

Etude de la structure des gels protéiques par Microscopie confocale

THÈSE

Présentée le 26 /02/2010 pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité Chimie et Physico-chimie des polymères

Par

AKO Komla Guéwoul-Guèdè

Composition du Jury

Madame Camille MICHON (AgroParistech - Massy)	Rapporteur
Monsieur Christian SANCHEZ (IATE - Montpellier)	Rapporteur
Monsieur Frank BOURY (INSERM – IBT Angers)	Examineur
Madame Laurence DONATO (NESTLE - Suisse)	Examineur
Monsieur Yves USSON (TIMC – IMAG Grenoble)	Examineur
Monsieur Taco NICOLAI (PCI – Le Mans)	Directeur de thèse
Monsieur Dominique DURAND (PCI – Le Mans)	Directeur de thèse

Je remercie Dieu de m'avoir accordé la santé durant toutes ces années.

Thank you God for giving me health during all these years.

*Ce sont les circonstances difficiles qui révèlent les hommes.
A l'avenir, quand il s'en présentera une, dis-toi que Dieu t'a
mis aux prises avec un adversaire redoutable pour faire de toi
un vainqueur ; et tu ne peux l'être sans sueur.*

*It is the difficult circumstances which reveal men.
In future, when there will come one, say that God made you fight
with a formidable adversary to make you a winner
and you cannot, without sweat.*

REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma reconnaissance à Taco NICOLAI et Dominique DURAND pour leurs conseils, leur aide et leur grande patience lors de ces trois années de thèse. Aussi je les remercie chaleureusement pour leur soutien tant sur le plan scientifique que humain.

Je tiens également à remercier les membres du jury : Madame Camille MICHON, Monsieur Christian SANCHEZ, Monsieur Frank BOURY, Madame Laurence DONATO, Monsieur Yves USSON, d'avoir aimablement accepté de juger mon travail. Mes remerciements vont aussi à la région **PAYS DE LA LOIRE** qui a financé cette thèse.

SOMMAIRE

Sommaire

Sommaire	2
Introduction	5
I. Situation bibliographique	7
I.1. La bêta-lactoglobuline (βlg) et les lipocalines	7
I.1.1. Définition.....	7
I.1.2. Structure moléculaire.....	7
I.1.3. Variant génétiques de la bêta-lactoglobuline	8
I.2. Comportement de la bêta-lactoglobuline à l'état natif	9
I.2.1. Influence du pH	9
I.2.2. Influence du sel	10
I.2.2.1. Salting-in	11
I.2.2.2. Salting-out.....	11
I.2.3. Influence de la concentration de β lg.....	11
I.3. Dénaturation de la bêta-lactoglobuline	12
I.3.1. Dénaturation thermique de la bêta-lactoglobuline	12
I.3.2. Influence du pH	13
I.3.3. Influence du sel	13
I.4. Agrégation et gélification de la βlg	14
I.4.1. Structure des agrégats dilués.....	14
I.4.2. Structure des gels.....	18
I.5. Gélification à froid	22
I.6. Résumé	23
II. Matériels et Méthodes	24
II.1. Méthode de caractérisation par Microscopie	24
II.1.1. Microscopie Confocale à balayage laser(MCBL).....	24
II.1.1.1. Principe de fluorescence.....	25
II.1.1.2. Paramètres de fluorescence	26
II.1.1.3. Durée de vie ou photo stabilité	27
II.1.1.4. Présentation de la technique de Microscopie	28
II.1.1.5. Détecteur : PhotoMultiplicateur Tube (PMT).....	32
II.1.2. Méthodes d'analyse quantitative	34
II.1.2.1. Sonde fluorescente	34
II.1.2.2. Etude de l'influence du gain (G)	35
II.1.2.3. Histogramme des images : mode de représentation	38
II.1.2.4. Mesure de la turbidité par MCBL.....	39
II.1.2.5. Fonction de corrélation de paire de pixels	42
II.1.2.6. Comparaison entre $g(r)$ théorique et expérimental	44
II.1.2.7. Conclusion	46
II.1.3. Méthodes de caractérisation et de préparation des échantillons	47
II.1.3.1. Préparation de la bêta-lactoglobuline en solution	47

II.1.3.2.	Fluorescence de la rhodamine.....	48
II.1.3.3.	Agrégation en présence de la rhodamine.....	49
II.1.3.4.	« Précipitation » des gels de β lg.	50
II.1.3.5.	Chauffage des systèmes : mode A.....	51
II.1.3.6.	Caractérisation des gels.....	52
II.1.3.7.	Obtention d'un $g(r)$ complet.....	54
II.1.3.8.	Interprétation du $g(r)$	57
II.1.3.9.	Gélification en présence de la rhodamine.....	58
II.1.3.10.	Méthode de « box counting ».....	59
II.1.3.11.	Conclusion.....	60
II.2.	Technique de diffusion du rayonnement.....	60
II.2.1.	Diffusion statique du rayonnement.....	62
II.2.1.1.	Principe de la diffusion.....	62
II.2.1.2.	Diffusion statique de la lumière.....	64
II.2.1.3.	Diffusion des rayons X aux petits angles : SAXS.....	65
II.2.2.	Diffusion dynamique de la lumière.....	65
II.2.3.	Diffusion statique de la lumière en milieu turbide (3DLS).....	70
II.2.4.	Caractéristiques des appareillages utilisés.....	72
II.2.4.1.	Diffusion de la lumière classique.....	72
II.2.4.2.	Diffusion de la lumière en milieu turbide.....	73
II.2.4.3.	Diffusion des rayons X aux petits angles : SAXS.....	73
II.2.5.	Turbidimétrie.....	74
II.2.5.1.	Théorie de la turbidimétrie.....	74
II.2.5.2.	Appareillage expérimental.....	75
III.	RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	76
III.1.	Etude de la gélification à chaud de la bêta-lactoglobuline.....	76
III.1.1.	Introduction.....	76
III.1.2.	Etude des systèmes à 100g/l de β lg.....	76
III.1.2.1.	Etude en fonction de la force ionique à pH7.....	76
III.1.2.2.	Etude de la structure des gels à 100g/l de β lg.....	79
III.1.3.	Etude en fonction du pH sans sel.....	82
III.1.3.1.	Evolution de la turbidité et de D/d en fonction du pH.....	82
III.1.3.2.	Etude de la structure des gels sans sel à 100g/l.....	83
III.1.4.	Etude en fonction de la concentration de β lg à 0.25M (NaCl) à pH7.....	88
III.1.4.1.	Evolution de la turbidité et du rapport D/d.....	88
III.1.4.2.	Evolution des $g(r)$ pour différentes concentrations de β lg.....	91
III.1.4.3.	Synérèse des gels en fonction de la concentration de β lg.....	92
III.1.4.4.	Diagramme de phase.....	93
III.1.5.	Résumé et conclusion.....	94
III.2.	Etude de la gélification à froid des agrégats de la bêta-lactoglobuline.....	96
III.2.1.	Comparaison entre la structure des gels à froid et des gels à chaud.....	96
III.2.1.1.	Ressemblance.....	96
III.2.1.2.	Différences.....	98
III.2.2.	Structure des gels à froid.....	102
III.2.2.1.	Influence de la température.....	102
III.2.2.2.	Influence de la force ionique.....	104
III.2.2.3.	Influence de la concentration des pré-agrégats.....	106

III.2.2.4.	Influence de la taille des pré-agrégats.....	107
III.2.2.5.	Evolution de la turbidité et du module élastique	108
III.2.2.6.	Conclusion	109
<i>Conclusion.....</i>		<i>111</i>
<i>Références Bibliographiques</i>		<i>114</i>

Introduction et Bibliographie

Introduction

Le lait est constitué d'une émulsion de matière grasse, d'une suspension colloïdale de nature protéique et d'une phase dispersante contenant des protéines solubles, le lactose et une partie de la fraction minérale. Le sérum du lait, appelé lactosérum ou le petit lait, est obtenu après précipitation acide des caséines du lait. Son constituant majoritaire est la bêta-lactoglobuline suivi de l'alpha-lactalbumine.

Le petit lait est couramment utilisé dans l'industrie alimentaire pour plusieurs raisons, par exemple pour ces propriétés gélifiantes, texturants, émulsifiantes et moussantes. Dans le domaine alimentaire ou d'autres comme la cosmétique ou la galénique, les propriétés mécaniques et nutritionnelles des gels de protéines sont utiles. Par exemple, des pastilles à base de lactosérum enrichies en bêta-lactoglobuline sont utilisées pour renforcer la musculature des sportifs de hauts niveaux « Body Bulding » (ou encore d'autres types de gels corporels riches en protéine).

La structure et les propriétés des gels de protéines sont souvent liées. Cette relation permet de contrôler les propriétés de la matière en contrôlant sa structure et son organisation. En étudiant en détail le mode d'organisation et d'assemblage de la bêta-lactoglobuline pure on peut espérer le contrôler afin d'obtenir la structure et les propriétés souhaitées. La bêta-lactoglobuline est une protéine globulaire qui s'auto-assemble à l'échelle de quelques nm jusqu'au micron. Une seule technique expérimentale comme la diffusion de lumière ne permet pas d'étudier la structure des gels de cette protéine sur toute l'échelle de son auto-assemblage. Depuis longtemps des techniques microscopiques sont utilisées pour observer de telles structures, mais les images générées par ces microscopes sont le plus souvent analysées de façons qualitatives.

L'objectif de cette thèse est d'abord de développer une nouvelle méthode d'analyse quantitative des images du microscope confocale à balayage laser, qui permette d'accéder aux mêmes paramètres que ceux obtenus par les techniques de diffusion de rayonnement. Nous allons ensuite caractériser la structure des gels de bêta-lactoglobuline obtenus par différentes préparations, à chaud et à froid, en variant la concentration et le type de sel, le pH, la température ou la concentration de protéine.

Ce manuscrit est décomposé en trois chapitres :

Le premier chapitre est une étude bibliographique sur la structure de la bêta-lactoglobuline et sur son mécanisme d'agrégation et de gélification. Cette partie bibliographique présente l'influence des conditions environnementales sur la stabilité de la protéine et sur la structure des agrégats ou des gels formés

Le second chapitre décrit les principales techniques et protocoles expérimentaux utilisés au cours de ce travail en mettant l'accent sur le développement de la méthode d'analyse quantitative par la microscopie confocale.

Le troisième chapitre présente les résultats obtenus sur l'étude de la structure des gels de bêta-lactoglobuline préparés à chaud et à froid.

I. Situation bibliographique

Une protéine globulaire est une macromolécule composée par une chaîne d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques et possédant quatre niveaux de structures différents. L'enchaînement de ces acides aminés constitue la structure primaire. Les protéines comportent des zones ordonnées périodiquement où la chaîne polypeptidique linéaire présente une structure tridimensionnelle régulière de type hélice α ou feuillet β . Ces différentes régions, dont l'organisation est maintenue par des liaisons hydrogènes entre acides aminés, constituent la structure secondaire de la protéine. La structure tertiaire correspond à une organisation tridimensionnelle des éléments de la structure secondaire, et résulte d'interactions non-covalentes (hydrogènes, hydrophobes, Van der Waals, électrostatiques...) avec parfois des ponts disulfures. La structure quaternaire se définit par l'état d'oligomérisation de la protéine c'est-à-dire par l'association de plusieurs chaînes. La protéine peut ainsi se présenter sous forme de monomères, de dimères... L'état « natif » d'une protéine correspond à la conformation prise à l'état naturel.

1.1. La bêta-lactoglobuline (β lg) et les lipocalines

1.1.1. Définition

Les lipocalines constituent une grande famille de protéines caractérisée par une cavité centrale hydrophobe appelée barrique- β , qui leur donne la capacité de lier de petites molécules hydrophobes en les enfermant dans leur poche hydrophobe pour réduire au minimum le contact avec le solvant. Elles sont classées parmi les protéines de transport et sont impliqués dans plusieurs fonctions importantes, comme la modulation de la croissance et du métabolisme, l'olfaction, la biogenèse et la réparation des membranes, etc. C'est à cette famille de protéines qu'appartient la β lg (Oliveira, Valente-Mesquita, Botelho, Sawyer, Ferreira & Polikarpov, 2001).

1.1.2. Structure moléculaire

La structure primaire de la β lg est constituée de 162 acides aminés et a, pour le variant A, une masse moléculaire de 18 362 Da. Elle est riche en acides aminés sulfatés, d'où sa grande valeur nutritionnelle. La conformation globulaire de la β lg est une conséquence de la répartition uniforme des résidus non-polaires, polaires et ionisés qui permet aux résidus hydrophobes de s'enfouir au sein de la molécule. La structure secondaire de la molécule a été déterminée par plusieurs techniques incluant le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge et la cristallographie. Elle comporte 10-15% d'hélices α , 43-50% de feuillets β , et 15 à 20% de coudes β . Cette structure se présente sous forme de huit brins de feuillets- β antiparallèles (nommées A à H dans la **Figure I.1**) qui s'enroulent pour former un tonneau β antiparallèle en forme de cône aplati ou de calice, dont l'intérieur est hydrophobe.

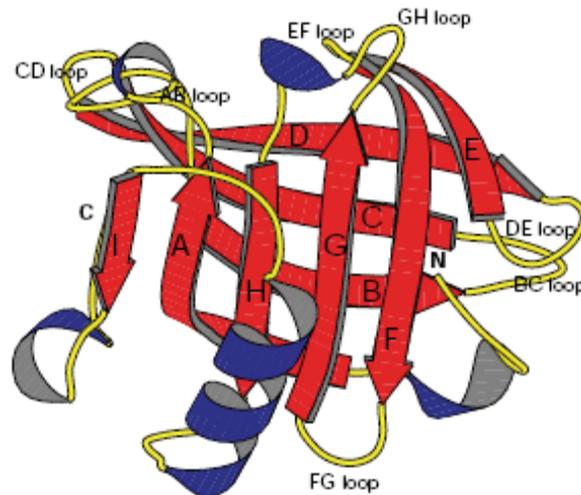


Figure 11 : Structure moléculaire d'un monomère de β -lactoglobuline, (Brownlow et al., 1997)

C'est dans cette cavité centrale que se trouve le site pour lier les ligands. Un neuvième brin, nommé I, qui ne prend pas part au calice et qui se trouve en position antiparallèle au premier feuillet A, est impliqué dans la formation des dimères. L'hélice α , qui se retrouve vers l'extrémité -COOH de la molécule (résidus 130 - 140), est stabilisée par des interactions hydrophobes et renforcée par des interactions entre les résidus Lysine et les résidus acides qui se trouvent dans l'entourage. La β lg contient deux ponts disulfures (S-S) entre les résidus Cys66-Cys160 et Cys106-Cys119 et un groupement thiol libre (-SH) très réactif en position 121, ce dernier est responsable de la saveur du lait chauffé. La structure secondaire est stabilisée par des liens hydrogène et les deux ponts disulfures stabilisent la structure tertiaire (Brownlow et al., 1997)

1.1.3. Variant génétiques de la bêta-lactoglobuline

Il existe à ce jour dans le lait de vache, une dizaine de variants génétiques de la β lg caractérisés qui se distinguent les uns des autres par la substitution de certains acides aminés. Les variants A et B sont les plus fréquemment rencontrés et diffèrent aux positions 64 (Asp/Gly), qui se trouvent dans une boucle flexible, et 118 (Val/Ala) au début du feuillet H. Un troisième variant dénommé β lg C dont la vitesse de migration est légèrement supérieure à la β lg B fut découvert par Bell en 1962 (Gaucheron, 2003). Il est connu que plusieurs régions peptidiques de la β lg sont riches en acides aminés chargés positivement (arginine, histidine et lysine) ou négativement (acide glutamique et asparagine) donnant origine à des zones chargées à la surface de la protéine. D'ailleurs, tous les groupements acides, Asp et Glu, se trouvent en surface, à l'exception de Glu89 qui est lié par un pont hydrogène au groupement Ser116, et le groupement Asp33 qui se trouve dans l'interface qui forme le dimère. De la même façon, les groupements basiques se trouvent tous en positions exposées. De ces groupements, seuls les Lys47 et Lys135 ne sont pas réactifs, dû à la formation de pontages ioniques ou de liens hydrogène (Brownlow et al., 1997)

1.2. Comportement de la bêta-lactoglobuline à l'état natif

Naturellement, la β lg existe sous la forme d'oligomère. Le nombre de sous-unités ou monomères qui s'auto-assemblent varie selon les caractéristiques du solvant ou du milieu physiologique de la β lg. C'est cet agrégat qui représente l'état natif de la protéine. Entre les sous-unités protéiques, il existe rarement des ponts disulfures dont on sait qu'ils sont essentiellement impliqués dans la stabilité de la structure tertiaire de la plupart des protéines globulaires. Dans le cas de la β lg, l'effet hydrophobe est l'un des facteurs importants dans l'assemblage des monomères. La constante d'association de l'équilibre monomère-dimère pour la β lg A et la β lg B a montré que le variant B s'associe plus que le variant A. Cela peut-être dû à la substitution chez le variant B de l'acide aminé aspartate qui porte une fonction carboxylate par la glycine. La compétition entre les forces électrostatiques répulsives et attractives de Van Der Waals amène à voir l'influence du pH et de la force ionique sur l'état natif de la β lg.

1.2.1. Influence du pH

Les protéines sont composées d'acides aminés et sont en conséquence des composés amphotères c'est-à-dire que suivant le pH, le nombre et la distribution des charges varient. Aux environs du pH7.5 (**Figure I.2**), la β lg subit un changement de conformation réversible qui conduit à l'exposition d'un groupement thiol, d'un carboxylate et d'une tyrosine : c'est la transition de Tanford (Tanford, Bunville & Nozaki, 1959; Tanford, 1960). Cette transformation a été suivie par la titration de la β lg. Pour des pH de 9 et au-delà, la structure tertiaire de la β lg change irréversiblement, tandis qu'à pH3, la β lg est essentiellement sous forme monomérique du fait des répulsions électrostatiques entre monomères (Townend, Winterbottom & Timasheff, 1960). Lorsque le pH augmente de 2 à 10, la charge nette diminue de +20 à -15 en passant par 0 à pH~5.0 (**Figure I.2**). En conséquence, la solubilité de la β lg va dépendre du pH du milieu. Mats Stading et al., (1990) ont montré l'influence du pH de l'eau distillée sur la solubilité de la β lg en mesurant à chaque pH la turbidité de la solution (Stading & Hermannsson, 1990), **Figure I.3**. L'évolution de la turbidité obtenue représente l'inverse de la solubilité. La solubilité est plus faible au pH où la turbidité est maximale, c'est-à-dire au point isoélectrique. La distribution de charges sur le monomère de la β lg n'est pas symétrique de part et d'autre du point isoélectrique (pI) ce qui confère des propriétés différentes à la β lg selon que le pH est inférieur ou supérieur au pI.

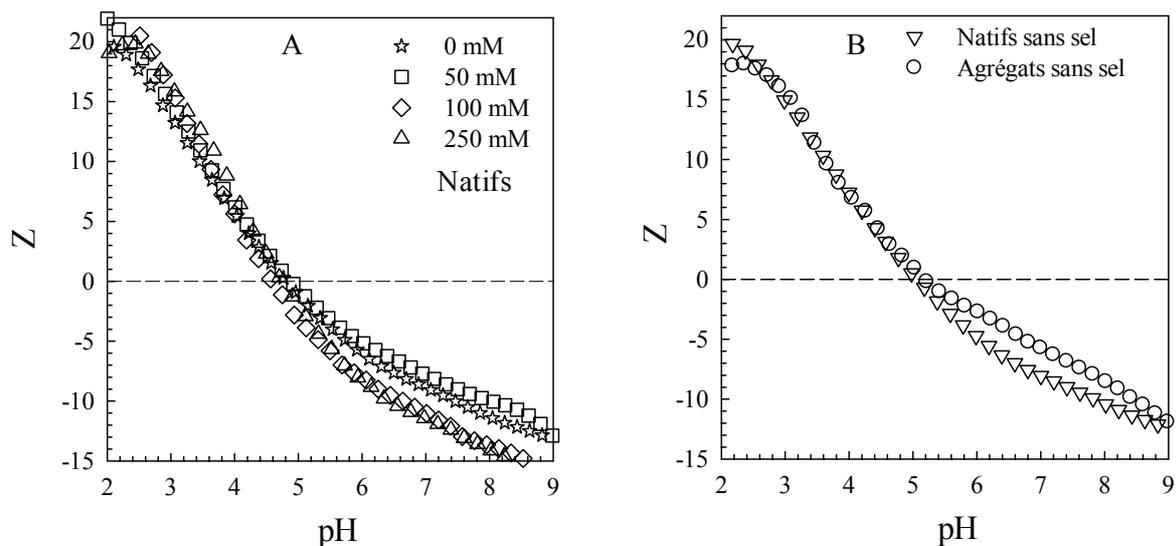


Figure 12 : Courbe de titration de la β -lactoglobuline du mélange des variants génétiques A et B à 20°C. Z est la charge nette par monomère. A) pour différentes forces ioniques de NaCl et B) comparaison entre les natifs et les agrégats sans sel.

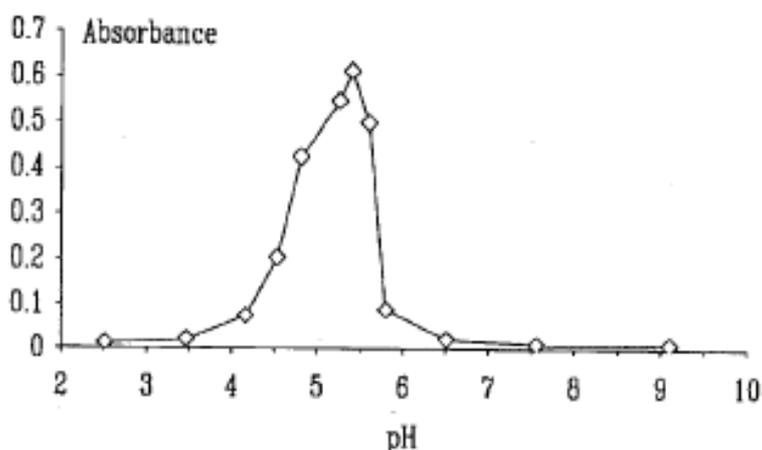


Figure 13 : Absorbance à 420nm de 1g/l de solution de β lg à 22°C (Stading et al., 1990)

1.2.2. Influence du sel

La β lg possède les caractères de solubilité propres aux protéines globulaires appartenant à la classe des globulines. La présence de charges à la surface des globules permet d'éviter la coagulation des globules de la β lg grâce aux forces répulsives électrostatiques dominantes dans le milieu par rapport aux forces attractives de van der Waals. Du fait de ces charges, les ions de charges opposées aux globules se rassemblent en une atmosphère ionique autour de

ceux-ci formant ensemble une double couche électrique (Renard & Lefebvre, 1992). Selon les travaux réalisés par B. Derjaguin et L. Landau et, indépendamment, par E. Verwey et J.T.G. Overbeek, on suppose qu'il y a équilibre entre, d'une part, les forces répulsives entre les charges des doubles couches électriques autour des « particules » voisines et, d'autre part, les forces attractives de van der Waals. A concentration de sel élevée, l'épaisseur de la couche diminue, en conséquence, la distance entre globules voisins diminue aussi. Ce rapprochement des globules favorise les forces attractives.

1.2.2.1. Salting-in

Contrairement à ce qui vient d'être décrit, il a été observé une augmentation de la solubilité de la β lg lorsque la concentration de sel augmente, par exemple, la solubilité de la β lg passe de 1.2g/l pour 10^{-3} M de NaCl à 12.5 g/l pour $20 \cdot 10^{-3}$ M de NaCl à pH5.2, c'est l'effet « salting-in ». Il a également été observé que la β lg B est quatre fois plus soluble dans l'eau que la β lg A (Gaucheron, 2003) malgré que cette dernière soit plus chargée.

1.2.2.2. Salting-out

Pour la β lg à pH inférieur au pI nous avons observé que la solubilité diminue lorsqu'on augmente la concentration de sel. C'est l'effet « salting-out ».

1.2.3. Influence de la concentration de β lg

Nous savons qu'à température ambiante, une solution de β lg devient turbide comme du « lait » dans la zone de pH comprise entre 4.5 et 5.6 (Mehalebi, 2008). Elle a observé que la quantité de protéines qui sédimente est d'autant plus importante que la concentration est grande. La fraction de produit perdu après centrifugation pendant 1h30 à 50000g peut atteindre 30% à 100g/l alors qu'elle est plus faible lorsque la concentration de protéine est faible. Plusieurs auteurs ont observé que la taille des oligomères formée augmente avec la concentration. A pH7, la β lg se trouve sous la forme d'un équilibre monomère-dimère dont la constante d'association dépend de la concentration en protéine (Baussay K., thèse 2005, p60). Mehalebi S. a observé une augmentation de plus de 40% de la masse molaire et de la taille des agrégats lorsque la concentration passe de 3g/l à 70g/l. Par ailleurs, Xiao lin Qui et al., ont interprété l'augmentation de la température de dénaturation en fonction de la concentration comme étant la conséquence de la dissociation de ces oligomères (Qi, Brownlow, Holt & Sellers, 1995). Ces observations s'expliquent par la contribution des contre ions de la β lg à la force ionique. En dehors de tout apport de sel au milieu aqueux, la force ionique vient essentiellement de la protéine.

1.3. Dénaturation de la bêta-lactoglobuline

Les structures tertiaires et quaternaires de la plupart des protéines sont très sensibles aux caractéristiques physiologiques de leur environnement. Tanford a montré que proche du pH7.5 la β lg présente une transition entre une conformation native (N) et une nouvelle conformation (R) durant laquelle des groupements fonctionnels (thiols, carboxylates et amines) sont exposés ou enfouis au sein de la structure tertiaire (Tanford et al., 1959; Tanford, 1960). Cette transition étant réversible, la protéine conserve ses propriétés fonctionnelles natives. La dénaturation d'une protéine, est définie comme la perte de sa conformation naturelle. Cette destruction peut être obtenue en changeant la température ou par l'emploi d'agent dénaturant.

1.3.1. Dénaturation thermique de la bêta-lactoglobuline

Le comportement de la β lg durant le chauffage a été très largement étudié (Park & Lund, 1984; Qi et al., 1995; Timasheff, Townend & Mescanti, 1966; Townend, Kumosinski & Timasheff, 1967) par analyse thermique différentielle ou calorimétrie différentielle. Lorsque la température augmente de 30°C à 55°C, le dimère se dissocie en monomères (Dupont, 1965). Cette dissociation, suppose-t-on, serait couplée à la transition révélée par Tanford. La dénaturation thermique telle qu'elle est observée, suivrait une « chaîne » de transitions en fonction du pH. Aux températures plus élevées, la protéine perd sa structure native irréversiblement en exposant le groupement thiol libre. Euston S.R. et al., ont observé, par simulation de la dynamique moléculaire d'un monomère de β lg, que les structures secondaires bêta de la protéine sont thermiquement plus résistantes que les structures alpha (Euston, Ur-Rehman & Costello, 2007). L'énergie de transition des hélices alpha est variable d'autant plus que l'état d'énergie diffère d'un monomère à l'autre dans les mêmes conditions physiologiques. On retient que la température de dénaturation de la β lg est très variable. La vitesse de chauffage et la concentration sont des facteurs qui introduisent de la variation dans la valeur précise de la température de dénaturation (Qi et al., 1995). La dénaturation des protéines à froid est moins étudiée que celle à chaud. Pourtant la majorité des protéines globulaires sont instables vers 0°C (Gaucheron, 2003). La dénaturation à froid de la β lg a été étudiée par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par dichroïsme circulaire (CD). Lors de la dénaturation, parce que la force des interactions hydrophobes diminue avec la baisse de la température, les interactions à l'intérieur du globule décroissent ce qui entraîne l'exposition de l'intérieur de la molécule au solvant. La dénaturation à froid affecte à la fois les structures tertiaire et secondaire (Griko & Kutysenko, 1994). Griko et al. ont mis en évidence une différence de mobilité de spin entre les groupements aliphatiques (G_{al}) et aromatiques (G_{ar}) de la β lg à des températures plus basses que la température de dénaturation à chaud. A l'état natif, la différence entre G_{ar} et G_{al} est maximale. Cette différence est minimale lorsque la température atteint 7°C alors qu'elle est nulle au dessus de 58°C. Cette différence de comportement entre la dénaturation à chaud et à froid, demeure inexplicée. Ces auteurs supposent néanmoins que c'est à la fois la réduction de l'entropie due à la rupture de la structure tertiaire et le changement global de toute la molécule qui sont la cause de ce

phénomène. Toutefois, ils reconnaissent que ceci n'est pas une explication raisonnable. Ils ont aussi observé que le processus de dénaturation à froid de la β lg est réversible en dessous de 35°C.

1.3.2. Influence du pH

La température de dénaturation de la β lg varie beaucoup avec le pH, par exemple la température de dénaturation à pH8.05 est de 65°C alors qu'elle est de 74°C à pH6.75 (Qi et al., 1995). La protéine est plus stable à la dénaturation à pH acide qu'à pH neutre ou basique. La **Figure I.4**, présente les résultats issus de l'étude sur la stabilité thermique de la bêta-lactoglobuline en fonction du pH.

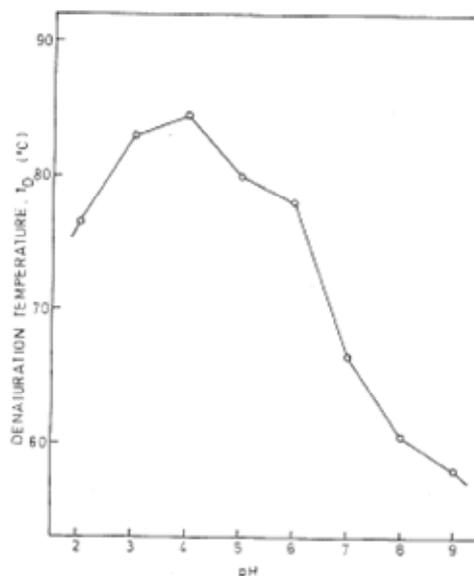


Figure I 4 : Evolution de la température de dénaturation de la β lg en fonction du pH par DSC, vitesse de chauffage 10°C/min (Per Olof HEGG, 1980)

1.3.3. Influence du sel

L'influence de la force ionique est moins spectaculaire que celle du pH. D'après les résultats obtenus par Relkin P., on retrouve l'influence significative du pH sur la température de dénaturation entre pH3.5 (courbe supérieure) et pH7 (courbe inférieure) de la **Figure I.5**, (Relkin, 1996). La nature du cation monovalent semble ne pas avoir d'effet sur la dénaturation de la protéine. Cependant, il est remarquable de noter l'effet inverse que le sel produit sur l'évolution de la température de dénaturation lorsque le pH est acide ou neutre.

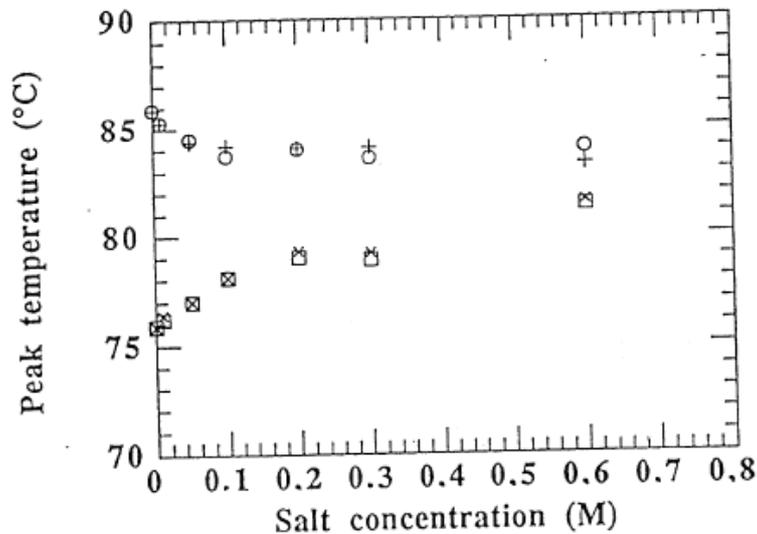


Figure 15: influence du sel sur l'évolution de la température de dénaturation pour : pH3.5 (○ : K⁺ ; + : Na⁺) et pH7 (□ : K⁺ ; × : Na⁺) (Relkin, 1996)

1.4. Agrégation et gélification de la βlg

Le processus d'agrégation et de gélification de la protéine globulaire dénaturée par la chaleur a été largement discuté. La structure des agrégats dilués et des systèmes in-situ a été étudiée par les techniques de diffusion de lumière. L'effet des interactions électrostatiques a été étudié en changeant la force ionique et le pH. La structure des gels de protéine globulaires change nettement sur une gamme étroite de ces paramètres. A faible force ionique et loin du point isoélectrique les gels sont transparents et homogènes sur des échelles spatiales plus grandes que quelques dizaines de nm. A force ionique élevée et près du point isoélectrique les gels sont troubles et hétérogènes sur des échelles de longueur jusqu'à plusieurs microns. Cependant, la structure globale des agrégats demeure autosimilaire et dépend peu des conditions externes, indiquant que la structure de gel est déterminée par interaction entre les agrégats pendant leur formation.

1.4.1. Structure des agrégats dilués

Quand une solution de βlg est chauffée, les protéines sont dénaturées et s'agrègent à un taux qui augmente exponentiellement avec l'augmentation de la température suivant la loi d'Arrhenius (Le Bon, Nicolai & Durand, 1999). A pH7, l'énergie d'activation est plus haute (environ 300kJ/mol) de sorte que le taux d'agrégation change rapidement (de très lent au-dessous de 60°C à très vite au-dessus de 80°C). Le taux change également avec la concentration en protéine, la concentration ionique et le pH, mais ces variations sont beaucoup plus faibles. Avec le temps de chauffage, la fraction non-agrégée de βlg diminue tandis que le nombre et la taille d'agrégats augmentent. Au-dessus d'une concentration critique

en protéine (C_g) un gel se forme c'est-à dire que l'échantillon ne coule pas quand il est incliné. C_g diminue avec l'augmentation de la concentration du sel et est également fonction du pH (Renard et al., 1992). Au pH loin du point isoélectrique ($pI=5.2$) et à basse concentration ionique C_g est près de 100g/L, alors que près du pI ou à la concentration ionique élevée, C_g peut descendre jusqu'à 10g/L. Pour $C < C_g$, le chauffage intensif des solutions de β lg conduit à des agrégats qui sont stables au refroidissement et à la dilution et peuvent donc être caractérisés en utilisant par exemple les techniques de diffusions de lumière. Cependant, près du pI ou à des concentrations ioniques très élevées la protéine précipite quand $C < C_g$.

Pour les $pH \geq 5.8$ les agrégats croissent et s'arrêtent seulement quand un gel est formé. En outre, des auteurs ont constaté que quand des solutions très diluées sont chauffées une fraction significative des protéines n'agrège pas du tout (Baussay, Le Bon, Nicolai, Durand & Busnel, 2004). Une restructuration interne des protéines dénaturées pourrait expliquer cette observation. Lorsque les monomères et dimères de β lg sont intensément chauffés, ils précipitent complètement quand le pH est près du pI.

La structure des agrégats peut être étudiée à l'aide des techniques de diffusion de lumière en mesurant l'intensité relative diffusée (I_r) par les agrégats en fonction du vecteur d'onde de diffusion (q). En solution diluée l'intensité diffusée I_r est liée à la masse molaire moyenne en poids (M_w) et au facteur de structure ($S(q)$) selon l'Eq II.35 du chapitre suivant (p. 61). L'évolution de I_r/KC en fonction de q permet d'accéder au rayon de giration (R_{gz}), des agrégats et à la masse molaire en poids (M_w). R_{gz} et M_w augmentent lorsque la concentration de protéine augmente. Lorsque la taille des objets est très grande, par exemple pour le système à 14g/l (**Figure I.6**), on n'a pas accès à M_w et à R_{gz} dans la fenêtre accessible par diffusion de la lumière.

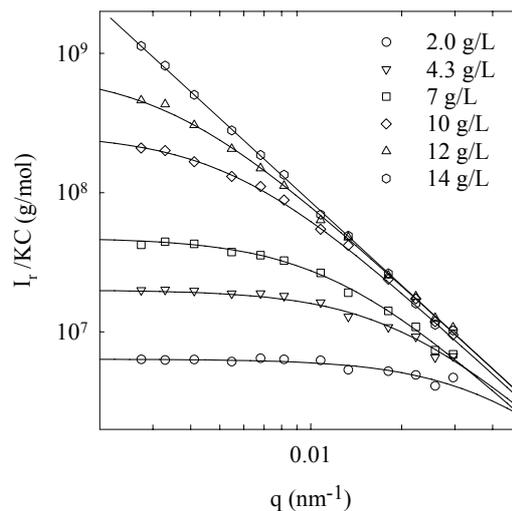


Figure I 6 : Evolution de I_r/KC en fonction du vecteur d'onde q pour des agrégats dilués formés à différentes concentrations en protéine (pH 7, 0.1M NaCl). Les lignes solides représentent des ajustements (Pouzot, Durand & Nicolai, 2004)

La **Figure I.7a** montre M_w en fonction de la concentration en protéine pour différentes concentrations de NaCl à pH7 (Baussay et al., 2004). A faible concentration, de petits agrégats plutôt bien définis sont observés pour les faibles forces ioniques. Ces pré-agrégats contiennent approximativement 100 monomères et ont une forme allongée avec une longueur d'environ 50nm et une largeur d'environ 5nm. Avec l'augmentation de la concentration, ces pré-agrégats se combinent pour former des agrégats de plus en plus grands jusqu'à C_g où la taille des agrégats diverge en gélifiant. L'augmentation se produit à des concentrations plus élevées quand la concentration ionique est faible (Baussay et al., 2004).

La **Figure I.7b** montre l'effet du changement de pH entre 6 et 8 en absence de NaCl supplémentaire. La croissance des agrégats se produit à des concentrations inférieures en protéine si le pH est abaissé. A une concentration donnée, de plus grands agrégats sont formés quand la répulsion électrostatique est réduite par un écrantage accru (force ionique) ou en abaissant la densité nette de charge (pH). Cela est observé pour les $pH \geq 9$ et $4 \leq pH \leq 5.5$, la β lg native n'est pas complètement stable et s'agrège partiellement à température ambiante. Pour $4 \leq pH \leq 5.5$, les agrégats sont constitués de protéines natives et peuvent être redispersés à nouveau complètement en élevant le pH à 7, alors que pour le $pH \geq 9$ l'agrégation est irréversible.

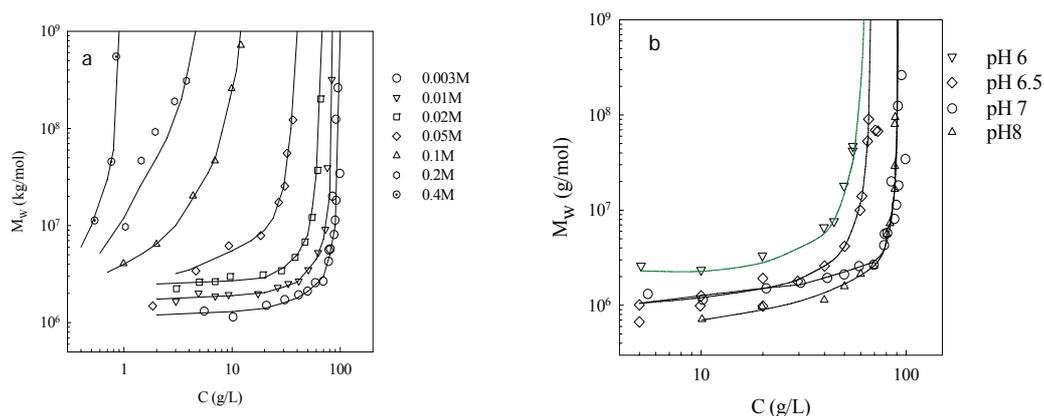


Figure I 7 : Evolution de M_w en fonction de la concentration des agrégats de β lg formés à différentes concentrations en NaCl à pH7 (a) et à différents pH en absence de sel supplémentaire (b). Les lignes solides sont des guides (Baussay et al., 2004)

R_{gz} augmente avec l'augmentation de M_w en suivant une loi de puissance : $M_w \propto R_{gz}^{d_f}$ en fonction de la force ionique à pH7 (Baussay et al., 2004), et du pH à faible force ionique. Ceci signifie que les agrégats ont une structure autosimilaire et l'exposant de la loi de puissance (d_f) est la dimension fractale. L'autosimilarité est aussi clairement vue quand le facteur de structure $S(q)$ est tracé en fonction de la variable réduite qR_{gz} . Ces représentations de $S(q)$, obtenue à partir des agrégats avec différents R_{gz} se superposent remarquablement. Les agrégats obtenus à différents pH et forces ioniques ont des facteurs de structure semblables, (**Figure I.8**). $S(q)$ peut être décrit avec une dimension fractale de 2 au-dessus de 30mM. A

faible force ionique, $S(q)$ dévie de cette forme au grand R_{gz} impliquant un d_f légèrement inférieur 2 ($d_f \approx 1.7$).

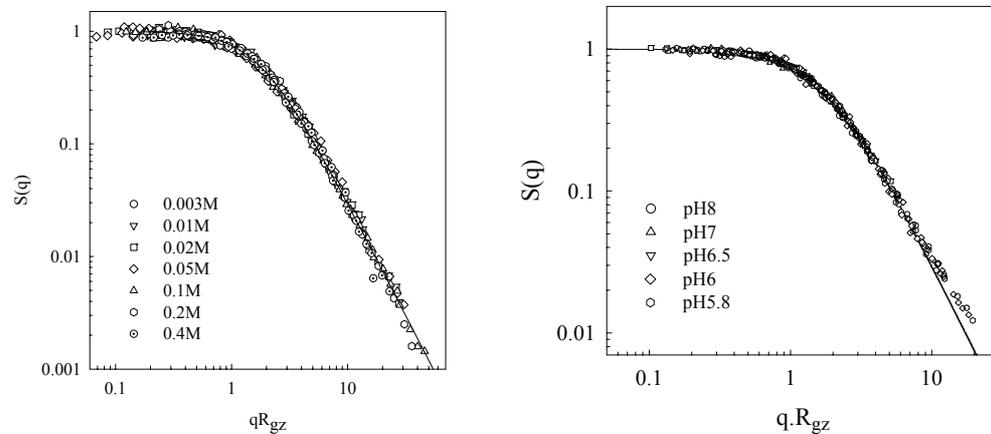


Figure 18 Facteurs de structure des agrégats de β lg formés à différentes forces ioniques de NaCl (à gauche) ou à différents pH en absence de sel supplémentaire (à droite). Les lignes solides représentent des ajustements théoriques de $S(q)$ (Baussay et al., 2004).

La structure autosimilaire est exprimée seulement au-dessus d'une certaine gamme de longueur. Les études de la structure des agrégats en utilisant le SAXS ou le SANS ont montré que localement la structure est comme un bâtonnet à faible force ionique avec une longueur de persistance qui diminue avec l'augmentation de la force ionique (Pouzot, Nicolai, Visschers & Weijers, 2005). Par Cryo-TEM (**Figure I.9**), ces auteurs ont montré que la densité de branchement des agrégats augmente avec la force ionique.

Des caractéristiques semblables à celles décrites ici pour la β lg ont également été observées, pour d'autres protéines globulaires telles que l'ovalbumine et le BSA (Hagiwara, Kumagai & Nakamura, 1998; Weijers, Visschers & Nicolai, 2004). Cependant, on a observé la formation de pré-agrégats bien définis que seulement pour la β lg au $pH > pI$. Les auteurs mentionnent qu'à pH2 la β lg et d'autres protéines globulaires forment des agrégats de forme fibrillaire avec des tailles allant jusqu'à plus d'un micron (Kavanagh, Clark & Ross-Murphy, 2000; Weijers, Sagis, Veerman, Sperber & van der Linden, 2002). Avec l'augmentation de la force ionique ou du pH des agrégats plus flexibles et plus branchés ont été observés.

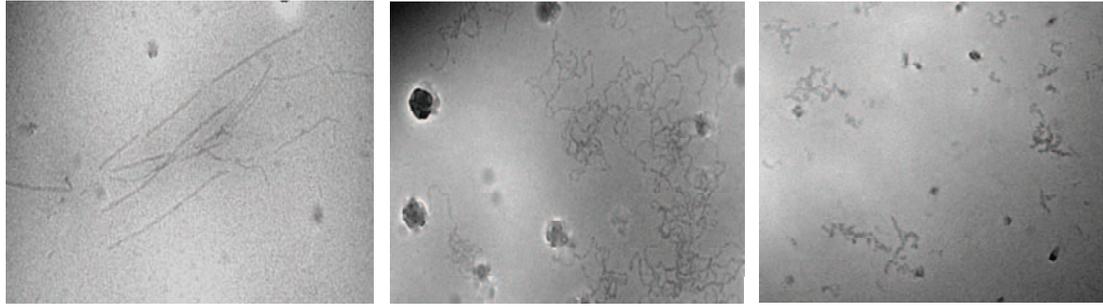


Figure I 9 Images Cryo-TEM des agrégats de β -lg formés dans différentes conditions: a) pH2 sans sel; b) pH2 0.1M NaCl; c) pH7 0.1M NaCl. La taille des images fait $1\mu\text{m}$.

I.4.2. Structure des gels

L'aspect visuel des gels des protéines globulaires dépend de la force des interactions électrostatiques entre les globules. Il change complètement, de transparent à opaque avec l'augmentation de la force ionique ou quand le pH s'approche du pI.

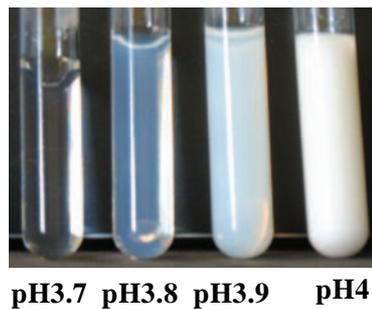


Figure I 10 : Photo illustrant l'augmentation de la turbidité des gels de β lg sur une gamme étroite du pH ($C=100\text{ g/l}$, aucun sel supplémentaire).

L'augmentation significative de la turbidité sur une gamme étroite du pH ou de la force ionique n'est pas corrélée à un changement de la structure globale et ne doit pas donc être attribuée à l'interaction entre les agrégats pendant qu'ils croissent et forment un gel (Weijers, 2005). L'intensité de la lumière diffusée par les systèmes transparents est faible et est indépendante du vecteur d'onde q , ce qui signifie que ces systèmes sont homogènes au delà de 15nm , c'est le cas de la solution à 2.1g/l de protéine de la **Figure I.11**. Dans le cas des gels, l'évolution de I_r/KC permet d'accéder au rayon apparent (R_a) ou à la longueur de corrélation $\xi = R_a/\sqrt{3}$ et à la masse molaire apparente (M_a).

A pH7 et 0.1M (NaCl) l'évolution de I_r/KC est presque indépendante de q lorsque la concentration en protéine est faible. Cela signifie que les tailles des agrégats qui se sont formés sont plus petites que l'échelle spatiale sondée. La **Figure I.11** montre l'évolution de I_r/KC pour différentes concentrations de β lg à pH7 et 0.1M (NaCl) après un chauffage long (Pouzot et al., 2004)

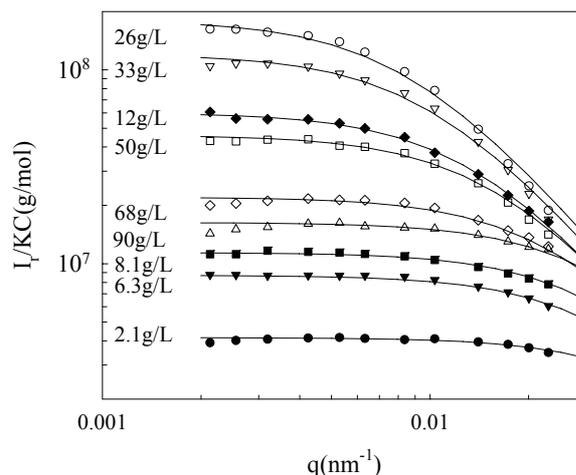


Figure 111 : Evolution de I_r/KC en fonction du vecteur d'onde q pour des solutions de β lg après chauffage : agrégat (symboles fermés) et gel (symboles ouverts) à pH7 et 0.1 (NaCl). Les lignes solides représentent des ajustements théoriques (Pouzot et al., 2004)

L'évolution de I_r/KC croît avec la concentration de protéine avant de décroître à partir de 26g/l. L'évolution de I_r/KC avec la concentration traduit l'évolution de M_a . Nous pouvons constater que la dépendance en q montre une courbure qui se déplace vers les plus faibles q lorsque la concentration augmente jusqu'à 26g/l. Ceci correspond à une augmentation de R_a . Localement, les systèmes ont la même structure caractérisée par la dimension fractale d_f égale à 2. Au-delà de 26g/l les interactions entre agrégats dominant et l'intensité diminue.

A pH7 sans sel, la diffusion des rayons X et des neutrons montrent des pics d'interactions dans l'allure du facteur de structure signifiant la présence d'un certain ordre local dans les systèmes. Cet ordre local est provoqué par les répulsions électrostatiques et diminue avec la densité décroissante de charge des protéines.

Lorsque le pH s'approche du pI ou quand la concentration de sel augmente, l'ordre local diminue. Il résulte une augmentation de la diffusion du rayonnement aux plus petites valeurs de q ainsi que la disparition du pic d'interaction.

Une méthode beaucoup plus commode consiste à déterminer la dépendance de la turbidité (τ) avec la longueur d'onde (λ) (Pouzot et al., 2004). La turbidité étant liée à M_a et $S(q)$, on peut déterminer la dimension fractale des gels. Cette méthode peut également être appliquée à des systèmes plus troubles jusqu'à une certaine limite. L'effet de l'interaction des charges sur la structure des gels est mieux apprécié en regardant la dépendance de M_a par rapport au pH ou par rapport à la force ionique pour une concentration de protéine donnée.

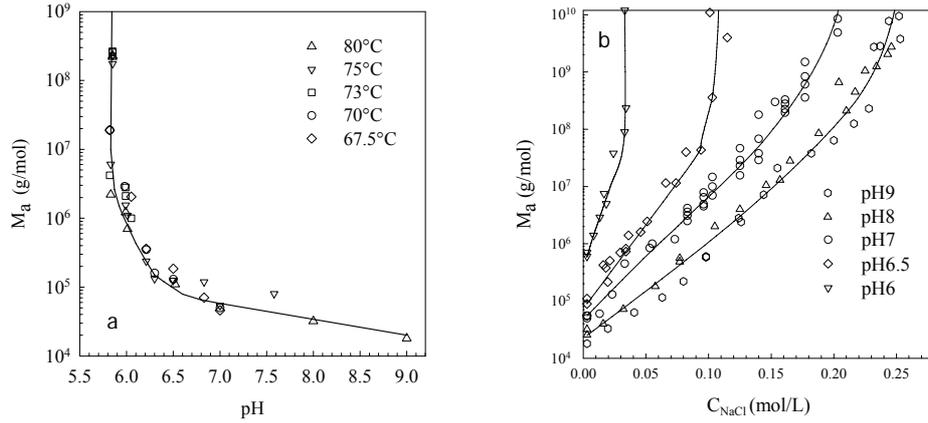


Figure I 12 : Evolution de M_a des gels de β lg à $C=100\text{g/L}$ en fonction du pH sans sel supplémentaire pour différentes températures (a) ou en fonction de la concentration de NaCl à différents pH (b). Les lignes solides sont des guides (Mehalebi, Nicolai & Durand, 2008a)

La **Figure I.12a** montre que l'augmentation de M_a diminue avec le pH en l'absence de sel supplémentaire pour $C=100\text{g/L}$ et la **Figure I.12b** montre l'augmentation de M_a avec l'augmentation de la concentration en sel à différent pH. A $C=100\text{g/L}$ toutes les solutions de β lg donnent des gels à tous les pH et forces ioniques. M_a augmente faiblement lorsque le pH diminue à partir de $\text{pH}>6.0$. Pour un pH donné, M_a augmente presque exponentiellement avec l'augmentation de la concentration en sel, jusqu'au-dessus d'une valeur critique où elle semble diverger. L'augmentation exponentielle de la turbidité est plus raide quand le pH diminue au-dessous de $\text{pH}5.8$ les systèmes deviennent alors trop troubles même en l'absence de sel supplémentaire. La forte variation de M_a correspond à une forte variation de la transmission. A la longueur d'onde de 500nm , où l'oeil humain est le plus sensible, la transmission diminue de plus de 90% par cm pour $M_a \approx 10^5 \text{ g/mol}$ à moins de 0.5% pour $M_a \approx 10^7 \text{ g/mol}$. L'augmentation de M_a est accompagnée d'une augmentation correspondant de R_a qui varie de moins de 20nm pour les gels transparents à un micron pour des systèmes très turbides, (**Figure I.13**).

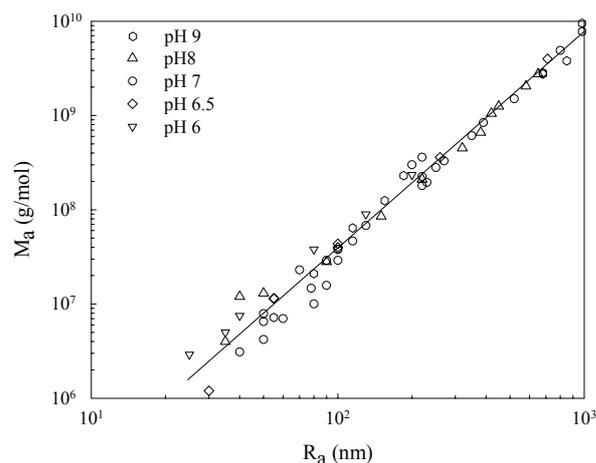


Figure I 13 : Evolution de M_a en fonction de R_a pour des gels à $C=100\text{g/L}$. La ligne solide a la pente 2.3 (Mehalebi et al., 2008a)

Les données représentées sur la **Figure I.13** montre que M_a évolue en fonction de R_a avec une pente légèrement différente de 2 à cause de la variation de la densité locale en fonction du pH et de la force ionique.

Un effet semblable de l'interaction électrostatique sur la structure des gels a été observé pour d'autres protéines globulaires, mais ces systèmes ont été étudiés avec beaucoup moins de détail. La forte augmentation de l'hétérogénéité sur une gamme relativement petite des forces ioniques a été rapportée pour l'ovalbumine et les gels de BSA (Donato, Garnier, Doublier & Nicolai, 2005). Dans le dernier cas il a été montré que les gels sont fortement hétérogènes pour une force ionique bien inférieure si des ions de calcium au lieu de sodium sont ajoutés. Comme mentionné ci-dessus, la structure des gels ne peut plus être caractérisée par diffusion de la lumière si le pH est moins de 5.8 en l'absence de sel supplémentaire et pour n'importe quel pH si la concentration en NaCl est plus grande que 0.25M. En effet, ces systèmes montrent une structure hétérogène sur des échelles de longueur plus grandes qu'un micron et ne peuvent donc être caractérisés qu'en utilisant la microscopie confocale. Les gels fortement hétérogènes semblent se composer d'un réseau aléatoire des particules sphériques riches en protéine, **Figure I.14**.

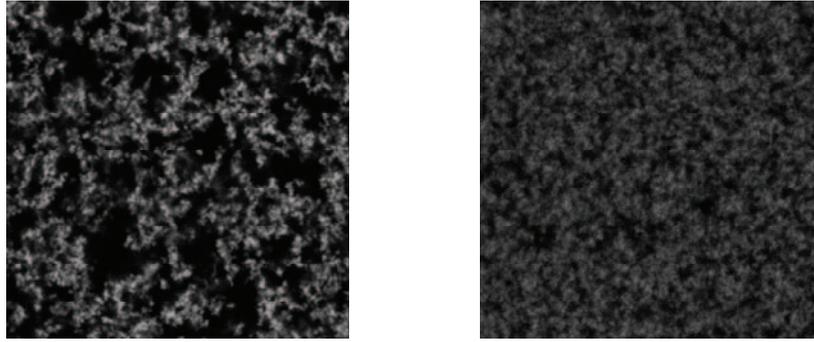


Figure 14 : Images Confocales des gels de β lg ($C=100\text{g/L}$) formés à pH 5.5 en l'absence de sel supplémentaire (gauche) et à pH 7 en présence de 0.3M (NaCl). Les images représentent $40 \times 40 \mu\text{m}$.

Le diamètre des particules sphériques est quelques microns et change légèrement selon les conditions. La forme sphérique implique que les particules ont été constituées par micro séparation de phase dans des domaines riches en agrégats de protéine. On n'observe pas la séparation macroscopique de phase, probablement en raison de la gélification du système. Les gels hétérogènes constitués par des domaines sphériques de protéine s'appellent généralement des gels particuliers, alors que les gels constitués par les filaments branchés de protéine s'appellent des gels filamenteux.

1.5. Gélification à froid

La méthode de gélification à froid de la β lg est différente de la gélification à chaud parce que dans le premier cas, le gel peut être formé à température ambiante alors que dans le deuxième cas c'est pendant le chauffage que le gel se forme. Si on veut des systèmes qui gélifient à froid, on choisit la concentration de protéine de la solution aqueuse telle qu'elle soit légèrement inférieure à la concentration de gélification à chaud. Ainsi la solution peut être chauffée à 80°C pendant longtemps sans gélifier. On sort alors l'échantillon du bain-marie et on le laisse refroidir jusqu'à 20°C . Après que l'échantillon soit entièrement refroidi, on ajoute du sel en solution sous agitation pendant quelques minutes. Le gel se forme plus ou moins vite en fonction de la force ionique. Nous pouvons distinguer la gélification à froid comme un processus à deux étapes. La première étape consiste à d'abord chauffer la solution de protéine native pour former des agrégats. La deuxième étape consiste, à température ambiante (20°C), à augmenter la force ionique ou à ajuster le pH pour induire la gélification des agrégats. On peut après réchauffer le système à différentes température pour étudier l'influence de la température sur la structure et la cinétique de gélification (Alting, 2003; Marangoni, Barbut, McGauley, Marcone & Narine, 2000; McClements & Keogh, 1995).

1.6. Résumé

A température ambiante, la β lg est présente sous forme de n-mères, n dépend des conditions environnementales comme, le pH, la force ionique, la concentration en protéine. La β lg est sensible à la chaleur comme la plupart des protéines lipocalines. En solution aqueuse, sous l'action de la chaleur, la β lg suit un processus de dénaturation complexe suivi d'un mécanisme d'agrégation et de gélification si la concentration le permet. La cinétique d'agrégation et de gélification a montré une forte dépendance des conditions environnementales. Ces conditions physiologiques notamment celles définies par le pH, la force ionique et la nature du sel gouvernent le mécanisme d'agrégation et de gélification. Ceci indique que les interactions dans le milieu sont essentiellement de nature électrostatique et hydrophobe. A pH acide et à faible force ionique, les gels de β lg adoptent une structure fibrillaire tandis qu'à force ionique élevée, ils adoptent une structure particulaire. Les techniques de diffusion de la lumière ont permis de caractériser la structure au cours et à la fin du processus de gélification, elles ont permis de confirmer que la structure des agrégats formés est autosimilaire caractérisée par une dimension fractale d_f variant entre 1.1 à 2 selon le pH essentiellement. Les auteurs (Mehalebi et al., 2008a) ont trouvé que la structure finale des gels est localement fractale avec une dimension fractale comprise entre 1.7 et 2. A forte force ionique ou aux pH proches du pI, les fluctuations de concentrations sont si importantes que les techniques classiques de caractérisation de la structure des gels ne permettent plus de les étudier. Le microscope confocal est alors la technique expérimentale adéquate pour l'observation directe et la caractérisation des structures des gels.

Matériels et Méthodes

II. Matériels et Méthodes

II.1. Méthode de caractérisation par Microscopie

II.1.1. Microscopie Confocale à balayage laser (MCBL)

La microscopie confocale à balayage laser (MCBL) a connu sa phase exploratoire en 1953 grâce aux travaux réalisés par Mervin Minsky (1957), ce n'est que dans les années 1960 que la microscopie confocale à balayage laser a été réellement mise en œuvre dans la pratique. Aujourd'hui, elle est utilisée de préférence dans la recherche biologique, l'analyse chimique et le contrôle des matériaux. Elle réunit les résultats de nombreuses années de recherche et développement dans de nombreux domaines comme : la microscopie, la technologie laser et optique pour la lumière cohérente, la technologie vidéo, l'électronique et l'informatique.

La MCBL permet d'identifier des structures, en focalisant la lumière émise ou réfléchiée par un échantillon à partir d'un seul plan focal (trajet lumineux en noir) et l'ensemble de la lumière qui ne provient pas de ce niveau est atténué (trajet lumineux en rouge), **Figure II.1** gauche. Lors d'un balayage de points focaux, les lentilles du microscope focalisent la lumière laser d'excitation (trajet en noir) à travers un diaphragme (pinhole d'entrée) sur un seul point de l'échantillon appelé, point focal objet. Le laser lit alors l'échantillon point par point et produit ainsi l'image scannée. Chaque point est traduit dans l'image par un pixel. La lumière de fluorescence émise et la lumière réfléchiée de l'échantillon, sont reconduites par le même objectif. Le système optique du module de balayage (Miroir dichroïque) focalise la lumière émise par le point focal objet sur un deuxième point, le point focal image. Certaines techniques, comme celle utilisée dans le cadre de notre étude, sont équipées d'un filtre automatique (AOTF). Grâce au diaphragme de détection (pinhole de sortie) positionné au foyer image de l'objectif juste devant le détecteur photomultiplicateur tube (PMT), seule la lumière issue du point focal objet peut arriver dans le détecteur. La lumière périphérique (trajet lumineux en rouge) ne passe pas par le diaphragme et n'est donc pas représentée, dans le cliché du microscope confocale (Conchello & Lichtman, 2005). Le grand avantage de ce système est qu'il permet de faire des coupes à différents niveaux dans l'échantillon et de réaliser une reconstruction 3D (**Figure II.1** droite).

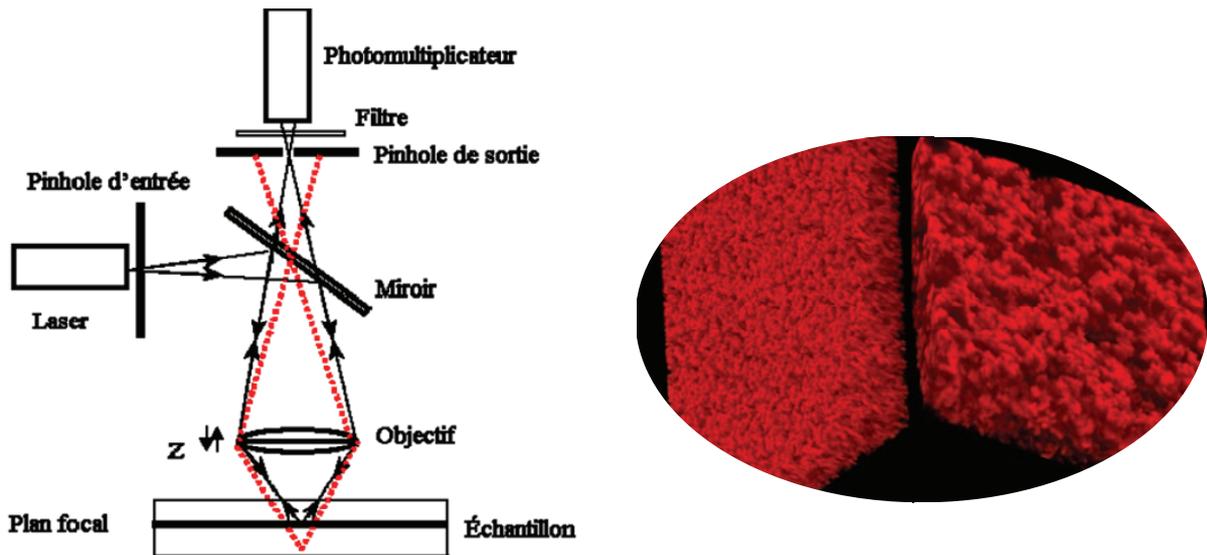


Figure II 1 : Schéma illustrant le mode de fonctionnement de la MCBL (à gauche) et une image 3D d'un gel de β lg à droite

II.1.1.1. Principe de fluorescence

La fluorescence est une forme de luminescence se produisant suite à l'absorption de photons par une molécule (fluorochrome ou sonde fluorescente). C'est un phénomène physique classé dans l'ensemble des phénomènes de luminescence comprenant la photoluminescence (fluorescence, phosphorescence) et les autres types de luminescence (chimiluminescence, bioluminescence...).

La photoluminescence se traduit par l'émission de photons par une molécule qui a été irradiée par un faisceau lumineux généralement dans une gamme de longueur d'onde s'échelonnant du visible à l'ultraviolet. La photoluminescence englobe deux processus: la fluorescence et la phosphorescence, qui dépendent de la nature des états fondamentaux et excités de la molécule considérée.

La fluorescence a lieu suite à une absorption de lumière, elle est caractérisée par l'émission de photons qui se produit lors des transitions électroniques d'une molécule à partir d'un état excité vers l'état fondamental (relaxation), **Figure II.2**. L'excitation lumineuse peut être induite par un seul photon (absorption mono-photonique, **Figure II.2a**) ou par l'interaction simultanée de deux ou trois photons dont la somme des énergies est égale à celle d'un photon exciteur (absorption bi-photonique, tri-photonique, **Figure II.2b**). Au cours du processus de fluorescence, la présence d'un état excité triplet (**Figure II.2c**) peut retarder la fluorescence (Atkins & De Paula, 2004).

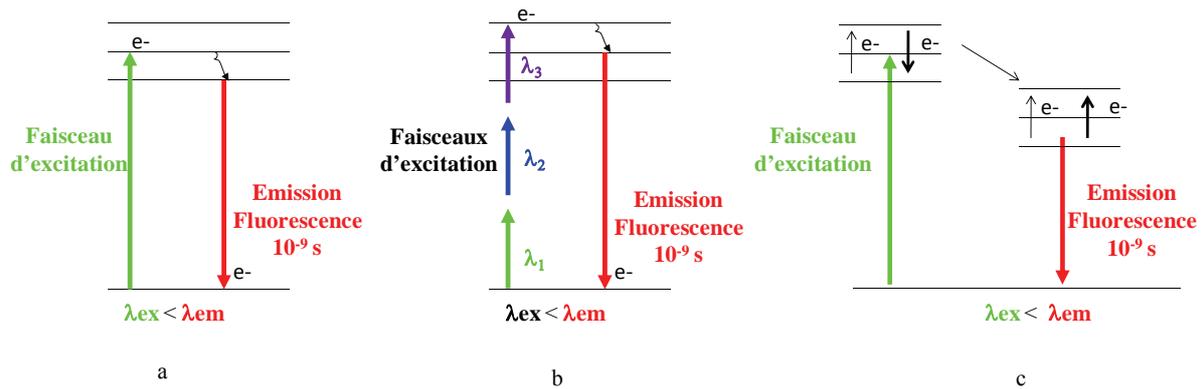


Figure II 2 : Illustration de la photoluminescence d'une sonde fluorescente

II.1.1.2. Paramètres de fluorescence

II.1.1.2.1. Coefficient d'extinction molaire

Le coefficient d'extinction ϵ , ou absorbance spécifique, reflète la probabilité d'absorption. Sa valeur peut constituer un critère pour le choix des colorants ; plus ϵ est grand, plus élevée sera la fluorescence à intensité lumineuse incidente égale. L'intensité lumineuse transmise après absorption de la lumière incidente est donnée par la loi de Beer-Lambert et s'écrit comme suit :

$$I_t = I_0 \times e^{-\epsilon c l} \quad \text{II. 1}$$

Pour que la fluorescence soit forte, il ne suffit pas seulement qu'une quantité importante de photons soit absorbée, il faut aussi un rendement quantique élevé.

II.1.1.2.2. Rendement quantique des sondes fluorescentes

Pour qu'une molécule puisse émettre une radiation de fluorescence, elle doit être capable d'absorber un photon. Le rendement quantique de fluorescence est défini comme le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés:

$$\Phi_f = \frac{N_e \text{ (nombre de photons émis)}}{N_a \text{ (nombre de photons absorbés)}} \quad \text{II. 2}$$

L'efficacité de l'émission de lumière fluorescente pour une molécule donnée est déterminée par le rendement quantique Φ_f . Puisqu'une partie des molécules excitées peuvent perdre leur énergie excédentaire soit par transition entre état singulet ($\uparrow\downarrow$) et triplet ($\uparrow\uparrow$) ou soit par dissociation de liaison, Φ_f est nécessairement inférieur à 1. Les sondes ont des rendements quantiques compris entre 0,1 et 1.

II.1.1.2.3. Relation entre ε et Φ_f

Une sonde qui possède un coefficient d'extinction molaire élevé de même qu'un rendement quantique élevé va avoir une intensité de fluorescence ou « brillance » très forte. C'est le cas des particules colloïdales appelées QD pour quantum-dot. La relation entre ε et Φ_f , est déterminée par les équations suivantes :

$$I_f = (I_0 - I_t) \times \Phi_f \quad \text{avec } I_0 - I_t = I_a \quad \text{II. 3}$$

- I_0 est l'intensité de la source laser
- I_f est l'intensité de fluorescence
- I_a est l'intensité absorbée
- I_t est l'intensité transmise

En considérant l'équation II.1 et le premier terme du développement limité de l'exponentiel, I_f s'écrit comme suit.

$$I_f = 2.3\varepsilon\Phi_f cl \times I_0 \quad \text{II. 4}$$

Cette relation n'est donc valable que si la concentration de la sonde ou le chemin optique du faisceau d'excitation est très faible. Aussi, il est nécessaire de déterminer la gamme de concentration dans laquelle, l'intensité de fluorescence est linéaire avec celle de la source. La microscopie confocale permet de mesurer l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration.

II.1.1.3. Durée de vie ou photo stabilité

La troisième caractéristique importante d'une molécule fluorescente est le temps de déclin, ou durée de vie de fluorescence, (τ_f). Elle correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité. La plupart des sondes ont des durées de vie de l'ordre de la nanoseconde voir du picoseconde. Plus ce temps est court, meilleur est la sensibilité de la sonde. En effet, plusieurs excitations successives sont possibles parce que la sonde repasse rapidement dans son état fondamental. La photo stabilité correspond au nombre d'excitations que peut subir une molécule fluorescente avant d'être dégradée. La photo-destruction de la sonde entraîne une perte de la fluorescence. C'est ainsi que la fluorescéine peut subir entre 10^4 et 10^5 excitations avant d'être détruite. Pendant la présence du laser au point focal objet, une molécule va être excitée quelques centaines de fois. Certaines sondes, malgré un bon rendement quantique, se détruisent très vite, ce qui limite leur application en détection directe. Cependant, il existe d'autres modes d'utilisation de ces sondes, comme le FRAP (Fluorescence Recovered After Photobleaching). On se sert de ce mode d'observation pour étudier la structure de différents systèmes. La récupération de la fluorescence après photo blanchiment de la zone excitée, se fait par diffusion de la sonde du reste de l'échantillon vers la zone atteinte. Le coefficient et la nature de la diffusion informent sur la structure.

II.1.1.4. Présentation de la technique de Microscopie

Le microscope que nous avons utilisé, est un microscope inversé Leica TCS-SP2, Leica Microsystems Heidelberg, Allemagne. Il est équipé de 6 lasers : 458nm, 476nm, 488nm, 514nm, 543nm et 633nm.

II.1.1.4.1. Objectifs du microscope

Pour tous les systèmes de microscopie optique, l'objectif est le composant critique de l'observation de la structure des systèmes. Le contraste, la résolution et la dimension de l'image. En microscopie confocale, il détermine aussi la profondeur accessible dans le système. La qualité de l'image dépend du type d'objectifs et de ses caractéristiques.

II.1.1.4.2. Types d'objectif

Il existe plusieurs types d'objectif. Ils diffèrent selon leur milieu d'immersion, leur grossissement ou leur ouverture numérique (ON). L'ouverture numérique détermine le pouvoir séparateur d'un objectif, c'est-à-dire la résolution de l'image. Elle peut varier de 0.6 à 1.4. Elle est calculée à partir de l'angle (θ) d'ouverture du cône lumineux collecté par l'objectif et l'indice de réfraction (n) du milieu, d'immersion entre la lentille de l'objectif et le système qu'on observe :

$$ON = n \sin(\theta) \quad \text{II. 5}$$

Les objectifs à fort grossissement ont généralement une grande ouverture numérique. On les trouve essentiellement chez les objectifs à immersion huile. Néanmoins, il existe des objectifs à fort grossissement qui ont une faible ouverture numérique. Lorsque le cône de lumière qu'un objectif peut collecter est grand, la distance de balayage des points focaux (X, Y) est de facto réduite. L'ouverture numérique étant inversement proportionnelle à la distance focale de la lentille, la distance de parcours axial f dans l'échantillon est faible pour les objectifs à plus grande ouverture numérique (**Figure II.3**).

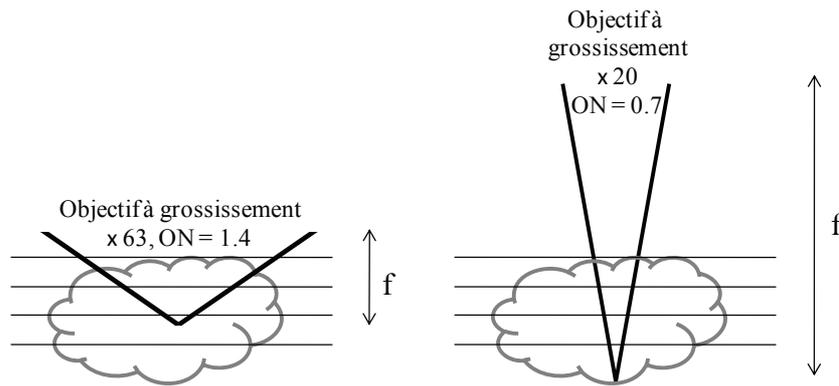


Figure II 3 : Schéma montrant la distance de parcours axial des objectifs dans un échantillon en fonction de l'ouverture numérique

Le parcours axial est très sensible à la différence des indices entre le milieu d'immersion de la lentille et l'échantillon. Cette sensibilité entraîne de nombreuses aberrations chromatiques que les fournisseurs d'objectifs tente de corriger. Ces aberrations sont responsables de la mauvaise résolution des images tant en (X, Y) qu'en Z où l'influence est plus problématique. Grâce aux avancées en technologie laser, les sources dont on dispose sont monochromatiques, les aberrations sont donc faibles. La plus problématique est celle concernant la différence des indices de réfraction entre le milieu d'immersion (n_i) et l'échantillon (n_r). Nous savons qu'à l'interface de deux milieux d'indices de réfraction différents, la lumière est réfractée d'après l'équation :

$$n_i \sin(i) = n_r \sin(r)$$

II. 6

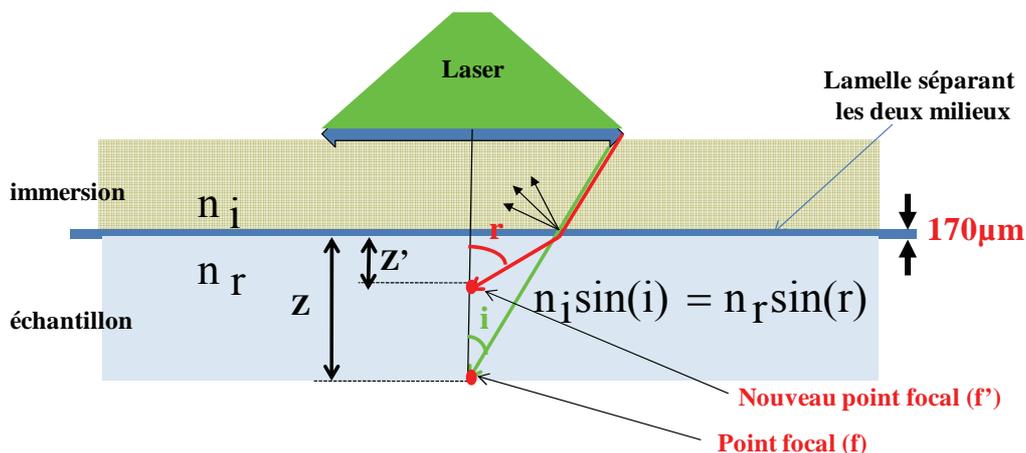


Figure II 4 : Schéma montrant la défocalisation d'un rayon lumineux pour deux milieux d'indices différents. Le rayon non réfracté représente le cas où les deux milieux auraient le même indice de réfraction. Il y a aussi de la réflexion à la surface de la lamelle (côté immersion)

La distance focale réelle ($f \rightarrow z$) se change en une nouvelle distance ($f' \rightarrow z'$) pour un rayon lumineux à travers l'échantillon. Le rapport z' sur z peut être connu par la relation suivante :

$$\frac{\tan(i)}{\tan(r)} = \frac{z'}{z} = k(\text{ON}) \quad \text{II. 7}$$

L'équation II.5 et II.6 permettent d'écrire :

$$r = \sin^{-1}\left(\frac{\text{ON}}{n_r}\right) \text{ et } i = \sin^{-1}\left(\frac{\text{ON}}{n_i}\right) \quad \text{II. 8}$$

si l'on connaît l'indice de réfraction du milieu d'immersion (n_i) et celui de l'échantillon (n_r), le rapport, $k(\text{ON}) = z'/z$, serait uniquement fonction de l'ouverture numérique. On peut aussi remarquer que, lorsque $\text{ON} \rightarrow 0$, on a :

$$k(\text{ON}) = \frac{\tan(i)}{\tan(r)} \approx \frac{i}{r} = 1 \quad \text{II. 9}$$

En pratique, il est extrêmement difficile de corriger cette aberration (Gibson & Lanni, 1991; Luo, Sun, Peng & Yang, 2006) à cause du fait que tous les rayons du faisceau laser n'ont pas tous le même angle incident lorsqu'il traverse la lamelle. Les multi-réfractions du faisceau qui existent dans l'échantillon compliquent et dramatisent la résolution axiale de l'appareil.

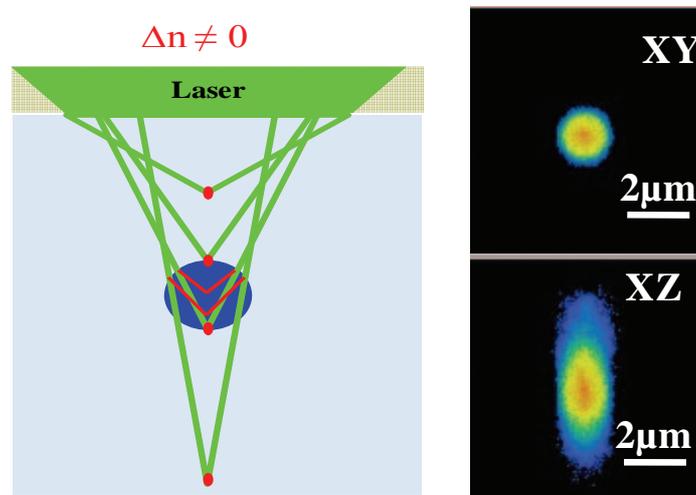


Figure II 5 : Schéma montrant la multi-réfraction (à gauche) et la taille d'une sphère en (X,Y) et en (X,Z)

Les objectifs à fort grossissement sont plus sensibles à cet effet que les objectifs à faible grossissement, cependant ils donnent une meilleure résolution et contraste de l'image en (X, Y). Nous avons essayé différents objectifs :

- HCx PL APO CS 63x ON=1,4 Huile
- HCx PL APO 40x ON=1,25 Huile
- HCx PL APO 63x ON=1,2 Eau
- HCx PL APO 20x ON=0,7 Eau.

Nous avons retenu les objectifs à immersion eau car ils donnent la plus faible aberration.

II.1.1.4.3. Résolution de la technique

Le dispositif le plus important en dehors de l'objectif utilisé est le pinhole situé devant le détecteur (Conchello et al., 2005). Le diamètre de l'ouverture de ce diaphragme, encore appelé disque d'Airy, est automatiquement réglé par le dispositif en fonction de l'objectif choisi. Ce diamètre correspond à l'Airy 1 de l'appareil utilisé dans le cadre de cette thèse.



Figure II 6 : Disque d'Airy

La résolution latérale du microscope correspond au diamètre de ce disque et est proportionnelle à la longueur d'onde d'émission (λ_{em}) de l'échantillon et inversement proportionnelle à l'ouverture numérique de l'objectif (ON), c'est-à-dire :

$$\delta_{xy} = 0.61 \times \frac{\lambda_{em}}{ON} \quad \text{II. 10}$$

Elle est définie comme la capacité de pouvoir discriminer deux points séparés d'une distance donnée. En dessous de cette distance les deux points paraissent fusionnés comme le montre la Figure II.7 ci-dessous. Les courbes associées correspondent à leurs profils d'intensité.

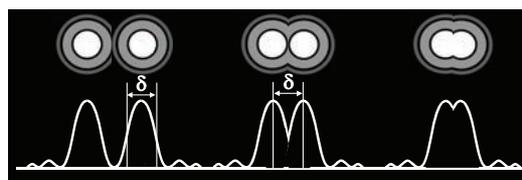


Figure II 7 : détermination expérimentale de la résolution

Si l'ouverture du diaphragme n'est pas adaptée à celle de la tache de diffraction alors dans un cas on aura une tache trop grande (entrée de la lumière périphérique du point focal,) donc image moins résolue, dans un autre cas une tache trop petite donc pas assez de lumière (image moins définie). Cette ouverture détermine également l'épaisseur des sections optiques. En pratique une grande ouverture entraîne un étalement axial du point lumineux plus important d'où une résolution axiale (XZ ou YZ) pire que la résolution latérale (XY). Pour les deux objectifs à immersion eau utilisés les résolutions latérales et axiales sont :

0.31 μm (XY) s'obtient pour le zoom 1 et 0.62 μm (XZ) pour le grossissement 63

0.50 μm (XY) s'obtient pour le zoom 2 et 1 μm (XZ) pour le grossissement 20

II.1.1.5. Détecteur : PhotoMultipliateur Tube (PMT)

II.1.1.5.1. Présentation du PMT

Le photomultiplicateur (PM) est un dispositif permettant la détection de photons. Il se présente sous la forme d'un tube électronique contenant une photocathode, plusieurs dynodes et une anode. Sous l'action de la lumière, des électrons sont arrachés d'un métal par effet photoélectrique à une photocathode. Ils sont accélérés par le champ électrique lorsqu'on applique une tension appelée gain (G) entre la cathode et l'anode. Ils arrivent sur la première dynode avec une énergie beaucoup plus importante. Lorsqu'ils frappent celle-ci, d'autres électrons de moindre énergie, mais plus nombreux, sont émis. Ceux-ci sont à leur tour accélérés en direction de la deuxième dynode, et le processus continue. La structure de la chaîne de dynodes est telle que le nombre d'électrons émis augmente toujours à chaque étape de la cascade. Finalement, l'anode est atteinte, et l'accumulation de charges crée une brève impulsion de courant, qui marque l'arrivée d'un photon sur la cathode (**Figure II.8.**). Ce détecteur permet de compter les photons individuellement.

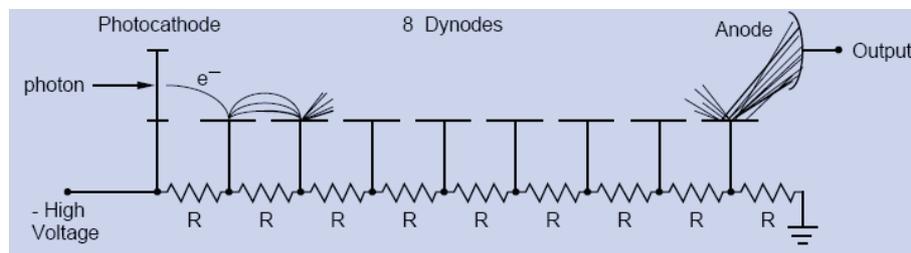


Figure II 8 : schéma d'un photomultiplicateur

II.1.1.5.2. Intensité du signal et temps de détection

L'intensité du signal (A) d'un point focal à la sortie du PMT, dépend du diamètre du disque d'Airy et du gain mis pour acheminer les électrons de la photocathode jusqu'à l'anode. Elle est également reliée à la durée d'exposition de la fenêtre de la photocathode. Le temps de détection (t_d) est prédéfini par la fréquence de balayage qui est de 4000 lignes par seconde. Pour un pixel, il s'exprime comme suit :

$$t_d = \frac{1}{4000 \times N_p}$$

II. 11

N_p est le nombre de pixels par ligne. L'intensité du signal augmente lorsque ce nombre diminue. Le nombre de pixels dans les deux directions X et Y définit ce qu'on appelle le format de l'image. Ainsi une coupe peut être représentée par différents format (X, Y) : 128×64, 128×128, 256×128, 256×256, 512×512, 1024×1024. Pour le format 128×64 et 512×512 par exemple, le temps de détection est respectivement $t_d \sim 2\mu s$ et $t_d \sim 500 ns$. Ainsi, l'intensité moyenne $\langle A \rangle$ d'une coupe représentée par le format 128×64 sera quatre fois celle représentée par le format 512×512.

La largeur de la fenêtre du détecteur permet de sélectionner les longueurs d'ondes. Une large ouverture de la fenêtre, permet une entrée importante de photons de longueurs d'ondes différentes donc une intensité plus importante. La fenêtre est réglée pour correspondre à la bande de l'émission de la sonde. En effet, l'intensité augmente avec l'ouverture du PMT. Dans le cadre d'une étude comparative, il faut toujours vérifier qu'on garde bien la même largeur pour tous les systèmes. De ce fait, on enregistre tous les paramètres dans un fichier qu'on rappelle à chaque nouvelle étude.

L'augmentation de l'intensité d'une coupe, pour un même format, peut être obtenue en remplaçant un objectif à fort grossissement ($\times 63$) par un objectif à faible grossissement ($\times 20$), car la taille du point lumineux augmente. Ce changement s'accompagne d'une augmentation de la surface de la coupe.

II.1.1.5.3. Rapport signal sur bruit

Nous avons mesuré en absence de lumière, le signal sur bruit. Il est plus faible pour le format 512×512.

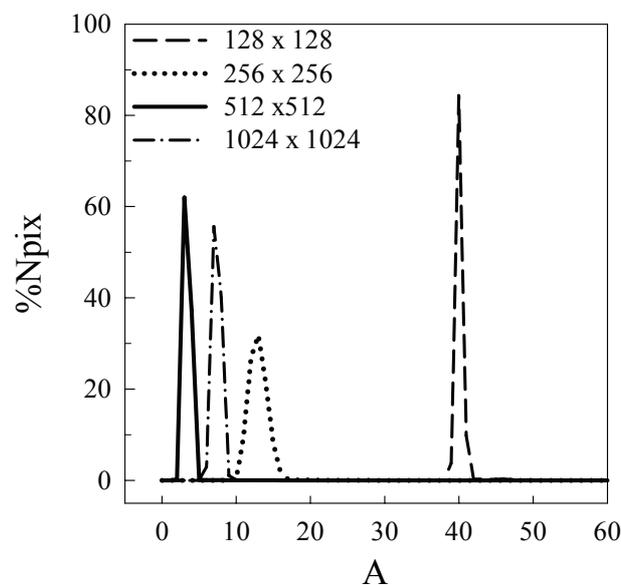


Figure II 9 : Histogramme des intensités moyennes du bruit pour différents formats

Le logiciel du dispositif permet d'appliquer un seuil automatique par la fonction « threshold » pour exclure le bruit des images. Il est possible d'avoir l'intensité du bruit égale à zéro donc un bon rapport signal sur bruit. Nous avons vérifié que le signal du bruit n'est pas dépendant du gain donc il n'est pas nécessaire d'appliquer pour chaque gain un seuil.

II.1.2. Méthodes d'analyse quantitative

II.1.2.1. Sonde fluorescente

II.1.2.1.1. Caractéristique physico-chimique

Il existe plusieurs marqueurs fluorescents disponibles sur le marché, notamment des marqueurs de protéines. Le plus connue est la fluorescéine et ses dérivées. Ce marqueur est malheureusement photosensible et demande une utilisation brève. Les tests que nous avons effectués en utilisant ce marqueur ont montré sa forte sensibilité au pH et à la force ionique. Nous avons aussi observé que la fluorescéine aime autant l'eau que les protéines. Dans le cadre de notre application, ces constats sont très désavantageux. Néanmoins, la fluorescéine a un très bon rendement quantique proche de 1. Les marqueurs fluorescents qui ont leur longueur d'onde d'excitation dans l'UV ne peuvent pas être utilisés avec l'appareil dont nous disposons. Nous avons recherché un marqueur de faible masse moléculaire, ayant une faible photosensibilité et une forte affinité pour les protéines et dont la longueur d'onde d'excitation est compatible avec le dispositif utilisé. Nous avons trouvé que la rhodamine B ou isothiocyanate répond bien à ces critères. La **Figure II.10** montre la structure moléculaire de la fluorescéine et de la rhodamine B (RhB).

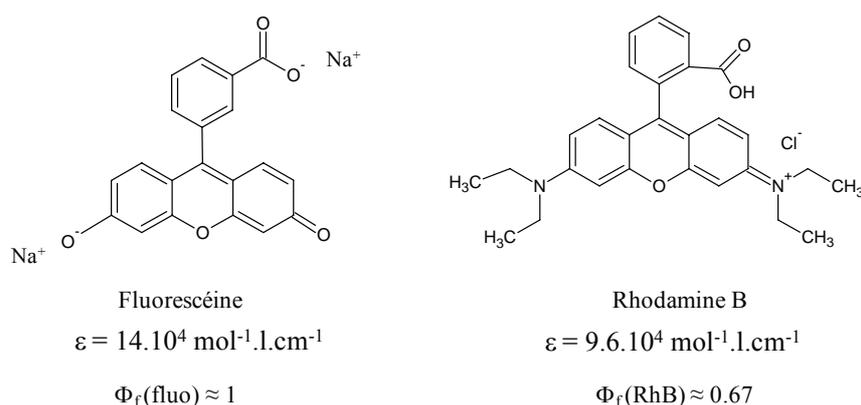


Figure II 10 : Structure moléculaire de la fluorescéine et de la rhodamine B

Grâce à sa structure moléculaire, la rhodamine se fixe préférentiellement sur les protéines par des interactions hydrophobes. C'est une molécule stable à pH acide comme basique. Les tests effectués ont montré qu'elle est moins photosensible que la fluorescéine. Sa durée de vie est largement suffisante pour les applications que nous voulons faire. Beaucoup d'auteurs ont

déjà utilisé cette molécule pour des observations en MCBL. Son coefficient d'extinction molaire a été mesuré par la spectroscopie UV-visible, sur un appareil Cary-50 Bio (Les Ulis, France). Son rendement quantique a été mesuré par rapport à la fluorescéine. Il est égal à 0.67, en considérant que le Φ_f de la fluorescéine est égal à 1.

II.1.2.1.2. Spectre d'absorbance et de fluorescence des sondes

Les spectres d'absorbance des marqueurs fluorescéine (Fluo) et rhodamine B (RhB) ont été obtenus par le spectrophotomètre UV-visible (**Figure II.11** à gauche).

A l'aide de la microscopie confocale, on peut déterminer le spectre de fluorescence d'une sonde afin de régler la fenêtre du PMT sur les longueurs d'ondes émises lors de la fluorescence. Le résultat pour les deux marqueurs est présenté sur la **Figure II.11** à droite.

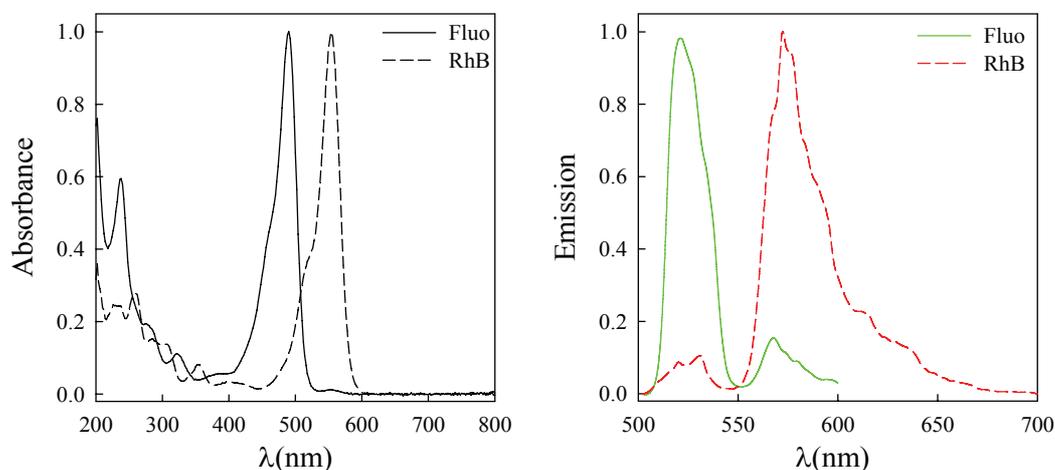


Figure II 11 : Spectre d'absorbance (à gauche) et d'émission (à droite) de la fluorescéine et de la rhodamine. Excitation à 488nm pour les deux sondes.

La rhodamine peut être excitée avec 488 nm, 514 nm ou 543nm (voir spectre d'absorbance), elle absorbe à 555 nm et émet principalement à 580 nm. Sa fluorescence s'étale de 560 nm à 700 nm. La fenêtre du détecteur est réglée sur cette gamme de longueur d'onde d'émission pour toutes les études réalisées dans cette thèse.

II.1.2.2. Etude de l'influence du gain (G)

Dans ce paragraphe, nous avons regardé l'évolution de l'intensité moyenne (A) d'une coupe, format 512×512, en fonction du gain (G) pour différentes concentrations de rhodamine exprimée en ppm (partie par million g/g ou mg/l de rhodamine). D'abord, une série de concentrations est mesurée par spectroscopie UV-visible, ensuite la même série est mesurée en MCBL pour établir une relation entre A et C

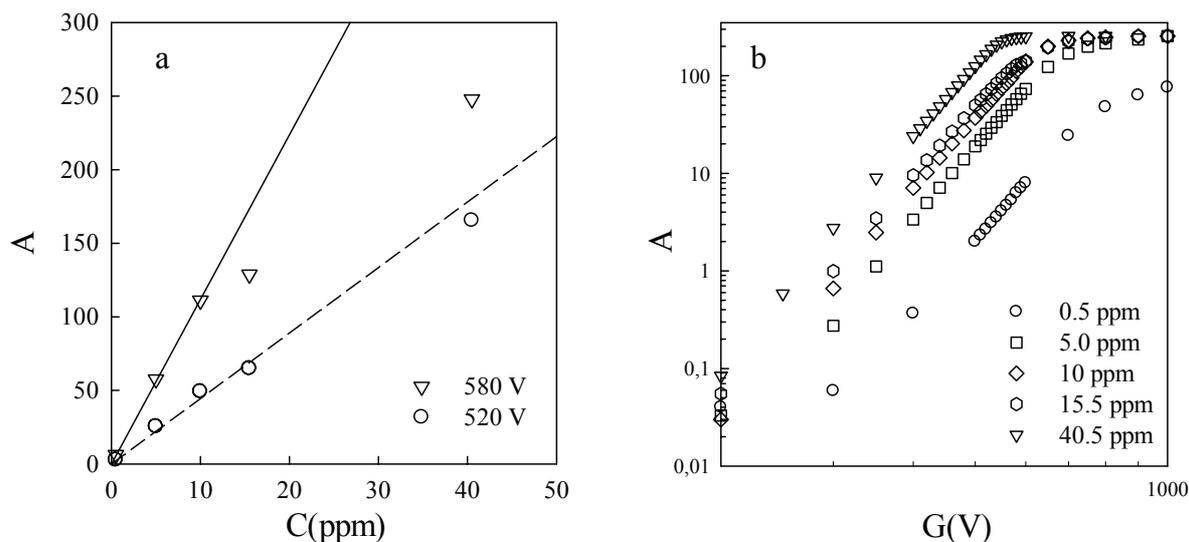


Figure II 12 : a) Evolution de l'intensité en fonction de la concentration de la rhodamine pour deux gains et b) Evolution de l'intensité en fonction du gain pour différentes concentrations en rhodamine.

$$A = A_0 \left(\frac{C}{C_0} \right) \left(\frac{G}{G_0} \right)^k$$

II. 12

- k est une constante qui représente la sensibilité du PMT. Un PMT très sensible aura une valeur de k élevée.
- C_0 est la concentration d'une référence
- A_0 est l'amplitude de la référence pour G_0

Dans les études quantitatives, il est indispensable que l'amplitude du signal soit proportionnelle à la concentration de marqueur utilisé. L'évolution de l'amplitude que nous avons constatée, représentée dans la **Figure II.12a**, permet donc d'effectuer une étude quantitative de nos systèmes. Cependant, comme nous avons pu le constater (**Figure II.12a**), l'intensité n'est pas linéaire quelle que soit la concentration, de plus le domaine sur lequel l'intensité du signal est linéaire avec la concentration dépend très fortement du gain. Il faut presque déterminer pour chaque gain, le domaine de linéarité de la concentration. La **Figure II.12b** montre l'évolution de l'intensité en fonction du gain pour différentes concentrations. On peut constater qu'il existe un domaine de gain sur lequel, la mesure de l'intensité est fiable. Un gain trop faible (200V) ne permet pas une mesure fiable des intensités pour des concentrations faibles (inférieures à 5ppm) et un gain trop fort (500V) entraîne la saturation du détecteur pour des concentrations fortes (supérieures à 40ppm). Nous avons regardé la distribution de la population de pixels en fonction de l'intensité du signal sur une coupe pour différents gains pour une concentration donnée. Le résultat est présenté dans la **Figure II.13**. L'intensité qu'on mesure varie de 0 à 255 pour un codage 8bits (1 octet). Lorsque le gain est 300V toutes les intensités des pixels sont presque nulles. De fait, la valeur moyenne de l'intensité n'est plus représentative de la concentration. Lorsque le gain est 800V, une forte population de pixels s'écrase sur la valeur $A = 255$, c'est la saturation, dans ce cas la valeur moyenne de l'intensité est faible par rapport à ce qu'elle devrait être. Pour 520V, la

distribution est gaussienne et la valeur moyenne est représentative de la concentration du marqueur.

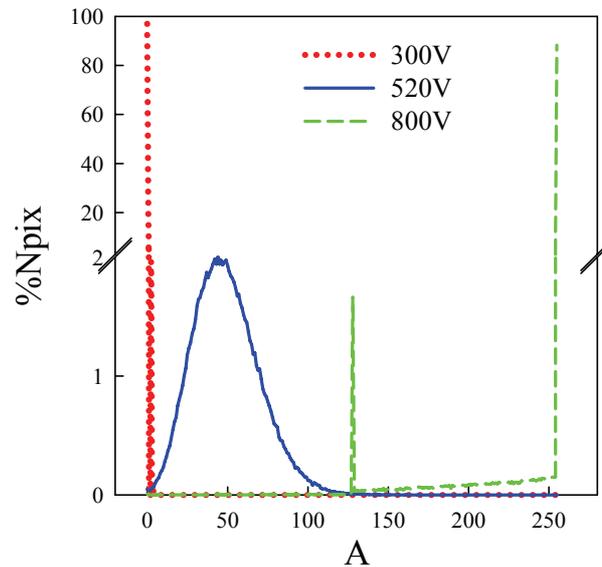


Figure II 13 : influence du gain sur la distribution de la population de pixels en fonction de l'intensité (Histogramme)

Ces constats nous ont amenés à déterminer le domaine de gain sur lequel nous pouvons considérer que nos mesures sont représentatives de la concentration du marqueur en déterminant l'évolution du coefficient de variation relatif (σ_r). Nous venons de voir que l'histogramme était très important pour apprécier la fiabilité de la moyenne de l'intensité moyenne du signal d'une coupe. Afin de déterminer un écart type fiable il faut d'abord que l'intensité moyenne soit fiable. En effet dans le cas d'une saturation, l'écart type diminue alors que la moyenne ne varie plus. Le coefficient de variation relative est donné par l'expression suivante :

$$\sigma_r = \frac{\sigma}{\langle A \rangle} \quad \text{II. 13}$$

La **Figure II.14** montre l'évolution de σ_r en fonction du gain pour les concentrations de la **Figure II.12.b**

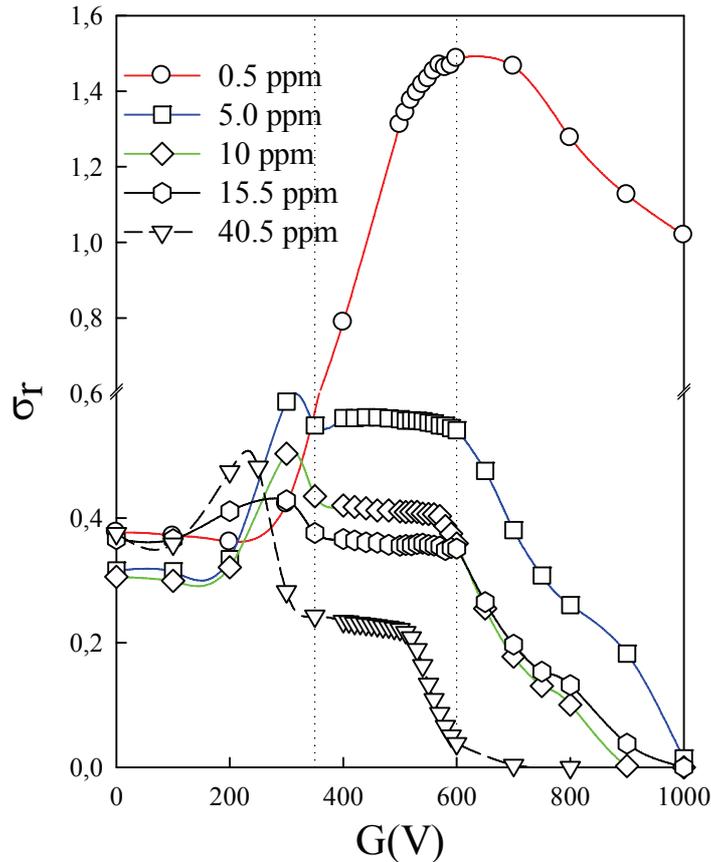


Figure II 14 : Evolution du coefficient de variation relative (σ_r) en fonction du gain pour différentes concentrations. Les lignes continues sont des guides.

Nous pouvons distinguer trois zones de variations. La première zone correspondant au domaine de faible gain, est essentiellement influencée par de fortes fluctuations locales. Elle est limitée à 350V même pour 40 ppm. Nous pouvons dire que la sensibilité du PMT débute lorsqu'on applique une tension minimale de 350V. Dans la deuxième zone, σ_r est constant sauf pour 0.5ppm, concentration trop faible. L'élargissement de cette zone est petit pour 40ppm, parce que la saturation arrive plus tôt, c'est-à-dire à 520V, alors qu'elle n'arrive qu'à partir de 600V pour les autres concentrations. La troisième zone correspond au domaine de saturation. Ces observations nous permettent de définir à la fois les domaines de concentrations du marqueur et de gains du détecteur. Nous varierons donc le gain entre 350V et 600V. La concentration du marqueur sera choisie entre 0.5ppm et 20ppm.

II.1.2.3. Histogramme des images : mode de représentation

L'histogramme des images est généralement présenté comme la distribution de la population de pixels en fonction des niveaux de gris allant de 0 à 255. Dans la **Figure II.16** suivante, nous présentons deux façons de représenter l'histogramme :

- La première est la représentation classique, assimilable à une représentation en nombre des pixels
- La deuxième est une représentation en poids. Une représentation pondérée par la valeur d'intensité correspondante à chaque population. Cette représentation présente l'avantage de révéler les populations de fortes concentrations qui sont cependant négligeables en nombre.

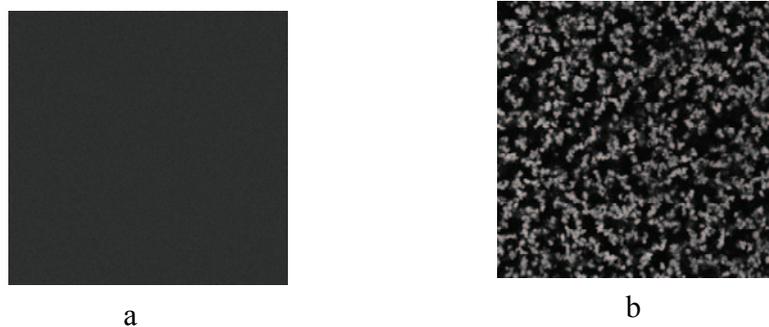


Figure II 15 : image de système homogène (a) et hétérogène (b), blanc = domaine dense

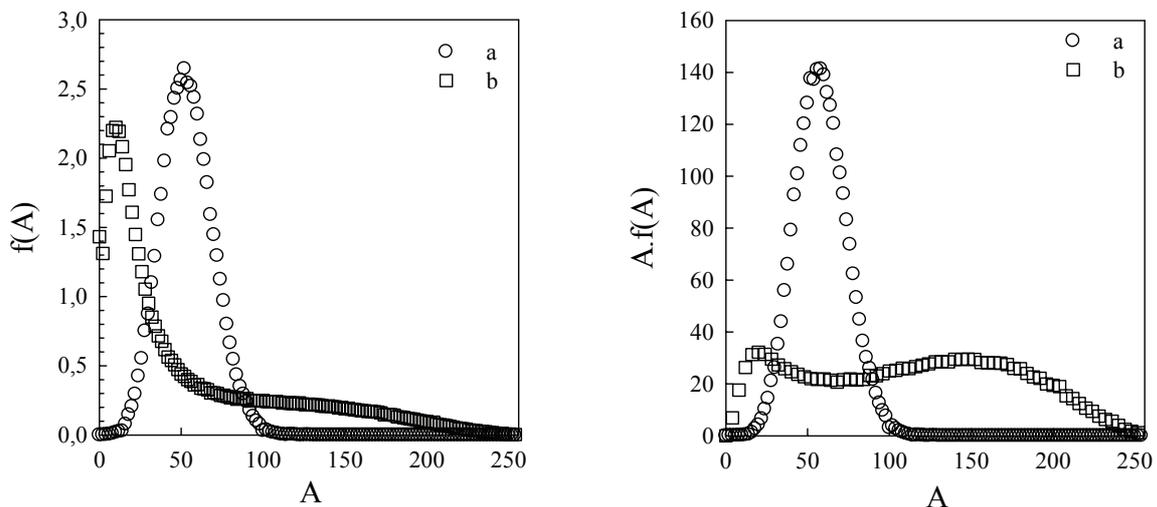


Figure II 16 : Histogramme des images de la **Figure II.15** : histogramme en fraction de pixels (à gauche), histogramme pondéré par les intensités de chaque fraction de pixels (à droite)

Lorsque le système est homogène, la distribution ne change pas. Avec la représentation pondérée, on peut apprécier la distribution bimodale de l'image b de la **Figure II.15**. Les domaines denses représentent en nombre une quantité faible par rapport au reste de l'image.

II.1.2.4. Mesure de la turbidité par MCBL

Lorsqu'une radiation incidente traverse une suspension colloïdale, l'intensité de la lumière diffusée est une fonction de la taille des particules en suspension et de leur concentration. En pratique on mesure l'intensité transmise par spectroscopie UV-visible à une longueur d'onde donnée. L'intensité transmise (I_t) est reliée à l'intensité incidente (I_0) par la relation suivante :

$$I_t = I_0 \times e^{-\tau \cdot l}$$

II. 14

- τ est la turbidité par unité de longueur (l) du trajet optique (**Equation II.35**).

En MCBL, « l » représente l'épaisseur d'une coupe du système. Pour obtenir la turbidité d'une suspension colloïdale, nous avons mesuré l'intensité de fluorescence de chaque coupe en fonction de « l ». Puisque la suspension ne fluoresce pas, nous l'avons marqué par la rhodamine à 5ppm. La **Figure II.17** montre l'évolution de l'intensité incidente à travers les couches d'un milieu turbide et celle transmise par la fluorescence dans le cas d'une épifluorescence (les faisceaux incident et transmis sont acheminés à la fois par le même objectif). Susanto A. et al., ont développé des modèles pour corriger l'effet de l'atténuation sur les données expérimentales (Susanto, Herrmann & Hubbuch, 2006). Nous allons nous servir de ce phénomène pour caractériser quantitativement nos systèmes.

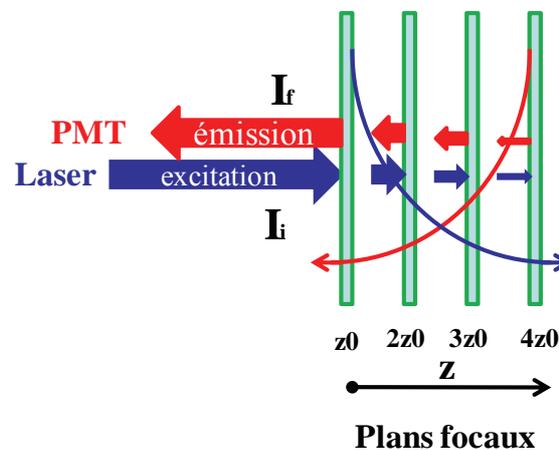


Figure II 17 : Parcours de la lumière incidente (I_i) et émise par fluorescence (I_f) à travers les couches d'un échantillon

L'intensité transmise est doublement atténuée (à l'aller et au retour). L'équation II.14 devient :

$$I_t = I_0 \times e^{-2\tau \cdot l}$$

II. 15

En MCBL, c'est l'intensité moyenne de chaque coupe en fonction de la profondeur axiale (z) que nous mesurons.

D'où

$$\ln(\langle A \rangle) = -2\tau \cdot z$$

II. 16

La suspension colloïdale est un latex que nous avons dilué plusieurs fois en gardant la même concentration de rhodamine. La **Figure II.18** montre l'évolution de A/A_0 , en échelle semi-logarithme, en fonction de z (μm) pour différents rapports de dilution.

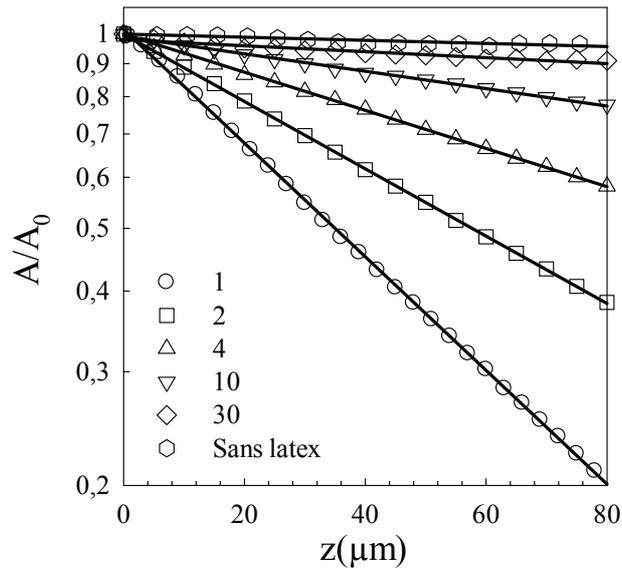


Figure II 18 : Evolution de la transmittance en fonction de la profondeur (z) dans une suspension de latex. La solution sans latex, est une solution de rhodamine à 5ppm (échelle semi-logarithme). Les lignes droites correspondent à l'équation II.15. La pente des droites est égale à deux fois la turbidité.

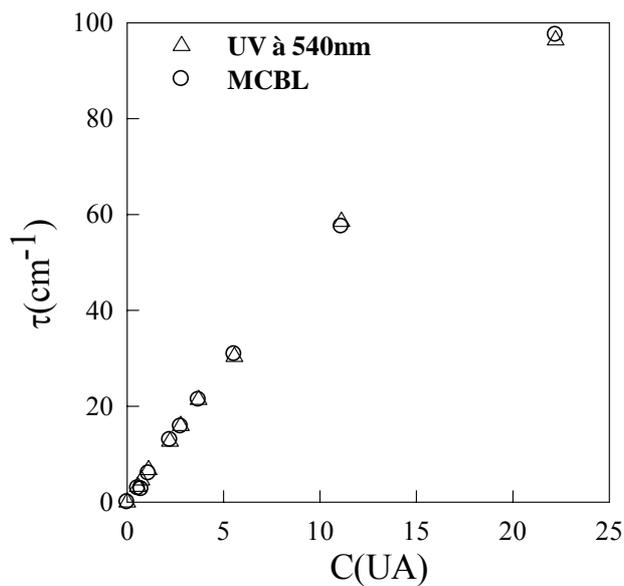


Figure II 19 : Evolution de la turbidité en fonction de la concentration en unité arbitraire par une suspension de latex. Mesure par spectrophotomètre UV-visible à 540nm (triangle) et par la MCBL (cercle)

Nous avons déterminé à partir des pentes des droites de la **Figure II.18** la turbidité, que nous avons tracée en fonction des dilutions pour obtenir le résultat de la **Figure II.19**. En parallèle, nous avons effectué les mêmes mesures en utilisant le spectrophotomètre UV-visible afin de comparer les résultats obtenus avec les deux techniques. L'excitation en MCBL a été faite à 543nm, sachant que l'émission se situe à 580nm, on peut penser que la comparaison avec le spectrophotomètre UV-visible se ferait à une longueur d'onde intermédiaire entre 540nm et

580nm. Nous pouvons donc dire que la diffusion de l'excitation à 543nm est plus importante que celle à 580nm de sorte que c'est elle qui domine l'atténuation de la fluorescence. Ce résultat va nous permettre d'étudier des systèmes de β lg très turbides qui ne sont pas caractérisables par le spectrophotomètre UV-visible.

II.1.2.5. Fonction de corrélation de paire de pixels

Nous avons vu que la concentration du marqueur est proportionnelle à l'intensité (\mathbf{A}). La fonction de corrélation des pixels, permettra donc de déterminer les fluctuations de concentrations, leur amplitude et leur évolution spatiale et ainsi d'obtenir la longueur de corrélation des systèmes s'il en existe une. On nomme \mathbf{A}_i l'intensité d'un pixel quelconque \mathbf{i} pris au hasard comme référence dans l'image (confocale) et \mathbf{A}_j celle d'un pixel voisin \mathbf{j} . Puisque \mathbf{A}_i et \mathbf{A}_j appartiennent à la même image, la fonction de corrélation de paire peut également être appelée fonction d'autocorrélation. La distance entre le pixel de référence \mathbf{i} et le pixel voisin \mathbf{j} est \mathbf{r} (la distance de corrélation). Le nombre \mathbf{n} de référence et le nombre \mathbf{m} de voisins sont déterminés par le format choisi. L'expression mathématique de la fonction d'autocorrélation ($\mathbf{g}(\mathbf{r})$) s'écrit comme suit :

$$\mathbf{g}(\mathbf{r}) = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \mathbf{A}_i \cdot \mathbf{A}_j}{\sum_{i=1}^n \mathbf{A}_i \cdot \sum_{j=1}^m \mathbf{A}_j} \quad \text{avec } \mathbf{r} = |\vec{\mathbf{i}} - \vec{\mathbf{j}}| \quad \text{II. 17}$$

✓ **Contraste des systèmes**

Lorsque $\mathbf{r} = 0$, l'expression du $\mathbf{g}(\mathbf{r})$ est :

$$\mathbf{g}(0) = \frac{1}{\mathbf{n}} \frac{\sum_{i=1}^n \mathbf{A}_i^2}{\langle \mathbf{A} \rangle^2} \quad \text{II. 18}$$

Avec \mathbf{n} = nombre total de pixels de l'image

L'écart type d'une image s'exprime comme suit :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (A_i - \langle A \rangle)^2}{\mathbf{n}}} \quad \text{II. 19}$$

D'où

$$\sigma^2 = \frac{1}{\mathbf{n}} \sum_n \mathbf{A}_i^2 - \langle \mathbf{A} \rangle^2 \quad \text{II. 20}$$

On déduit donc :

$$g(0) = \sigma_r^2 + 1 \quad \text{avec} \quad \sigma_r = \frac{\sigma}{\langle A \rangle} \quad \text{II. 21}$$

Le contraste théorique du système est obtenu par $g(0)$, c'est-à-dire, les fluctuations de concentration entre points infiniment petits. En pratique, le point a la taille de la résolution de l'image, donc la taille du pixel pour le zoom 1 (objectif $\times 63$) et le zoom 2 (objectif $\times 20$).

Puisque le coefficient de variation (σ_r) est relié au contraste des systèmes, il faut donc que le coefficient de variation du milieu continue soit négligeable. Nous avons déjà vu dans la **Figure II.16**, l'évolution du coefficient de variation du milieu continu. Il est faible lorsque la concentration de rhodamine augmente. Comme nous ne pouvons pas augmenter la concentration de rhodamine plus que 40ppm, nous pouvons néanmoins moyenner plusieurs fois la même image. La **Figure II.20** montre l'évolution du coefficient de variation en fonction du nombre d'images pour une solution de rhodamine à 5ppm.

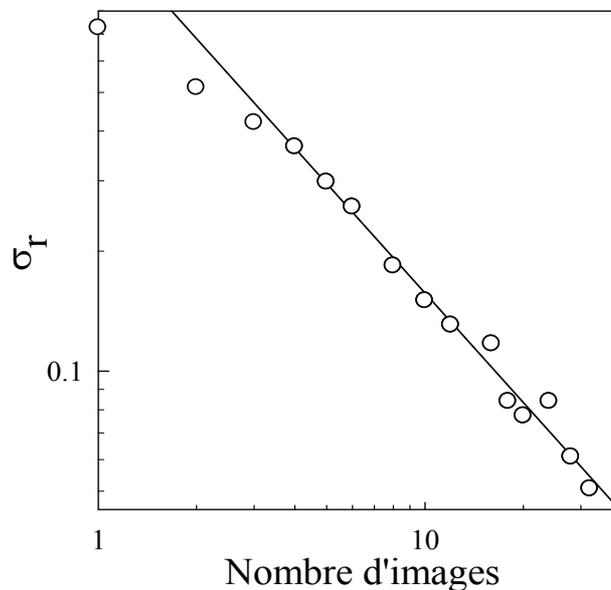


Figure II 20 : Evolution du coefficient de variation en fonction du nombre d'images

Le nombre d'images peut être exprimé en temps mis pour scanner ou enregistrer une coupe. 10 images correspondent à environ 1s pour enregistrer une coupe. Le coefficient de variation diminue d'abord lentement, puis ensuite rapidement à partir de 4 images. Nous avons constaté que σ_r diminue continuellement et si nous voulons obtenir un nombre d'images à partir duquel σ_r n'évolue plus, il faut moyenner environ 100 fois. Au-delà de 100 images, $\sigma_r = 0.02$. Il faut donc compter au minimum 10s pour acquérir complètement l'image d'une coupe. En pratique, nous allons déterminer la durée minimale qu'il faut pour que le contraste ne change pas.

II.1.2.6. Comparaison entre $g(r)$ théorique et expérimental

II.1.2.6.1. Cas d'une bille

Comme il a été mentionné, une image confocale 3D comporte plusieurs défauts qui sont liés à l'optique du milieu. La résolution axiale étant deux fois moins bonne que la résolution latérale, l'image confocale d'une sphère a la forme d'un ballon de Rugby comme le montre les images de la **Figure** suivante.

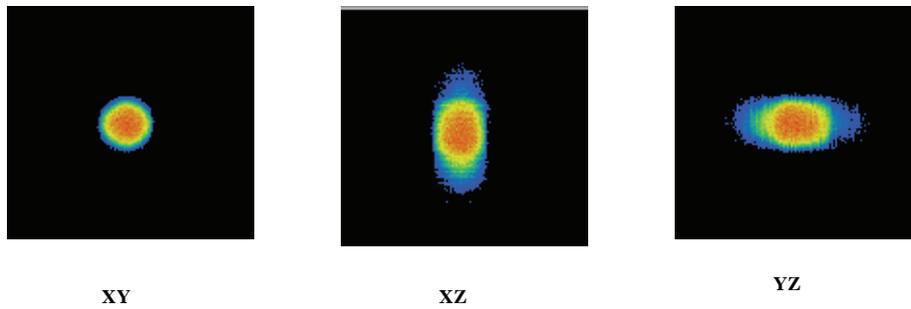


Figure II 21 Image confocale d'une bille de $1.8\mu\text{m}$ prise dans les trois plans xy , xz et yz avec l'objectif $\times 63W$

Un calcul tridimensionnel du $g(r)$ sur un tel objet donnerait une longueur de corrélation égale au diamètre de la première sphère qui circonscrit le ballon de rugby. Ce diamètre est la taille axiale de l'objet. Le moyen qui permet d'obtenir une taille correcte de la bille est le calcul bidimensionnel du $g(r)$ sur chaque coupe de l'objet. Le $g(r)$ final de l'objet s'obtient par la moyenne du $g(r)$ des coupes. La longueur de corrélation du $g(r)$ final est égale au diamètre du disque qui coupe la sphère en son centre dans le plan XY.

Nous avons comparé le $g(r)$ théorique d'une sphère dont l'expression est la suivante :

$$g_s(r) = g_s(0) \left(1 - \frac{r}{2R_s}\right)^2 \left(1 + \frac{r}{4R_s}\right) \quad \text{II. 22}$$

au $g(r)$ expérimental 2D (XY) d'une bille (**Figure** II.21, XY). La superposition des deux profils est satisfaisante pour considérer que le $g(r)$ bidimensionnel moyen est égal au $g(r)$ tridimensionnel dans le cas d'une sphère.

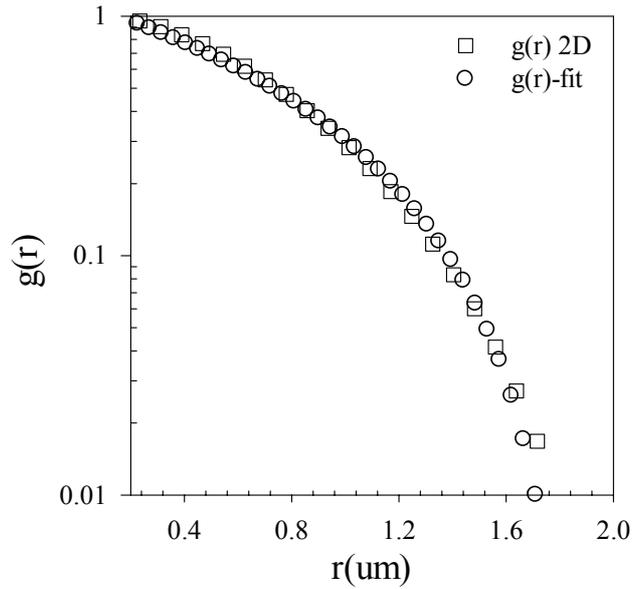


Figure II 22 : Comparaison entre le $g(r)$ théorique d'une sphère et son $g(r)$ expérimental

II.1.2.6.2. Cas d'un gel théorique

Les images de la **Figure II.23** sont celles d'un gel obtenu par simulation DLCA.

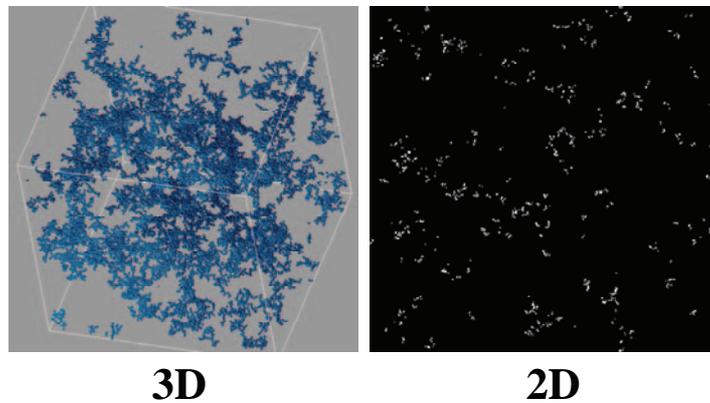


Figure II 23 : Images 3D (à gauche) et 2D (à droite) d'un gel obtenu par simulation DLCA

Les $g(r)$ calculés sur ces images (3D et 2D) sont présentés dans la **Figure II.24**. Les deux fonctions se superposent de telle sorte que nous pouvons considérer que sur des systèmes isotropes (Snyder, Vlachos & Nikolakis, 2007), le $g(r)$ calculé en 2D est identique à celui calculé en 3D. Ce résultat nous affranchit des problèmes dus à une mauvaise résolution axiale qu'on rencontre fréquemment dans l'étude 3D des objets.

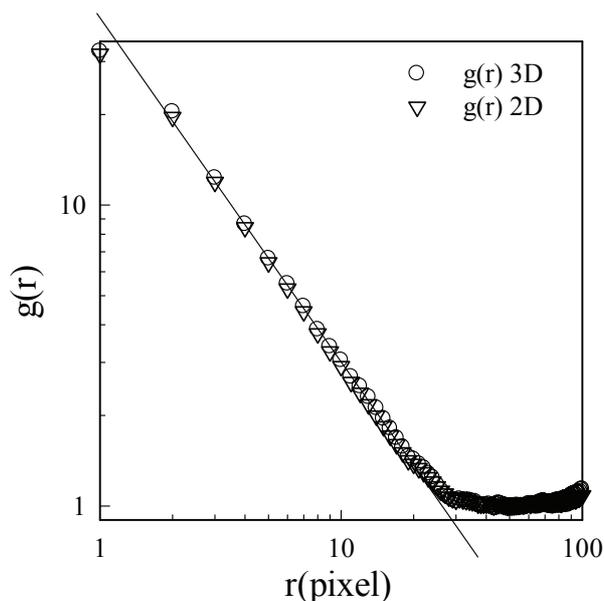


Figure II 24 : Comparaison entre le $g(r)$ calculé sur l'image 3D et 2D de la **Figure II.23**, la pente de la droite est égale -1.25

II.1.2.7. Conclusion

Le microscope confocal à balayage laser est une technique qui permet l'analyse quantitative des systèmes fluorescents. Les objectifs que nous allons utiliser sont à immersion eau puisque les systèmes que nous allons utiliser sont riches en eau à plus de 80%. Le microscope confocal qui est utilisé pour les travaux réalisés dans cette thèse ne permet que des observations de systèmes qui sont excitables dans le visible et qui fluorescent dans le visible. Lorsqu'un système ne fluoresce pas, il faut le marquer avec une sonde fluorescente ayant un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique élevés. La plupart des sondes dérivées de la fluorescéine ont une durée de vie de fluorescence très courte et se prêtent moins à une longue utilisation dans le cas d'observation directe. Nous avons choisi la rhodamine B pour sa résistance au photoblanchiment pendant toute la durée du travail sous excitation laser. Il existe un domaine où l'intensité qu'on mesure est linéaire avec la concentration de la sonde. Nous avons trouvé que ce domaine dépend de la sensibilité du détecteur et du gain mis pour amplifier le signal. Nous avons constaté que quelle que soit la concentration, il faut au minimum un gain = 350V pour avoir une mesure d'intensité fiable, c'est-à-dire qui représente la concentration de la sonde. Nous avons aussi observé que lorsque la concentration est trop faible, 0.5ppm par exemple, les fluctuations locales de concentrations sont importantes. Pour éviter cela, il est nécessaire d'augmenter la concentration sans dépasser 20ppm, puisqu'au-delà de cette concentration la saturation fait que le domaine de variabilité du gain est trop court (de 350V à < 500V au lieu de 600V). Nous avons élaboré une fonction d'autocorrélation, $g(r)$, pour étudier la structure des systèmes isotropes. Cette fonction va être calculée sur des coupes 2D car cela permet d'éviter les problèmes qui sont liés à la mauvaise résolution axiale qu'on rencontre fréquemment avec ce type de technique. La diffusion de la lumière permettra de caractériser les échantillons qui sont homogènes à l'échelle du confocal.

Dans la suite, nous allons voir la préparation des gels et la façon dont nous allons les caractériser.

II.1.3. Méthodes de caractérisation et de préparation des échantillons

Il est nécessaire de marquer la β lg avant de pouvoir l'observer au microscope confocal. La β lg pourrait être marquée une fois le gel formé ; Mais cette façon de procéder pose des problèmes d'homogénéité du marqueur dans le gel, en plus la diffusion du marqueur dans le gel est très lente. L'autre manière de faire, consiste à ajouter le marqueur dans la solution de β lg avant le chauffage. Cette procédure permet d'avoir un système marqué de façon homogène, mais pose un certain nombre de questions, notamment celle de l'influence de la présence du marqueur sur le mécanisme de gélification. Nous allons donc voir dans cette deuxième partie du chapitre, l'influence du marqueur, ensuite nous présenterons la façon dont les systèmes sont chauffés entre lame et lamelle, puis l'obtention d'un $g(r)$ complet, en passant par la prise et l'enregistrement des images.

II.1.3.1. Préparation de la bêta-lactoglobuline en solution

La β lg est fournie par Lactalis (Laval, France) sous forme de poudre. La composition de la poudre a été déterminée par Lactalis par Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC). La poudre contient en proportion égale : les variants génétiques A et B. Mais elle contient également un peu d'alpha-lactalbumine, de lactose et 1% de matière minérale (**Figure II.25**)

Composition	Quantité (% m/m poudre)
Humidité	3.93
β -lactoglobuline	90
α -lactalbumine	1.6
Matières minérales	1.0
Lactose	0.06

Figure II 25: Composition biochimique de la poudre de bêta-lactoglobuline, lot 958 Lactalis

On prépare une solution de ~ 170 g/l avec de l'eau Mili Q contenant 200ppm d'azote de sodium (NaN_3), pour protéger la protéine contre toute attaque bactériologique, puis on met sous agitation jusqu'à solubilisation complète (~ 3 h). Le pH de cette solution est ~ 3.5 . Toutes les solutions de la β lg contiennent toujours 200 ppm d'antibactérien. On ajoute à cette solution mère 15 g d'une solution de NaOH à 0.5M sous agitation continue afin de remonter le pH à 7. Lorsque l'on passe le pI de la protéine, elle s'agrège ce qui entraîne une augmentation de la turbidité (apparence du lait). Dès que le pH est proche de 6, la solution

redevient limpide. Après quelques minutes d'agitation supplémentaire, on filtre la solution sur un filtre GHP Acrodisc® GF/0.45µm « life Sciences ». Ensuite, la solution est mise dans la membrane « spectra/por® 3 dialysis membrane MWCO : 3,500 » pour être dialysée pendant une journée à pH7. La solution est dialysée dans 4 litres d'eau Mili Q et renouvelée 4 fois. La solution après dialyse peut être conservée sous forme de solution dans le cas d'une utilisation rapide ou sous forme lyophilisée pour une conservation durable ou pour pouvoir préparer après des systèmes plus concentrés.

Le marquage de la protéine se fait directement en ajoutant une goutte de solution très concentrée de rhodamine à l'aide d'une micropipette en veillant à ce que la concentration de la βlg ne change pas (pour avoir 5ppm, on ajoute 38µl de 647 ppm dans 5 ml de solution de protéine). La masse molaire de la rhodamine B est 479 g/mol et celle du monomère de la βlg est 1800g/mol. La concentration de la βlg et de la rhodamine s'obtient par spectrophotométrie en utilisant les coefficients d'extinction molaire respectifs suivants 0.96 l/g et 0.2 ppm⁻¹.

II.1.3.2. Fluorescence de la rhodamine

II.1.3.2.1. Influence de la température

Nous avons vérifié que la température de 80°C n'affecte pas la fluorescence de la rhodamine. Après 24 h de chauffage d'une solution pure de rhodamine à 5ppm dans un kimble (récipient en verre doté d'un bouchon à vis) nous avons obtenu la même intensité de fluorescence que la solution avant le chauffage. Nous avons également vérifié la conservation de masse avant et après le chauffage.

II.1.3.2.2. Influence de la présence de la βlg

Une solution de rhodamine à 24 ppm contenant 20 g/l de βlg a été préparée, soit un rapport de 22 monomères pour une molécule de rhodamine. La **Figure II.26** montre l'évolution de l'intensité (A) en fonction de la concentration de βlg obtenue à partir de la dilution de la solution mère. Le point à 5ppm est celui correspondant à une solution pure de rhodamine. L'évolution linéaire de A en fonction C (βlg) montre que la présence de la βlg n'affecte pas la fluorescence de la rhodamine.

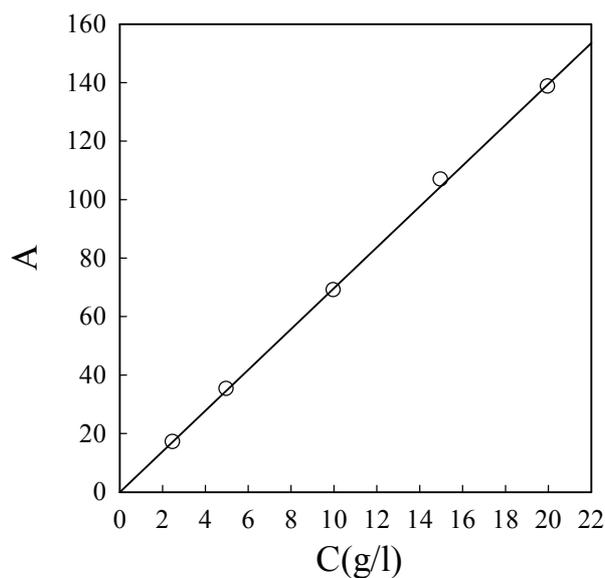


Figure II 26 : Evolution de l'intensité de fluorescence de la rhodamine en fonction de la concentration en β lg.

II.1.3.3. Agrégation en présence de la rhodamine

En étudiant l'évolution de la turbidité en fonction de longueur d'onde, pour différentes concentrations de rhodamine, nous avons observé que la présence de la rhodamine n'affecte pas la concentration ni la taille des agrégats qui sont formées (**Figure II.27**). Cette étude a été réalisée pour 10 g/l de β lg. Cependant nous avons observé que 5 ppm de rhodamine provoque une accélération de la formation des agrégats lorsque la concentration de protéine est inférieure à 5g/l.

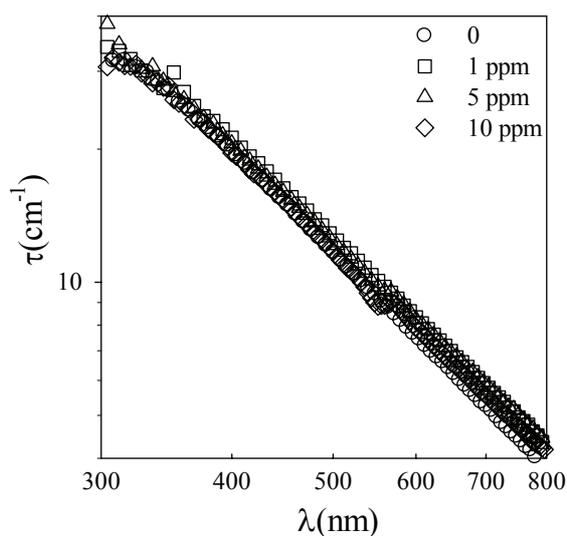


Figure II 27 : Etude de l'influence de la rhodamine sur la turbidité d'une solution de β lg à 10g/l pH 6.4 en présence de 0.1M NaCl chauffée à 80°C.

II.1.3.4. « Précipitation » des gels de β lg.

Plusieurs auteurs ont observé que les gels de protéines « précipitent » sous certaines conditions. Nous avons solubilisé la β lg à pH 3.54 en présence de 1M NaCl puis nous avons chauffé la solution à 80°C. Cette opération a été effectuée pour différentes concentrations (C) de protéine afin d'obtenir l'évolution de la fraction massique (f) d'eau expulsée en fonction de C.

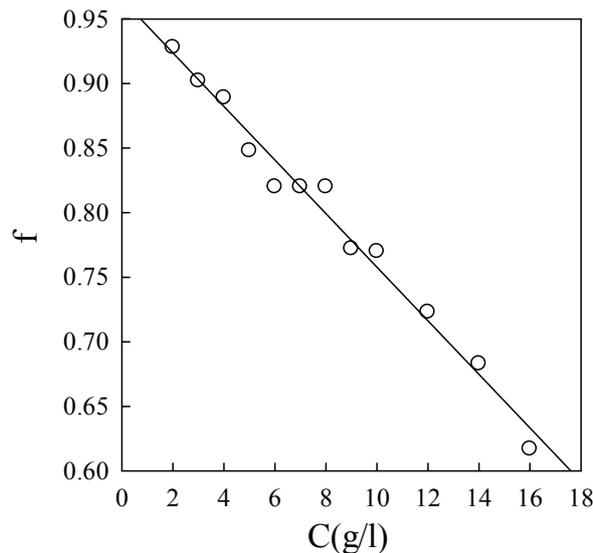


Figure II 28 : Evolution de la fraction massique d'eau expulsée en fonction de la concentration de protéine après chauffage à 80°C. La ligne droite est une régression linéaire

Au-dessus de 16g/l il n'est plus possible de prélever le surnageant sans presser le gel. Il est difficile dans ce cas, d'apprécier la séparation de phase macroscopique du système. Les systèmes qu'on observe au microscope confocal sont chauffés entre lame et lamelle comme l'indique la **Figure II.29**. L'observation se fait à partir de la face lamelle, que nous avons appelé face A, sur une épaisseur de 200 μ m (distance focale de l'objectif \times 63).

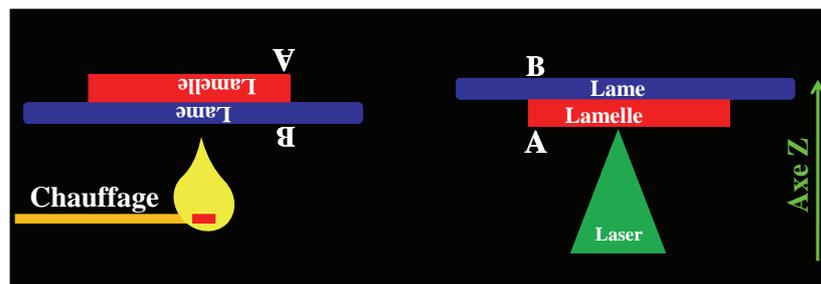


Figure II 29 : Illustration du chauffage (face lame) d'un système de β lg entre lame et lamelle et de l'observation au microscope (face lamelle)

Ce mode de chauffage par la face lame que nous appelons mode B, peut être problématique pour l'observation microscopique lorsque le récipient est mal rempli ou lorsque le gel précipite, sachant que l'épaisseur de la couche d'eau qui est expulsée peut dépasser 200 μ m ce qui représente environ 25% de l'épaisseur totale, ceci signifie qu'un système qui expulse plus

de 25% de son contenu en eau, ne pourra pas être observé en MCBL par ce mode de chauffage, en utilisant un objectif $\times 63$. Il est connu qu'une solution de β lg à 100g/l à pH 7 sans sel forme un gel lorsqu'elle est chauffée à 80°C. Ce gel ne montre aucun détail structural en microscopie confocale. Nous avons regardé le profil axial de l'intensité de ce système pour le mode B et pour le mode A. La superposition des deux profils (**Figure II.30**) indique d'une part que le récipient est bien rempli et d'autre part que le système est homogène pour les deux modes de chauffages.

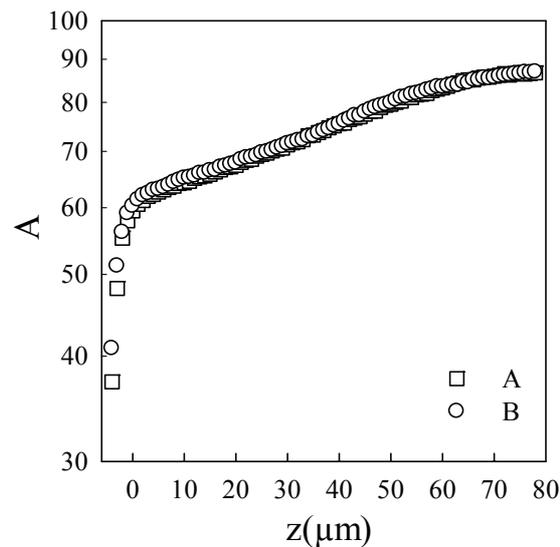


Figure II 30 : Comparaison du profil axial de l'intensité de fluorescence d'un gel obtenu par le chauffage mode A et mode B.

II.1.3.5. Chauffage des systèmes : mode A

Les systèmes ont tous été chauffés dans un bain-marie en posant le récipient sur la face lamelle entre deux supports métalliques. La lamelle est collée à la lame avec un « GENE FRAME[®] » fourni par Bio block. Il permet d'obtenir un récipient étanche qui peut résister jusqu'à 90°C. La **Figure II.31** est un exemple de la façon dont on chauffe les systèmes.



Figure II 31 : Mode de chauffage des systèmes, face lamelle en bas. Le carré bleu est le « GENE FRAME[®] »

Ce mode de chauffage nous permet d'éviter les difficultés qui sont causées par la précipitation des gels lorsqu'on les observe au MCBL.

II.1.3.6. Caractérisation des gels

II.1.3.6.1. Mesure de la turbidité des gels

Nous avons établi le profil axial de l'intensité de fluorescence de plusieurs lamelles et nous avons observé que la plupart fluorescent sur environ $6\mu\text{m}$.

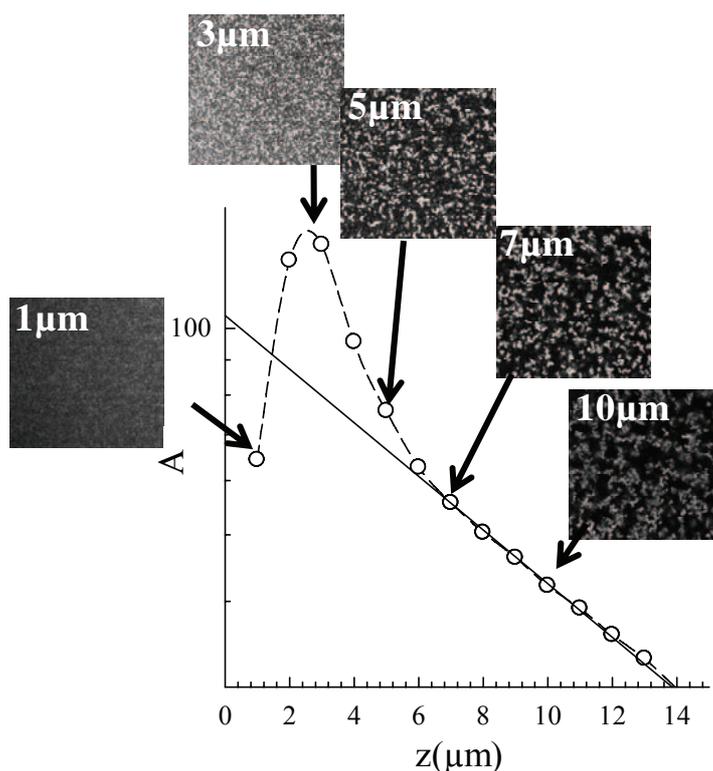


Figure II 32 : Profil axial de l'intensité de fluorescence et les images correspondantes pour quelques positions des coupes d'un gel. Echelle log-lin

Les images sont prises à $7\mu\text{m}$ au-dessus de la lamelle. La **Figure II 32** montre l'évolution de l'intensité de la fluorescence en fonction de z . La fluorescence diminue de manière exponentielle à partir de $6\mu\text{m}$ ou $7\mu\text{m}$ avec une pente de -900 cm^{-1} . Nous considérerons par la suite, la position $z = 0\mu\text{m}$ comme étant la position d'où A décroît exponentiellement. Comme il a été vu dans le chapitre précédent, la turbidité s'obtient en prenant la moitié de la pente en valeur absolue, soit 450 cm^{-1} . En réalité, la détermination de la turbidité ne se fait pas directement à partir du profil de A des gels. Nous avons observé que le profil de A des systèmes avant chauffage n'est pas constant en fonction de z , pour des raisons liées à la différence des indices de réfraction du système et du milieu d'immersion de l'objectif. Pour cette raison, nous enregistrons pour tous les systèmes, le profil de A avant de chauffer les systèmes. La turbidité réelle des systèmes après chauffage s'obtient en prenant la moitié de la différence des pentes (**Figure II.33**)

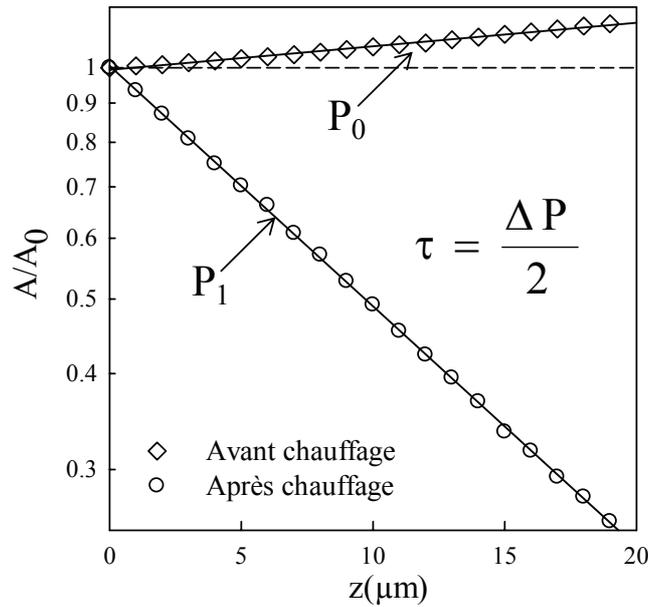


Figure II 33 : Evolution du profil de A avant et après chauffage d'un système. La turbidité du système après chauffage est égale à la moitié de la différence des pentes ($P_0 - P_1$)

II.1.3.6.2. Détermination du rapport des densités locales

La détermination du rapport des densités permettra de suivre l'évolution des systèmes en fonction des différents paramètres physico-chimiques. On sait que la structure des systèmes est accessible par la MCBL lorsque la taille des domaines est supérieure à la résolution et que les domaines denses (D) sont distinguables par rapport aux domaines moins denses (d). Suivre le rapport D/d permettra de comprendre l'influence du sel, du pH, de la température sur l'enrichissement de ces domaines denses et jusqu'où la densification des domaines peut aller.

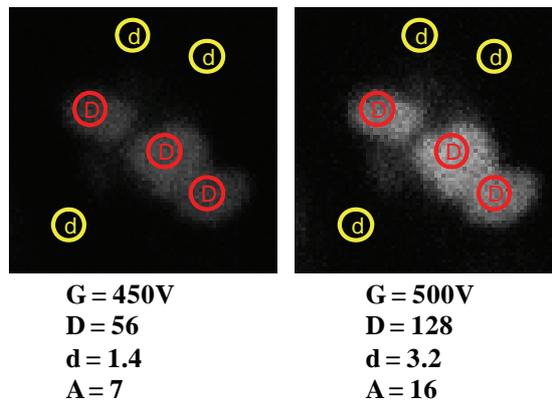


Figure II 34 : Mesure de l'intensité des domaines denses (D) et moins denses (d), l'intensité moyenne (A) est indiquée pour chaque gain (G)

Le rapport D/d permet surtout de s'affranchir de l'influence du gain sur la valeur absolue de la concentration locale, on peut toutefois utiliser une référence dont on connaît bien la concentration. La **Figure II.34** montre la manière dont on mesure les concentrations locales. Un système est dit homogène lorsque le rapport D/d est proche de 1.

II.1.3.7. Obtention d'un $g(r)$ complet

Plusieurs travaux ont montré l'intérêt de faire une exploration multiéchelle afin de caractériser les structures. La dimension des objets est donnée par la longueur de corrélation (passage à 1 du $g(r)$). Dans notre situation, les objets sont connectés entre eux puisque nos systèmes sont des gels. La caractérisation complète nécessite une exploration multi-échelle. Les $g(r)$ obtenus par un objectif donné sont limités à une certaine échelle spatiale. Il est donc indispensable pour construire un corrélogramme complet d'utiliser différents objectifs et zooms. Dans cette section, nous montrerons comment obtenir un corrélogramme complet. En établissant un lien entre les niveaux d'échelles successifs, l'objectif est d'obtenir une description structurale représentative des systèmes.

II.1.3.7.1. Calcul numérique

Dans le calcul du $g(r)$, le format de l'image représente une boîte carrée de dimension L . Dans cette boîte, le programme choisit un pixel au hasard comme référence. Si le pixel de référence est choisi tout près du bord de la boîte, la corrélation avec les pixels voisins sera fortement limitée en r (r est la distance de corrélation) ou même arrêtée. Pour éviter ces situations, on définit une nouvelle boîte carrée à l'intérieur de la grande. La taille (l) de cette petite boîte est reliée à la distance maximale de corrélation appelée R_{\max} telle que $R_{\max} = (L-1)/2$. En entrant dans le programme le format de la grande boîte et R_{\max} en nombre de pixels, le programme ne peut choisir que tous les pixels contenus dans la petite boîte. Ainsi pour tous les pixels qui seront choisis, le $g(r)$ pourra être calculé jusqu'à R_{\max} .

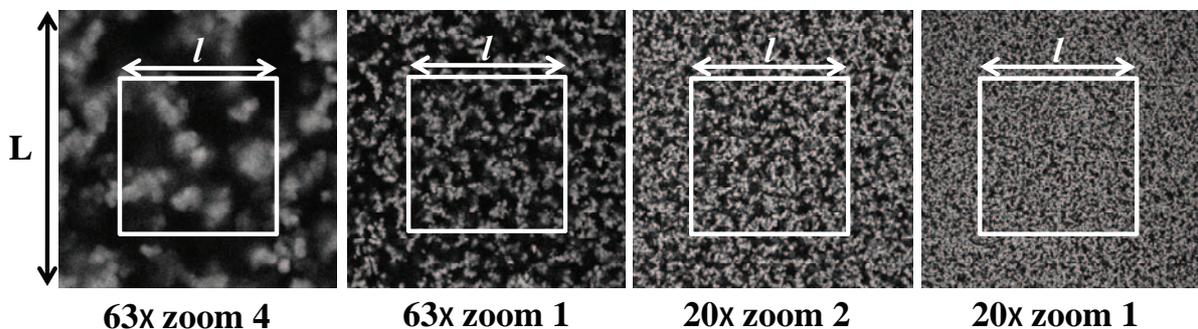


Figure II 35 : Images microscopiques confocales d'un gel de β lg à différents zooms pour les objectifs $\times 63$ et $\times 20$

En d'autres termes, les sous boîtes représentent l'ensemble ω d'objets sur lequel on effectue l'analyse statistique quantitative. Cet ensemble d'objets est inclus dans le grand ensemble Ω qu'est la grande boîte. Il est donc nécessaire que ω représente le mieux possible la diversité de la population entière Ω d'objets. C'est pour cette raison que l'objectif $\times 20$ va être utile, malgré que sa résolution soit mauvaise. Le mieux serait d'avoir l'image $\times 63$ zooms 4 sur une large distance. Rappelons-nous que le format de l'image que nous utilisons est 512×512 pixels et que la taille d'un pixel fait $0.31 \mu\text{m}$ soit une distance totale $L = 158.72 \mu\text{m}$ pour le zoom 1 de l'objectif $\times 63$. En principe, d'après Nyquist, la taille du pixel qu'il faut pour conserver les détails structuraux d'un objet doit être le tiers de la résolution de l'objectif utilisé. Moins que le tiers, aucune information supplémentaire ne peut pas être obtenue. Ce qui signifie qu'il faut au minimum un zoom 3. Cependant, plus le zoom augmente, plus la taille de la boîte diminue donc moins la population ω représente celle de Ω . Pour pallier à cette difficulté, nous allons associer les différentes échelles entre elles. