nous avons vérifié préalablement aux mesures neutrons par DXPA que l'organisation des nanoparticules est parfaitement reproductible d'un échantillon à l'autre. Il existe de fortes remontées aux petits angles sur tous les spectres dues à la présence de micro-craquelures. Ce signal parasite ne peut être soustrait de façon consistante pour la globalité des échantillons car son intensité dépend à la fois du contraste entre la matrice et l'air *et* du nombre de micro-craquelures, deux paramètres qui peuvent varier d'un échantillon à l'autre de façon non corrélée. L'échantillon témoin réalisé avec la matrice purement deutérée permet de vérifier que l'extinction du signal des nanoparticules est pratiquement parfaite¹⁶⁷. Dans le nanocomposite à matrice purement hydrogénée qui ne contient que deux types de diffuseurs, le signal est uniquement dû aux nanoparticules. L'introduction progressive de chaînes deutérées fait apparaître le signal des chaînes au détriment de celui des nanoparticules qui disparaît concurremment. Ceci se traduit par la diminution du signal aux petits q lié aux agrégats qui s'accompagne d'un changement de la pente aux grands q , depuis le q^{-4} du

¹⁶⁵ Il est en fait possible de faire ce type de mesure dans n'importe quel système expérimental donné à condition de synthétiser la couronne avec des copolymères statistiques H/D de ρ équivalent au cœur de la particule. Ceci requiert évidemment un gros travail préparatoire, en particulier si les monomères hydrogénés et deutérés ont des réactivités différentes.

¹⁶⁶ Ces chaînes, synthétisées par les bons soins d'Anne-Sophie par polymérisation radicalaire classique, ont des caractéristiques très proches : $M_w \sim 124000 \text{ g/mol}$ et $M_n \sim 67000 \text{ g/mol}$ (IP 1,85) pour les chaînes hydrogénées et $M_w \sim 131000 \text{ g/mol}$ et $M_n \sim 69000 \text{ g/mol}$ (IP 1,9) pour les chaînes deutérées.

¹⁶⁷ Outre le signal des microcraquelures, il reste un très faible signal résiduel lié aux nanoparticules, visible essentiellement aux q intermédiaires, leur ρ différant légèrement de celle du PSD. L'intensité de ce signal est néanmoins inférieure de près de 2 ordres de grandeur à celui des autres échantillons dans la gamme de q d'intérêt.

facteur de forme des nanoparticules jusqu'à une loi de décroissance en q^{-2} , caractéristique du signal d'une chaîne gaussienne, dans l'échantillon à 25% de chaînes hydrogénées. La courbe extrapolée à partir des échantillons aux 4 fractions de chaînes hydrogénées (25%, 50%, 75% et 100%) est présentée sur la figure 2.6.c. La partie située en dessous de $0,008 \text{ \AA}^{-1}$ n'est pas exploitable car le signal des microcraquelures perturbe trop le signal de l'échantillon pour permettre une extrapolation correcte¹⁶⁸. La partie exploitable de la courbe se modélise parfaitement par une fonction de Debye avec un rayon de giration de 105 \AA , valeur similaire aux erreurs expérimentales près à celle que nous avons mesuré pour le fondu sans nanoparticules (110 \AA)¹⁶⁹. *La conformation des chaînes n'est donc pas affectée par la présence des nanoparticules.*

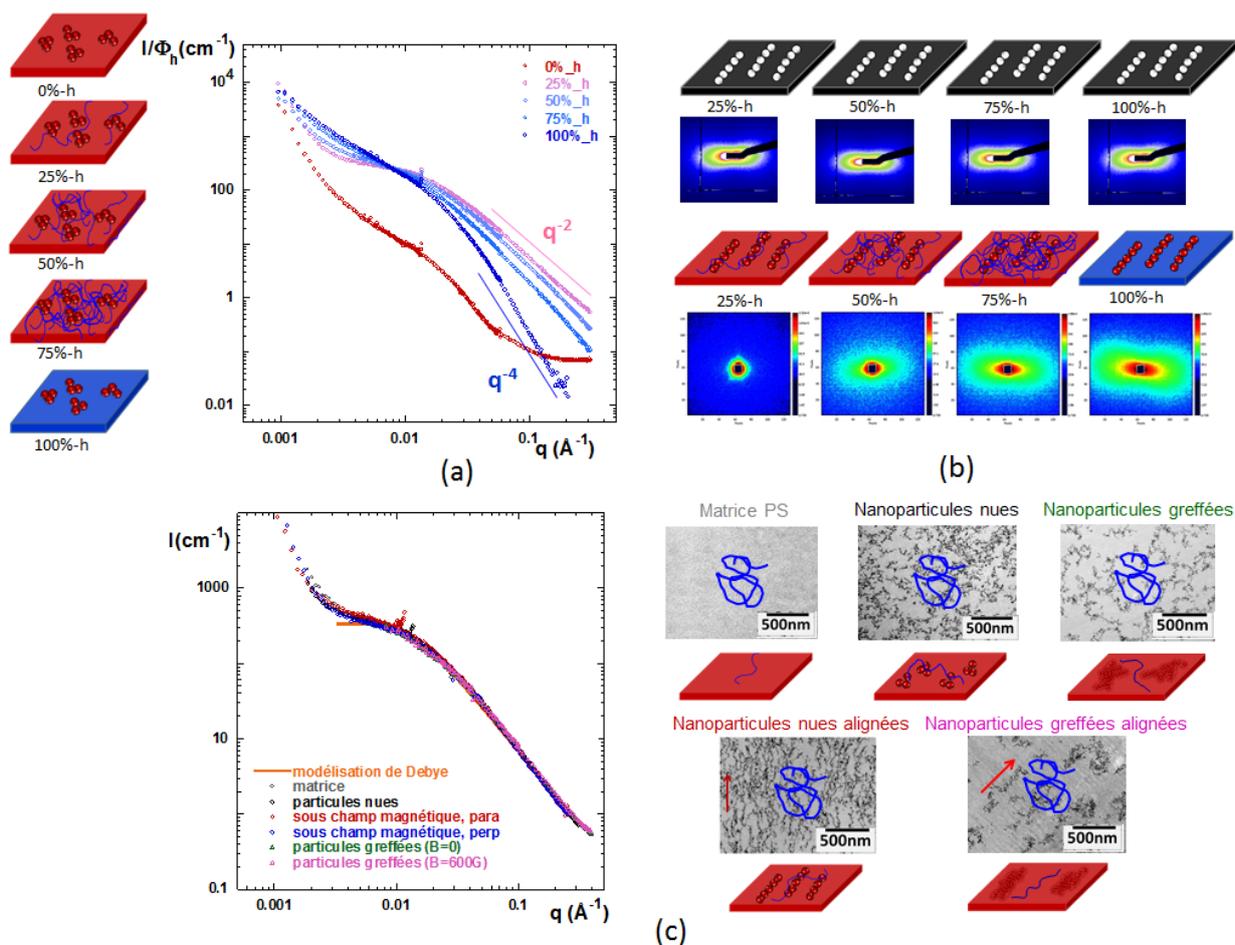


Figure 2.6 : Conformation des chaînes de la matrice dans les nanocomposites au repos. (a) Spectres DNPA des systèmes de nanoparticules nues non alignées ($\Phi_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = 3\%$) à différentes fractions en chaînes H, normalisés par Φ_H ; (b) Comparaison des spectres 2D DXPA et DNPA pour les systèmes de nanoparticules nues alignées à différentes fractions en chaînes H ($\Phi_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = 3\%$); (c) bilan des mesures pour toutes les types d'organisation structurale de charges obtenus (spectres DNPA après regroupement 1D à gauche et images TEM des échantillons à droite). Pour les données anisotropes, les regroupements sont réalisés selon des secteurs respectivement parallèle et perpendiculaire à l'axe du champ magnétique imposé pendant la formulation (seul le regroupement parallèle est présenté dans le système de nanoparticules greffés alignées). La courbe continue orange ajustant les données des DNPA est une fonction de Debye correspondant à un comportement gaussien des chaînes ($R_g = 105 \text{ \AA}$).

En pratique, il apparaît que la courbe mesurée dans l'échantillon à 25% de chaînes H se superpose quasiment avec la courbe extrapolée, le signal du facteur de forme dominant alors

¹⁶⁸ Les intensités expérimentales extraites des mesures pour un q donné ne sont d'ailleurs plus linéaires en fonction de la fraction en chaînes dans ce domaine de q .

¹⁶⁹ Ce R_g est cohérent avec la masse des chaînes estimée à partir de l'intensité du plateau de Guinier (150000 g/mol), très proche de celle déterminée par GPC. Pour le PS, $R_g = 0,275M_w^{1/2}$ [11], ce qui donne un M_w de 145000 g/mol pour un R_g de 105 \AA .

complètement les termes de facteurs de structure. Ceci s'observe aussi sur les spectres 2D d'échantillons réalisés avec des billes nues à $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3} = 3\%$ alignées sous champ : alors que toutes les spectres DXPA sont similaires et fortement anisotropes, l'anisotropie décroît progressivement sur les spectres neutrons à mesure de l'augmentation de chaînes D jusqu'à devenir complètement isotrope pour l'échantillon à 25% de chaînes H (Figure 2.6.b). Ceci montre qualitativement que l'alignement des nanoparticules n'a pas entraîné l'alignement des chaînes. *Cette expérience est ainsi une démonstration expérimentale visuelle élégante du principe de l'extrapolation à concentration nulle.* Une étude propre du signal démontre qu'il n'y a dans ce cas anisotrope aucune influence des nanoparticules sur la conformation des chaînes, à l'instar de ce qui est observée dans le cas isotrope.

Les mesures d'extrapolation à concentration nulle étant très coûteuses en quantité de nanoparticules puisqu'il faut dupliquer les échantillons, nous avons décidé de ne faire les mesures sur les nanocomposites renforcés d'objets greffés à couronne deutérée que sur les échantillons contenant 25% de chaînes H, en postulant que le signal mesuré ne provient que du facteur de forme des chaînes. Ceci nous a permis de sonder la conformation des chaînes dans des situations très variées : formation de gros agrégats ($R_{N/p} < 1$), isotropes ou alignés sous champ, dispersion des charges ($R_{N/p} = 1$) et dispersion hétérogène des charges ($R_{N/p} > 1$), et ce pour différentes $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$. Quelles que soient les conditions, aucune modification de la conformation de la chaîne n'est observée, comme la montre la Figure 2.6.c. *Cette étude exhaustive nous a donc permis de démontrer sans ambiguïté que la présence des charges n'influence pas la conformation des chaînes au repos, en accord avec les toutes mesures les plus récentes sur le sujet.*

II.7 Evolution de la microstructure des renforts et de la conformation des chaînes sous étirement uniaxial

La question qui se pose ensuite est évidemment de savoir si le comportement des chaînes du fondu dans les nanocomposites reste similaire à celui des chaînes du fondu sous étirement, dans des situations pour lesquelles les propriétés mécaniques macroscopiques sont notablement modifiées par l'adjonction des charges.

Un peu de mécanique...

Pour répondre à cette question, je commence par donner un bref aperçu des caractérisations mécaniques faites sur les échantillons à base de nanoparticules nues¹⁷⁰ couplant mesures d'élongation uniaxiale¹⁷¹ et rhéologie oscillatoire en géométrie plan-plan pour sonder respectivement les régimes de faibles déformations et de grandes déformations.

Pour les échantillons isotropes synthétisés hors champ, nous observons des modifications de comportement similaires à celles déjà observées sur des fondus de polystyrène dopés de billes de silice, à savoir : (i) aux grandes déformations, une forte augmentation du module d'Young E induite par l'introduction des nanoparticules, l'évolution de E versus $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$ étant linéaire à bas $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$ puis beaucoup plus marquée au-delà d'un seuil correspondant à la concentration de recouvrement des agrégats, et, dans le régime non linéaire des très grandes élongations, une forte élévation du niveau de contrainte en présence des nanoparticules par rapport au fondu de référence¹⁷²; (ii) aux

¹⁷⁰ Les études antérieures menées sur des systèmes formés de matrice PS dopées de nanoparticules de silice greffées montrent que l'impact le renforcement mécanique du fondu induit par les objets greffés est en fait très limité, ce qui nous a incités à nous focaliser sur le cas des nanoparticules nues pour « tester » le modèle de renforcement.

¹⁷¹ Les mesures ont été réalisées 15°C au-dessus de la T_g des échantillons, mesurée préalablement par DSC.

¹⁷² Pour des nanoparticules de 37Å de rayon, le module d'Young augmente de près d'un facteur 2 dès $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3} = 0,01$, croît ensuite linéairement avec $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$, puis diverge au-delà de la concentration de recouvrement de 0,03, estimé à partir des mesures de DXPA [87]. Puisqu'il n'est pas possible d'établir formellement qu'il existe un chemin percolant dans

faibles déformations, une augmentation de la valeur du plateau caoutchoutique couplé à l'apparition d'un temps long aux basses fréquences de sollicitation. Dans ce régime, nous avons cependant pu raffiner la description du comportement des systèmes en jouant sur le fait que la morphologie structurale très particulière de nos échantillons permet de varier la surface spécifique de contact charge/polymère sans changer ni l'organisation des agrégats à grande échelle ni $\Phi_{\gamma\text{Fe}2\text{O}_3}$ ¹⁷³. Nous avons ainsi pu démontrer que les courbes des modules G' et G'' en fonction de la fréquence sont reproductibles si $\Phi_{\gamma\text{Fe}2\text{O}_3}$ est maintenue constante, et ce quelle que soit la surface spécifique des échantillons. Ceci démontre que les mécanismes modifiant les propriétés mécaniques sont à longue portée¹⁷⁴.

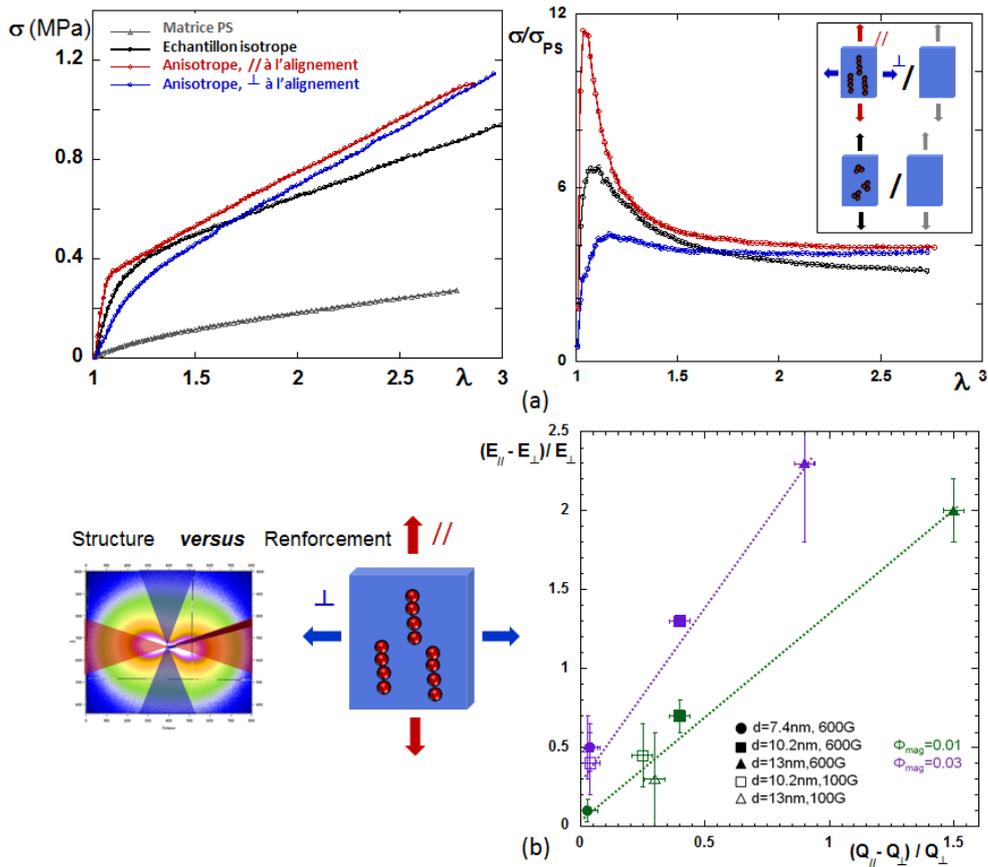


Figure 2.7 : Propriétés mécaniques d'échantillons à base de nanoparticules nues dans le régime des fortes déformations [92]: (a) (*gauche*) Mesures d'élongation uniaxiale de 2 échantillons à $\Phi_{\gamma\text{Fe}2\text{O}_3} = 3\%$, respectivement isotrope et aligné par un champ magnétique de 600 Gauss, et de la matrice PS de référence. λ est le rapport d'élongation entre la longueur de l'échantillon étiré L et la longueur initiale de l'échantillon L_0 ; (*droite*) Données des échantillons renforcés de la figure de la gauche normalisées de la contrainte de la matrice, comme représenté dans l'insert. (b) Rapport d'anisotropie mécanique à basse élongation *versus* rapport d'anisotropie structurale. La courbe de droite rassemble toutes les données des échantillons anisotropes formulés.

Pour les échantillons anisotropes synthétisés sous champ, les résultats sont spectaculaires et beaucoup plus originaux. Pour les échantillons les plus anisotropes formés de chaînes de

l'échantillon, cette divergence peut être soit liée à la percolation du réseau de charges, soit à des effets d'enchevêtrements entre agrégats. Aux grandes élongations, l'augmentation du niveau de contrainte résiduelle est linéaire avec $\Phi_{\gamma\text{Fe}2\text{O}_3}$, et donc avec la surface de contact entre nanoparticules et chaînes de la matrice [96]. Si l'on suppose que les mécanismes de rotation/rupture n'opèrent plus dans ce régime, on peut légitimement l'attribuer aux interactions charges/polymères [96].

¹⁷³ Il suffit juste de changer la taille de la nanoparticule de départ dans ces structures de type « agrégats d'agrégats primaires ». En effet, puisque le rayon de ces agrégats primaires ne dépend pas de cette taille de nanoparticule, il s'ensuit que la surface spécifique des agrégats varie nécessairement d'une taille de nanoparticule à une autre.

¹⁷⁴ Puisque les variations de quantité d'interface considérées ne permettent pas de voir de différences, les mécanismes opérant ne sont pas liés à la relaxation, la conformation ou l'adsorption des chaînes de polymère au voisinage immédiat des nanoparticules.

nanoparticules orientées, il apparaît que le renforcement à basse élongation est beaucoup plus fort lorsque l'étirement est réalisé parallèlement aux chaînes de nanoparticules que perpendiculairement (figure 2.7.a). Le module d'Young d'un seul et même échantillon peut ainsi varier près d'un facteur 3 fois selon la direction de sollicitation, et ce pour des $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$ relativement faibles de 0,03 ! Aux élongations intermédiaires, la courbe de renforcement présente un maximum dans le sens d'étirement parallèle mais pas dans le sens perpendiculaire, ce que l'on peut attribuer à la rupture d'un réseau de chaînes 1-D de nanoparticules connectées¹⁷⁵. Enfin, de façon remarquable, le niveau de contrainte devient indépendant de la direction de l'étirement aux très grandes élongations, et ne dépend plus alors que de la $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$ introduite¹⁷⁶, ce qui suggère que les contributions au renforcement spécifiquement liées à la réorganisation structurale des agrégats de nanoparticules sous déformation n'opèrent plus dans ce régime.

Qualitativement, il apparaît ainsi que l'anisotropie des propriétés mécaniques des échantillons est d'autant plus prononcée que l'anisotropie de la microstructure est importante [92]. Nous avons alors cherché à déterminer si la corrélation entre ces deux quantités, l'une macroscopique et l'autre microscopique, était quantitative. Pour ce faire, nous avons alors tracé le rapport d'anisotropie mécanique $(E_{\parallel} - E_{\perp})/E_{\perp}$, en fonction du rapport d'anisotropie microstructurale issu des données de DXPA $(Q_{\text{hori}} - Q_{\text{vert}})/Q_{\text{vert}}$ ¹⁷⁷, et ce pour tous les échantillons anisotropes formulés (figure 2.7.b). Pour une $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$ donnée, toutes les valeurs se rassemblent sur une droite maîtresse ! L'anisotropie microstructurale est donc directement convertie en anisotropie mécanique, en accord avec le fait que le module d'Young est proportionnel à la fraction volumique en renforts au premier ordre. Cette courbe maîtresse est, à notre connaissance, la première démonstration expérimentale quantitative directe du lien existant entre microstructure des renforts et propriétés mécaniques dans les nanocomposites !

Les spectres de diffusion 2D d'échantillons trempés : des instantanés de l'évolution de la structure sous étirement

Fort de ces caractérisations mécaniques macroscopiques, il ne reste plus qu'à déterminer l'évolution structurale des briques constitutives du nanocomposite sous déformation pour discuter les *scenarii* possibles de renforcement proposés dans la littérature. Pour ce faire, nous avons mesuré les spectres d'échantillons étirés à une élongation donnée puis trempés¹⁷⁸, et composés de billes nues et d'une matrice formée d'un mélange de 25% de chaînes H et de 75% chaînes D. Dans ces

¹⁷⁵ Afin de mettre en exergue les effets spécifiquement liés spécifiquement aux nanoparticules, on normalise traditionnellement la contrainte du nanocomposite par celle de la matrice seule de PS pour aboutir à la courbe de renforcement. La présence d'un maximum sur une telle courbe est généralement associée à la rupture du réseau percolant d'agrégats de nanoparticules, le système relâchant partiellement les contraintes après la rupture. Ce maximum n'existe ainsi pas en régime dilué. La courbe de contrainte de l'échantillon anisotrope apparaît donc comme celui d'un système concentré percolant lorsque le système est étiré parallèlement aux chaînes et dilué lors d'un étirement dans le sens perpendiculaire.

¹⁷⁶ Ce niveau de contrainte des échantillons à structure anisotrope à très grande déformation est d'ailleurs pratiquement égal à celui de l'échantillon isotrope formulé avec la même $\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$.

