

Structure, micro- et nanomécanique de fibres de soie

Structure, micro- and nanomechanics of silk fibre

Hung Manh Dinh¹, Céline Paris¹, Philippe Colomban¹ et
Bernard Mauchamp²

1 : Laboratoire de Dynamique, Interaction et Réactivité UMR 7075
Université Pierre et Marie Curie (UPMC)
CNRS 2 rue Henry-Dunant 94320 Thiais, France
e-mail : dinh@glvt-cnrs.fr, paris@glvt-cnrs.fr, philippe.colomban@glvt-cnrs.fr

2 : Unité Séricicole Nationale
INRA, 69350 La Mulatière, France
e-mail : mauchamp@clermont.inra.fr

Résumé

Les fibres naturelles sous leurs formes traditionnelles ou sous de nouvelles formes (fibres/films/composites régénérés) offrent une alternative aux fibres synthétiques. La soie du *Bombyx mori* présente de très bonnes propriétés mécaniques moyennes, mais une très grande variabilité. Afin de mieux comprendre cette variabilité des soies de différentes sources (vers à soie ou araignées) sont analysées par plusieurs techniques (absorption Infrarouge et diffusion Raman *in situ-in vivo*, calorimétrie, traction uniaxiale) pour caractériser simultanément la structure et la mécanique des monofilaments, en fonction de leur âge, depuis le précurseur de fibroïne dans la glande jusqu'aux fibres chimiquement traitées (décreusage, teintures) en passant par des fibres prélevées *in vivo*. Cinq comportements sont identifiés et discutés en fonction des changements structuraux (transition hélices α - feuilletts β), des interactions avec l'eau à la lumière de l'analyse des modes Amide I & II ainsi que du mode ν N-H et de son décalage Raman sous contrainte ou allongement contrôlé. Le passage de la soie d'un état hydrophobe à hydrophile dans la zone filière explique l'établissement de couplages entre macromolécules de fibroïne et la formation du filament de soie.

Abstract

Natural fibres, traditionally produced or issued by new routes (regenerated fibre, films and composites) can compete with synthetic ones. The *Bombyx mori* silk has good mean mechanical properties but very scattered. In order to understand better the variability origin and its relation with the macromolecule conformation/structure and mechanical behaviour, various silkworm and spider silks have been analysed by different techniques: *in situ* IR absorption, Raman scattering, calorimetry, tensile measurement. Different forms have been considered: silk precursor of different gland part, single fibres, just formed or aged, chemically treated fibres (degummed, dyed). Five different tensile signatures are identified and discussed as a function of potential local conformation (α -helix or β -sheet) and of water content using the following probes: Amide I & II modes, ν N-H and ν H₂O modes. The Raman shift under controlled stress/strain is discussed. The transition from an hydrophobic silk precursor to a hydrophilic silk in the spigot region explains the coupling between the macromolecular fibroin chains and the formation of the fibre.

Mots Clés : fibre naturelle, soie, traction, structure, IR, Raman

Keywords : natural fibre, silk, tension, structure, IR, Raman

1. Introduction : variabilité intrinsèque des produits naturels

La variabilité des produits naturels est intrinsèque au vivant et ce caractère est un inconvénient pour l'utilisation de bio-matériaux. Deux voies s'offrent pour pallier cette difficulté, i) celle d'utiliser le composé naturel comme une matière première comme par exemple la rayonne obtenue à partir de cellulose ou les essais récents de dissolution / régénération de la soie [1,2]) et ii), celle longtemps empirique de la sélection et du soin dans l'élevage. Ces deux voies nécessitent une identification et une compréhension des paramètres pilotant l'optimum des propriétés. La macromolécule de fibres protéiques (fibroïne pour la soie de papillon, spidroïne pour celle d'araignée, kératine pour le cheveu et les poils (laine)) peut être décrite comme une chaîne polyamide sur laquelle sont « greffés » des acides aminés, différant quant à leur

composition, encombrement et rigidité, selon des séquences plus ou moins régulières. Les conformations sont classées en deux types, des hélices « α » plus ou moins régulières et des feuillets « β » provenant de l'association d'hélices « déroulées » [3-6]

De nombreux insectes produisent de la soie et de nombreux auteurs se sont intéressés aux propriétés mécaniques des fibres de soie [3,5-7]. Les valeurs tant de résistance que d'allongement à la rupture sont variables, respectivement de quelques centaines au millier de MPa et de ~10 à 30%. Les rares courbes de contrainte-allongement publiées montrent des signatures très différentes, souvent attribuées au type d'animal producteur [5], sans qu'une attention particulière n'ait été portée à l'allure de ces courbes. Or dans l'analyse des relations entre structure et comportement mécanique de fibres polymères synthétiques, nous avons mis en évidence la corrélation entre l'allure des courbes contrainte-allongement en traction et l'organisation nanostructurale des macromolécules appartenant aux configurations "amorphe" et "ordonnée" [8-11]. L'étude de fibres de soies de différents animaux [7,12,13] ou pour un même animal d'âges variés nous ayant montré que ce dernier paramètre était important, des soies de *Bombyx mori* non-excrétées, c'est-à-dire présente dans le canal de la glande précédant la filière, juste filées par extraction manuelle ou âgées de quelques heures à quelques jours, ou plus, ont été analysées par calorimétrie différentielle (DSC), microscopie Infrarouge et microscopie Raman ainsi que par comparaison des courbes à rupture en traction contrainte-allongement sur mono-filament. La mise en contrainte des macromolécules a été analysée en couplant le dispositif micromécanique au micro-spectromètre Raman, méthode expérimentée sur de nombreuses fibres synthétiques (polyamide, polypropylène, polyester, ... [8-11]) ou naturelles (kératine) [4].

2. Expérimental

Les soies sont extraites soit directement de fils, de cocon, après découpage de celui-ci, soit de flottillons dévidés (décreusés) dans l'eau chaude (+ Na_2CO_3). La soie fraîche est obtenue par extraction manuelle de la bave d'un vers à soie ayant atteint son stade de filage.

Les spectres infrarouge ont été obtenus soit avec un microscope IRscope II (volume analysé $\sim 20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$), soit avec le dispositif ATR Diamant Golden Gate (Specac, surface analysée $\sim 0.6 \text{ mm}^2$), dans les 2 cas couplé à un spectromètre Equinox 55 (Bruker, résolution 4 cm^{-1}), respectivement avec un détecteur MCT refroidi à l'azote liquide ou un détecteur DTGS. Les courbes de charge-allongement ont été obtenues avec le dispositif décrit précédemment [4]. La transformation en courbes de contrainte-allongement est faite en prenant une section moyenne. Les spectres Raman ont été enregistrés avec le spectromètre haute-résolution Dilor XY (514.5nm, $\sim 2 \text{ mW}$ sur échantillon, grossissement x500 (volume analysé $\sim 10 \times 10 \times 20 \mu\text{m}^3$), durée d'enregistrement $t = 1$ à 3 heures) pour les fibres sous charge ou allongement contrôlé) ou avec des spectromètres haute sensibilité DILOR INFINITY ou Horiba Jobin-Yvon HR (532 et 632nm, $< 2 \text{ mW}$ sur échantillon, x500, $t =$ qlq minutes). La calibration est faite soit en utilisant une lampe Néon externe, soit le pic fin à 1002 cm^{-1} de la phénylalanine, un greffon aromatique dont ce mode, vibreur isolé, est quasi insensible aux perturbations. Pour les mesures de décalage Raman sous contrainte/allongement, la fibre est contrôlée en contrainte dans la partie élastique ($< \sim 3\%$) puis contrôlée en allongement.

Les mesures de calorimétrie différentielle à balayage ont été effectuées avec une DSC TA Instrument 2010 (vitesse $20^\circ\text{C}/\text{mn}$), $\sim 15 \text{ mg}$ de produit étant enfermé dans une capsule d'aluminium.

3. Variabilité des signatures contrainte-allongement

3.1. Signatures micromécaniques en traction uniaxiale

La figure 1a montre un ensemble représentatif de courbes contraintes-allongement obtenues pour des mono-filaments de soie de *Bombyx mori*. Une partie de la dispersion résulte de la variabilité de la section du filament : le ver à soie a deux glandes disposées symétriquement et il « bave » un bi-fil présentant une section assimilable à deux demi-cercles/triangles de fibroïne enrobés par une couche de cire, la séricine, éliminable par décreusage [13]. Cette demi-section a un diamètre équivalent de $\sim 12 \mu\text{m}$ (7×14 à $10 \times 15 \mu\text{m}^2$), maximum en milieu de cocon. Cette variation influe sur la valeur de la contrainte mais n'a pas d'effet sur les allures des courbes que nous avons classées en 5 types ([7], Fig. 1b) en considérant l'ensemble des courbes obtenues pour les soies de différents vers ou araignées:

- le type I, comportement élastique jusqu'à $\sim 2\%$ d'allongement suivit souvent d'une bosse puis d'un quasi palier. Cette signature est quasi-identique à celle mesurée pour le cheveu (mais avec le seuil à $\sim 4\%$), filament de protéine assez comparable mais où des liaisons covalentes (ponts disulfures) lient assez « fortement » les macromolécules. La transition à 4% est attribuée au déroulement des hélices α en chaîne β du fait d'une rupture des ponts S-S inter-macromolécules [4]. Ce type I est très rare et n'est observé que

sur des fibres fraîches de cocons ou certaines baves étirées manuellement, bien que le palier y soit alors moins horizontal (Fig. 2a).

- le type II, comportement élastique jusqu'à ~6% avec changement de module d'Young à 2 %, puis le quasi palier viscoélastique.

- le type III, avec une transition quasi continue depuis un comportement élastique vers un quasi-plateau.

- le type IV est observé pour les fibres d'araignée *Nephila madagascarensis* (notre lot est âgé de plusieurs années), il débute comme le type I puis on observe un comportement quasi-élastique jusqu'à la rupture. Les signatures micromécanique de cheveux (secs) sont aussi de type IV, mais avec un plateau « parfait (transition α - β) puis au-delà de 20% d'allongement un régime de durcissement jusqu'à plus de 40% d'allongement.

- un dernier type de signature est observé, le type V : la rupture se produit très tôt dans le domaine élastique, avant le quasi-plateau viscoélastique. Ce type n'est rencontré que pour des fibres ayant subi un traitement chimique agressif (mordançage, bain acide) [12]

Afin de préciser l'origine de ces différentes signatures une analyse statistique a été faite pour des fibres prélevées dans des cocons frais non-décreusés, dans des cocons décreusés rapidement et pour des fibres décreusées, saturées en eau. En outre quelques filaments obtenus par étirage manuel d'un vers *B. m.* en début de production de soie ont été mesurés. Les résultats sont donnés dans le tableau 1.

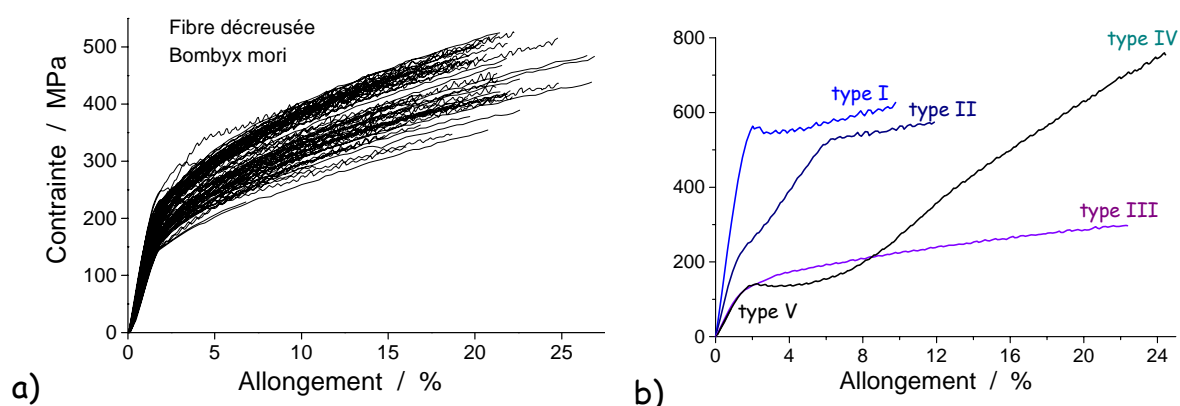


Fig. 1. a) courbes de traction uniaxiale Contrainte/Allongement de fibres de *Bombyx mori*, décreusées ou non ; b) courbes type ; le type IV a été obtenu pour une fibre de *Nephila madagascarensis*. Les types sont définis selon l'allure, non par le niveau de la contrainte de rupture (d'après [7]).

Fibre	Type	%	Module d'Young		Contrainte ultime		Allongement ultime	
			< > (GPa)	Déviaton %	< > (MPa)	Déviaton %	< > (%)	Déviaton %
bavée	Type I	50	10	19	359	28	30	44
	Type II	10	9	-	239	-	7	-
	Type III	40	8	50	226	57	17	57
de cocon frais	Type I	42	25,5	35	560	42	13,5	45
	Type II	42	13,5	25	423,5	25	16	14
	Type III	16	8,5	2	273,5	9	20,5	10
de cocon décreusé	Type I	6	15,5	8	390	9	18	15
	Type II	4	14,5	14	392	12	13	31
	Type III	90	12,5	14	418	18	17	31
saturée en eau	Type I	0	-	-	-	-	-	-
	Type II	0	-	-	-	-	-	-
	Type III	100	10	17	347	15	14,5	21

Tab. 1. Caractéristiques mécaniques de fibres de *Bombyx mori* de différents âges ou après différents traitements.

La comparaison des données du Tableau 1 montre que le type I n'est observé que pour des fibres fraîches n'ayant pas subi de modifications induites par un traitement comme le décreusage. L'allongement est maximal, d'une valeur double, pour les baves extraites manuellement du ver en comparaison avec celles de fibres « âgées » fussent-elles âgées de quelques heures. Par contre le palier est plus horizontal dans les

(rares) fibres 'I' « âgées » de quelques jours. Le type III est obtenu à 100% par action de l'eau. Les résultats sont assez comparables à ceux obtenus pour les fibres de kératine saturées en eau [4] pour lesquelles il a été montré que l'incorporation de molécules d'eau entre les macromolécules détruit les ponts inter/intra-chaînes : les liaisons hydrogène inter- ou intra-chaînes disparaissent au profit de liaisons avec les molécules d'eau insérées ce qui écarte les chaînes et « lubrifie » le glissement chaîne/chaîne, conduisant à un abaissement de la contrainte de changement de régime et à l'augmentation de l'allongement à rupture.

Le type IV est observé pour les fibres d'araignées dont le diamètre est beaucoup plus petit (~5 μm) mais avec une section bien circulaire et une absence de défauts de surface. On peut donc supposer que le deuxième régime élastique survenant après le quasi plateau ne peut être observé pour la plupart des fibres de vers à soie du fait d'une rupture prématurée induite par des défauts de surface (visibles dans [13]). Ce type IV est aussi observé pour les cheveux (kératine) secs, après un plateau parfait du au déploiement « instantané » des macromolécules lors de la transition α - β . Ce type IV est aussi observé pour quelques fibres d'*Antheraea (Tussah)*, cf. Tabl. 2 et pour des fibres de Bombyx modifiées génétiquement par incorporation d'un gène d'araignée.

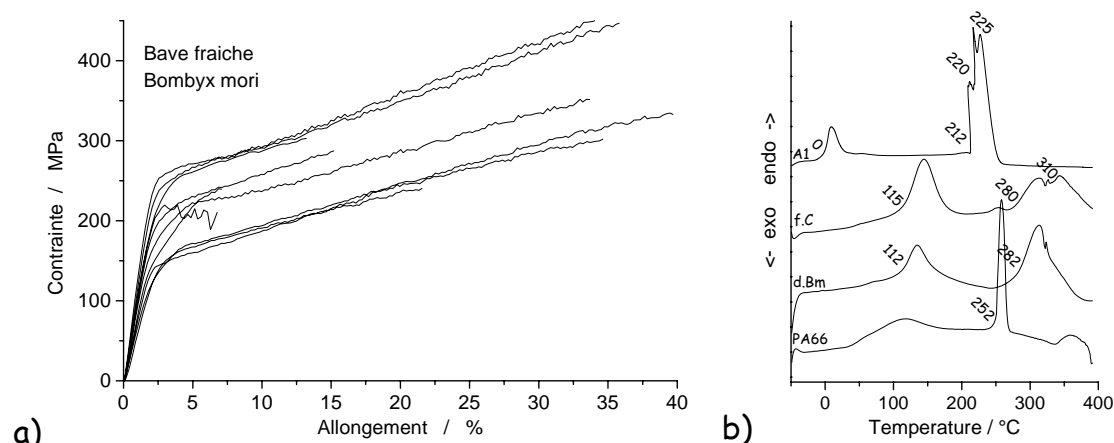


Fig. 2. a) exemples de courbes contrainte-allongement obtenues pour des baves fraîches extraites manuellement ; b) courbes DSC de précurseur (A1), de fibres de cocon frais (f.c.), de cocon décreusé (d. Bm) et de polyamide 66 (PA 66).

Il est évident que la nature/localisation/quantité d'eau insérée entre les macromolécules joue un rôle sur le comportement mécanique en traction. L'effet des séquences de greffons d'acides aminés sur la chaîne polyamide (alanine, glycine, serine, etc...) doit aussi être important, leur longueur et rigidité étant variables ce qui influe sur la géométrie de la chaîne (angles, conformations) et les distances inter-chaînes.

La description suivante peut être proposée : jusqu'à 2% d'allongement, mise en tension des macromolécules sans changement de conformation ; à partir de 2 % les hélices « ordonnées » se déploient (Type 1) puis les hélices désordonnées ou avec défauts ce qui conduit au quasi plateau. Des glissements chaîne/chaîne (ou ouvertures de feuillets β) sont probables dans les zones où les espacements inter-chaînes le permettent, et une striction/densification progressive peut expliquer la pente au-delà de 2-3%. Si beaucoup de molécules d'eau sont insérées entre les macromolécules, le déploiement α - β sera – a priori – plus rare, étalé avec des molécules d'eau facilitant, en expansant le milieu, le glissement relatif des macromolécules, et/ou leur déploiement.

Fibre	Type	%	<Module d'Young> GPa	<Contrainte ultime> MPa	<Allongement ultime> %
Fil	Type I	21			
B. m.	Type II	65	12	350	14
Brésil	Type III	14			
Fil	Type I	6			
	Type II	53			
Tussah	Type III	36	25	900	10
Chine	Type IV	6			

Tab. 2. Caractéristiques mécaniques de fibres de Bombyx mori et de Tussah (*Antheraea*)

4. Origine de la variabilité : hydratation et structure de la fibroïne

4.1. Formation de la fibre

La figure 2b compare les courbes DSC obtenues pour le précurseur de fil de soie contenu dans l'excréteur d'un ver filant, pour des fibres extraites d'un cocon frais (~qlq heures), ou décreusées, à celle d'un polyamide synthétique (PA 66). Alors que le précurseur contient de l'eau « libre » ($T_{\text{onset}} \sim 0^\circ\text{C}$), indiquant un caractère hydrophobe des macromolécules de soie, les fibres – y compris la bave – contiennent de l'eau liée ($\sim 110^\circ\text{C}$). Le pic à $\sim 250^\circ\text{C}$ de fusion du PA 66 (T_f) est moyennement fin (polymère semi-cristallin, cristallinité $\sim 50\%$) [8], le T_g étant visible vers 40°C ainsi que les traces d'eau liée. Le pic analogue du précurseur est à $\sim 220^\circ\text{C}$ tandis que celui des fibres est à $\sim 280^\circ\text{C}$: il est clair qu'au passage par la zone de la filière les interactions entre macromolécules de fibroïne sont modifiées, le bond de près de 60°C de la T_f indiquant des interactions plus fortes entre macromolécules. Classiquement dans les modélisations de l'effet des filières on postule un dépliement et alignement des macromolécules, initialement en amas globulaires, ici du fait du milieu hydrophobe. Le changement de nature de l'eau indique aussi un effet possible d'ionocité, mécanisme beaucoup plus fort que la liaison hydrogène pour coupler des macromolécules. La formation de quelques ponts S-S n'est pas exclue si les greffons le permettent. Si la largeur du pic de « fusion » du précurseur est compatible avec une cristallinité significative, comparable à celle du PA 66 en tenant compte des composantes, la largeur mesurée pour les fibres indique une structure très désordonnée, voire entièrement amorphe. La courbe DSC de glandes séchées [7] montre, comme attendu, la disparition du pic d'eau liée à $\sim 115^\circ\text{C}$ et une marche vers 50°C pouvant être attribuée à une transition vitreuse (T_g).

Le type II montre un comportement particulier avec un changement de pente avant le pseudo palier. On peut tenter d'expliquer ce comportement par – après le déroulement de certaines hélices – la formation d'une structure particulière. Une évolution quasi continue entre ce type de signature et le type III, typique des fibres saturées en eau, laisse penser que ce type II correspondrait à des fibres où les molécules d'eau occuperaient des sites bien spécifiques, peut être en relation avec des séquences d'acides aminés spécifiques.

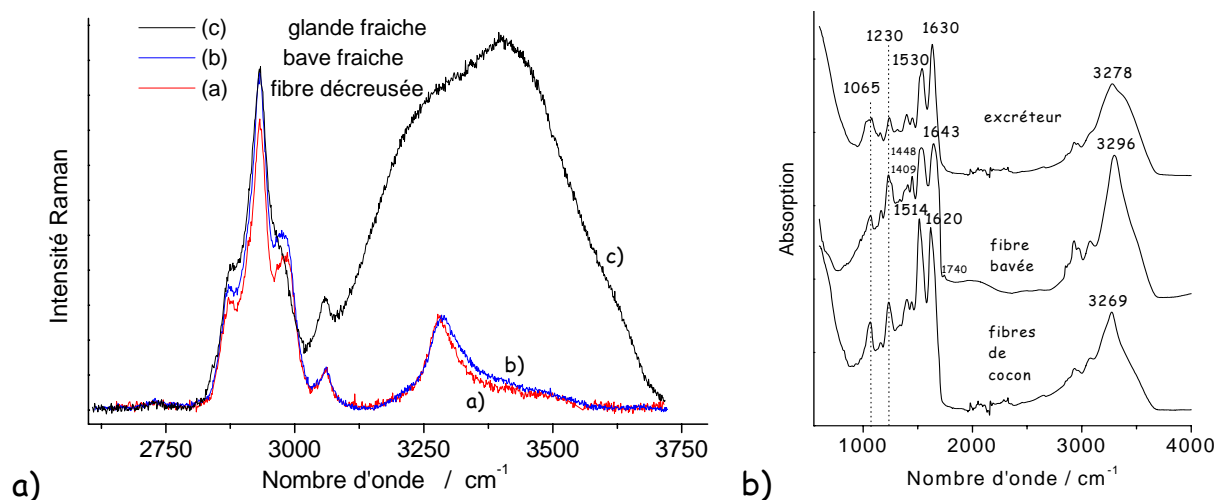


Fig. 3 a) spectres Raman du précurseur (glande, zone centrale), d'une fibre fraîche et d'une fibre décreusée ; b) spectres IR du précurseur de soie dans l'excréteur (A1), d'une fibre de soie filée manuellement (~10 mn après) ou extraite d'un cocon non-décreusé.

4.2. Interactions fibroïne-eau et structuration des chaînes macromoléculaires

Les spectres de vibration, infrarouge ou Raman informent sur la teneur en eau ainsi que sur la conformation des chaînes de fibroïne (sondes Amide I et Amide II, vibrateur N-H) [4,7-17]. La décomposition des modes IR en leurs différentes composantes est plus délicate que pour les modes Raman car ils sont plus larges et la forme des raies plus difficilement modélisables. En outre des combinaisons se superposent aux modes fondamentaux (par ex. à 3070 cm^{-1}). Les spectres Raman sont moins sensibles à la teneur en eau et l'analyse des composantes des modes Amide plus précise qu'en absorption IR, du fait de la plus faible largeur des modes Raman et de leur forme assimilable à des Lorentziennes ou en cas de désordre à des Gaussiennes. Une deutération sera nécessaire pour découpler les vibrateurs $\nu\text{-X-H}$ et réduire d'un facteur 2 les largeurs des modes IR [11] et ainsi affiner les discussions. La Fig. 3a compare les spectres Raman obtenus dans le lumen de la glande (partie centrale en Z) et sur le cœur d'une fibre fraîchement filée ou extraite d'un cocon décreusé : la très forte intensité de la composante à $\sim 3460\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{H}_2\text{O}$) montre que dans la glande le précurseur est « dilué » en milieu aqueux, en accord avec les mesures de calorimétrie. Les différences entre fibre fraîche et décreusée sont beaucoup plus subtiles [7]. L'analyse des composantes des modes Amides I (issus de $\nu\text{C=O}$, Raman ($\sim 1660\text{ cm}^{-1}$) & IR ($\sim 1630\text{ cm}^{-1}$) et II (issu de $\delta\text{ N-H}$ couplé avec

ν C-N, IR, ($\sim 1540\text{ cm}^{-1}$) et ν N-H donnent plus d'informations (vers $\sim 3280\text{ cm}^{-1}$, Fig. 3b). Deux composantes à ~ 3285 (Raman)/3290 (IR) et à ~ 3325 (Raman)-3350 (IR) cm^{-1} , de largeurs différentes (~ 60 & 150 cm^{-1}) sont visibles sur les différents spectres et attribuées aux vibrateurs X-H (Figs 3 & 4). Si la composante « fine » est attribuable sans ambiguïté au vibrateur ν N-H, la bande large peut correspondre soit à un vibrateur N-H plus libre dans une zone « amorphe », soit à de l'eau liée ; cette composante est intense dans les films régénérés et dans le précurseur, ce qui est un argument pour attribuer cette composante à un vibrateur N-H de zones amorphes. Confirmation est donnée par le spectre Raman d'une glande séchée, pour laquelle la calorimétrie indique une très faible teneur en eau : la composante Raman vers 3325 cm^{-1} attribuée aux vibrateurs N-H « amorphes » y est intense tandis que celle de l'eau ($\sim 3465\text{ cm}^{-1}$) est affaiblie. Les nombres d'ondes sont cependant supérieurs à ceux mesurés pour le cheveu (3277 et 3310 cm^{-1} respectivement pour les composantes « ordonnées » et « amorphe » [4]), ce qui indique des liaisons hydrogène plus faibles dans la soie, comme dans la fibre PA 66, du fait de l'absence de ponts S-S favorisant le rapprochement des macromolécules de kératine.

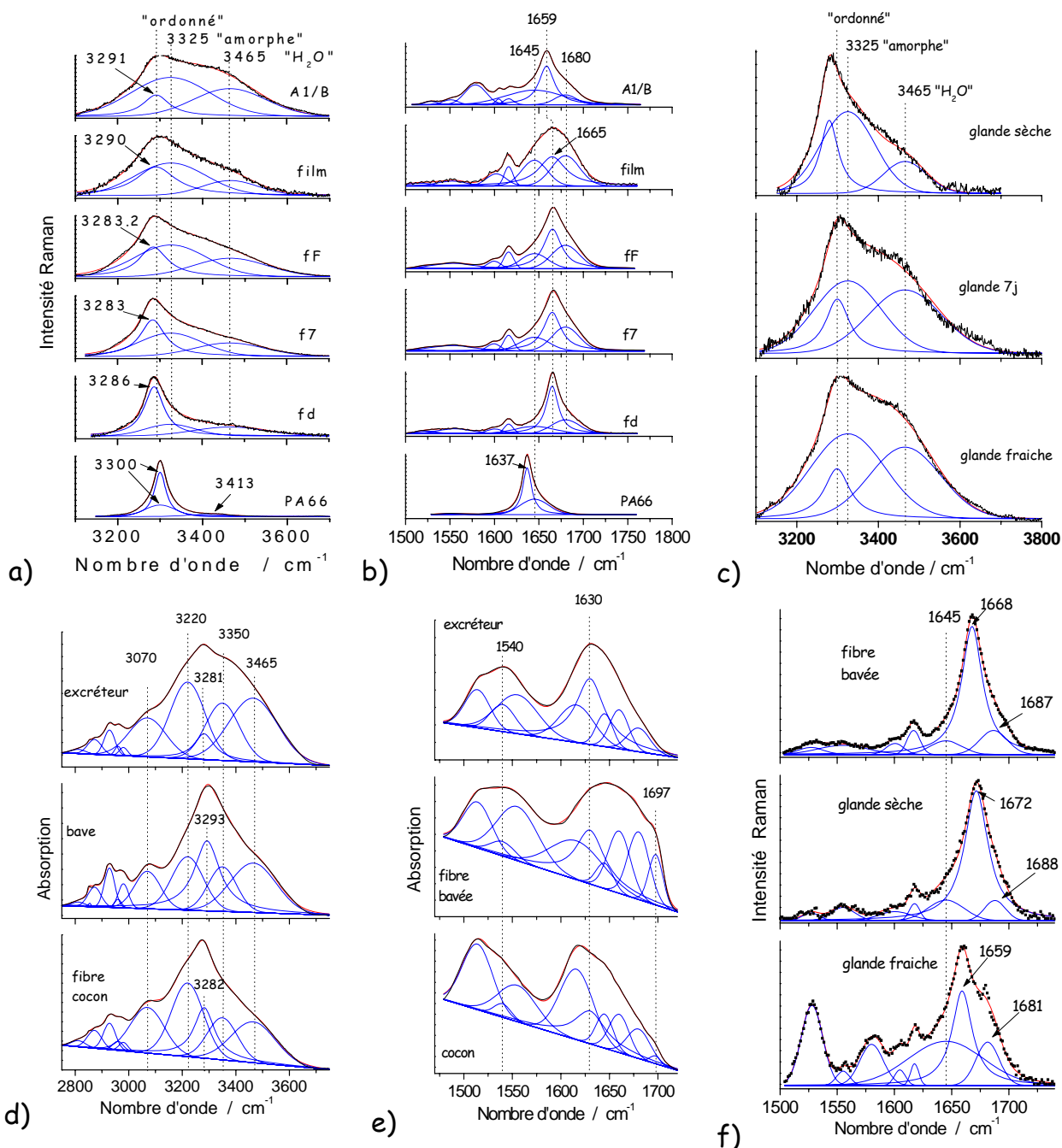


Fig. 4. Comparaison des signatures des modes d'élongation Amide I (b, f, Raman, e, IR), II (e, IR) et des modes ν N-H et ν O-H en diffusion Raman (a,c) et absorption IR (d) pour la soie du précurseur de fibre, une fibre fraîche, une fibre décreusée ainsi que pour la zone centrale de la glande, fraîche (juste après dissection) et séchée.

La largeur de la composante fine est assez proche de celle du PA66 où la composante amorphe se superpose avec celle des zones « amorphes ». Le décalage des barycentres des modes N-H_{ordonné}/N-H_{amorphe} indique que les liaisons hydrogène sont un peu plus fortes pour les vibrateurs "ordonnés", la zone la plus amorphe étant moins dense. En accord avec la calorimétrie le caractère très amorphe de la soie est confirmé.

La Fig. 4 précise la comparaison des modes Amide I (IR, Raman) et II (IR) de la soie depuis son état de précurseur de fibre dans l'excréteur jusqu'aux fibres décreusées. Le décalage du mode Amide I ($\nu_{C=O}$) de 1630 (IR)/1659 cm^{-1} (Raman) dans la glande fraîche à 1643 (IR)/1668 (Raman) cm^{-1} dans la fibre fraîche confirme l'important changement structural au passage de la zone filière du ver à soie déjà mis en évidence par calorimétrie. La comparaison des spectres Raman de glande fraîche (riche en eau) et sèche (Fig. 4c) montre un décalage de près de 10 cm^{-1} (1659/1672 cm^{-1}) pour la composante principale, la valeur étant intermédiaire pour la fibre fraîche (1668 cm^{-1}). Comme le montre le tableau 3, l'interaction eau-macromolécule modifie donc fortement les spectres.

	Amide I (R) cm^{-1}	Amide I (IR) cm^{-1}	N-H (R) cm^{-1} « or »	N-H (R) cm^{-1} « am »	N-H (IR) cm^{-1} "or"	N-H (IR) cm^{-1} "am"
Lumen <i>in vivo</i>	1659	1630	3291	3325		3350
Précurseur <i>in vivo</i>	1659	1630	3291	3325	3282	3350
Lumen sec	1672		3280	3325		
Bave fraîche	1668	1643	3283	3325	3293	3350
Soie décreusée	1665		3286	3325		
Film régénéré (hydraté)	1665		3290	3325		
kératine	1650		3277	3310		
PA 66	1637		3300			

Tab. 3. Comparaison des nombres d'onde des vibrateurs Amide I et N-H « ordonnés » et « amorphes »

Une abondante littérature discute de l'attribution des composantes des bandes Amide I aux diverses conformations que peuvent prendre les chaînes peptidiques y compris de fibroïne ou de spidroïne : hélice α régulière, hélices irrégulières (« turns ») ou bien feuilletts β formés de l'association d'hélices déroulées. Ces différentes conformations peuvent être déterminées par les greffons d'acides aminés, leur répétition (séquence) et leur encombrement-rigidité. Un nombre élevé de composantes semble nécessaire pour décrire les bandes Amide en IR, bien supérieur au nombre requis pour les bandes Raman, sans qu'il soit possible de certifier que toutes ces composantes correspondent à des vibrateurs différents et non à un problème de rendu des formes de raie. Le principal argument de la littérature pour les attributions est la valeur du nombre d'onde [14-17]. Cela semble peu compatible avec l'observation en fait d'une signature Raman formée d'une raie Lorentzienne assez fine (comme pour le PA 66) et de part et d'autre de deux Gaussiennes, plus larges, d'intensités variables dont le barycentre peut se déplacer de 1650 cm^{-1} dans la kératine à 1672 cm^{-1} dans le lumen sec (Tableau 3). On peut raisonnablement penser que la composante Lorentzienne fine correspond aux chaînes peu distordues (hélices α), parties de chaîne dont les greffons sont courts, proches de la structure semi-cristalline du PA 66, avec une liaison hydrogène modérée, la composante à plus haut nombre d'onde correspondant à des feuilletts désordonnés. Dans le film régénéré la composante centrale perd son caractère Lorentzien et s'élargit du fait du désordre mais ne se déplace pas, ce qui coïncide avec une augmentation du désordre local des hélices, sans passage à un autre type de structure. Pour les fibres de kératine, le changement d'intensité relative des composantes fine (L) et large (G) au-delà de 5% d'allongement est aussi en accord avec cette attribution. Les critères de largeur et d'intensité relative des composantes semblent donc plus pertinents que les critères de nombre d'onde et nous attribuons la Lorentzienne fine aux hélices α , non ou peu distordues, *a priori* celles dont les greffons, courts, ne perturbent pas trop une conformation « régulière » comme dans le polyamide 66.

Un saut de 1657 à 1668 cm^{-1} du nombre d'onde du mode Amide I a aussi été observé entre le spectre de la soie dans la partie principale (sac) et celui mesuré près de la filière dans une glande fraîche de *Nephila clavipes* [18]. Il a été montré que le saut de nombre d'onde se produisait en fait dans une zone réduite, entre la valve et la filière, distantes de ~ 1 mm. Les auteurs postulent que cela correspond à la formation de feuilletts β . Le suivi du facteur de polarisation montre, que comme observé lors de la transformation d'un précurseur de fibre synthétique en une fibre à haute propriété, l'étape finale correspond principalement à un développement de l'anisotropie axiale, en d'autres termes, à l'alignement des chaînes macromolécules dans l'axe de la fibre.

La Fig. 5 schématise la formation du filament de soie à partir du précurseur très riche en eau mais une eau n'interagissant pas fortement avec les macromolécules de fibroïne, contenues dans la glande (soie

hydrophobique). A la sortie de l'excréteur et au passage dans la filière la majeure partie de l'eau est perdue et les interactions entre macromolécules augmentent le point de fusion de plus de 60°C. Des études en cours, *in vivo*, sur les contenus des diverses parties de la glande montrent que d'autres transformations importantes du précurseur de soie se produisent antérieurement à la zone de filière, pour les animaux s'apprêtant ou prêts à filer dans la partie centrale. Il semble que le précurseur transformé se constituerait d'abord au centre de la partie avant (vers la filière) de la partie centrale en Z et que la transformation s'étende dans toute la glande lorsque l'animal s'apprête à filer.

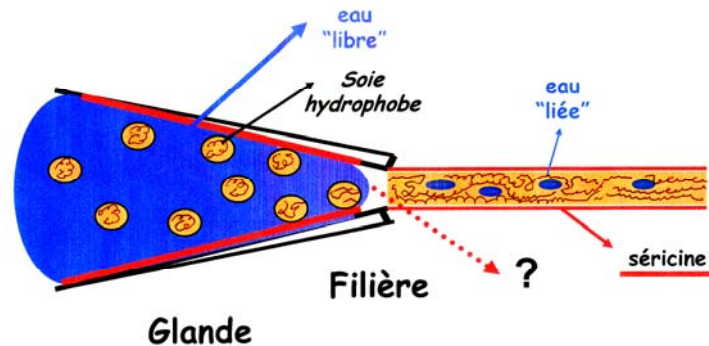


Fig. 5. Représentation schématique de la formation du filament de soie à partir des données de spectroscopie et de calorimétrie.

5. Relations entre comportement micro- et nano-mécanique

5.1. Analyse nanomécanique : relation décalage Raman - contrainte

Lorsqu'un solide est soumis à une contrainte, de traction ou de compression macroscopique, dans un matériau « solide », la liaison ultime, la liaison chimique, est allongée ou comprimée, compte-tenu des dissipations résultant à des échelles supérieures du fait de glissements inter-chaînes macromoléculaires par exemple ou de changement de densité, particulièrement en compression [19-21]. Le fort caractère axial des fibres (rapport élevé longueur/diamètre, alignement des macromolécules mis en évidence par les spectres polarisés [9,10]) est bien adapté à l'étude des modifications du spectre de vibration sous traction uniaxiale contrôlée en charge ou en allongement. La perturbation du nombre d'onde des modes de vibration est d'autant plus forte que la liaison est anharmonique [19,20] et donc maximale pour les modes ν X-H. L'interprétation mécanique est claire lorsque les modes sont des modes d'élongation des liaisons de la chaîne macromoléculaire (et non des greffons) ou bien concerne les modes externes les plus collectifs, à très bas nombre d'onde, mettant en jeu l'ensemble de l'unité vibrationnelle. Sauf pour les modes ν X-H où les variations peuvent être importantes (la liaison X-H est la seule liaison qui peut s'allonger de plus de 20%, sans rompre, contre 2-3% pour les autres liaisons covalentes) les variations en nombres d'onde des modes fondamentaux sont faibles ($qlq\text{ cm}^{-1}$) et cela nécessite l'usage de spectromètres précis, ce qui conduit à des temps de mesures longs (0,5 à 2h), donc en régime quasi-statique.

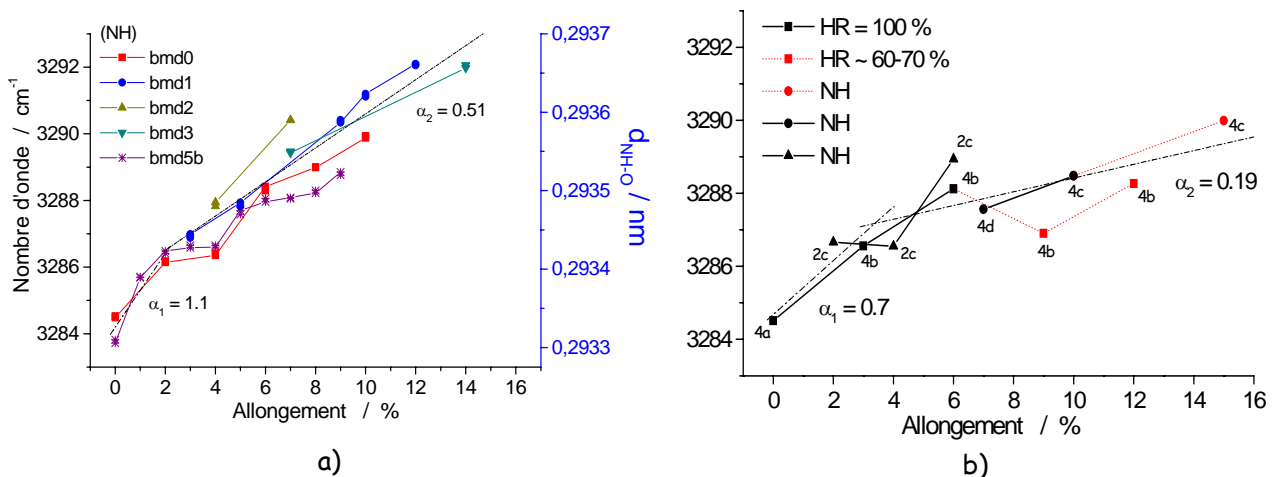


Fig. 6. a) évolution du nombre d'onde du mode d'élongation ν N-H pour 5 fibres (séchées, humidité relative ~60%) en fonction de l'allongement appliqué ; b) évolution pour 2 fibres saturées d'eau et mesurées partiellement immergées. Les mesures sont faites en régime quasi statique (pas de = 2%:2h).

Dans un précédent travail [13] nous avons montré que certains modes Raman de la fibroïne, les modes Amide III et associés entre 1200 et 1550 cm^{-1} avaient un comportement homothétique à celui des courbes macromécaniques : un régime quasi-élastique jusqu'à $\sim 3/4\%$ (et non 2%) d'allongement puis une augmentation faible proche d'un pseudo plateau, en accord avec les travaux de Young et coll. [23,24] sur l'araignée *Nephila edulis*. On notait que les modes attribuables aux chaînes « amorphes » présentaient un seul régime linéaire, en accord avec l'attribution du seuil et du pseudo plateau à la transition α - β , c'est-à-dire à un déroulement des hélices. Les modes collectifs des chaînes ($<100\text{ cm}^{-1}$) n'étaient sensibles qu'en dessous de $2\text{-}4\%$ d'allongement, en accord avec une perte de couplage au-delà.

La comparaison des évolutions mesurées sur fibres sèches ou saturées d'eau confirme le changement de comportement provoqué par l'incorporation d'eau. La pente est fortement réduite, de $1,1$ (milieu sec, Fig. 6a) à $0,7\text{ cm}^{-1}/\%$ (humide, Fig. 6b), valeurs beaucoup plus faibles que celle mesurée sur la kératine ($5\text{ cm}^{-1}/\%$), ce qui indique une plus grande facilité à la déformation de la soie, en relation avec le seuil plus bas (2 au lieu de 4%) et sans doute le moindre nombre de liaisons fortes inter-macromolécules et la plus faible cristallinité. L'utilisation des courbes de corrélation entre les nombres d'onde $\nu\text{N-H}$ et les distances $\text{N}\dots\text{O}$ [25], permet d'estimer l'ampleur des déplacements (Fig. 6a, échelle Y de droite). Les faibles allongements sont cohérents avec des liaisons hydrogènes intramoléculaires.

5.2. Fluage et comportement intrinsèque

La durée de la mesure conduit à un certain fluage visible sur la Fig. 6 : les mesures à $0,1,2,3$ et 4% ont été faites le même jour ($2\text{h}/\text{point}$) ; les mesures à $5,6,7,8$ et 9% le lendemain. Considérant que les sauts à $4\text{-}5$ et $8\text{-}9\%$ sont provoqué par le fluage pendant la nuit, la soustraction de ce fluage permet de reconstruire une courbe intrinsèque, homologue à un type IV : comportement élastique jusqu'à 2% , plateau puis « durcissement structural » au delà de $\sim 5\%$ d'allongement.

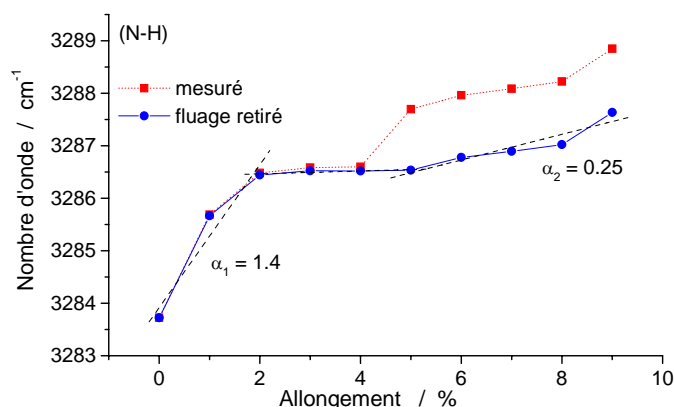


Fig. 7. évolution du nombre d'onde du mode d'élongation $\nu\text{N-H}$ pour une fibre (sèche) en tenant compte du fluage lent.

La mise au point d'un nouveau dispositif de traction uniaxiale, suffisamment miniaturisé pour être positionné sous un spectromètre à haute sensibilité devrait permettre d'acquérir les mesures par pas de $2\%/0.1\text{h}$ et de comparer avec les données obtenues en régime quasi statique.

Conclusion

Ce travail confirme l'intérêt d'une analyse couplée micro-mécanique et vibrationnelle pour comprendre comment la transmission des efforts au maillon ultime, la liaison chimique et leur dissipation induisent des changements de structure ou de conformation qui déterminent le comportement en traction. Le rôle de l'eau sur les propriétés mécaniques de la fibre de soie commence à être explicité. Le changement d'affinité entre les macromolécules de soie et l'eau est contrôlé par l'animal pour constituer la fibre au passage excréteur - filière. La mise en évidence de plusieurs signatures micromécaniques (contrainte = $f(\text{allongement})$) permet de mieux classifier la variabilité intrinsèque et sa dépendance en fonction du temps, de l'humidité... Des premières corrélations entre ces types de comportement mécanique et les changements de conformation ont été proposées.

Remerciements

Une partie de ce travail a été supporté par l'ANR Blanche NANOSOIE. Les auteurs remercient Hicham El Baghli, Sonia Ben Fredj et Rafika Snoussi pour leurs contributions ainsi que M. Michel Garcia et MM les Drs A. Bunsell et G. Chavancy pour leurs suggestions. Le Dr F. Henry (ICMPE CNRS-Université Paris-Créteil) est remercié pour les mesures de DSC.

Références

- [1] Z.H. Zhu, K. Ohgo, T. Asakura, « Preparation and characterization of regenerated Bombyx mori silk fibroin fiber with high strength », *Express Polymer Lett.*, Vol. 2, pp. 885-889, 2008.
- [2] Ph. Colomban, S.E. Moukit, H.M. Dinh, M. Hassine, J. Riand, B. Mauchamp, « Micro- & nano-mécanique des fibres naturelles animales ». *Rev. Comp. & Mat. Avancés*, Vol. 18, pp. 163-168, 2008.
- [3] J.W. S. Hearle, « Protein fibers: structural mechanics and future opportunities », *J. Mater. Sci.* Vol. 42, pp. 8010-8019, 2007.
- [4] R. Paquin, Ph. Colomban, « Nanomechanics of single keratin fibres: a Raman study of the α -helix β -sheet transition and the effect of water », *J. Raman Spectrosc.* Vol. 38, pp. 504-514, 2007.
- [5] F. Vollrath & D.P. Knight, « Liquid crystalline spinning of spider silk », *Nature*, Vol. 410, pp. 541-548, 2001.
- [6] V. Jauzein, Ph. Colomban, Silks, ch. 21 in *Tensile Properties of Synthetic and Natural Fibres Handbook*, A. Bunsell Ed., Woodhead Publishing, 2009, sous presse.
- [7] H.M. Dinh, H. El Baghli, Ph. Colomban, « The mechanics of proteic single fibre : the silkworm fibres ». In: *Proceedings APCTP-ASEAN Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology (AMSN2008), Nha Trang, Vietnam, September 15-21, 2008*.
- [8] A. Marcellan, Ph. Colomban, A. Bunsell, «(Nano)structure, Internal Stress and *in situ* Fracture Behaviour of Polyamide Fibres», *J. Raman Spectrosc.* Vol. 35 [4], pp. 308-315, 2004.
- [9] J.M. Herrera-Ramirez, Ph. Colomban, A. Bunsell, «MicroRaman Study of the Fatigue Fracture and Tensile Behaviour of Polyamide (PA66) Fibres», *J. Raman Spectrosc.* Vol. 35 [12], pp. 1063-1072, 2004.
- [10] Ph. Colomban, J.M. Herrera Ramirez, R. Paquin, A. Marcellan, A. Bunsell, «Micro-Raman Study of the Fatigue and Fracture Behaviour of single PA66 Fibres. Comparison with single PET and PP fibres», *Engn. Fract. Mech.* Vol. 73 [16], pp. 2463-2475, 2006.
- [11] Ph. Colomban, G. Gouadec, «Raman and IR micro-analysis of high performance polymer fibres tested in traction and compression», *Comp. Sci. & Tech.* 69 [1], pp. 10-16, 2008.
- [12] H. El Baghli, R. Snoussi, H.M. Dinh, N. Ayed, M. Garcia, Ph. Colomban, *Ladir internal Report*, 2008.
- [13] Ph. Colomban, H.M. Dinh, J. Riand, L.C. Prinsloo, B. Mauchamp, « Nanomechanics of single silkworm and spider fibres : a Raman and micro-mechanical *in situ* study of the conformation change with stress ». *J. Raman Spectrosc.* Vol. 39, pp. 1749-1764, 2008.
- [14] P. Monti, P. Taddei, G. Freddi, T. Asakura, M. Tsukada, «Raman spectroscopic characterization of Bombyx mori silk fibroin: Raman spectrum of Silk I», *J. Raman Spectrosc.*, Vol. 32, pp. 103-107, 2001.
- [15] M.E. Rousseau, T. Lefèvre, L. Beaulieu, T. Asakura, Pérolet M., «Study of protein conformation and orientation in silkworm and spider silk fibre using Raman microspectroscopy», *Biomacromolecules* Vol. 5, pp. 2247-2257, 2004.
- [16] M.E. Rousseau, L. Beaulieu, T. Lefèvre, J. Paradis, T. Asakura, Pérolet M., «Characterization by Raman spectroscopy of the stress-induced conformation transition in fibroin fibers from the silkworm *Samia cynthia ricini*», *Biomacromolecules* Vol. 5, pp. 2512-2521, 2006
- [17] M.M. Rahman Khan, H. Morikawa, Y. Gotoh, M. Miura, Z. Ming, Y. Sato, M. Iwasa, «Structural characteristics and properties of Bombyx mori silk fibers obtained by different artificial forcibly silking speeds», *Inter. J. Biological Macromolecules*, Vol. 42, pp. 264-270, 2008.
- [18] T. Lefèvre, S. Boudreault, C. Cloutier, M. Pérolet, «Conformational and orientational transformation of silk proteins in the major ampullate gland of *Nephila clavipes* spiders», *Biomacromolecules* Vol. 9, PP. 2399-2407, 2008.
- [19] Ph. Colomban, «Analysis of Strain and Stress in Ceramic, Polymer and Metal Matrix Composites by Raman Spectroscopy». *Adv Engn Mater.* 4 [8], pp. 535-42, 2002.
- [20] G. Gouadec, Ph. Colomban, «Raman study of Nanomaterials : How spectra related to disorder, particle size and mechanical properties», *Progr. Cryst. I Grow. & Charact. Mater.* 53 [1] 1-56, 2007.
- [21] Ph. Colomban, « Nanomechanics of advanced polymer fibres », *Comp. Sci. & Tech.* Vol 69 (2009) <http://dx.doi.org/10.1016/j.compscitech.2008.04.002>
- [22] Ph. Colomban, G. Sgon, M. Lesage, J.M. Herrera-Ramirez, «MicroRaman Study of the Compressive Behaviour of Polyamide (PA66) Fibres in a Diamond –Anvil Cell», *Vibr. Spectrosc.* Vol 37, pp. 83-90, 2005.
- [23] J. Sirichaisit, R.J. Young, F. Vollrath, «Molecular deformation in spider dragline silk subjected to stress», *Polymer* Vol. 41, 1223-1227, 2000.
- [24] J. Sirichaisit, V.L. Brookes, R.J. Young, F. Vollrath, «Analysis of structure/property relationship in silkworm (*Bombyx mori*) and spider dragline (*Nephila edulis*) silks using Raman spectroscopy», *Biomacromolecules*, Vol. 4, pp. 387-394, 2003.
- [25] A. Gruger, A. Novak, A. Regis, Ph. Colomban, «Infrared and Raman study of polyaniline. Part II: Influence of Orthosubstituents on hydrogen bonding and UV/Vis-near IR electron charge transfer», *J. Mol. Struct.* 328, pp. 153-167, 1995.