¹⁷⁷ Pour évaluer le rapport d'anisotropie mécanique, nous avons simplement utilisé les valeurs des modules d'Young E_{\parallel} et E_{\perp} obtenus respectivement en étirant l'échantillon parallèlement ou perpendiculairement au champ magnétique imposé, et donc aux chaînes de nanoparticules. Le critère permettant de quantifier l'anisotropie microstructurale des échantillons à partir des spectres 2D de diffusion aux petits angles était cependant beaucoup moins trivial à évaluer puisque l'anisotropie dépend du vecteur de diffusion q . Nous avons alors fait le choix de faire des regroupements des données 2D obtenues sur les échantillons au repos selon les axes de la figure, respectivement horizontalement puis verticalement (l'axe vertical correspondant à la direction selon laquelle le champ magnétique avait été imposé), puis de calculer la quantité $\int I(q)q^2 dq$ pour chacun de ces regroupements, soit le pendant sur une direction de l'invariant de diffusion Q calculé usuellement en 3D. Comme cet invariant est égal à $2\pi^2\Phi(1-\Phi)\Delta\rho^2$, le rapport $(Q_{\text{hori}} - Q_{\text{vert}})/Q_{\text{vert}}$ est relié aux rapport des fractions volumiques effectives dans les deux directions, soit $\sim (\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\parallel} - \Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\perp})/\Phi_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3\perp}$.

¹⁷⁸ Après étirement à $T_g + 15^\circ\text{C}$, soit à environ 120°C , les échantillons sont brutalement refroidis à l'aide d'une soufflette. Les structures sont donc complètement figées lors des mesures de diffusion aux petits angles réalisées à température ambiante.

conditions de contraste, en prenant deux clichés de diffusion, l'un avec des neutrons et l'autre avec des rayons X, on capture respectivement la structure des chaînes polymériques et celle des charges à cette elongation. Il est alors possible de parcourir l'isotherme de contrainte-déformation en prenant des clichés successifs afin d'élaborer une « chronophotographie » de l'évolution du système¹⁷⁹.

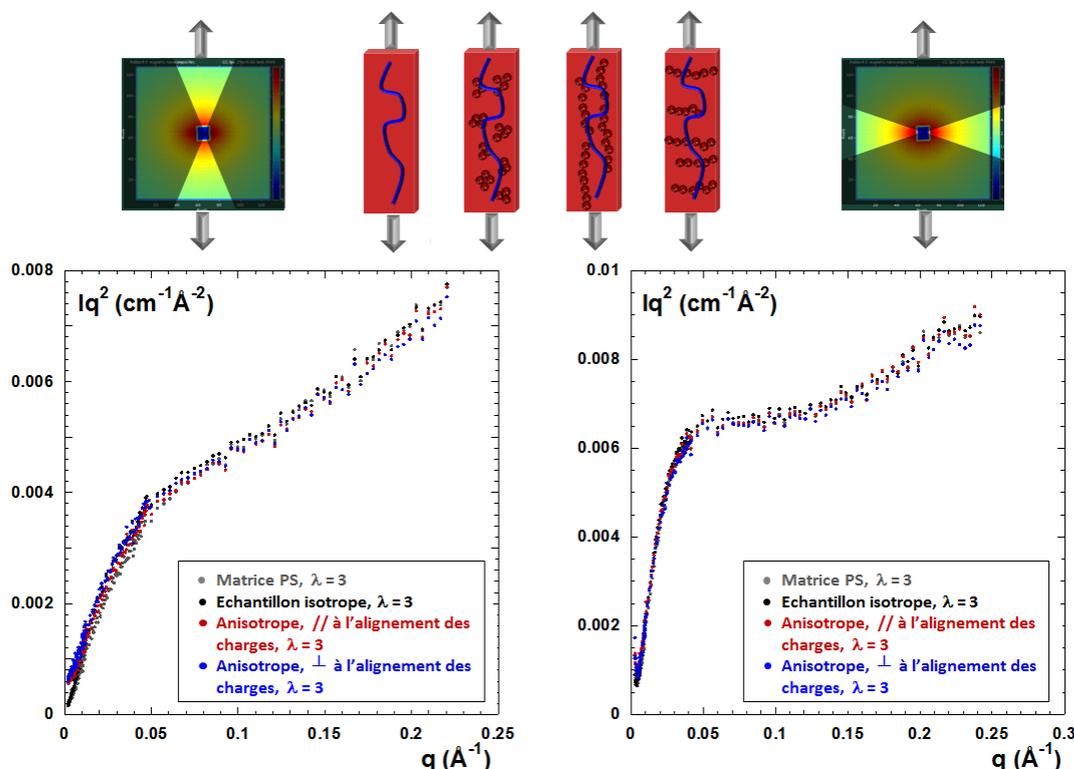


Figure 2.8 : Mesure de la conformation des chaînes dans des matrices contenant 25% de chaînes H à $\lambda = 3$. Comparaison de 2 échantillons à $\Phi_{\gamma\text{Fe}2\text{O}3} = 3\%$, réalisé hors champ ou sous champ magnétique de 600 Gauss, avec la matrice PS de référence: (*gauche*) regroupement parallèle à la direction de l'étirement; (*droite*) regroupement perpendiculaire à la direction de l'étirement.

En ce qui concerne le comportement des chaînes polymériques, les résultats sont clairs et immédiatement interprétables dans la mesure où les spectres 2D de DNPA des échantillons renforcés sont identiques à celui de la matrice de PS de référence, et ce aussi bien lorsque l'organisation initiale des agrégats est isotrope que lorsqu'elle est anisotrope. Ceci est illustré sur la figure 2.8 qui compare les intensités diffusées regroupées parallèlement ou perpendiculairement à l'étirement de la matrice avec celles d'échantillons à $\Phi_{\gamma\text{Fe}2\text{O}3} = 3\%$, l'un isotrope et le second très anisotrope, pour une forte elongation λ de 3. La représentation choisie est celle de Kratky $I(q)q^2$ versus q qui est la plus adaptée pour déceler une éventuelle modification du rayon de giration des chaînes ainsi que de leur conformation. Il apparaît que les chaînes se sont fortement allongées dans le sens de l'étirement puisque le rayon de giration des chaînes, dont la valeur au repos était de 110\AA , a augmenté jusqu'à $142\pm 4\text{\AA}$ dans le sens parallèle alors qu'il a été abaissé à $92\pm 3\text{\AA}$ dans le

¹⁷⁹ On se limite en pratique à quelques points de mesure si l'on veut que le(a) doctorant(e) qui prépare les échantillons respecte la législation horaire sur le travail... Il n'est en effet pas possible de faire des mesures successives sur un échantillon donné car l'accès aux faisceaux X et neutrons est ponctuel. Il faut donc préparer autant d'échantillons étirés que de λ souhaitées lors d'une campagne de diffusion aux petits angles, à partir d'un échantillon de grande surface que l'on découpe en autant de parties que de λ . Une solution alternative serait d'étirer à chaud *in situ* l'échantillon directement sous faisceau. Nous avons tenté cette approche aux rayons X mais avons rencontré des problèmes techniques liés à l'homogénéisation de la température sur l'ensemble de l'échantillon, paramètre crucial puisqu'il faut s'assurer que l'écart à la T_g soit le même pour toutes les chaînes polymères. Il nous reste ainsi un beau film de l'évolution continue de la structure des charges lors d'un étirement, que la rigueur scientifique ne nous permet cependant pas d'exploiter...

sens perpendiculaire¹⁸⁰. Ces valeurs sont similaires pour tous les échantillons, aux barres d'erreurs près, même lorsque l'étirement est réalisé perpendiculairement aux chaînes de nanoparticules orientées. *Les chaînes polymériques du fondu se déforment donc toujours de la même manière sous étirement, qu'elles soient en présence de nanoparticules ou non.*

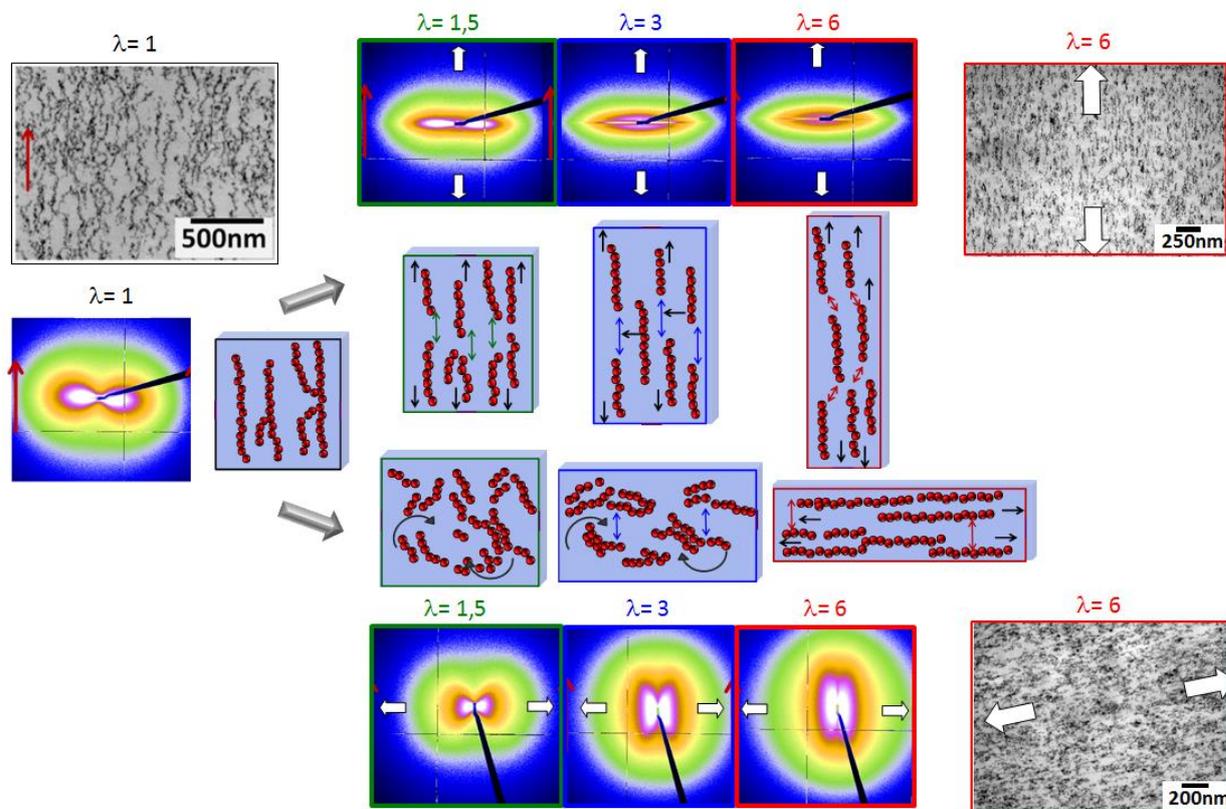


Figure 2.9 : Suivi par DXPA et TEM de la structure des charges sous étirement uniaxial d'un échantillon formé de chaînes de nanoparticules ($\Phi_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = 3\%$, réalisé sous champ magnétique de 600 Gauss). Les dessins sont des représentations schématiques dans l'espace direct des structures issues de l'analyse des spectres 2D de DXPA [96]. Les flèches blanches sur les images TEM ou les spectres DXPA correspondent à la direction de l'étirement et les flèches rouges à l'orientation du champ magnétique pendant la formulation.

La situation est beaucoup plus complexe lorsque l'on s'intéresse à l'évolution de la structure des charges. Partant d'échantillons présentant une grande diversité morphologique au repos, nous avons obtenu sous étirement toute une variété d'élégantes figures 2D¹⁸¹. Leur analyse, ardue, nous a permis de proposer une description de cette évolution dans l'espace direct¹⁸² qui rend compte de façon remarquable des courbes de traction uni-axiale et du comportement mécanique des matériaux. A titre d'exemple, je présente sur la figure 2.9 quelques dessins schématiques donnant un synoptique de l'évolution de la structure d'un échantillon concentré formé de chaînes de nanoparticules alignées. Lorsque l'étirement est mené selon l'axe d'orientation de ces chaînes de nanoparticules, ces dernières se rompent à basse déformation en sous-unités plus petites, sous-unités qui s'alignent ensuite complètement dans la direction de l'étirement, en s'éloignant progressivement les unes des autres dans le sens parallèle à l'étirement, tout en se rapprochant dans le sens perpendiculaire. A très grande déformation, du fait du très fort rétrécissement de

¹⁸⁰ Ces rayons ont été évalués à partir d'un modèle de Debye. Bien que ce modèle gaussien ne permette pas de rendre compte précisément de la déformation des chaînes, il permet par contre d'ajuster avec précision la zone du plateau de Guinier et d'extraire avec exactitude la valeur de ce rayon de giration.

¹⁸¹ Ellipses, losanges, diabolos, papillons, figures en « 8 » [96]...

¹⁸² Pour un lecteur intéressé, cette analyse est relatée de façon exhaustive dans le manuscrit de thèse d'Anne-Sophie sur plus de vingt pages [96]...

l'échantillon, certaines des sous-unités s'intercalent entre deux sous-unités voisines¹⁸³. Lorsque l'étirement est effectué perpendiculairement aux chaînes de nanoparticules, celles-ci tournent afin de se réorienter dans la direction de l'étirement en se brisant progressivement. Aux grandes déformations, elles forment des amas orientés dans le sens de l'étirement. Ceci permet d'expliquer les principales caractéristiques des courbes de traction présentées dans la partie précédente : (i) à faible déformation, la rupture des chaînes de nanoparticules est à l'origine du maximum observé dans la courbe de renforcement puisqu'elle permet de relâcher les contraintes ; (ii) aux très grandes déformations, le fait que le niveau de contrainte soit pratiquement indépendant de la direction d'étirement provient du fait que les agrégats se sont réorganisés afin de s'aligner complètement selon cette direction d'étirement, et ce quelle qu'ait été son orientation initiale par rapport à celle des chaînes de nanoparticules.

Le suivi combiné des évolutions respectives des chaînes et des charges sous étirement démontre donc que, *dans notre système nanocomposite*, ce sont essentiellement les réarrangements dynamiques des agrégats de nanoparticules qui sont à l'origine des modifications de comportement mécanique du fondu. Il démontre ainsi la prééminence de la structure du « réseau de charges » sur les propriétés de renforcement¹⁸⁴.

II.8 Et pour conclure....

Au final, ce travail aura permis quelques avancées dans le domaine des nanocomposites, aussi bien dans une démarche de formulation de matériaux aux propriétés mécaniques modulables – *démonstration de la possibilité d'un double contrôle de la structure des charges par le couplage de la chimie et d'un champ extérieur, élaboration d'échantillons aux propriétés mécaniques prononcées et contrôlées* – que dans une démarche plus fondamentale de compréhension des mécanismes mêmes du renforcement – *vérification du collapse des brosses dans les systèmes greffés pour $R_{N/p} < 1$, conformation des chaînes non affectée par la présence des nanoparticules, aussi bien au repos que sous élongation, corrélation quantitative entre anisotropie structurale et anisotropie de renforcement, suivi de l'évolution de la microstructure des charges sous étirement en adéquation avec la courbe de contrainte-déformation*. Ces avancées auront été rendues possibles par les stratégies expérimentales que nous avons mise en œuvre, à savoir la flexibilité apportée par le caractère magnétique des nanoparticules pour varier la morphologie des agrégats de charges, l'association fructueuse des rayons X et des neutrons pour la caractérisation fine des structures¹⁸⁵ et, *last but not least*, le choix de réaliser toutes les étapes de formulation des échantillons au laboratoire depuis la synthèse des briques de base pour s'assurer de leur contrôle et de leur reproductibilité¹⁸⁶.

¹⁸³ Comme en atteste l'apparition d'une nouvelle corrélation aux grandes λ .

¹⁸⁴ Il faut bien évidemment se garder de vouloir généraliser ce résultat à l'ensemble de tous les systèmes nanocomposites du fait de leur diversité.

¹⁸⁵ Elle nous aura en particulier permis de combiner deux approches de stratégies de variation de contraste, à savoir la *création* de contraste pour la mesure de la conformation d'une chaîne concomitante à l'*extinction* du signal des nanoparticules, et ce même dans le cas des nanoparticules greffées constituées de deux types de diffuseurs très différents du point chimique (cœur de maghémite et couronne de PS) mais que l'on peut rendre uniforme du point de vue de la longueur de diffusion.

¹⁸⁶ Anne-Sophie aura ainsi formulé tous les échantillons à partir des « ingrédients » suivants : solutions de chlorure de fer II et de fer III, ammoniacque, acide nitrique, DMAc, styrène (hydrogéné ou deutéré), hydroxyde de TBA, et quelques amorceurs de polymérisation...

Chapitre III. Variation de contraste *en couches minces* : Quelques exemples utilisant la réflectivité de neutrons

Je décris dans cette troisième partie à travers quelques exemples courts comment j'ai eu l'occasion d'aborder la variation de contraste en réflectivité de neutrons (RN) pour aborder des problématiques interfaciales, et non volumiques comme dans les parties précédentes, lors de ces dix dernières années. Les deux premières thématiques présentées sont les fruits de collaborations avec des utilisateurs extérieurs avec qui j'avais élaboré les stratégies de variations de contraste qui seront présentées. Les deux derniers sujets sont relatifs à deux thèses que j'ai co-encadrées.

III.1 Des brosses ultradenses de polystyrène dont la capacité à diffuser les neutrons gardent la mémoire de leur procédé de synthèse

La première thématique que j'ai décidé de présenter concerne la caractérisation de brosses ultradenses de chaînes polystyrène greffées sur substrat silicium. Elle est issue d'une collaboration avec Carole Devaux et Jean-Paul Chapel, qui étaient alors au laboratoire LMPB à Lyon [97]. C'est au cours de ce travail que je fis ma première expérience probante de réflectivité de neutrons¹⁸⁷. Les collègues avaient élaboré une stratégie de synthèse des brosses permettant à la fois le contrôle de la densité de greffage σ , grâce au dépôt sur la surface d'une monocouche d'amorceurs de polymérisation par des techniques Langmuir-Blodgett, et le contrôle de la masse des chaînes N par polymérisation radicalaire en présence de nitroxydes [98][99]¹⁸⁸. Cette technique permet d'obtenir une gamme très étendue de σ , jusqu'à une densité record de 1,1 chaînes/nm². Nous voulions vérifier par réflectivité que les chaînes poussaient bien toutes de façon simultanée pour prouver que le procédé de polymérisation était contrôlé. Pour ce faire, nous avons adapté le protocole de synthèse de sorte à obtenir *un échantillon gardant en mémoire l'histoire de la croissance des chaînes du point de vue du contraste neutronique*. Cette croissance a en effet été scindée en deux parties : la réaction a été initiée avec des monomères deutérés, stoppée, puis réamorcée avec des monomères hydrogénés. Au final, bien que la brosse soit homogène du point de vue chimique, c'est un copolymère H/D du point de vue neutronique. La mesure de l'épaisseur caractéristique d'interdiffusion entre parties hydrogénées et deutérées permet de rendre compte du degré de contrôle de la polymérisation (figure 3.1.a).

La courbe de RN de la couche mesurée à l'air présente des franges d'interférences irrégulières (figure 3.1.b). Ceci provient du fait qu'il y a trois épaisseurs caractéristiques dans le système, préalablement déterminées par ellipsométrie¹⁸⁹ : celle de la partie deutérée (270 Å), celle de la partie hydrogénée (150 Å) et celle de la brosse entière (420 Å). S'il n'y avait aucune interdiffusion dans le système, le signal de NR serait complètement dominé par la partie deutérée puisque le contraste du PS_D/air est bien meilleur que le contraste PS_H/air. Il apparaîtrait alors des oscillations pratiquement régulières avec une valeur d'interfrange permettant de retrouver l'épaisseur de cette partie deutérée. Au contraire, si l'interdiffusion était très forte, on ne mesurerait plus que le signal d'une couche homogène. Les battements seraient alors toujours réguliers mais beaucoup plus rapides car provenant de l'épaisseur totale de la brosse. Entre ces deux cas limites, une faible

¹⁸⁷ Les expériences furent faites en 2002 lors de mon séjour-postdoctoral, bien que seulement publiées quelques années plus tard [97]. C'est donc un travail qui est cher à mon cœur et au cours duquel j'ai beaucoup appris sur la technique de réflectivité, sur laquelle il était opportun que je me spécialise puisque j'avais été embauché pour accueillir les utilisateurs sur EROS.

¹⁸⁸ Celle-là même que nous avons utilisée pour greffer les nanoparticules de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ dans le chapitre 2.

¹⁸⁹ Les mesures ont été faites sur la brosse purement deutérée avant réamorçage et sur la brosse finale. Cette dernière a un indice de réfraction optique constant puisque toutes les unités monomériques sont du PS. Cette pré-caractérisation fine par ellipsométrie des différentes parties permet de réduire le nombre de paramètres ajustables lors de la modélisation de la courbe de réflectivité.

variation de la zone d'interdiffusion provoque de fortes modifications sur la courbe de NR, en particulier lorsque les interférences provenant de la couche deutérée et de la couche complètement interdiffusée sont en opposition de phase car ceci provoque l'extinction totale ou partielle des franges, comme on peut l'observer par exemple vers $0,05 \text{ \AA}^{-1}$. Ceci permet alors une détermination très fine de l'épaisseur d'interdiffusion $\sigma_{\text{int}}^{190}$, seul paramètre ajustable de la modélisation, car certaines des franges de la courbe de NR apparaissent ou disparaissent au gré des valeurs simulées. L'épaisseur permettant le meilleur ajustement des données expérimentales (25 \AA) est très faible par rapport à l'épaisseur totale de la couche, ce qui démontre le bon contrôle du procédé de polymérisation¹⁹¹.

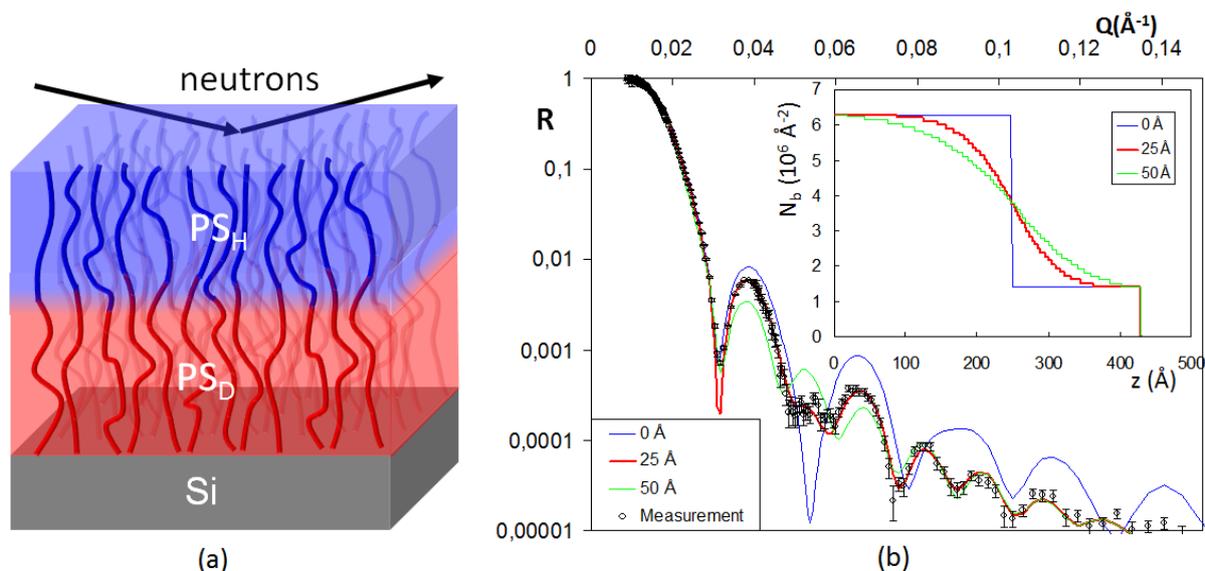


Figure 3.1 : Mesure de l'épaisseur d'interdiffusion entre la partie deutérée et la partie hydrogénée d'une brosse ultradense de PS : (a) schéma de principe de la mesure ; (b) Mesure expérimentale comparée à des courbes de réflectivité simulées de brosses d'épaisseur d'interdiffusion croissantes (traits pleins). L'insert présente les profils de densité de longueur de diffusion correspondant aux courbes simulées [97].

Je ne décrirai pas ici les mesures à sec et en bon solvant car elles ne présentent pas d'originalité du point de vue du contraste¹⁹² mais elles nous ont permis de montrer que ces brosses présentent des lois de gonflement très inhabituelles. Pour la densité de greffage la plus importante testée ($1,1 \text{ chaînes/nm}^2$), la fraction volumique de chaînes en surface $\Phi(z=0)$ est de 0,85 en bon solvant, la valeur la plus élevée jamais reportée dans la littérature, car les chaînes sont déjà très étirées dans les brosses sèches. Ceci empêche un gonflement complet des couches et conduit à un écart important de comportement par rapport aux lois d'échelles classiques [97].

III.2 Pénétration de l'eau dans la silice sous contrainte : mise en évidence d'une couche de D_2O fossilisée à la surface du verre

Le second exemple de réflectivité que j'ai choisi de montrer est une excursion hors des sentiers de la matière molle et concerne la problématique de l'influence de la corrosion sous contrainte¹⁹³ sur la propagation des fissures dans les verres [100][101]. Sa présence dans ce

¹⁹⁰ L'interdiffusion, dont l'extension totale est $2\sigma_{\text{int}}$, est prise en compte dans le calcul de la réflectivité théorique faite par la méthode matricielle optique en remplaçant l'interface discrète entre couches H et D par une fonction erreur de largeur à mi-hauteur σ_{int} .

¹⁹¹ C'est aussi une bonne démonstration de la robustesse du procédé de réamorçage de polymérisation pour l'élaboration de systèmes multicouches.

¹⁹² La réflectivité de neutrons est néanmoins la seule technique permettant des mesures de conformation de couches de polymères en solvant et a donc été indispensable à l'accomplissement du projet.

¹⁹³ *Id est*, l'action combinée de contraintes mécaniques et de corrosion par l'eau de l'atmosphère environnante.

manuscrit peut paraître un peu incongrue¹⁹⁴ mais je l'ai choisi pour montrer que la variation de contraste n'est pas restreinte aux systèmes composés de molécules organiques et peut s'appliquer à des thématiques très variées. Les travaux présentés résultent d'une collaboration entre plusieurs laboratoires initiée par Elisabeth Bouchaud. L'objectif était de montrer que l'eau pénètre de façon importante sous la surface du verre lorsqu'il est fracturé en atmosphère humide. S'il est en effet admis que les molécules d'eau viennent en aide aux contraintes mécaniques pour permettre la progression des amorces de fissures créées par le choc initial lors du processus de fracturation, la description exacte du phénomène est encore sujette à débat. Certains modèles présupposent que l'hydrolyse entre l'eau et la silice, qui provoque la rupture de liaisons atomiques dans le verre, n'a lieu qu'à la pointe de la fissure et en nul autre endroit, alors que d'autres proposent que l'eau pénètre plus largement et endommage ainsi le verre bien davantage.

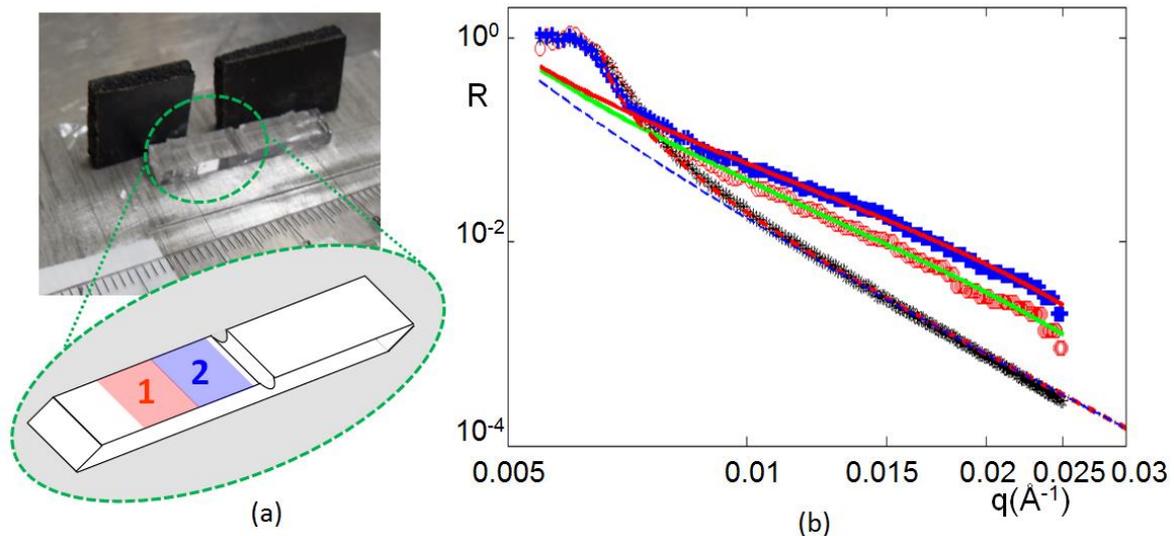


Figure 3.2 : Mesure de la profondeur de pénétration de l'eau dans le verre sous contrainte par NR. (a) photo de l'échantillon de verre étudié. Les zones 1 et 2 correspondent à des charges appliquées différentes lors de la fracture. Les pièces noires faites de B_4C , un très bon absorbant de neutrons, permettaient de sélectionner les zones de mesure d'intérêt lors de l'expérience. (b) Résultats obtenus : Les symboles \circ et $+$ correspondent aux mesures des zones 1 et 2 et les symboles \times à la mesure d'un échantillon de référence fait du même verre mais non fracturé; le trait pointillé rouge est un calcul de la réflectivité de Fresnel d'une interface plane non rugueuse air/verre et les traits continus sont les meilleurs ajustements des spectres expérimentaux par le modèle décrit en référence [100].

L'idée de l'expérience était de déterminer s'il existe une couche « fossile » de D_2O ¹⁹⁵ sous la surface de rupture après la fracturation d'un échantillon de verre en atmosphère d'eau lourde. Sans fracture, les molécules d'eau lourde ne pénètrent pratiquement pas le verre car le coefficient de diffusion de l'eau dans la silice est très faible¹⁹⁶. Lors de la fracture, la diffusion est cependant très accélérée sous l'effet de la contrainte qui est très élevée en pointe de fissure, permettant ainsi la progression des molécules d'eau au sein du verre. Lorsque la fissure se propage, les contraintes sont relaxées loin de cette pointe de fissure, ce qui piège alors les molécules d'eau lourde qui ont diffusé sous la surface de rupture du verre. Les temps caractéristiques de diffusion de ces molécules d'eau lourde piégées redeviennent alors extrêmement longs et il faudrait attendre plusieurs années pour que le profil interfacial de l'eau sous la surface soit significativement différent de ce qu'il était en fin de rupture. La mesure de NR effectuée quelques jours après fracturation permet donc d'obtenir un « instantané » de ce profil.

¹⁹⁴ J'ai donc choisi un titre de manuscrit qui n'est pas complètement représentatif de son contenu. J'assume.

¹⁹⁵ L'eau lourde a été choisie du fait de son très bon contraste neutronique par rapport à l'air.

¹⁹⁶ Une molécule d'eau ne pourrait progresser typiquement que d'un nanomètre en plus de cent jours !

La figure 3.2 compare la réflectivité mesurée pour deux surfaces de rupture obtenues pour des charges appliquées différentes avec celle d'un échantillon de référence non fracturé. La mesure a été un challenge du point de vue expérimental car la surface illuminée était de l'ordre de 15 mm^2 , la plus faible jamais mesurée sur le réflectomètre EROS¹⁹⁷, contre $\sim 10 \text{ cm}^2$ pour les échantillons usuels [102]. Il apparaît que la réflectivité des surfaces fracturées est significativement supérieure à celle de l'échantillon de référence, preuve de la présence d'eau lourde emprisonnée dans les échantillons rompus. L'analyse détaillée du profil des courbes, présentée en référence [100], indique une profondeur de pénétration moyenne de l'eau lourde de l'ordre de 10 nm sous la surface de rupture dans les deux cas. La concentration en eau est très élevée sur les 4 premiers nanomètres et dépend du taux de charge appliqué ($\Phi_{D2O} \sim 35\%$ pour la charge appliquée la plus faible, $\Phi_{D2O} \sim 57\%$ pour la charge la plus élevée). La mise en évidence de cette très forte concentration en eau lourde dans les premiers nanomètres sous la surface indique que la diffusion sous contrainte de l'eau entraîne un fort endommagement par corrosion du matériau. Cette mesure devrait ainsi permettre de raffiner les modèles de propagation de fracture en milieu humide.

III.3 Signal de neutrons diffusés par une mousse : réflectivité ou diffusion aux petits angles ?

J'évoque dans cette troisième partie les travaux que nous avons faits sur la caractérisation d'autoassemblages d'acides gras à longues chaînes en milieu aqueux dans différentes géométries (volume, interface air/eau, mousses). Ce travail est le fruit d'une collaboration entre Jean-Paul Douliez de l'unité BIA de l'INRA Nantes d'une part, et François Boué et moi-même d'autre part. Il a constitué le cœur du sujet de doctorat d'Anne-Laure Fameau, qui a effectué sa thèse entre les deux instituts. L'objectif de la thèse était de déterminer l'origine des propriétés remarquables de mousses formées à partir de solutions aqueuses d'acides gras 12-hydroxystéariques, des tensioactifs « verts » car issus de l'extraction d'agro-ressources renouvelables¹⁹⁸. Ces mousses ont en effet une moussabilité optimale, une stabilité exceptionnelle à température ambiante de l'ordre de plusieurs mois et sont « thermostimulables » car elles peuvent être déstabilisées en quelques minutes si la mousse est chauffée au-delà d'une température seuil [103].

Une mousse étant une architecture complexe au sein de laquelle on retrouve des assemblages d'acides gras à la fois en volume dans les bords de Plateau et adsorbés à l'interface air/eau, nous avons dans un premier temps cherché à faire une description structurale des morphologies qu'adoptent ces assemblages soit en solution par DNPA, soit sur une interface air/eau modèle par NR, et ce en fonction de la température. Des études antérieures par DNPA [104] avaient montré que ces acides gras forment en solution à température ambiante des phases « poireaux » composées de phases lamellaires très solvatées qui s'enroulent pour former des tubes dont le diamètre extérieur est de l'ordre de quelques centaines de nanomètres et dont la longueur peut atteindre dix microns (figure 3.3.a)¹⁹⁹. Nous les avons complétées pour comprendre les propriétés de gonflement/dégonflement de ces tubes en fonction de la température²⁰⁰. Ces caractérisations en volume ne nécessitaient pas d'expériences de variations de contraste avec des raffinements

¹⁹⁷ J'ai à cette occasion mesuré le bruit de fond ambiant du spectromètre pendant près de 48 heures pour pouvoir faire des soustractions propres !

¹⁹⁸ Ces acides gras à longue chaînes peuvent être extraits en grande quantité de téguments tels que la peau de tomate. Leurs applications dans les secteurs de la détergence ou de la cosmétique ont pendant longtemps été négligées car ils ne sont pas spontanément solubles dans l'eau. Il a cependant été montré il y a quelques années par nos collègues de l'INRA [167] qu'ils peuvent être solubilisés en milieu aqueux à température ambiante en présence de contre-ions de type éthanolamine, ouvrant la voie à leur valorisation pour des applications potentielles variées.

¹⁹⁹ Ce sont donc des poireaux à la tomate !

²⁰⁰ Des observations par microscopie à contraste de phase montraient en effet que le diamètre des tubes passe par un maximum lorsque l'on chauffe un échantillon de tubes. En particulier, au voisinage de cette température critique de gonflement, le diamètre augmente brusquement de près d'un facteur 10 sur quelques degrés. Si l'on continue de chauffer au-delà de cette température critique, le diamètre redescend jusqu'à retrouver sa valeur initiale [105].

particuliers puisqu'il n'y a que deux composants dans le système, les acides gras et le solvant, et que le contraste entre ces deux composants est naturellement très bon quand les mesures sont faites dans l'eau lourde. Elles nous ont permis de montrer que les propriétés de gonflement des tubes sont directement liées à la rigidité des bicouches, et également que ces tubes fusionnent en micelles à haute température [105]²⁰¹.

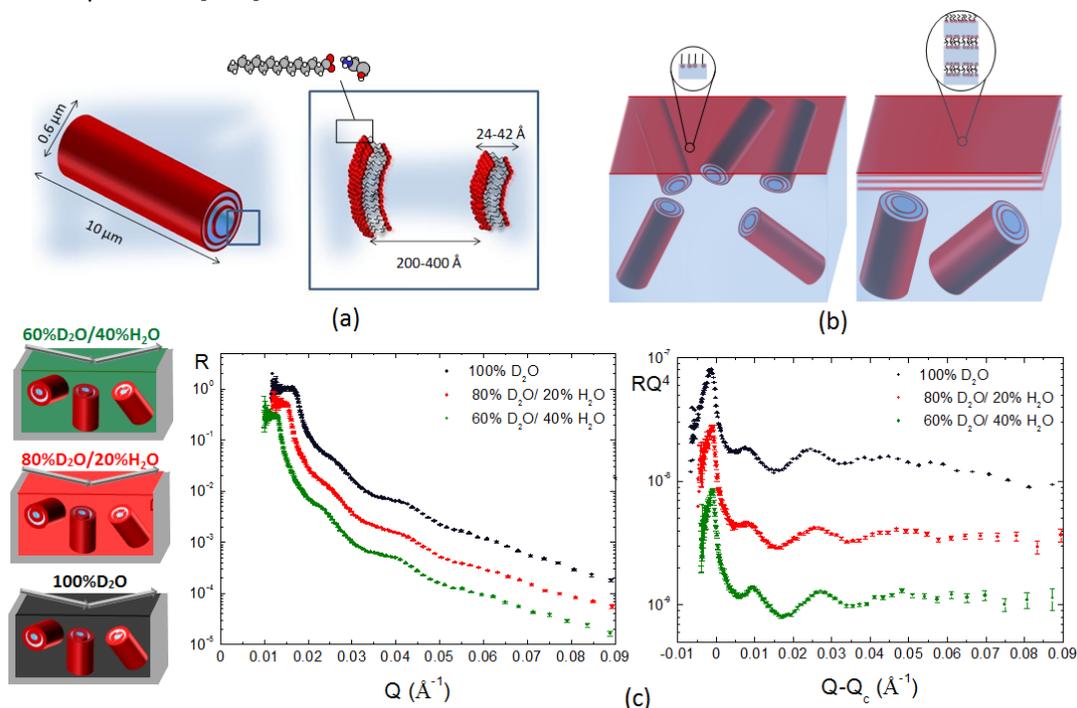


Figure 3.3 : Tubes multi-lamellaires d'acides gras 12-hydroxystéariques en présence d'ions éthanolamine en solution et à l'interface air/eau. (a) Description schématique de la morphologie des assemblages [104] [105]. (b) Corrélation entre les structures adoptées en solution et à l'interface air/eau en fonction de la rigidité des bicouches : les tubes « rigides » s'adsorbent sur une monocouche d'acide gras alors que les tubes « mous » gonflent en solution et se déplient pour former des couches lamellaires sous l'interface. (c) Mesures de NR sur des solutions aqueuses d'acides gras (1 mg/ml) pour 3 compositions H₂O/D₂O dans deux représentations différentes: $R=f(Q)$ (gauche) et $RQ^4 = f(Q-Q_c)$ (droite). Les courbes sont décalées arbitrairement en intensité pour une meilleure lisibilité. La représentation de droite montre que les variations d'une courbe à l'autre ne sont liées qu'aux changements de la valeur de Q_c induits par la modification de la composition isotopique de la phase aqueuse [100].

Les choses se sont compliquées quand nous avons voulu déterminer le comportement de ces acides gras à l'interface air/eau par NR. Le signal spéculaire que nous mesurons présentait des franges de faible intensité dont l'espacement en q était sensiblement le même que celui que fait le pic de corrélation de la phase lamellaire avec ses harmoniques dans les spectres DNPA des solutions. Nous observons par ailleurs un fort signal hors-spéculaire. Nous nous sommes donc légitimement demandé si nous n'étions pas en train de mesurer un signal DNPA parasite de tubes en solution. Pour discriminer entre signal de surface et signal de volume, nous avons alors changé le contraste de la sous-phase aqueuse en réalisant plusieurs mesures dans des mélanges H₂O/D₂O de compositions variables : *si le signal est d'origine volumique, la position en q des franges ne doit pas changer et seule l'amplitude varie car elle dépend du contraste. A contrario, dans le cas d'un signal de surface, les franges doit se déplacer car leur écartement par rapport au vecteur de diffusion critique q_c est constant. Or la valeur de ce dernier est d'autant plus petite que la fraction d'eau légère est élevée*

²⁰¹ La DNPA permet notamment de déterminer l'espace interlamellaire, le paramètre de Caillé des membranes et l'épaisseur des bicouches. Grâce à la caractérisation de tous ces paramètres en fonction de la température, nous avons pu montrer que l'augmentation de diamètre ne provient pas de la transition L_{α} - L_{β} fluide-gel de la membrane et n'est pas corrélée aux variations de l'espace interlamellaire entre bicouches. Elle est par contre liée à une forte augmentation du paramètre de Caillé.

dans le mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ²⁰². Expérimentalement, c'est ce deuxième cas que nous avons observé, prouvant ainsi que le signal mesuré provient bien d'objets à l'interface (figure 3.3.c). Nous avons réussi à le modéliser en considérant que les tubes multilamellaires sont adsorbés à l'interface air/eau²⁰³ [106]. Leur comportement en température à cette interface est alors très similaire à celui du volume, sauf à la température pour laquelle le diamètre des tubes présente un maximum en solution, *id est* lorsque la rigidité des membranes est faible. Dans ce régime de température particulier, les tubes se déplient pour former des phases lamellaires orientées perpendiculairement à la surface (figure 3.3.b).

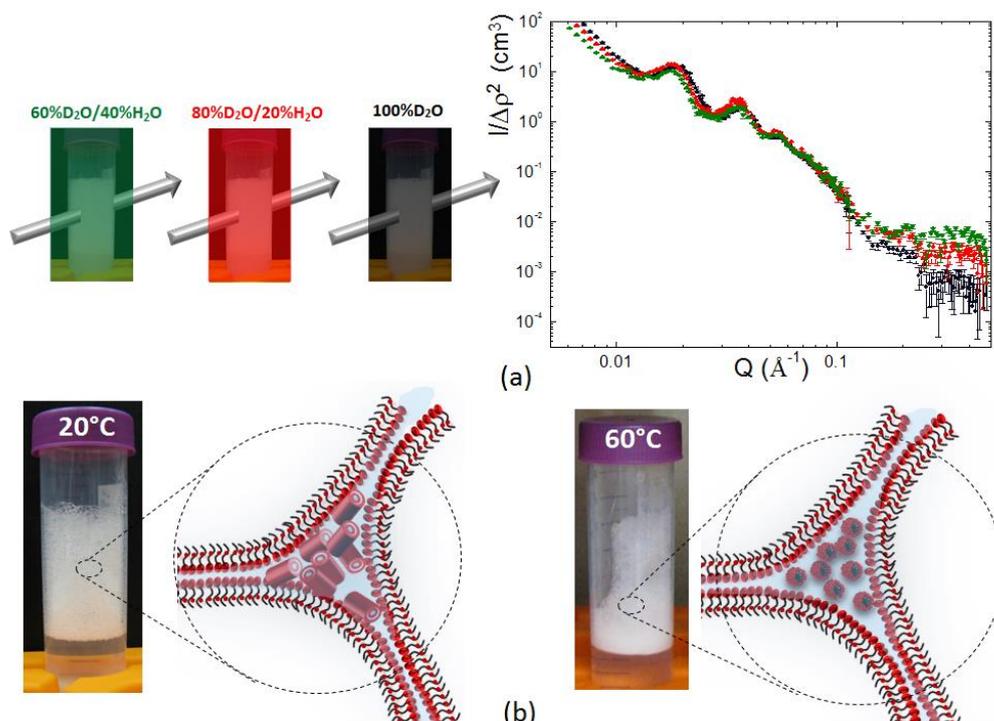


Figure 3.4 : Mousses ultrastables et thermostimulables d'acides gras [103]: (a) Mesures DNPA réalisées sur des mousses pour 3 compositions $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$; (b) Illustration des structures formées par les acides gras au sein des mousses respectivement à basse température (mousse ultrastable, gauche) et à haute température (mousse se déstabilisant en quelques minutes, droite). Les rapports de tailles entre les monocouches d'acides gras, les micelles et les tubes ne sont pas respectés.

Pour finir, nous avons mesuré directement le signal diffusé par la mousse en géométrie de diffusion aux petits angles. Or, dans une mousse, le signal recueilli peut provenir non seulement du signal « petits angles » des objets en solution dans les bords de Plateau mais aussi de la réflexion des neutrons sur les films minces [107] ou sur la surface des bords de Plateau²⁰⁴. Afin de trancher entre signal de DPA et/ou de réflectivité, nous avons réutilisé le principe déjà présenté dans le paragraphe précédent en faisant des mesures sur des mousses élaborées avec différents mélanges $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. Dans ce cas, les spectres se superposent tous lorsqu'on renormalise les intensités absolues par le terme de contraste $(\rho_{\text{acide gras}} - \rho_{\text{solvant}})^2$ (figure 3.4.a). Les termes de réflectivité sont donc négligeables et le signal peut être totalement assigné au signal petit angles des assemblages dans les bords de Plateau. Ce signal est par ailleurs similaire à celui de la solution de tubes ayant servi à produire la mousse, ainsi qu'à celui du liquide ayant drainé sous la mousse [103]. Les tubes sont donc toujours

²⁰² Pour mémoire, je rappelle que la position du q_c ne dépend ici que de la différence de densité de longueur de diffusion entre l'air et le substrat (ici l'eau) et ce quelle que soit la densité de longueur de diffusion de la couche mince à l'interface que l'on désire caractériser.

²⁰³ La faible amplitude des franges vient du fait que la fraction d'acides gras à une distance z donnée de l'interface est faible quand on intègre le profil des tubes selon (x,y) sur toute la surface puisque ceux-ci sont essentiellement composés d'eau.

²⁰⁴ Bien que la réflectivité soit négligeable dès lors que l'angle entre le faisceau incident et la surface est supérieur à 3 degrés pour des neutrons froids, il y a nécessairement des films minces ou des parties de surfaces de bord de Plateau en géométrie de réflexion puisque la distribution des films minces est celle d'une poudre au sein de la mousse.

présents dans les mousses en très grande concentration ! Ils forment alors un « squelette » dans les canaux liquides qui limite le drainage et confère sa stabilité exceptionnelle à la mousse (figure 3.4.b)²⁰⁵. Lorsque la mousse est chauffée au-delà de la température de transition tubes/micelles, ce squelette s'effondre car, à l'instar de ce qui se déroule en solution, les tubes dont la taille est micronique fondent en micelles mille fois plus petites au sein de la mousse²⁰⁶. Cette dernière se déstabilise alors en quelques minutes puisque le drainage n'est plus limité. La transition entre tubes et micelles étant parfaitement réversible, il est cependant tout à fait possible de restabiliser la mousse par abaissement de la température en dessous de la température de transition car les tubes se reforment instantanément.

Au final, la variation de contraste ne nous a pas servi dans cette partie à sonder la structure d'une espèce particulière comme dans tous les cas présentés jusqu'ici mais à comprendre l'origine du signal que l'on mesure.

III.4 Monocouches de copolymères PS-PAA à l'interface air/eau : variation de contraste en NR et diffusion des rayons X aux petits angles en incidence rasante

Le dernier exemple que je présente concerne la caractérisation structurale de monocouches de copolymères PS-PAA à l'interface air/eau et mêle variation de contraste « classique » en réflectivité et DXPA *en incidence rasante* (DPAXIR). C'est un travail qui a été effectué dans le cadre de la thèse de Zineb Guennouni, fruit d'une collaboration entre l'Institut des Nanosciences de Paris (Université Paris 6) avec Michel Goldmann et Marie-Claude Fauré et le LLB avec moi-même. L'objectif de la thèse était de former des nanostructures métalliques de taille et de morphologie contrôlée par photoréduction et/ou radiolyse d'ions métalliques adsorbés par condensation de Manning sur la partie polaire chargée d'une molécule tensioactive à l'interface air/eau²⁰⁷, la modulation de la structure de l'auto-assemblage formé par les molécules tensioactives permettant de contrôler la forme du « moule » organique sur lequel sont piégés les ions métalliques. La preuve de concept avait déjà été effectuée par les collègues de l'INSP sur des monocouches d'acide behénique [108] et nous souhaitons l'étendre à des copolymères hydrophobes/hydrophiles offrant une plus grande richesse morphologique que ces simples savons.

Notre choix de moule s'était porté sur un système *a priori* simple, composé d'une ancre hydrophobe polystyrène de faible masse et d'une chaîne de polyelectrolyte faible négativement chargée de PAA devant permettre un contrôle fin de la quantité de cations adsorbés par le pH, qui fixe le taux d'ionisation des blocs²⁰⁸, et par la salinité de la sous-phase aqueuse. Nous pensions initialement que ce copolymère formait de simples brosses à l'interface air/eau en nous appuyant sur la littérature [109], avec deux régimes à bas pH lorsque les blocs PAA ne sont pas chargés, champignons à basse densité de surface et brosses à haute densité de surface, et un seul régime de brosse à pH élevé. Cette description était basée sur l'hypothèse que les copolymères PS-PAA se comportent à bas pH comme les copolymères diblocs neutres PS-PEO [110] du fait de la similitude existant entre leurs isothermes de compression respectifs, mais n'était étayée en pratique par aucune mesure structurale pour le PS-PAA. Les isothermes des deux systèmes présentent en effet

²⁰⁵ Cette limitation du drainage se combine avec la forte rigidité des films minces d'acides gras 12-hydroxystéariques qui empêchent le murissement d'Oswald et la coalescence. Ces acides gras peuvent en effet former des films rigides par couplage des molécules les unes avec les autres *via* des liaisons hydrogènes grâce à la fonction hydroxy en C₁₂ [103].

²⁰⁶ Processus que nous avons vérifié par des mesures DNPA *cinétiques in situ* dans les mousses sur PAXY au LLB. La durée typique d'acquisition d'un spectre était de l'ordre de la minute.

²⁰⁷ En volume, la réduction d'ions argent sous irradiation mène à la formation de petits colloïdes d'argent. C'est le principe même de la photographie argentique [168]! L'intérêt de l'irradiation de surface réside dans le fait de pouvoir contrôler finement l'épaisseur d'illumination avec des rayons X. En se plaçant en incidence rasante en dessous de l'angle critique, on peut fixer très précisément la profondeur de pénétration de l'onde évanescente avec une résolution nanométrique.

²⁰⁸ Le pKa des fonctions carboxyliques est en effet de ~ 4,7.

une région où la pression de surface est pratiquement constante, interprétée comme étant le plateau de coexistence d'une transition de phase de premier ordre de type brosse/champignon²⁰⁹. Lorsque les blocs PAA sont chargés, cette zone de forte compressibilité disparaît, ce qui suggère que les fortes répulsions électrostatiques à longue portée entre blocs PAA voisins forcent le système à adopter la conformation brosse dès les très faibles densités de surface.

Cette vision « idéale » du comportement des copolymères PS-PAA était cependant sujette à controverse. Il n'y a en effet pas *a priori* de paramètre d'ordre variant entre les conformations brosse et champignon, ce qui rend l'existence d'une transition de premier ordre contestable et pose la question de l'origine du plateau observé expérimentalement, et que j'appellerai par la suite « pseudoplateau ». Elle a d'ailleurs été récemment remise en cause par Theodoly *et alii* [111] qui ont montré que les copolymères peuvent s'auto-assembler à l'interface air/eau pour former des hémimicelles grâce à des expériences de DXPAIR *in situ*, les premières de ce genre à notre connaissance²¹⁰. Lors de cette étude, les auteurs avaient cependant travaillé dans des conditions particulières ne permettant ni de trancher sur l'existence d'une transition de premier ordre, ni de prouver que les hémimicelles qu'ils avaient observées sont les structures qui sont formées dans le cas général²¹¹. Ce sont ainsi les incertitudes concernant le comportement du système PS-PAA à l'interface air/eau qui nous ont poussé à réaliser une étude structurale poussée permettant d'obtenir une description claire des morphologies qu'adoptent les copolymères au sein des monocouches, aussi bien à bas pH qu'à pH élevé. *Nous avons alors choisi de coupler la NR et la DXPAIR pour résoudre les structures respectivement perpendiculairement à la surface et dans le plan de l'interface*²¹². *Dans le cas de la NR, nous avons utilisé la variation de contraste pour déterminer la structure de chacun des blocs PAA et PS par ajustement du contraste de la sous-phase*²¹³. Toutes les mesures ont été effectuées *in situ* sur une cuve de Langmuir²¹⁴. Les dépôts ont été faits à partir de solutions de copolymères dissous dans le DMF, qui est un bon solvant des deux blocs mais est miscible à l'eau et peu volatil [112]²¹⁵.

²⁰⁹ Ces copolymères PS-PEO présentent en effet un plateau de transition d'aspect très similaire à celui des copolymères PS-PAA. Des mesures de NR sur ces PS-PEO ont effectivement démontré que ces copolymères transitent d'un régime champignon à un régime brosse lors de la compression des chaînes [110]. Il n'est cependant pas prouvé que ces monocouches de PS-PEO soient homogènes dans le plan.

²¹⁰ Il existe par contre un certain nombre d'articles visant à réaliser une caractérisation structurale des monocouches PS-PAA par microscopie à force atomique faites sur substrat solide, généralement à l'air, après transfert des monocouches par des techniques de type Langmuir-Schaeffer ou Langmuir-Blodgett [169] [170]. Les structures observées sont très variées. Il n'y a cependant aucune garantie qu'elles soient représentatives de la situation à l'interface air/eau du fait de problèmes de démouillage potentiels pouvant intervenir durant la phase de transfert ou lors de la mesure.

²¹¹ L'étude a en effet menée à pH 10, lorsque les blocs sont très chargés. L'isotherme ne présente donc pas de plateau. Par ailleurs, les auteurs avaient choisi un solvant de dépôt dans lequel les copolymères PS-PAA sont déjà assemblés sous forme de micelles [111]. Il n'est donc pas surprenant que ces micelles se retrouvent à l'interface.

²¹² Nous aurions pu effectuer cette mesure de diffusion en incidence rasante avec des neutrons pour bénéficier de la variation de contraste mais nous avons choisi les rayons X pour pouvoir bénéficier de la possibilité d'irradiation des ions argent dans la sous-phase. Il n'y a par ailleurs à l'heure actuelle que très peu de spectromètres neutrons permettant effectivement de réaliser une telle mesure à l'interface air/eau donnant un signal avec un rapport signal/bruit acceptable.

²¹³ Nous avons en effet travaillé avec des copolymères PS-PAA dont le bloc PS est deutéré que nous nous sommes procuré chez Polymer Source. La masse du bloc PS est de 3500 g/mol (33 unités de répétition) et celle du PAA de 10800 g/mol (145 unités de répétition). La densité de longueur de diffusion du PAA ($1,7 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) s'annule dans un mélange 67% H₂O/33% D₂O. Celle du PS_D ($6,5 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) est pratiquement complètement éteinte dans l'eau lourde ($6,39 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$).

²¹⁴ Nous avons effectué des mesures d'isothermes en faisant varier le pH depuis pH 2 jusqu'à pH 9 et avons retrouvé les comportements caractéristiques décrits dans la littérature, en particulier le pseudoplateau à bas pH [112].

²¹⁵ Le choix du solvant de dépôt est en effet une étape cruciale qui a occupé Zineb dans les premiers mois de sa thèse car elle aura tâtonné avant d'aboutir au DMF. La solubilisation simultanée de deux blocs aux propriétés antagonistes (bloc très hydrophobe *versus* bloc hydrophile polaire) est en effet peu aisée et un certain nombre de papiers reportent l'utilisation d'une solution de dépôt formée d'un mélange de 2 solvants, tels que le dioxane et le toluène [109][171]. Cette solution n'est pas optimale car il faut adapter le rapport de fraction des solvants dans le mélange en fonction des masses respectives des blocs. Zineb a alors cherché un solvant de dépôt unique et seul le DMF s'est avéré avoir solubilisé parfaitement les deux blocs, ce que nous avons d'ailleurs vérifié expérimentalement par DNPA [112]. Parallèlement à ses essais, Wang *et alii* ont abouti à la même conclusion en terme de choix de solvant [170].

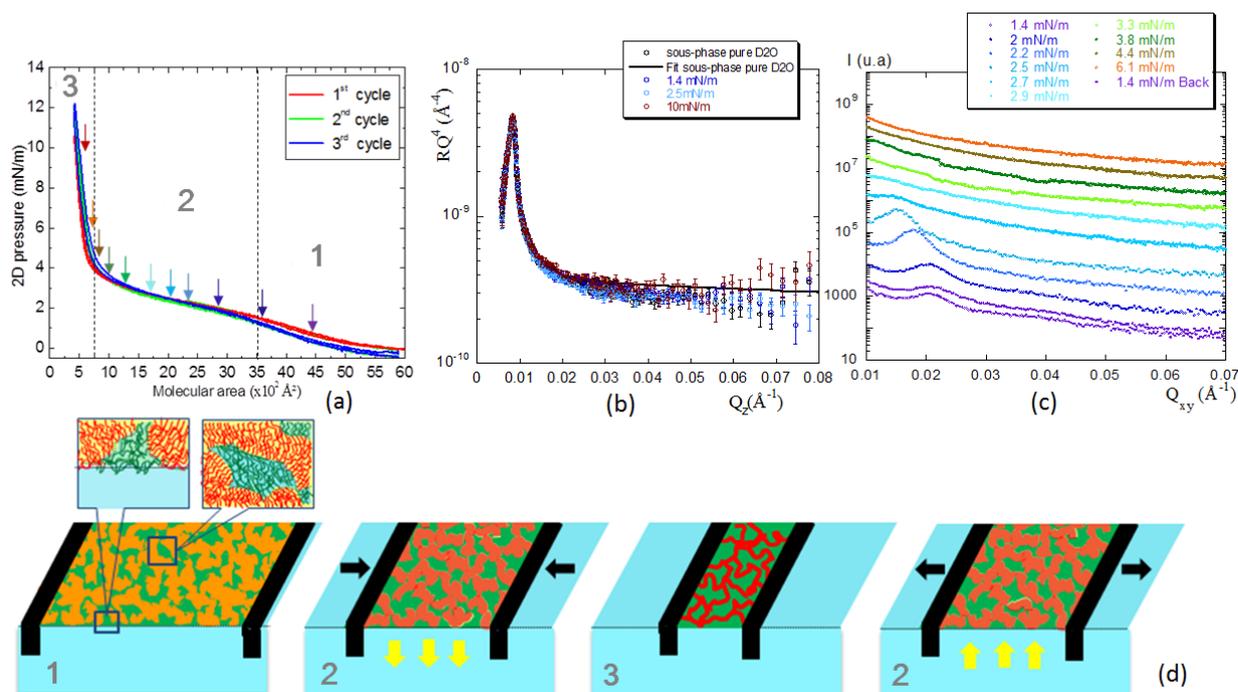


Figure 3.5 : Monocouches de PS-PAA à l'interface air/eau formées sur une sous-phase aqueuse à pH 2 à partir d'une solution de dépôt à base de DMF [112] [113] : (a) Isotherme de compression du système. Les flèches de couleur repèrent les points de mesures de NR ou DXPAIR. (b) Mesures de NR réalisées dans une sous-phase aqueuse de D₂O réalisant l'extinction des parties PS des copolymères. (c) Mesures de DXPAIR. Les courbes sont arbitrairement décalées en intensité pour une meilleure lisibilité. (d) Représentation schématique de l'évolution du système lors d'un cycle de compression/décompression. Les numéros renvoient aux 3 régions caractéristiques de l'isotherme. Le PS est représenté en rouge, le PAA en vert, le DMF en jaune et l'eau en bleu.

Lorsque les blocs PAA sont neutres, les mesures de NR *dans les conditions d'extinction du PS* nous ont permis de montrer que ces blocs PAA sont collapsés sous la surface, et ce quelle que soit la pression de surface, contrairement à ce qui avait été observé dans le cas du PS-PEO [110]. Les courbes se superposent en effet toutes à celle de la courbe de Fresnel²¹⁶ dans les barres d'erreur (figure 3.5.b). L'épaisseur de la couche de PAA doit donc être de l'ordre de la valeur minimale qu'il est possible de mesurer par NR, soit environ 5 Å²¹⁷. *Les chaînes ne sont donc jamais en régime brosse, ce qui infirme l'hypothèse de transition de premier ordre brosse/champignon*. Les mesures de DXPAIR présentent quant à elles un pic de corrélation intense à très petits q_{xy} , et ce dès les faibles pressions superficielles (0,021 Å⁻¹ à 1,4 mN/m, soit ~ 300 Å dans l'espace direct, cf figure 3.5.c)²¹⁸, ce qui montre que les copolymères s'auto-organisent pour former des nanostructures en surface au moment du dépôt. Lorsque l'on comprime la monocouche le long du pseudo-plateau, la taille caractéristique de ces nanostructures croît car le pic se déplace continûment vers les faibles q_{xy} ! Cette aptitude à se réorganiser progressivement sous compression suggère que les copolymères s'organisent à la surface en domaines respectivement riches en PAA et en PS en adoptant une

²¹⁶ La courbe de Fresnel est la courbe de réflectivité du substrat pur, ici celle de l'eau lourde, mesurée sans copolymère.

²¹⁷ La couche de PS, mesurée en condition d'extinction du PAA, est également de très faible épaisseur et ne devient mesurable qu'à haute pression (~ 18 Å à 4mN/m) [112] [113].

²¹⁸ Ce signal provient bien d'objets en surface et non en volume car il apparaît sous la forme d'une tige à q_{xy} constant et non d'un anneau sur les cartes d'intensité 2D $I = f(q_{xy}, q_z)$. Les spectres 1D présentés dans le corps de texte principal sont intégrés selon q_z .

structure proche de celle résultant d'une décomposition spinodale²¹⁹, et non en héli-micelles. A plus grande échelle, la surface demeure homogène (figure 3.5.d)²²⁰.

Pour expliquer l'évolution de la structure sous compression, nous proposons que certaines molécules du solvant de dépôt (DMF) restent piégées au sein de la monocouche dans les parties PS, en accord avec des observations faites en volume [114]²²¹. Ces molécules se désorbent continûment de l'interface vers le volume lorsqu'une pression superficielle critique est atteinte, qui correspond à l'apparition du pseudo-plateau sur l'isotherme. Le film est très compressible dans ce régime d'expulsion de solvant, ce qui provoque l'existence de ce pseudo-plateau, sa disparition coïncidant avec l'expulsion complète du DMF de la monocouche. Cette expulsion du DMF n'est pas définitive car celui-ci remonte à la surface si la monocouche est décomprimée et regonfle les chaînes de PS²²². C'est l'évolution de l'intensité du pic de corrélation sous compression qui nous a inspiré ce scénario d'expulsion de solvant de dépôt : celle-ci passe par un maximum puis décroît jusqu'à disparaître complètement en bout de pseudo-plateau. Or le DMF possède une densité de longueur de diffusion électronique ρ_e très différente de celles des trois autres constituants de l'interface (eau, PS et PAA), qui sont quant à elles très proches les unes des autres²²³. *Le contraste donnant lieu au signal de diffusion X provient donc des différences de composition entre zones de surface « marquées » par le DMF et zones non marquées.* Ce contraste s'atténue naturellement quand la quantité de DMF à l'interface diminue et s'annule pratiquement quand ce dernier est totalement expulsé du PS²²⁴. En conséquence, le pic disparaît à haute pression alors que les nanostructures restent formées. Il est donc amusant de noter que ce sont les spécificités du contraste X vis-à-vis de molécules organiques qui ont permis ici de révéler la structure d'un des constituants de ce mélange à 4 composants! Un schéma synoptique de l'évolution de la structure en fonction de la compression est présenté sur la figure 3.5.d.

A pH 9, lorsque les blocs PAA sont chargés, nous retrouvons le même type d'organisation de surface 2D (figure 3.6.c). L'ionisation des fonctions carboxyliques a cependant forcé le déploiement de ces blocs dans la sous-phase aqueuse. Les fortes répulsions électrostatiques entre chaînes PAA abaissent alors fortement la compressibilité de la monocouche et le pseudo-plateau disparaît de l'isotherme²²⁵ (figure 3.6.a). Ces fortes répulsions stabilisent les nanostructures formées lors du dépôt et s'opposent à leur croissance. La position du pic de corrélation observé en DXPAIR ne varie en effet pratiquement pas lors de la compression (figure 3.6.b). Son intensité évolue par contre

²¹⁹ Pour confirmer ce résultat, nous avons imagé la surface par AFM en milieu liquide après transfert Langmuir Schaeffer sur substrat hydrophobe solide à pH 9. Ce transfert n'est pas possible à pH 2 car la couche démouille puisque les blocs PAA sont adsorbées en surface, confirmant que les images présentées dans la littérature ne sont pas représentatives du système. Il est par contre possible à pH 9 quand les blocs PAA plongent dans la phase aqueuse.

²²⁰ Cette affirmation est basée sur les images AFM mentionnées dans la note précédente qui ne montrent aucune hétérogénéité à grande échelle. Nous n'avons par ailleurs observé aucun domaine de grande taille par microscopie à angle de Brewster.

²²¹ Ces études menées en volume sur des agrégats micellaires de PS-PAA formés dans des mélanges d'eau et de solvants organiques polaires miscibles à l'eau (DMF, dioxane, THF) montrent en effet qu'une partie importante du solvant polaire reste piégée dans le cœur de PS des micelles [114].

²²² Les isothermes sont en effet parfaitement réversibles à ce pH sur plusieurs cycles. Pour comprendre ce mécanisme, il faut garder en mémoire qu'il y a du DMF dissous en grande quantité dans la sous phase aqueuse provenant du dépôt (on dépose typiquement 25 μL de solvant, soit typiquement 1000 fois plus que la quantité maximale qu'il est possible de piéger dans une monocouche de 20 Å sur une surface de cuve de Langmuir standard). Cette sous phase aqueuse est donc un réservoir quasi-infini de DMF pour la monocouche de copolymères.

²²³ Le calcul donne les valeurs suivantes : $\rho_e(\text{DMF}) = 8,3 \cdot 10^{10} \text{ cm}^2$; $\rho_e(\text{PS}) = 9,58 \cdot 10^{10} \text{ cm}^2$; $\rho_e(\text{PAA}) = 9,83 \cdot 10^{10} \text{ cm}^2$; $\rho_e(\text{eau}) = 9,43 \cdot 10^{10} \text{ cm}^2$.

²²⁴ Le ρ_e du PS étant situé à une valeur intermédiaire entre celui de l'eau et du PAA, il est en effet pratiquement égal à celui des régions riches en PAA/eau.

²²⁵ Si l'on observe l'isotherme avec un regard acéré, on peut néanmoins repérer un changement de pente vers de 6,5 mN/m. Leurs compressibilités respectives des régions situées de chaque côté de cette pression de transition sont 195 m/N et 85 m/N. Le régime de faible compressibilité à haute pression est atteint lorsque la presque totalité du solvant de dépôt est expulsé de la monocouche.

fortement et passe par un maximum aux pressions intermédiaires. L'observation de cet extremum d'intensité à $q_{xy} \sim \text{constant}$ peut s'expliquer par les actions conjuguées de l'augmentation des répulsions entre domaines sous l'effet de la compression et de l'expulsion de solvant de dépôt qui produisent des effets antagonistes sur la forme du pic : l'accroissement des répulsions tend à le rendre plus marqué alors que l'expulsion de solvant tend à l'« effacer » du fait de la perte de contraste. Puisque les nanostructures ne peuvent se réorganiser dans le plan, l'augmentation de la pression superficielle force une partie des copolymères à plonger de la surface vers le volume pour les pressions les plus élevées (figure 3.6.d)²²⁶. C'est la NR avec variation de contraste qui a permis de révéler ce comportement singulier. Les mesures en contraste PS éteint permettent en effet de vérifier que les blocs PAA se solvatent avec un profil gaussien, comme attendu pour des brosses de PEL en régime osmotique, sauf pour les pressions les plus élevées pour lesquelles il apparaît un léger excès de matière loin de la surface. La présence de cet excès de matière, que nous attribuons au transfert de copolymères vers la sous-phase aqueuse, est confirmée de façon certaine par les mesures en conditions PAA éteint qui montrent qu'à haute pression superficielle, le profil associé aux blocs PS hydrophobes de très petites masses s'étend jusqu'à près de 100 Å de l'interface²²⁷.

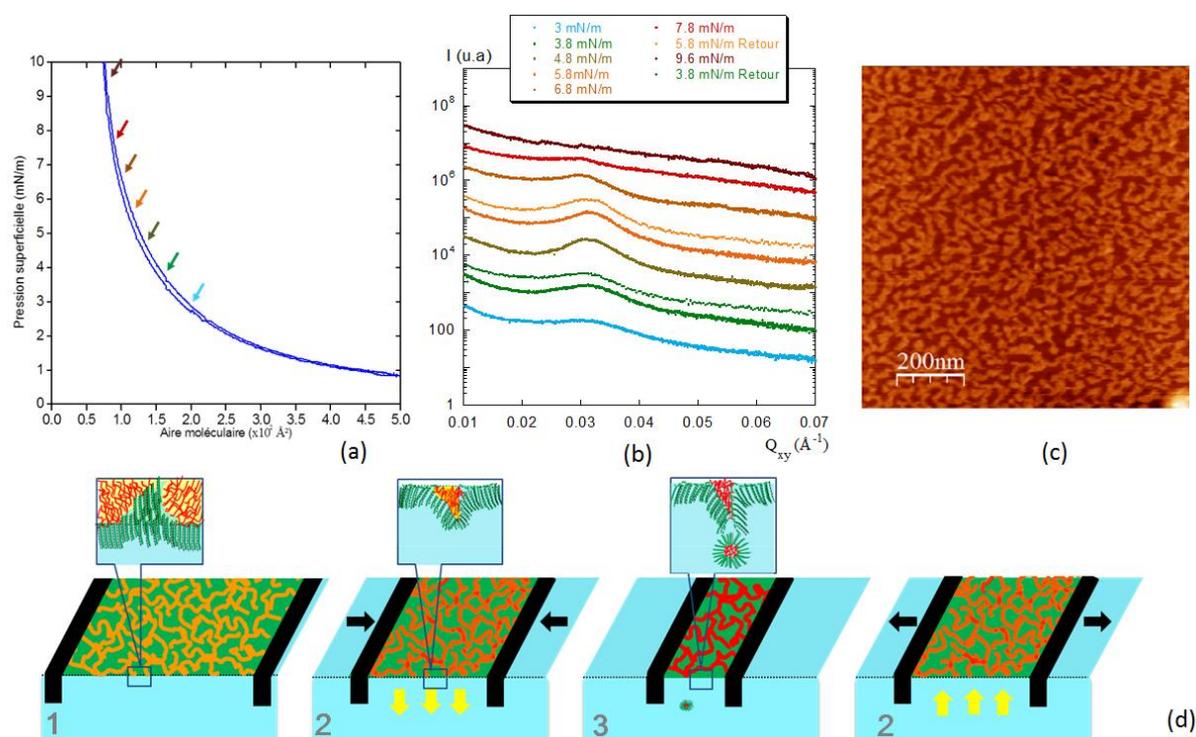


Figure 3.6 : Monocouches de PS-PAA à l'interface air/eau formées sur une sous-phase aqueuse à pH 9 à partir d'une solution de dépôt à base de DMF [112] : (a) Isotherme de compression du système. Les flèches de couleur repèrent les points de mesures de DXPAA. (b) Mesures de DXPAA. Les courbes sont arbitrairement décalées en intensité pour une meilleure lisibilité. (c) Image AFM de topographie en milieu liquide d'une monocouche de PS-PAA transférée sur substrat solide à $\Pi = 3,8$ mN/m. (d) Représentation schématique de l'évolution du système lors d'un cycle de compression/décompression. Le PS est représenté en rouge, le PAA en vert, le DMF en jaune et l'eau en bleu.

²²⁶ Ceci doit se produire sous la forme d'invaginations de la monocouche dans la sous-phase aqueuse qui peuvent éventuellement se scinder en micelles, menant à une solubilisation définitive de certains copolymères dans l'eau. Les isothermes de compression ne sont d'ailleurs pas complètement reproductibles sur plusieurs cycles d'expansion/compression car on perd un peu de matière à chaque cycle.

²²⁷ Les mesures et profils associés sont présentés dans la thèse de Zineb [112] et devraient être publiés très prochainement. Lorsque le signal des blocs PS est annulé, il apparaît sur les courbes expérimentales des franges d'interférences marquées, ce qui est la signature structurale d'une couche épaisse de blocs PAA solvatés dans la sous-phase aqueuse. Le profil de ces blocs dérivé de l'ajustement des courbes est très similaire à un profil gaussien de forme $\phi(z) = \phi_0 \exp(-(z/l)^2)$, où l est la longueur caractéristique de la brosse, sauf pour la partie terminale qui présente un excès de densité. Les mesures en contraste PAA éteint montrent quant à elles la formation d'une couche de PS de faible épaisseur à basse pression superficielle. Pour les plus hautes pressions superficielles, il apparaît sur les courbes expérimentales des franges d'interférences amorties aux petits q_z qui prouvent que certains blocs PS plongent jusqu'à près de 100 Å de l'interface.

En conclusion, les deux techniques de caractérisation structurales de surface se sont révélées très complémentaires car chacune d'entre elles a apporté des informations uniques sur le système. Leur utilisation conjointe nous a ainsi permis de proposer une description des structures des monocouches de PS-PAA dans une vaste gamme de conditions expérimentales avec une précision inégalée. Ce faisant, nous avons revisité le comportement de ces copolymères hydrophiles/hydrophobes à l'interface air/eau en soulignant le rôle crucial joué par le solvant de dépôt et en démontrant que le pseudo-plateau n'est pas lié à une transition de type champignon/brosse.

Chapitre IV. Projets : Et si l'on continuait à s'amuser avec les neutrons...

Je liste dans cette dernière partie ici les projets que je propose de développer dans les 4 années à venir²²⁸, qui seront pour certains les prolongements directs des sujets présentés dans les parties précédentes et pour d'autres liés à des thématiques complètement nouvelles pour moi, avec comme point commun le fait qu'ils devraient pouvoir être menés à bien grâce à l'utilisation intensive des techniques neutroniques. Je souhaite en particulier me former sur les techniques nouvellement disponibles au laboratoire, à savoir la DNPA en incidence rasante et la neutronographie²²⁹, ce qui m'obligera à m'ouvrir à des thématiques ne relevant plus directement de la matière molle dans le cas de la neutronographie. En outre, je souhaite orienter une partie de mes recherches vers des problématiques d'intérêt industriel plus appliquées que ce qu'ai pu faire jusqu'à présent²³⁰.

IV.I Métallisation d'auto-assemblages de copolymères en volume et en surface

Ce projet²³¹ s'inscrit dans la suite directe de la thèse Zineb Guennouni relatée dans la partie 3.4 sur l'utilisation de « moules » formés d'auto-assemblage de copolymères pour l'obtention de nanostructures métalliques par radiolyse et/ou photoréduction. Si les résultats obtenus lors de cette thèse relatifs à la description des monocouches de PS-PAA furent fructueux, ceux concernant les tentatives de métallisation de ces monocouches par de l'argent furent par contre beaucoup plus mitigés. Nous avons en effet démontré que l'introduction d'ions Ag^+ dans la sous-phase aqueuse induit l'effondrement de la monocouche [112], le bloc PAA n'étant en effet pas suffisamment hydrophile pour se solvater en milieu aqueux en présence de ce cation [115]²³².

Nous avons donc décidé de changer de moule organique et proposons d'utiliser le copolymère PS-b-P(S-st-DMAEMA) comme brique élémentaire pour former nos assemblages. Ce copolymère est un copolymère séquencé formé d'un bloc hydrophobe de PS, qui servira d'ancre hydrophobe pour l'accrochage à l'interface air/eau, et d'un bloc hydrophile composé d'un copolymère statistique formé de motifs cationiques de 2-(diméthylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) et de motifs hydrophobes styrène, le taux de motifs DMAEMA au sein du bloc pouvant être modulé à façon lors de la synthèse. L'architecture de ce bloc hydrophile devrait ainsi permettre un contrôle inégalé de la quantité d'ions condensés sur les chaînes puisqu'il dépendra à la fois du taux de motifs DMAEMA et

²²⁸ Je me garde de donner des perspectives précises sur le plus long terme. En effet, il a été acté en mai 2015 que le réacteur Orphée, qui fournit les neutrons du Laboratoire Brillouin, sera fermé en 2019, et ce sans que l'on sache si le Laboratoire perdurera au-delà de cette date. Mes activités scientifiques dépendront donc fortement de décisions qui seront prises dans ce sujet dans les années à venir. Elles seront de toutes façons à terme moins « neutrons-centrées » car les sources de neutrons devraient fortement se tarir en Europe dans les années à venir pour des raisons budgétaires, et ce alors même que la source à spallation européenne de haute brillance ESS ne devrait pas être complètement opérationnelle avant au moins 2025. En effet, outre la fermeture annoncée d'Orphée et celle déjà actée du HMI à Berlin, le nombre de jours de faisceau disponibles à l'ILL a été notablement réduit en 2015 pour économiser l'uranium et le flou règne pour 2016.

²²⁹ Grâce à la mise en service de la station d'imagerie IMAGINE en 2014 [172] et du spectromètre de diffusion aux petits angles PA20 en 2015[173]. Ce nouveau spectromètre de DNPA intègre un collimateur très flexible permettant des collimations similaires à celles que l'on trouve sur un réflectomètre et nécessaires aux mesures de DNPAIR, qu'il n'était pas possible de réaliser sur les spectromètres de DNPA déjà existants au LLB.

²³⁰ Plus particulièrement dans les domaines de l'agro-alimentaire, de la pharmacologie ou de la cosmétique. Le projet relatif à l'élaboration de biogels pour l'encapsulation du fer en est un exemple. Je tiens d'ailleurs ici à remercier Camille Loupiac (AgroSup Dijon) et son formidable carnet d'adresses qui, lors de passage de deux ans au LLB, m'a fait rencontrer nombre d'industriels de l'agro-alimentaire désireux de goûter aux neutrons.

²³¹ Il se fera au sein d'un véritable consortium formé de partenaires issus de 4 laboratoires différents. Michel Goldmann (INSP Paris) et moi-même, déjà impliqués dans la thèse de Zineb Guennouni, seront rejoints par Patrick Perrin (laboratoire SIMM, ESPCI Paris), spécialiste de la synthèse macromoléculaire, Philippe Fontaine (synchrotron Soleil), spécialiste de diffusion des rayons X de surface, François Muller (LLB/ECE-Paris), spécialiste des micelles à cheveux polyelectrolyte et, *last but not least*, Louis Bondaz, dont la thèse a débuté sur le sujet en octobre 2015 et qui sera le véritable maître d'œuvre du projet.

²³² De ce fait, s'il l'on irradie la monocouche en présence d' Ag^+ avec des rayons X, on forme simplement des colloïdes d'argent sous la monocouche collapsée, sans que la présence du moule organique ait apporté une quelconque plus-value par rapport à la simple illumination d'une solution de sels d'argent.

du degré d'ionisation de ces motifs²³³, deux paramètres qu'il est possible de faire varier de façon indépendante. Ce bloc étant positivement chargé, nous chercherons à métalliser le complexe négativement chargé AuCl_4^- en remplacement de Ag^+ pour former les nanostructures métalliques²³⁴. Par ailleurs, la morphologie des assemblages pourra être modulée par le rapport des longueurs des deux blocs qui pilote le paramètre d'empilement du système. Le système sera étudié aussi bien en solution qu'à l'interface air/eau pour comparer les nanostructures issues de la métallisation de moules 3D ou 2D. En particulier, nous envisageons des mesures de DNPA en incidence rasante avec variation de contraste pour décrire les nanostructures formées par les moules organiques en 2D, mesures qu'il sera possible de mettre en œuvre sur le nouveau spectromètre PA20 du LLB²³⁵.

IV.2 Impact du chemin de formulation sur la complexation de colloïdes inorganiques avec des polyelectrolytes de charges opposées

Ce projet fait écho à la thématique développée sur la complexation de protéines et de PEL dans la première partie du manuscrit puisque traitant de complexes électrostatiques d'objets de charges opposées. Sa philosophie est cependant différente puisque le propos est ici de déterminer si, dans ces systèmes hors d'équilibre, les mécanismes de complexation sont affectés par le chemin de formulation usité pour former les complexes. Il se fait au sein de l'ANR PANORAMA²³⁶ qui a pour objectif d'évaluer les impacts respectifs que peuvent avoir à la fois les forces d'interaction et le chemin de formulation sur les morphologies et les états thermodynamiques de systèmes macromoléculaires auto- ou co-assemblés, en couplant notamment mesures structurales et thermodynamiques. L'idée de proposer cette ANR était basée sur un constat simple, à savoir qu'il existe peu d'études visant à décrire de façon rationnelle le lien existant entre l'histoire d'un système²³⁷ et ses propriétés finales[116][117][118], alors même que les formulateurs expérimentent chaque jour le fait qu'il est possible d'obtenir quantité de systèmes hors d'équilibre à partir de briques de base identiques, en jouant simplement sur les conditions utilisées pour les assembler. Au cours de l'ANR, l'accent sera particulièrement porté sur l'influence du temps caractéristique de mélange, qui pourra être varié sur plusieurs décades de quelques *ms* jusqu'à quelques heures par des dispositifs expérimentaux adaptés. Ceci nous amènera à faire des suivis cinétiques de la morphologie des assemblages par la DNPA, en utilisant notamment *des mélangeurs à flux stoppé* permettant d'atteindre des temps de mélange ultra-rapides. L'arsenal de la variation de contraste sera bien évidemment utilisé lors de ces expériences.

La partie sur laquelle je travaillerai se focalisera sur les mécanismes d'assemblage et de désassemblage de complexes denses formés de nanoparticules inorganiques chargées et de polyelectrolytes (NPs/PEL) de charges opposées dans le régime des très hautes forces ioniques. Dans

²³³ Le pKa de ces motifs est de 6.8 pour les diblocs purs et décroît jusqu'à ~ 6.2 quand la partie hydrosoluble est statistique [174].

²³⁴ Même s'il est déjà noble de travailler sur l'argent, il est encore plus chic de fabriquer des nanostructures hydrides *plaqué or* ! Plus sérieusement, il existe à l'heure actuelle un fort engouement pour le développement de nouvelles voies de synthèse de nanoparticules d'or, motivé par les propriétés plasmoniques remarquables de ces dernières.

²³⁵ Les mesures de DNPA-IR nous permettront notamment de résoudre spatialement l'évolution des nanostructures dans les premiers nanomètres sous la surface, en jouant sur la profondeur de onde évanescente qui peut être réglée très finement au voisinage de l'angle de Brestwer neutronique [175].

²³⁶ Cette ANR intitulée *Assemblage Macromoléculaire Hors-équilibre Compréhension, Contrôle & Nouvelles Structures*, comme son acronyme ne l'indique pas, est portée par Jean-Paul Chapel (CRPP Bordeaux) et a pour autres partenaires Christophe Schatz (LCPO Bordeaux), Jean-François Berret (MSC Paris) et moi-même pour le LLB.

²³⁷ Par histoire de l'échantillon, j'entends ici la description de tous les processus appliqués pour former le système (la recette, en quelque sorte...). Dans le cas de complexes d'objets A et B de charges opposées, ce peut être par exemple la façon dont a été fait le mélange (vitesse de mélange, mélange progressif de A dans B ou de B dans A, etc.), la façon dont la force ionique a été imposée au système (fixée dès le départ, modifiée après formation des complexes de façon brusque par ajout de sel ou douce par dialyse, etc...).

ces systèmes NPs/PEL, il existe une force ionique critique seuil, dont l'ordre de grandeur est d'environ 0,4 mol/L²³⁸, à partir de laquelle les interactions électrostatiques sont tellement écrantées que la complexation n'opère plus. La transition entre co-assemblages et objets individuels non complexés est très brusque puisqu'elle se fait sur une plage de quelques mM. Partant d'un mélange de NPs et de PEL non associés dans une solution très salée, il est ainsi possible d'induire la complexation par dessalage si la force ionique est abaissée en dessous de la valeur critique de transition, le dessalage permettant « d'allumer » les interactions électrostatiques dans le système²³⁹. Or, il a été remarqué que les tailles et les morphologies des agrégats sont des structures hors d'équilibre dépendant de la cinétique de dessalage [117][118]²⁴⁰. L'objectif du projet que nous proposons est de décrire plus avant les mécanismes liés à cette cinétique de dessalage, en testant notamment si des trempes de dessalage peuvent figer le système dans des structures particulières et si ces structures dépendent de la vitesse de trempe, *id est* s'il existe pour ces systèmes l'équivalent d'une transition vitreuse pilotée par l'électrostatique²⁴¹.

IV.3 Formulation de matrices alimentaires enrichies en fer à base de polysaccharides

L'objectif de ce projet est l'encapsulation du fer, un oligo-élément essentiel pour l'organisme, dans une matrice polysaccharidique à base de pectine afin de remplacer les solutions utilisées actuellement pour son enrichissement dans les aliments. C'est donc un projet à visée pharmaceutique dont la problématique est en phase avec l'orientation plus appliquée que je souhaite donner à mes recherches. Il fait suite à une collaboration déjà existante entre le laboratoire PAM et le LLB visant à décrire finement les mécanismes de gélation de la pectine en présence de cations divalents Ca^{2+} ou Zn^{2+} [119]²⁴². En pratique, nous essaierons de formuler des biogels contenant du fer pour la vectorisation à partir d'acide polygalacturonique²⁴³. Nous nous focaliserons

²³⁸ Cette force ionique seuil varie d'un système à l'autre mais l'ordre de grandeur reste le même (0,39 mol/L pour des complexes $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-PAA}_{2\text{K}}/\text{PTEA}_{11\text{K}}\text{-b-PAM}_{30\text{K}}$ [118], 0,43 mol/L pour $\text{CeO}_2\text{-PAA}_{2\text{K}}/\text{PDADMAC}_{100\text{K}}$ [117], 0,5 mol/l pour $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-PAA}_{2\text{K}}/\text{PDADMAC}_{8\text{K}}$ (mesures de Laure, cf note 241). A ces forces ioniques, la longueur de Debye λ est très faible, de l'ordre de 0,3 nm, si tant est que la notion de longueur de Debye ait encore un sens pour des forces ioniques si élevées.

²³⁹ Ce concept utilisé pour induire la complexation est alors similaire dans l'esprit à celui utilisé dans une réaction chimique avec des espèces dormantes.

²⁴⁰ Les résultats décrits dans la référence [118] sont particulièrement remarquables. Les auteurs induisent la formation de complexes de NPs de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-PAA}_{2\text{K}}$ et de copolymères de $\text{PTEA}_{11\text{K}}\text{-b-PAM}_{30\text{K}}$ en abaissant lentement la force ionique par dialyse, ce qui permet la formation d'agrégats sphériques de plusieurs milliers de NPs. Si un champ magnétique est appliqué pendant cette dialyse, des aiguilles micrométriques rigides relativement monodisperses sont formées en lieu des sphères, stables dans le temps, et qui peuvent être manipulées ultérieurement par des champs magnétiques. C'est une belle démonstration de l'utilisation du chemin de formulation pour l'élaboration de matériaux innovants basé sur le contrôle de la formation de structures hors d'équilibres.

²⁴¹ Ce travail sera principalement effectué par Laure Hermann, dans le cadre d'un contrat post-doctoral MSC/LLB, qu'elle a commencé au laboratoire MSC avec Jean-François Berret, et qu'elle poursuivra au LLB courant 2016. Le système que nous avons choisi d'étudier est constitué de PDADMAC pour le PEL et de nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ décorées de chaînes courtes de PAA pour les NPs, soient *les briques de base déjà rencontrées au cours des chapitres II et III.4*. Laure a déjà obtenu des résultats spectaculaires sur le comportement du système lors de cycles de dessalage/salage en cherchant à déterminer si les agrégats formés se re-dissocient complètement lorsque l'on repasse la transition critique par fort ajout de sel. Elle a pu mettre en évidence que la re-dissociation est totale si l'ajout est effectué quelques minutes après la trempe mais qu'il reste des agrégats si cet ajout est effectué plusieurs heures ou jours après la trempe, la taille des agrégats rémanents étant d'autant plus important que le délai entre la trempe et l'ajout est élevé.

²⁴² C'est une collaboration centrée autour d'Ali Assifaoui (PAM, AgroSup Dijon), spécialiste de la pectine, impliquant Adrien Lebrét (PAM), moi-même et Camille Loupiac (PAM), qui a permis qui nous nous rencontrions tous lors de son passage au LLB comme chercheuse invitée. Elle est née suite aux questions que se posait Ali quant aux différences de mécanismes de gélation de la pectine pouvant exister selon qu'on initie cette gélation avec du zinc ou du calcium. Il avait en effet formulé des billes de pectinate pour l'encapsulation à partir de ces cations et avait montré que les propriétés macroscopiques de ces billes (taux d'encapsulation, gonflement, libération...) dépendaient fortement du cation utilisé [176][177]. Nous avons alors entamé une étude couplant mesures mécaniques, structurales, thermodynamiques et des simulations de dynamique moléculaire qui ont permis de revisiter les mécanismes de formations de gélation de la pectine [119].

²⁴³ La pectine est une macromolécule complexe formée d'un squelette linéaire d'acide polygalacturonique sur lequel il existe des zones branchées plus ou moins ramifiées de différents types de sucres. Elle montre une très grande variabilité selon

particulièrement sur l'état d'oxydation du fer dans ces gels (Fe^{2+} versus Fe^{3+} , sachant que le Fe^{2+} est plus facilement assimilable par l'organisme) en fonction de fortes variations de pH ou de force ionique puisque l'objectif principal du projet est d'élaboration de vecteurs protégeant le fer de l'oxydation dans les environnements agressifs, du point de vue physicochimique, qui peuvent être rencontrées dans le système digestif²⁴⁴.

IV.4 Imagerie neutronique, tomographie et variation de contraste

Si les techniques d'investigation structurale d'espace réciproque de diffusion et de diffraction ou les spectroscopies se sont développées de longue date avec les neutrons, il n'y a paradoxalement que depuis peu de temps que les techniques d'imagerie directe en transmission prennent leur essor dans les centres de diffusion neutronique²⁴⁵, et ce grâce à l'avènement d'algorithmes performants permettant les reconstructions 3D d'objets par tomographie²⁴⁶. Ces techniques de radiographie et de tomographie permettent d'observer des structures à des échelles spatiales très supérieures à celles sondées par les techniques d'espace réciproque, de l'ordre de quelques dizaines de microns jusqu'à plusieurs dizaines de centimètres²⁴⁷. Elles sont particulièrement adaptées au suivi de la migration de fluides dans tous types de systèmes poreux ou de milieux hétérogènes car le coefficient d'atténuation d'un matériau est essentiellement dépendant de sa teneur en hydrogène et peut être fortement modulé par substitution isotopique²⁴⁸. Elles permettent donc de traiter des problématiques importantes dans des disciplines telles que la science du sol ou la géologie. C'est dans ce contexte que nous avons débuté une collaboration avec des chercheurs en science du sol de l'INRA d'Orléans²⁴⁹, visant à imager les phases hydriques et gazeuses au sein d'un sol lors de cycles consécutifs d'humectation et de dessiccation, l'objectif étant de suivre l'évolution de la distribution et de la connectivité de la phase hydrique dans le réseau poreux d'un cycle à l'autre. Ceci devrait permettre de mieux décrire les mécanismes d'hystérèse hydrique apparaissant dans les sols et, *in*

l'origine de la source depuis laquelle elle a été extraite, généralement un fruit (pomme, poire, citron...). Nous avons donc choisi de nous concentrer sur le seul acide polygalacturonique pour simplifier la description des mécanismes polysaccharides/ions ferreux ou ferriques à l'échelle moléculaire.

²⁴⁴ Cette étude se fera dans le cadre de la thèse d'Aline Maire du Poset qui a débuté à l'automne 2015, en partenariat entre laboratoire PAM d'AgroSup Dijon avec Ali Assifaoui et Adrien Lerbret, le LLB avec moi-même et le synchrotron SOLEIL avec Andrea Zitolo. Nous déterminerons notamment la structure du gel par DNPA et l'état d'oxydation du fer avec des mesures spectroscopiques de XANES.

²⁴⁵ Et ce bien que les appareils de neutronographie sont plus simples à construire et beaucoup moins chers que les autres spectromètres neutrons.

²⁴⁶ Ceci est lié au fort développement des techniques d'imagerie 3D lors de ces vingt dernières années, en particulier dans le domaine de l'imagerie médicale.

²⁴⁷ Elles intéressent ainsi des utilisateurs provenant de disciplines aussi variées que les sciences des matériaux, les nouvelles technologies de l'énergie (piles à combustibles, batterie au lithium), les sciences du sol, la géologie, la physique nucléaire, la métallurgie, mais aussi les sciences archéologiques, l'héritage culturel, ou l'agro-alimentaire. C'est pour attirer ces nouvelles communautés d'utilisateurs vers les neutrons qu'est née très récemment la station IMAGINE, la première station d'imagerie du LLB ouverte aux utilisateurs extérieurs, opérationnelle depuis le printemps 2014 [172]. Il existe par ailleurs un autre appareil de neutronographie installé sur le réacteur Orphée, *G45*, ouvert depuis près de 30 ans. Cet appareil est dévolu à des mesures de type « contrôle qualité » sur des pièces industrielles de grande taille et est géré par une société extérieure au laboratoire. Il n'est donc pas accessible à la communauté scientifique par la procédure classique de demandes de temps de faisceau.

²⁴⁸ De manière générale, la matière est très transparente vis-à-vis des neutrons du point de vue de l'absorption puisque seuls certains éléments du tableau périodique possèdent des sections efficaces d'absorption ayant des valeurs significatives ou importantes (le bore, le cadmium, l'hélium 3, le gadolinium...). C'est en fait la diffusion qui est le principal facteur d'atténuation des neutrons lors de la traversée d'un échantillon, et en particulier la diffusion incohérente, homogène sur 4π stéradians. Comme pour la diffusion cohérente pour laquelle il possède une longueur de diffusion cohérente très différente des autres atomes légers, c'est encore l'hydrogène ^1H qui se distingue des autres atomes en ce qui concerne cette diffusion incohérente. Sa section efficace est très élevée ($\sigma_{\text{inc}} = 80,26 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^{-2}$), 40 fois supérieure à celle du deutérium ^2H ($2,05 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^{-2}$), alors que celles du C et de l'O sont nulles et que celle de l'N est faible ($0,5 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^{-2}$). En d'autres termes, pour des objets composés de molécules organiques, ce sont la teneur en hydrogène et la composition isotopique H/D qui fixent le coefficient d'atténuation du faisceau.

²⁴⁹ Le projet est principalement développé par Eva Rabot, spécialiste de la science du sol, en contrat post-doctoral au LLB depuis novembre 2014, en collaboration avec Marine Lacoste et Isabelle Cousin, de l'unité de l'Unité de Recherche en Sciences du Sol d'Orléans (UR 072), et avec Frédéric Ott et moi-même.

fine, de mieux modéliser le transport de l'eau et du gaz. Pour ce faire, nous utilisons notamment la variation de contraste afin de *marquer* les zones du réseau de pores dans lesquelles la phase hydrique est piégée. L'idée est de changer le coefficient d'atténuation de l'eau introduite dans l'échantillon lors de chaque phase d'humectation par l'utilisation de mélanges H₂O/D₂O de teneur en D₂O variable pour déterminer si le coefficient d'atténuation d'une zone hydratée de l'échantillon a évolué d'un cycle à l'autre.

Les premiers tests utilisant un « vrai » sol s'étant révélés peu fructueux²⁵⁰, nous avons montré la faisabilité de principe sur un système modèle formé de billes de silice et de sable²⁵¹ qui a été saturé lors d'un premier cycle par de l'eau lourde, dé-saturé, puis re-saturé lors d'un second cycle par un mélange d'eau contenant 10% d'eau légère. Les figures 4.1.a et 4.1.b présentent la distribution 3D de la phase hydrique dans l'échantillon, respectivement après une phase de saturation et après une phase de désaturation. Il apparaît ainsi qu'il reste une quantité d'eau piégée importante à l'issue de la désaturation. La coupe transverse de la figure 4.1.c résulte quant à elle de la soustraction de deux images. C'est en effet l'image obtenue après la saturation du second cycle avec 90%D₂O/10%H₂O de laquelle a été soustraite l'image obtenue après la désaturation du premier cycle. Les parties noires correspondent ainsi aux zones de l'échantillon pour lesquelles le coefficient d'atténuation n'a pas évolué, et qui peuvent être soit du vide, soit de la silice²⁵², soit de l'eau lourde provenant de la saturation du premier cycle et non échangée lors du second. Les contours en jaune repèrent pour leur part l'eau lourde segmentée après la désaturation. *En combinant les informations, il est donc possible d'assigner à chaque voxel de l'échantillon reconstruit la phase dont il est composé (eau introduite lors du second cycle, eau piégée après le premier cycle, silice provenant des billes ou du sable, vide)*. La suite du projet consistera à utiliser le même type d'approche sur des systèmes formés de milieux poreux ayant une structure beaucoup plus hétérogène.

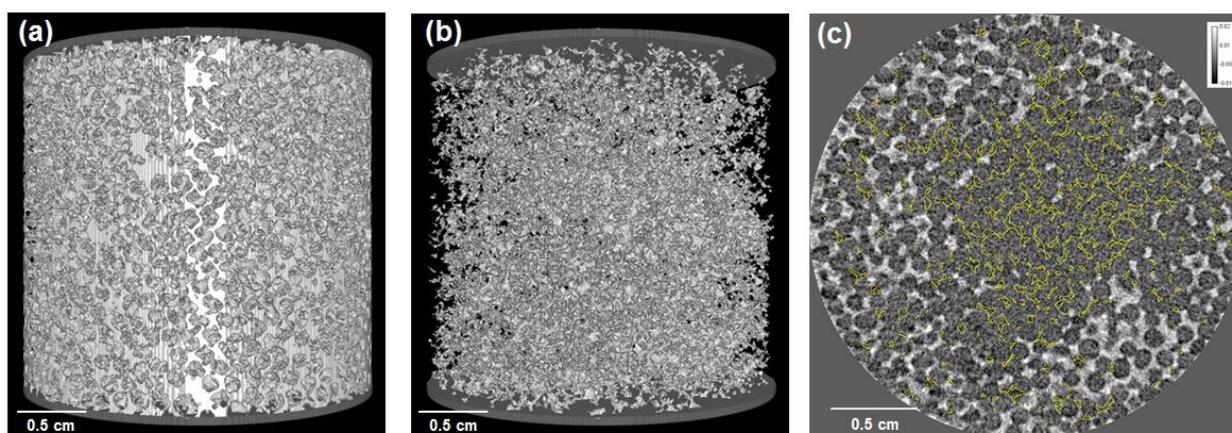


Figure 4.1 : Représentation en 3D de la distribution de la phase hydrique dans un système modèle composé de billes de silice millimétriques et de grains de sable : (a) à l'issue d'une phase de saturation en eau; (b) à l'issue d'une phase de désaturation; (c) Coupe transverse correspondant à une image obtenue après saturation par un mélange H₂O/D₂O lors du second cycle de laquelle a été soustraite une image obtenue après la désaturation du premier cycle. Les contours en jaune repèrent l'eau segmentée après la phase de désaturation.

²⁵⁰ Nous avons en effet rencontré de grandes difficultés à caractériser le réseau hydrique du sol choisi pour les mesures, provenant d'une parcelle témoin située en Poitou-Charentes, car ce milieu poreux hétérogène possède une grande distribution de tailles de pores, dont certaines sont inférieures à la taille limite qu'il est possible de résoudre par l'expérience. De ce fait, les pores fins saturés d'eau et la phase solide se présentent comme des zones de contraste moyen homogène, dont la valeur dépend de la quantité d'eau qu'ils contiennent, ce qui a rendu la distinction des phases solides et hydriques impossible.

²⁵¹ Le diamètre des billes était de l'ordre de 1000 μm et celui des grains de sable de 500 à 800 μm, soient des tailles très supérieures à la résolution utilisée lors de l'expérience (~ 100 μm). La silice est pratiquement transparente aux neutrons car le Si et l'O ont des sections efficaces d'absorption très faibles et des sections efficaces de diffusion incohérentes nulles. Il est néanmoins possible de la distinguer facilement de l'eau et de l'air en tomographie de neutrons.

²⁵² Les disques noirs présents sur les bords de l'échantillon sont très facilement identifiables aux billes de silice.

IV.5 Mousses et émulsions : des architectures complexes faciles à contraster

Cette toute dernière partie traite de l'utilisation de la variation de contraste en DNPA pour la caractérisation d'architectures complexes : les émulsions et les mousses. Ce sont des sujets que j'ai déjà traités lors de la thèse d'Anne-Laure Fameau (cf chapitre III.3) et que je poursuis actuellement plutôt au travers de collaborations poussées, en particulier avec I. Capron (BIA, INRA Nantes) sur les émulsions de Pickering à base de nanocristaux de cellulose [120] et avec A. Salonen (LPS Orsay) sur la formulation de mousses ultrastables (LPS Orsay) [121]. Les concepts d'utilisation du contraste que je présente ici étant à la fois très puissants, faciles à mettre en œuvre et sur le principe transposables à tous les systèmes d'émulsions et de mousses, j'aimerais les populariser afin d'attirer la communauté vers la DNPA dans les années à venir.

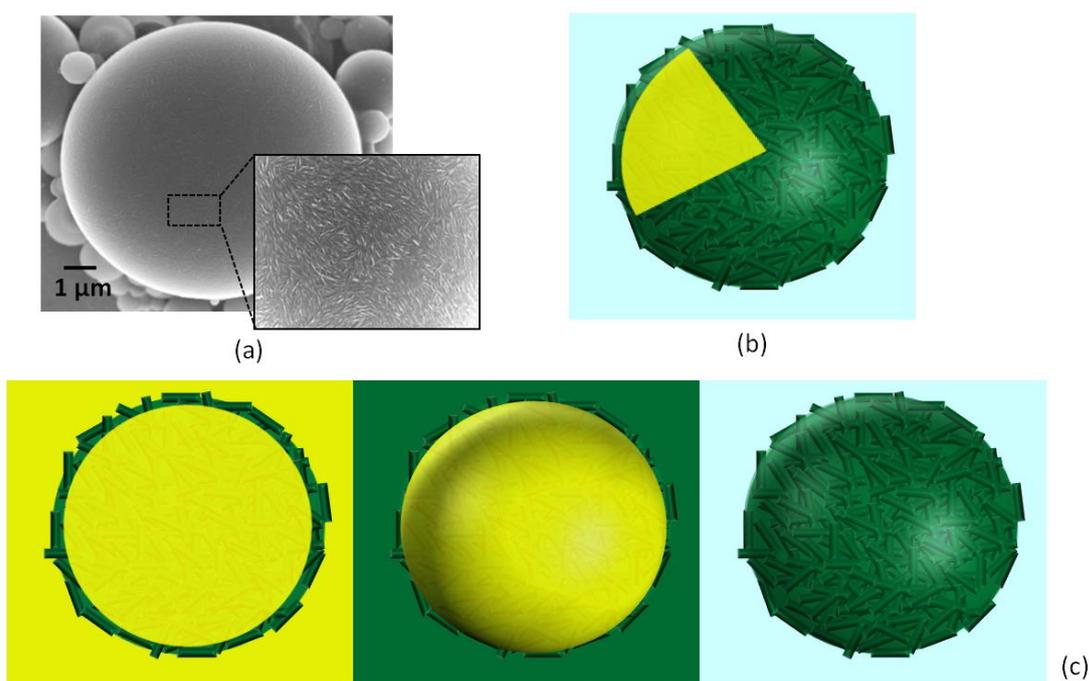


Figure 4.2 : Utilisation de la variation de contraste pour la caractérisation d'émulsions de Pickering stabilisées par des nanocristaux de cellulose [120]. (a) Image MEB d'une gouttelette; (b) Représentation schématisée de l'émulsion; (c) Illustration des 3 contrastes utilisés pour les expériences de DNPA : « eau = huile », seule l'interface formée de la couche de nanocristaux est visible (panneau de gauche); « eau = nanocristaux », la face interne de la gouttelette est visible (panneau du centre, lisse dans [120]); « huile = nanocristaux », la face externe de la gouttelette est visible (panneau de droite, rugueuse dans [120]).

Concernant les émulsions²⁵³, la problématique est de décrire finement la structure de la couche de stabilisants à l'interface eau/huile, les stabilisants pouvant être de nature très variée (nanoparticules, savons, complexes, protéines, etc...). Les gouttes ayant des tailles caractéristiques très supérieures à celles que l'on peut sonder aux neutrons, le signal mesuré en DNPA ne dépend que de leur interface. La caractérisation est alors basée sur l'idée, proposée initialement en référence [122], d'utiliser trois contrastes différents pour dépeindre cette interface de 3 façons différentes (cf figure 4.2). Lors de la première mesure, le contraste de l'eau est ajusté à celui de l'huile. L'interface est alors vue comme un plan infini du point des neutrons, le signal présentant de ce fait une décroissance globale en q^{-2} ²⁵⁴. Une approximation de Guinier permet alors de déterminer

²⁵³ J'entends ici les émulsions « classiques », directes ou inverses, ayant des tailles de goutte supérieures au micron, la DNPA étant évidemment utilisée de longue date pour la caractérisation des microémulsions.

²⁵⁴ Il faut évidemment que le signal ne soit pas perturbé par de la diffusion aux petits angles résiduelle d'objets en excès non adsorbés présents dans la phase aqueuse, ou dans la phase huile dans les émulsions inverses. Les expériences sont donc facilitées quand les émulsions peuvent être lavées. Si ce n'est pas le cas, il faut soustraire du signal cette contribution additionnelle, ce qui peut s'avérer délicat [122].

directement l'épaisseur du film²⁵⁵, et éventuellement de la comparer avec les dimensions caractéristiques des stabilisants pour préciser leur mode d'adsorption²⁵⁶. Les deux autres mesures sont des variations autour de la loi de Porod. Le contraste de l'objet stabilisant est en effet ajusté soit à celui de l'eau, soit à celui de l'huile, le signal provenant alors de la diffusion par la surface des gouttes. Il est alors possible de déterminer si, pour chacune de ces deux conditions, l'interface est parfaitement lisse, *id* est que le signal présente une décroissance pure en q^{-4} , ou si elle est rugueuse²⁵⁷, et ce afin d'établir si les stabilisants plongent dans telle ou telle des deux phases liquides, ainsi que la surface spécifique de l'émulsion.

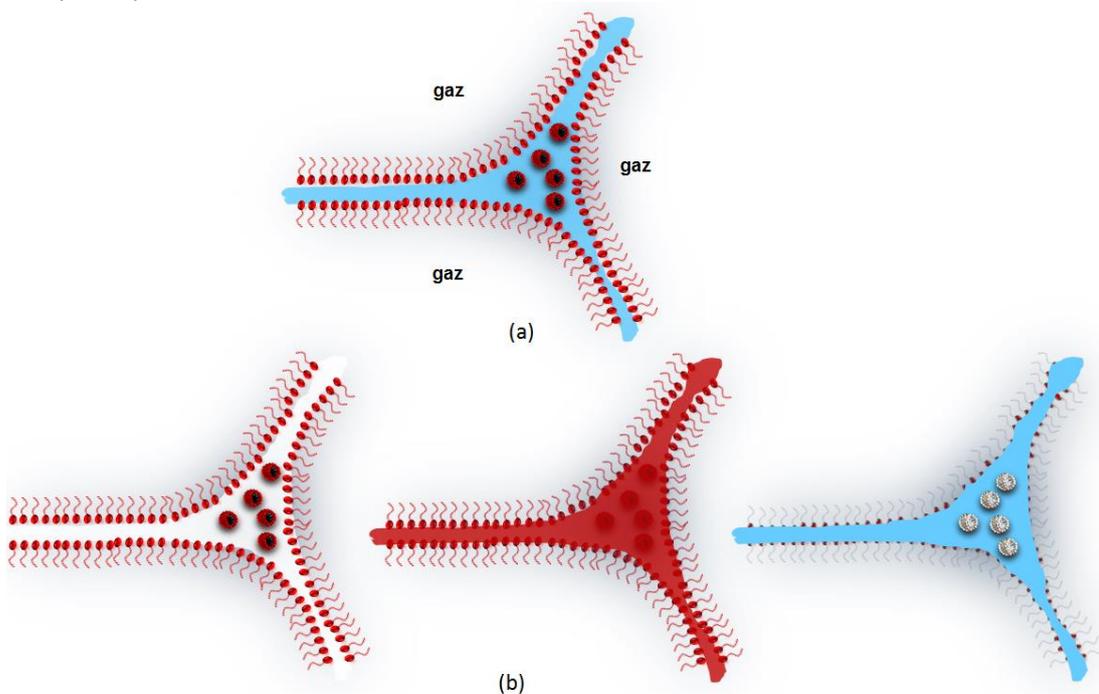


Figure 4.3 : Utilisation de la variation de contraste pour la caractérisation de mousses. (a) Représentation schématique de la mousse; (b) Illustration des 3 contrastes d'utilisation possible pour la DNPA : « eau = gaz » (panneau de gauche, cf note 258); « eau = stabilisants » (panneau du centre) ; « gaz = stabilisants » (panneau de droite, cf note 259).

Les caractérisations des mousses sont basées sur les mêmes artifices de contraste que pour les émulsions, à savoir que l'on peut égaler le contraste de l'eau à celui du gaz²⁵⁸ pour exalter le signal des stabilisants ou au contraire d'éteindre le signal de ce stabilisant en ajustant son contraste à celui de l'eau ou à celui du gaz²⁵⁹ (cf figure 4.3). L'interprétation des données est cependant rendue plus

²⁵⁵ On se concentre en effet sur la région des petits q , en postulant que le rayon de la gouttelette R est très supérieur à $1/q_{\min}$ et que l'épaisseur du film h est suffisamment petite pour que l'on soit dans le régime de Guinier vis-à-vis de cette épaisseur.

Le facteur de forme de la gouttelette s'écrit alors comme $P(q) \approx \frac{2}{qR^2} e^{\left(-\frac{qh^2}{3}\right)}$ pour $qh \leq 1$ et $qR \gg 1$. L'épaisseur h est obtenue sans modélisation par le tracé de $\ln(I(q))$ versus q^2 .

²⁵⁶ Il est alors possible de déterminer si les stabilisants s'adsorbent sous forme individuelle ou sous forme d'agrégats [122], si les protéines globulaires restent natives ou se déplient, ou si les stabilisants s'adsorbent avec une orientation préférentielle quand leur forme est anisotrope... Par exemple, nous avons pu démontrer que les nanocristaux de cellulose chargés s'adsorbent à plat sur des gouttelettes d'huile pour stabiliser des émulsions de Pickering, puisque l'épaisseur de l'interface mesurée sur de telles émulsions est toujours de 7 nm [120], ce qui correspond à la section d'un nanocristal individuel [178].

²⁵⁷ Dans ce cas, les déviations à la loi de Porod proviennent de la structure adoptée par les stabilisants perpendiculairement à l'interface, qu'il est alors possible de déterminer [7], ce qui revient à faire une expérience de réflectivité.

²⁵⁸ L'air, ou les autres gaz, ont une densité de longueur de diffusion qui peut être approximée à 0 du fait de leur très faible densité. Or, de façon remarquable, il est possible de faire des mélanges eau lourde/eau légère ayant une densité de longueur neutronique égale à 0 (pour 8% H₂O/92% D₂O). Si elle peut usitée en DNPA, cette « eau nulle » est très couramment utilisée en réflectivité des neutrons à l'interface air/eau.

²⁵⁹ Il n'est par contre évidemment pas possible d'ajuster le signal des stabilisants à celui du gaz. Cependant, lorsque les stabilisants de la mousse sont des savons à chaîne aliphatique CH₂ hydrogénés, leurs queues ont *de facto* une densité de longueur pratiquement nulle car $b_C \approx 2|b_H|$ ($b_C = 0,665$; $b_H = -0,374$). Les têtes polaires, pour leur part, ont un contraste proche de celui de l'eau car elles sont solvatées. De ce fait, si la composition isotopique de l'eau est choisie de sorte à ce

complexe que dans le cas des émulsions par le fait que les neutrons peuvent être réfléchis par les films minces ou diffusés par les stabilisants dans les bords de Plateau. L'utilisation conjointe des deux contrastes dans lesquels le stabilisant est éteint permet de mesurer proprement à la fois l'épaisseur des films (dans le contraste « eau = stabilisant ») et de déterminer la structure des stabilisants dans les bords de Plateau (dans le contraste « gaz = stabilisant », après soustraction du signal des films). Le contraste « gaz= eau » permet de résoudre quant à lui la structure des stabilisants au sein des films si la diffusion aux petits angles est négligeable. En pratique, le signal est dominé par la réflectivité des films lorsque les mousses sont sèches et par la diffusion aux petits angles dans les bords de Plateau lorsqu'elles sont humides. Une mesure dans un contraste quelconque, généralement dans l'eau lourde, permet ainsi d'obtenir soit l'épaisseur des films [107] [123], soit la morphologie des assemblages [121].

qu'elle soit très contrastée par rapport au gaz, en prenant de l'eau lourde par exemple, le système est pratiquement équivalent à un système « gaz = savon » du point de vue de contraste.

Bibliographie

- [1] F. Cousin, V. Cabuil, and P. Levitz, "Magnetic colloidal particles as probes for the determination of the structure of Laponite suspensions," *Langmuir*, vol. 18, no. 5, pp. 1466–1473, 2002.
- [2] B. Hammouda, "www.ncnr.nist.gov/staff/hammouda/the_sans_toolbox.pdf," *Probing Nanoscale Structures - The SANS Toolbox*.
- [3] D. Lairez and J. Pelta, "Diffusion de neutrons aux petits angles : application à l'étude des macromolécules biologiques en solution," *J. Phys. IV*, vol. 130, pp. 39–62, 2005.
- [4] T. Zemb and P. Lindner, Eds., *Neutrons, X-rays and light: scattering methods applied to soft condensed matter*. North-Holland, 2002.
- [5] I. Grillo, "ring and Applications in Soft Condensed Matter," in *Soft Matter Characterization*, R. Borsali and R. Pecora, Eds. Springer, 2008, pp. 723–782.
- [6] D. Lairez, "Bonnes pratiques de la diffusion de neutrons aux petits angles," *École thématique la Société Française la Neutron.*, vol. 11, pp. 43–69, Dec. 2010.
- [7] L. Auvray and A. Brûlet, "Diffusion de neutrons aux petits angles appliquée aux études d'interfaces et de systèmes confinés," *École thématique la Société Française la Neutron.*, vol. 12, pp. 179–205, May 2007.
- [8] J. Penfold and R. K. Thomas, "The application of the specular reflection of neutrons to the study of surfaces and interfaces," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 2, no. 6, pp. 1369–1412, 1990.
- [9] T. P. Russell, "X-ray and neutron reflectivity for the investigation of polymers," *Mater. Sci. Reports*, vol. 5, no. 4, pp. 171–271, 1990.
- [10] G. Fragneto, "Réflectivité de neutrons : exemples d'études des systèmes en matière molle," *École thématique la Société Française la Neutron.*, vol. 11, pp. 89–100, Dec. 2010.
- [11] J. Cotton, D. Decker, H. Benoit, B. Farnoux, J. Higgins, G. Jannink, R. Ober, R. Picot, and J. des Cloizeaux, "Conformation of polymer chain in the bulk," *Macromolecules*, vol. 7(6), pp. 863–872, 1974.
- [12] H. Morawetz and W. J. Hughes, "The interaction of proteins with synthetic polyelectrolytes. I. Complexing of bovine serum albumin," *J. Phys. Chem.*, vol. 56, no. 1, pp. 64–69, 1952.
- [13] H. Bungenberg de Jong and H. de Kruyt, "Coacervation (partial miscibility in colloid systems)," *Proc. K. Ned. Akad. Wet.*, no. 32, pp. 849–856, 1929.
- [14] F. Cousin, J. Gummel, S. Combet, and F. Boué, "The model Lysozyme-PSSNa system for electrostatic complexation: Similarities and differences with complex coacervation," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 167, no. 1–2, pp. 71–84, 2011.
- [15] A. B. Kayitmazer, D. Seeman, B. B. Minsky, P. L. Dubin, and Y. Xu, "Protein–polyelectrolyte interactions," *Soft Matter*, vol. 9, no. 9, p. 2553, 2013.
- [16] L. Bromberg and E. Ron, "Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 31, no. 3, pp. 197–221, 1998.
- [17] N. Chaniotakis, "Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 378, no. 1, pp. 89–95, 2004.
- [18] V. Izumrudov, I. Galaev, and B. Mattiasson, "Polycomplexes—potential for bioseparation," *Bioseparation*, vol. 7, no. 4, pp. 207–220, 1998.
- [19] L. Jourdain, M. Leser, C. Schmitt, M. Michel, and E. Dickinson, "Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: relationship to complexation in solution," *Food ...*, vol. 22, no. 4, pp. 647–659, 2008.
- [20] F. Caruso and H. Möhwald, "Protein multilayer formation on colloids through a stepwise self-assembly technique," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 25, pp. 6039–6046, 1999.
- [21] S. Rosenfeldt, A. Wittemann, and M. Ballauff, "Interaction of proteins with spherical polyelectrolyte brushes in solution as studied by small-angle x-ray scattering," *Phys. Rev. E*, vol. 70, no. 6, p. 061403, 2004.

- [22] G. Decher, "Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites," *Science (80-.)*, vol. 277, no. 5330, pp. 1232–1237, 1997.
- [23] X. Guo, A. Weiss, and M. Ballauff, "Synthesis of spherical polyelectrolyte brushes by photoemulsion polymerization," *Macromolecules*, vol. 32, no. 19, pp. 6043–6046, 1999.
- [24] C. Tribet, "Complexation between amphiphilic polyelectrolytes and proteins : from necklaces to gels," in *Surfactant Science Series*, T. Radeva and M. Dekker, Eds. New York, 1999, pp. 687–741.
- [25] C. L. Cooper, P. L. Dubin, a. B. Kayitmazer, and S. Turksen, "Polyelectrolyte-protein complexes," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 10, no. 1–2, pp. 52–78, 2005.
- [26] S. L. Turgeon, C. Schmitt, and C. Sanchez, "Protein-polysaccharide complexes and coacervates," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 12, no. 4–5, pp. 166–178, 2007.
- [27] S. Ulrich, M. Seijo, and S. Stoll, "The many facets of polyelectrolytes and oppositely charged macroions complex formation," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 11, no. 5, pp. 268–272, 2006.
- [28] E. Seyrek, P. L. Dubin, C. Tribet, and E. a. Gamble, "Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 2, pp. 273–282, 2003.
- [29] O. Ivinova and V. Izumrudov, "Influence of complexing polyanions on the thermostability of basic proteins," *Macromol. Biosci.*, vol. 3, no. 3–4, pp. 210–215, 2003.
- [30] J. Park, B. Muhoberac, P. Dubin, and J. Xia, "Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation," *Macromolecules*, vol. 25, no. 1, pp. 290–295, 1992.
- [31] A. Tsuboi, T. Izumi, M. Hirata, and J. Xia, "Complexation of Proteins with a Strong Polyanion in an Aqueous Salt-free System," *Langmuir*, vol. 12, no. 26, pp. 6295–6303, 1996.
- [32] F. Carlsson, M. Malmsten, and P. Linse, "Protein-polyelectrolyte cluster formation and redissolution: A Monte Carlo study," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 10, pp. 3140–3149, 2003.
- [33] C. L. Cooper, A. Goulding, a. B. Kayitmazer, S. Ulrich, S. Stoll, S. Turksen, S. I. Yusa, A. Kumar, and P. L. Dubin, "Effects of polyelectrolyte chain stiffness, charge mobility, and charge sequences on binding to proteins and micelles," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 4, pp. 1025–1035, 2006.
- [34] F. Carlsson, P. Linse, and M. Malmsten, "Monte Carlo simulations of polyelectrolyte-protein complexation," *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, no. 38, pp. 9040–9049, 2001.
- [35] S. Stoll and P. Chodanowski, "Polyelectrolyte adsorption on an oppositely charged spherical particle. Chain rigidity effects," *Macromolecules*, vol. 35, no. 25, pp. 9556–9562, 2002.
- [36] a B. Kayitmazer, E. Seyrek, P. L. Dubin, and B. a Staggemeier, "Influence of Chain Stiffness on the Interaction of Polyelectrolytes with Oppositely Charged Micelles and Proteins," *J. Phys. Chem.*, vol. 107, pp. 8158–8165, 2003.
- [37] M. Skepö and P. Linse, "Dissolution of a polyelectrolyte-macroion complex by addition of salt," *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 66, no. 5, pp. 1–7, 2002.
- [38] J. Xia, P. L. Dubin, Y. Kim, B. B. Muhoberac, and V. J. Klimkowski, "Electrophoretic and quasi-elastic light scattering of soluble protein-polyelectrolyte complexes," *J. Phys. Chem.*, vol. 97, no. 17, pp. 4528–4534, 1993.
- [39] V. Ball, M. Winterhalter, P. Schwinte, P. Lavalle, J. C. Voegel, and P. Schaaf, "Complexation mechanism of bovine serum albumin and poly(allylamine hydrochloride)," *J. Phys. Chem. B*, vol. 106, no. 9, pp. 2357–2364, 2002.
- [40] M. Nigen, T. Croguennec, D. Renard, and S. Bouhallab, "Temperature Affects the Supramolecular Structures Resulting from R-Lactalbumin-Lysozyme Interaction," *Biochemistry*, vol. 46, no. 5, pp. 1248–1255, 2007.
- [41] C. Schmitt, T. Palma Da Silva, C. B. S. Rami-Shojaei, P. Frossard, E. Kolodziejczyk, and M. E. Leser, "Effect of time on the interfacial and foaming properties of β -lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes and coacervates at pH 4.2," *Langmuir*, vol. 21, no. 17, pp. 7786–7795, 2005.
- [42] S. Park, R. Bruinsma, and W. Gelbart, "Spontaneous overcharging of macro-ion complexes," *EPL (Europhysics Lett.)*, vol. 46, no. 4, pp. 454–460, 1999.
- [43] J. Joanny, M. Castelnovo, and R. Netz, "Adsorption of charged polymers," *J. Phys. Condens. Matter.*, vol. 12, pp. 1–7, 2000.

- [44] G. Manning, "Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions I. Colligative properties," *J. Chem. Phys.*, vol. 51, no. 3, pp. 924–938, 1969.
- [45] R. Borrega, C. Tribet, and R. Audebert, "Reversible gelation in hydrophobic polyelectrolyte/protein mixtures: an example of cross-links between soft and hard colloids," *Macromolecules*, 1999.
- [46] H. Bohidar, P. L. Dubin, P. R. Majhi, C. Tribet, and W. Jaeger, "Effects of protein-polyelectrolyte affinity and polyelectrolyte molecular weight on dynamic properties of bovine serum albumin-poly(diallyldimethylammonium chloride) coacervates.," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 3, pp. 1573–1585, 2005.
- [47] J.-F. Berret, P. Hervé, O. Aguerre-Chariol, and J. Oberdisse, "Colloidal Complexes Obtained from Charged Block Copolymers and Surfactants: A Comparison between Small-Angle Neutron Scattering, Cryo-TEM, and Simulations," *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 32, pp. 8111–8118, 2003.
- [48] S. Trabelsi, S. Guillot, H. Ritacco, F. Boué, and D. Langevin, "Nanostructures of colloidal complexes formed in oppositely charged polyelectrolyte/surfactant dilute aqueous solutions," *Eur. Phys. J. E*, vol. 23, no. 3, pp. 305–311, 2007.
- [49] J.-F. Berret, N. Schonbeck, F. Gazeau, D. El Kharrat, O. Sandre, A. Vacher, and M. Airiau, "Controlled clustering of superparamagnetic nanoparticles using block copolymers: design of new contrast agents for magnetic resonance imaging.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 5, pp. 1755–1761, 2006.
- [50] C. G. De Kruif, F. Weinbreck, and R. De Vries, "Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 9, no. 5, pp. 340–349, 2004.
- [51] S. Ulrich, A. Laguecir, and S. Stoll, "Complexation of a weak polyelectrolyte with a charged nanoparticle. Solution properties and polyelectrolyte stiffness influences," *Macromolecules*, vol. 38, no. 21, pp. 8939–8949, 2005.
- [52] S. Ulrich, M. Seijo, A. Laguecir, and S. Stoll, "Nanoparticle adsorption on a weak polyelectrolyte. Stiffness, pH, charge mobility, and ionic concentration effects investigated by Monte Carlo simulations," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 42, pp. 20954–20964, 2006.
- [53] B. Jacrot, "Scattering From Solution," *Reports Prog. Phys.*, vol. 39, no. 156, pp. 911–953, 1976.
- [54] F. Cousin, J. Gummel, D. Ung, and F. Boué, "Polyelectrolyte-protein complexes: structure and conformation of each specie revealed by SANS.," *Langmuir*, vol. 21, no. 21, pp. 9675–88, Oct. 2005.
- [55] D. Weitz, J. Huang, M. Lin, and J. Sung, "Limits of the fractal dimension for irreversible kinetic aggregation of gold colloids," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 54, no. 13, p. 1416, 1985.
- [56] M. Lin, H. Lindsay, and D. Weitz, "Universal diffusion-limited colloid aggregation," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 2, no. 13, pp. 3093–3113, 1990.
- [57] P. Calmettes, D. Durand, and M. Desmadril, "How random is a highly denatured protein?," *Biophys. Chem.*, vol. 53, no. 1–2, pp. 105–113, 1994.
- [58] A. Petrescu, V. Receveur, P. Calmettes, D. Durand, M. Desmadril, B. Roux, and J. C. Smith, "Small-angle neutron scattering by a strongly denatured protein: analysis using random polymer theory.," *Biophys. J.*, vol. 72, no. 1, pp. 335–342., 1997.
- [59] J. Gummel, "Structures et mécanismes de complexes protéines-polyelectrolytes," Paris XI, 2011.
- [60] J. Gummel, F. Boué, B. Demé, and F. Cousin, "Charge stoichiometry inside polyelectrolyte-protein complexes: A direct SANS measurement for the PSSNa-lysozyme system," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 49, pp. 24837–24846, 2006.
- [61] J. Gummel, F. Boué, D. Clemens, and F. Cousin, "Finite size and inner structure controlled by electrostatic screening in globular complexes of proteins and polyelectrolytes," *Soft Matter*, vol. 4, pp. 1653–1664, 2008.
- [62] J. Teixeira, "Small-angle scattering by fractal systems," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 21, no. 6, pp. 781–785, 1988.
- [63] J. Gummel, F. Cousin, J. M. Verbavatz, and F. Boué, "Wide scale range structure in polyelectrolyte-protein dense complexes: Where sans meets freeze-fracture microscopy," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 29, pp. 8540–8546, 2007.
- [64] F. Cousin, J. Gummel, D. Clemens, I. Grillo, and F. Boué, "Multiple scale reorganization of electrostatic complexes of poly(styrenesulfonate) and lysozyme," *Langmuir*, vol. 26, no. 10, pp. 7078–7085, 2010.

- [65] J. Gummel, F. Cousin, and F. Boué, "Counterions release from electrostatic complexes of polyelectrolytes and proteins of opposite charge: A direct measurement," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 18, pp. 5806–5807, 2007.
- [66] J. Gummel, F. Cousin, and F. Boué, "Structure transition in PSS/lysozyme complexes: A chain-conformation-driven process, as directly seen by small angle neutron scattering," *Macromolecules*, vol. 41, no. 8, pp. 2898–2907, 2008.
- [67] M. Spiteri, F. Boué, a. Lapp, and J. Cotton, "Persistence Length for a PSSNa Polyion in Semidilute Solution as a Function of the Ionic Strength," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 77, no. 26, pp. 5218–5220, 1996.
- [68] E. a. Litmanovich, S. O. Zakharchenko, and G. V. Stoichev, "Influence of chain charge and complexation on the overlap and entanglements formation in poly(acrylic acid) salt-containing aqueous solutions," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 29, pp. 8567–8571, 2007.
- [69] I. Schmidt, F. Cousin, C. Huchon, F. Boué, and M. A. V Axelos, "Spatial structure and composition of polysaccharide-protein complexes from small angle neutron scattering.," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 6, pp. 1346–57, Jun. 2009.
- [70] I. Morfin, E. Buhler, F. Cousin, I. Grillo, and F. Boué, "Rodlike complexes of a polyelectrolyte (hyaluronan) and a protein (lysozyme) observed by SANS," *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 4, pp. 859–870, 2011.
- [71] C. Tejero, A. Daanoun, H. Lakkerkerker, and M. Baus, "Isostructural solid-solid transition of (colloidal) simple fluids," *Phys. Rev. E*, vol. 51, no. 1, pp. 558–566, 1995.
- [72] C. Tejero, A. Daanoun, H. Lekkerkerker, and M. Baus, "Phase diagrams of simple fluids with extreme pair potentials," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 73, no. 5, pp. 752–755, 1994.
- [73] G. Heinrich, M. Klüppel, and T. a. Vilgis, "Reinforcement of elastomers," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 6, no. 3, pp. 195–203, 2002.
- [74] N. Jouault, P. Vallat, F. Dalmas, S. Said, J. Jestin, and F. Boue, "Well-dispersed fractal aggregates as filler in polymer-silica nanocomposites: Long-range effects in rheology," *Macromolecules*, vol. 42, no. 6, pp. 2031–2040, 2009.
- [75] G. Tsagaropoulos and a Eisenburg, "Direct observation of two glass transitions in silica-filled polymers. Implications to the morphology of random ionomers," *Macromolecules*, vol. 28, no. 1, pp. 396–398, 1995.
- [76] D. Long and F. Lequeux, "Heterogeneous dynamics at the glass transition in van der Waals liquids, in the bulk and in thin films," *Eur. Phys. J. E*, vol. 4, no. 3, pp. 371–387, 2001.
- [77] J. Berriot, H. Montes, F. Lequeux, D. Long, and P. Sotta, "Evidence for the shift of the glass transition near the particles in silica-filled elastomers," *Macromolecules*, vol. 35, no. 26, pp. 9756–9762, 2002.
- [78] J. Oberdisse and B. Demé, "Structure of latex-silica nanocomposite films: A small-angle neutron scattering study," *Macromolecules*, vol. 35, no. 11, pp. 4397–4405, 2002.
- [79] J. Oberdisse, "Structure and rheological properties of latex-silica nanocomposite films: Stress-strain isotherms," *Macromolecules*, vol. 35, no. 25, pp. 9441–9450, 2002.
- [80] N. Jouault, F. Dalmas, S. Said, E. Di Cola, R. Schweins, J. Jestin, and F. Boué, "Direct measurement of polymer chain conformation in well-Controlled model nanocomposites by combining SANS and SAXS," *Macromolecules*, vol. 43, no. 23, pp. 9881–9891, 2010.
- [81] N. Jouault, F. Dalmas, S. Said, E. Di Cola, R. Schweins, J. Jestin, and F. Boué, "Direct small-angle-neutron-scattering observation of stretched chain conformation in nanocomposites: More insight on polymer contributions in mechanical reinforcement," *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 82, no. 3, pp. 3–6, 2010.
- [82] C. Chevigny, F. Dalmas, E. Di Cola, D. Gigmès, D. Bertin, F. Boué, and J. Jestin, "Polymer-grafted-nanoparticles nanocomposites: Dispersion, grafted chain conformation, and rheological behavior," *Macromolecules*, vol. 44, no. 1, pp. 122–133, 2011.
- [83] C. Chevigny, J. Jestin, D. Gigmès, R. Schweins, E. Di-Cola, F. Dalmas, D. Bertin, and F. Boué, "'Wet-To-Dry' Conformational Transition of Polymer Layers Grafted To Nanoparticles in Nanocomposite," *Macromolecules*, vol. 43, no. 11, pp. 4833–4837, 2010.
- [84] J. Jestin, F. Cousin, I. Dubais, C. Ménager, R. Schweins, J. Oberdisse, and F. Boué, "Anisotropic reinforcement of nanocomposites tuned by magnetic orientation of the filler network," *Adv. Mater.*, vol. 20, no. 13, pp. 2533–2540, 2008.
- [85] R. Massart, "IEEE Transactions on Magnetics," vol. 17, no. 2, pp. 1247–1248, 1981.

- [86] R. Massart, E. Dubois, V. Cabuil, and E. Hasmonay, "Preparation and properties of monodisperse magnetic fluids," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 149, no. 1–2, pp. 1–5, 1995.
- [87] A. S. Robbes, J. Jestin, F. Meneau, F. Dalmas, O. Sandre, J. Perez, F. Boué, and F. Cousin, "Homogeneous dispersion of magnetic nanoparticles aggregates in a PS nanocomposite: Highly reproducible hierarchical structure tuned by the nanoparticles' size," *Macromolecules*, vol. 43, no. 13, pp. 5785–5796, 2010.
- [88] C. Chevigny, D. Gigmes, D. Bertin, J. Jestin, and F. Boué, "Polystyrene grafting from silica nanoparticles via nitroxide-mediated polymerization (NMP): synthesis and SANS analysis with the contrast variation method," *Soft Matter*, vol. 5, pp. 3741–3753, 2009.
- [89] A.-S. Robbes, F. Cousin, F. Meneau, C. Chevigny, D. Gigmes, J. Fresnais, R. Schweins, and J. Jestin, "Controlled grafted brushes of polystyrene on magnetic γ -Fe₂O₃ nanoparticles via nitroxide-mediated polymerization," *Soft Matter*, vol. 8, no. 12, p. 3407, 2012.
- [90] J. S. Pedersen and M. C. Gerstenberg, "Scattering Form Factor of Block Copolymer Micelles," *Macromolecules*, vol. 29, pp. 1363–1365, 1996.
- [91] J. S. Pedersen, C. Svaneborg, K. Almdal, I. W. Hamley, and R. N. Young, "A small-angle neutron and x-ray contrast variation scattering study of the structure of block copolymer micelles: Corona shape and excluded volume interactions," *Macromolecules*, vol. 36, no. 2, pp. 416–433, 2003.
- [92] A. S. Robbes, F. Cousin, F. Meneau, F. Dalmas, F. Boué, and J. Jestin, "Nanocomposite materials with controlled anisotropic reinforcement triggered by magnetic self-assembly," *Macromolecules*, vol. 44, no. 22, pp. 8858–8865, 2011.
- [93] A. S. Robbes, F. Cousin, F. Meneau, F. Dalmas, R. Schweins, D. Gigmes, and J. Jestina, "Polymer-grafted magnetic nanoparticles in nanocomposites: Curvature effects, conformation of grafted chain, and bimodal nanotriggering of filler organization by combination of chain grafting and magnetic field," *Macromolecules*, vol. 45, no. 22, pp. 9220–9231, 2012.
- [94] S. Sen, Y. Xie, S. K. Kumar, H. Yang, A. Bansal, D. L. Ho, L. Hall, J. B. Hooper, and K. S. Schweizer, "Chain conformations and bound-layer correlations in polymer nanocomposites," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 98, no. 12, pp. 1–4, 2007.
- [95] K. Nusser, S. Neueder, G. J. Schneider, M. Meyer, W. Pyckhout-Hintzen, L. Willner, A. Radulescu, and D. Richter, "Conformations of Silica-Poly(ethylene-propylene) Nanocomposites," *Macromolecules*, vol. 43, no. 23, pp. 9837–9847, 2010.
- [96] A.-S. Robbes, "Nanocomposites à base de particules magnétiques: Synthèse et contribution de la dispersion des charges et de la conformation des chaînes sur les propriétés de renforcement," Paris XI, 2011.
- [97] C. Devaux, F. Cousin, E. Beyou, and J. P. Chapel, "Low swelling capacity of highly stretched polystyrene brushes," *Macromolecules*, vol. 38, no. 10, pp. 4296–4300, 2005.
- [98] C. Devaux and J. Chapel, "Controlled polystyrene brushes grown on AFM tip," *Eur. Phys. J. E*, vol. 10, no. 1, pp. 77–81, 2003.
- [99] C. Devaux and J. Chapel, "Controlled structure and density of 'living' polystyrene brushes on flat silica surfaces," *Eur. Phys. J. E*, vol. 7, no. 4, pp. 345–352, 2002.
- [100] F. Lechenault, C. L. Rountree, F. Cousin, J. P. Bouchaud, L. Ponson, and E. Bouchaud, "Evidence of deep water penetration in silica during stress corrosion fracture," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 106, no. 16, pp. 1–4, 2011.
- [101] F. Lechenault, C. L. Rountree, F. Cousin, J.-P. Bouchaud, L. Ponson, and E. Bouchaud, "Damage of silicate glasses during stress corrosion," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 319, p. 012005, 2011.
- [102] F. Cousin, F. Ott, F. Gibert, and A. Menelle, "EROS II: A boosted time-of-flight reflectometer for multi-purposes applications at the Laboratoire Léon Brillouin," *Eur. Phys. J. Plus*, vol. 126, no. 11, pp. 1–11, 2011.
- [103] A. L. Fameau, A. Saint-Jalmes, F. Cousin, B. Houinsou Houssou, B. Novales, L. Navailles, F. Nallet, C. Gaillard, F. Boué, and J. P. Douliez, "Smart foams: Switching reversibly between ultrastable and unstable foams," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 36, pp. 8264–8269, 2011.
- [104] J. Douliez, C. Gaillard, L. Navailles, and F. Nallet, "Novel lipid system forming hollow microtubes at high yields and concentration," *Langmuir*, vol. 22, no. 7, pp. 2942–2945, 2006.

- [105] A. L. Fameau, F. Cousin, L. Navailles, F. Nallet, F. Boué, and J. P. Douliez, "Multiscale structural characterizations of fatty acid multilayered tubes with a temperature-tunable diameter," *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 29, pp. 9033–9039, 2011.
- [106] A. L. Fameau, J. P. Douliez, F. Boué, F. Ott, and F. Cousin, "Adsorption of multilamellar tubes with a temperature tunable diameter at the air/water interface," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 362, no. 2, pp. 397–405, 2011.
- [107] M. a V Axelos and F. Boué, "Foams as viewed by small-angle neutron scattering," *Langmuir*, vol. 19, no. 17, pp. 6598–6604, 2003.
- [108] F. Muller, P. Fontaine, S. Remita, M. C. Fauré, E. Lacaze, and M. Goldmann, "Synthesis of nanostructured metal-organic films: Surface X-ray radiolysis of silver ions using a Langmuir monolayer as a template," *Langmuir*, vol. 20, no. 12, pp. 4791–4794, 2004.
- [109] E. P. K. Currie, a. B. Sieval, G. J. Fleer, and M. a C. Stuart, "Polyacrylic acid brushes: Surface pressure and salt-induced swelling," *Langmuir*, vol. 16, no. 22, pp. 8324–8333, 2000.
- [110] H. Bijsterbosch and V. De Haan, "Tethered adsorbing chains: neutron reflectivity and surface pressure of spread diblock copolymer monolayers," *Langmuir*, vol. 11, no. 11, pp. 4467–4473, 1995.
- [111] O. Theodoly, a. Checco, and P. Muller, "Charged diblock copolymers at interfaces: Micelle dissociation upon compression," *EPL (Europhysics Lett.)*, vol. 90, no. 2, p. 28004, 2010.
- [112] Z. Guennouni Assimi, "Étude des films de Langmuir de copolymères diblocs et formation de nanostructures inorganiques par réduction des ions argent à leur voisinage," Université Pierre et Marie Curie, 2014.
- [113] Z. Guennouni, F. Cousin, F. Marie-Claude, P. Perrin, D. Limagne, O. Konovalov, and M. Goldmann, "Self-organization of PS-b-PAA monolayer at the air/water interface: a process driven by the release of the solvent spreading," *Langmuir*, p. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b02652, 2016.
- [114] Y. S. Yu, L. F. Zhang, and A. Eisenberg, "Morphogenic effect of solvent on crew-cut aggregates of amphiphilic diblock copolymers," *Macromolecules*, vol. 31, no. 97, pp. 1144–1154, 1998.
- [115] A. Ezhova and K. Huber, "Specific Interactions of Ag⁺ Ions with Anionic Polyacrylate Chains in Dilute Solution," *Macromolecules*, vol. 47, no. 22, pp. 8002–8011, Nov. 2014.
- [116] L. Qi, J. Fresnais, J.-F. Berret, J.-C. Castaing, I. Grillo, and J.-P. Chapel, "Influence of the Formulation Process in Electrostatic Assembly of Nanoparticles and Macromolecules in Aqueous Solution: The Mixing Pathway," *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 30, pp. 12870–12877, Aug. 2010.
- [117] L. Qi, J. Fresnais, J. F. Berret, J. C. Castaing, F. Destremaut, J. B. Salmon, F. Cousin, and J. P. Chapel, "Influence of the formulation process in electrostatic assembly of nanoparticles and macromolecules in aqueous solution: The interaction pathway," *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 39, pp. 16373–16381, 2010.
- [118] J. Fresnais, J. F. Berret, B. Frka-Petesic, O. Sandre, and R. Perzynski, "Electrostatic co-assembly of iron oxide nanoparticles and polymers: Towards the generation of highly persistent superparamagnetic nanorods," *Adv. Mater.*, vol. 20, no. 20, pp. 3877–3881, 2008.
- [119] A. Assifaoui, A. Lebrét, H. T. D. Uyen, F. Neiers, O. Chambin, C. Loupiac, and F. Cousin, "Structural behaviour differences in low methoxy pectin solutions in the presence of divalent cations (Ca²⁺ and Zn²⁺): a process driven by the binding mechanism of the cation with the galacturonate," *Soft Matter*, vol. 11, no. 3, pp. 551–560, 2015.
- [120] F. Cherhal, F. Cousin, and I. Capron, "Structural description of the interface of Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals," *Biomacromolecules*, p. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01413, 2015.
- [121] L. Zhang, A. Mikhailovskaya, P. Yzhgur, F. Muller, F. Cousin, D. Langevin, N. Wang, and A. Salonen, "Precipitating Sodium Dodecyl Sulfate to Create Ultrastable and Stimulable Foams," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 54, no. 33, pp. 9533–9536, 2015.
- [122] J. Jestin, S. Simon, L. Zupancic, and L. Barré, "A small angle neutron scattering study of the adsorbed asphaltene layer in water-in-hydrocarbon emulsions: Structural description related to stability," *Langmuir*, vol. 23, no. 21, pp. 10471–10478, 2007.
- [123] C. Micheau, P. Bauduin, O. Diat, and S. Faure, "Specific salt and pH effects on foam film of a pH sensitive surfactant," *Langmuir*, vol. 29, no. 27, pp. 8472–8481, 2013.
- [124] "http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1991/gennes-lecture.html."

- [125] F. Cousin, I. Grillo, J. Jestin, and J. Oberdisse, "Une brève introduction à la matière molle," *École thématique la Société Française la Neutron.*, vol. 11, pp. 1–6, 2010.
- [126] Société Française de la Neutronique, "<http://www.sfn.asso.fr/ecoles-thematiques/>."
- [127] F. Cousin, "Small Angle Neutron Scattering," *EPJ Web Conf.*, vol. 104, p. 01004, 2015.
- [128] F. Cousin and A. Menelle, "Neutron reflectivity.," *EPJ Web Conf.*, vol. 104, p. 01005, 2015.
- [129] "https://fr.wikipedia.org/wiki/Eau_lourde."
- [130] V. Sears, "Neutron scattering lengths and cross sections," *Neutron news*, vol. 3, no. 3, pp. 26–37, 1992.
- [131] D. H. Everett, "Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry," *Pure Appl. Chem.*, vol. 31, no. 4, pp. 577–638, Jan. 1972.
- [132] T. Odijk, "Possible scaling relations for semidilute polyelectrolyte solutions," *Macromolecules*, vol. 12 3, no. 4, pp. 688–693, 1979.
- [133] T. Odijk, "Polyelectrolytes near the rod limit," *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, vol. 15, pp. 477–483, 1977.
- [134] F. Weinbreck, H. S. Rollema, R. H. Tromp, and C. G. De Kruif, "Diffusivity of whey protein and gum arabic in their coacervates," *Langmuir*, vol. 20, no. 15, pp. 6389–6395, 2004.
- [135] M. M. Ries-Kautt and a. F. Ducruix, "Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme.," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 2, pp. 745–748, 1989.
- [136] "<http://biophysics.cs.vt.edu/H++/>," *Calcul du pKa de chaque acide aminé acide ou basique* .
- [137] W. Essafi, F. Lafuma, and C. Williams, "Effect of solvent quality on the behaviour of highly charged polyelectrolytes," *J. Phys. II*, vol. 5, no. 9, pp. 1269–1275, 1995.
- [138] J. Combet, F. Ise, M. Rawiso, and F. Boué, "Scattering functions of flexible polyelectrolytes in the presence of mixed valence counterions: Condensation and scaling," *Macromolecules*, vol. 38, no. 17, pp. 7456–7469, 2005.
- [139] J. Combet, "Structure des solutions de polyélectrolytes: apport de la diffusion des rayons X et des neutrons aux petits angles," *École thématique la Société Française la Neutron.*, vol. 11, pp. 153–176, 2010.
- [140] L. Huizhou, Y. Weijing, and C. Jiayong, "Effects of surfactants on emulsification and secondary structure of lysozyme in aqueous solutions," *Biochem. Eng. J.*, vol. 2(3), pp. 187–196, 1998.
- [141] P. Sharp and V. Bloomfield, "Light scattering from wormlike chains with excluded volume effects," *Biopolymers*, vol. 6, no. 8, pp. 1201–1211, 1968.
- [142] J. Des Cloizeaux, "Form factor of an infinite kratky-porod chain," *Macromolecules*, vol. 6, no. 3, pp. 403–407, 1973.
- [143] S. Chodankar, V. K. Aswal, J. Kohlbrecher, R. Vavrin, and a. G. Wagh, "Structural study of coacervation in protein-polyelectrolyte complexes," *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 78, no. 3, pp. 1–8, 2008.
- [144] X. Wang, Y. Li, Y.-W. Wang, J. Lal, and Q. Huang, "Microstructure of beta-lactoglobulin/pectin coacervates studied by small-angle neutron scattering.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 3, pp. 515–520, 2007.
- [145] S. S. Singh, V. K. Aswal, and H. B. Bohidar, "Structural studies of agar-gelatin complex coacervates by small angle neutron scattering, rheology and differential scanning calorimetry," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 41, no. 3, pp. 301–307, 2007.
- [146] a. B. Kayitmazer, S. P. Strand, C. Tribet, W. Jaeger, and P. L. Dubin, "Effect of polyelectrolyte structure on protein - Polyelectrolyte coacervates: Coacervates of bovine serum albumin with poly(diallyldimethylammonium chloride) versus chitosan," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 11, pp. 3568–3577, 2007.
- [147] V. Mengarelli, L. Auvray, and M. Zeghal, "Phase behaviour and structure of stable complexes of oppositely charged polyelectrolytes," *EPL (Europhysics Lett.)*, vol. 85, no. 5, p. 58001, 2009.
- [148] S. Lindhoud, R. de Vries, R. Schweins, M. a. Cohen Stuart, and W. Norde, "Salt-induced release of lipase from polyelectrolyte complex micelles," *Soft Matter*, vol. 5, no. 1, p. 242, 2009.

- [149] A. Einstein, "On the theory of the Brownian movement," *Ann. Phys.*, 1906.
- [150] H. Smallwood, "Limiting law of the reinforcement of rubber," *J. Appl. Phys.*, vol. 15, p. 758, 1944.
- [151] E. Guth and O. Gold, "On the hydrodynamical theory of the viscosity of suspensions," *Phys. Rev.*, vol. 53, p. 322, 1938.
- [152] E. Guth, "Theory of filler reinforcement," *J. Appl. Phys.*, vol. 16, p. 20, 1945.
- [153] P. Akcora, H. Liu, S. K. Kumar, J. Moll, Y. Li, B. C. Benicewicz, L. S. Schadler, D. Acehan, A. Z. Panagiotopoulos, V. Pryamitsyn, V. Ganesan, J. Ilavsky, P. Thiyagarajan, R. H. Colby, and J. F. Douglas, "Anisotropic self-assembly of spherical polymer-grafted nanoparticles," *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 4, pp. 354–359, 2009.
- [154] D. Sunday, J. Ilavsky, and D. L. Green, "A phase diagram for polymer-grafted nanoparticles in homopolymer matrices," *Macromolecules*, vol. 45, no. 9, pp. 4007–4011, 2012.
- [155] S. K. Kumar, N. Jouault, B. Benicewicz, and T. Neely, "Nanocomposites with polymer grafted nanoparticles," *Macromolecules*, vol. 46, no. 9, pp. 3199–3214, 2013.
- [156] F. Dalmas, J. Y. Cavallé, C. Gauthier, L. Chazeau, and R. Dendievel, "Viscoelastic behavior and electrical properties of flexible nanofiber filled polymer nanocomposites. Influence of processing conditions," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 67, no. 5, pp. 829–839, 2007.
- [157] V. Favier, H. Chanzy, and J. Y. Cavaille, "Polymer Nanocomposites Reinforced by Cellulose Whiskers," *Macromolecules*, vol. 28, no. 18, pp. 6365–6367, 1995.
- [158] G. Mériguet, F. Cousin, E. Dubois, F. Boué, A. Cebers, B. Farago, and R. Perzynski, "What tunes the structural anisotropy of magnetic fluids under a magnetic field?," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 9, pp. 4378–4386, 2006.
- [159] T. G. Fox and P. J. Flory, "Second-Order Transition Temperatures and Related Properties of Polystyrene. I. Influence of Molecular Weight," *J. Appl. Phys.*, vol. 21, no. 6, p. 581, 1950.
- [160] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, and R. N. Muller, "Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 6, pp. 2064–2110, 2008.
- [161] E. Hasmonay, a Bee, J. C. Bacri, and R. Perzynski, "pH effect on an ionic ferrofluid: Evidence of a thixotropic magnetic phase," *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, no. 31, pp. 6421–6428, 1999.
- [162] P. Auroy, L. Auvray, and L. Léger, "Characterization of the brush regime for grafted polymer layers at the solid-liquid interface," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 66, no. 6, pp. 719–722, 1991.
- [163] M. Daoud and J. Cotton, "Star shaped polymers: a model for the conformation and its concentration dependence," *J. Phys.*, vol. 43, no. 3, pp. 531 – 538, 1982.
- [164] F. Cousin, E. Dubois, and V. Cabuil, "Tuning the interactions of a magnetic colloidal suspension.," *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, vol. 68, no. 2, p. 021405, 2003.
- [165] M. E. Mackay, A. Tuteja, P. M. Duxbury, C. J. Hawker, B. Van Horn, Z. Guan, G. Chen, and R. S. Krishnan, "General strategies for nanoparticle dispersion.," *Science*, vol. 311, no. 5768, pp. 1740–1743, 2006.
- [166] A. Tuteja, P. M. Duxbury, and M. E. MacKay, "Polymer chain swelling induced by dispersed nanoparticles," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, no. 7, pp. 21–24, 2008.
- [167] J. Douliez, B. Pontoire, and C. Gaillard, "Lipid Tubes with a Temperature-Tunable Diameter," *Chemphyschem*, vol. 7, no. 10, pp. 2071–2073, 2006.
- [168] "http://fr.wikipedia.org/wiki/Photographie_argentique." .
- [169] T. J. Joncheray, S. A. Bernard, R. Matmour, B. Lepoittevin, R. J. El-Khoury, D. Taton, Y. Gnanou, and R. S. Duran, "Polystyrene-b-poly(tert-butyl acrylate) and polystyrene-b-poly(acrylic acid) dendrimer-like copolymers: two-dimensional self-assembly at the air-water interface.," *Langmuir*, vol. 23, no. 5, pp. 2531–8, Feb. 2007.
- [170] X. Wang, X. Ma, and D. Zang, "Aggregation behavior of polystyrene-b-poly(acrylic acid) at the air–water interface," *Soft Matter*, vol. 443, pp. 443–453, 2013.

- [171] P. Muller, G. Sudre, and O. Théodoly, "Wetting transition on hydrophobic surfaces covered by polyelectrolyte brushes.," *Langmuir*, vol. 24, no. 17, pp. 9541–50, Sep. 2008.
- [172] F. Ott, C. Loupiac, S. Désert, A. Hélary, and P. Lavie, "IMAGINE: A Cold Neutron Imaging Station at the Laboratoire Léon Brillouin," *Phys. Procedia*, vol. 69, pp. 67–70, 2015.
- [173] G. Chaboussant, S. Désert, P. Lavie, and A. Brûlet, "PA20: A new SANS and GISANS project for soft matter, materials and magnetism," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 340, no. 1, p. 012002, Feb. 2012.
- [174] L. Besnard, M. Protat, F. Malloggi, J. Dailant, F. Cousin, N. Pantoustier, P. Guenoun, and P. Perrin, "Breaking of the Bancroft rule for multiple emulsions stabilized by a single stimuable polymer," *Soft Matter*, vol. 10, no. 36, pp. 7073–7087, 2014.
- [175] M. Wolff, J. Herbel, F. Adlmann, A. J. C. Dennison, G. Liesche, P. Gutfreund, and S. Rogers, "Depth-resolved grazing-incidence time-of-flight neutron scattering from a solid–liquid interface," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 47, no. 1, pp. 130–135, Dec. 2013.
- [176] A. Assifaoui, C. Loupiac, O. Chambin, and P. Cayot, "Structure of calcium and zinc pectinate films investigated by FTIR spectroscopy," *Carbohydr. Res.*, vol. 345, no. 7, pp. 929–33, May 2010.
- [177] A. Assifaoui, O. Chambin, and P. Cayot, "Drug release from calcium and zinc pectinate beads: Impact of dissolution medium composition," *Carbohydr. Polym.*, vol. 85, no. 2, pp. 388–393, May 2011.
- [178] F. Cherhal, F. Cousin, and I. Capron, "Influence of Charge Density and Ionic Strength on the Aggregation Process of Cellulose Nanocrystals in Aqueous Suspension, as Revealed by Small-Angle Neutron Scattering," *Langmuir*, vol. 31, no. 20, pp. 5596–5602, 2015.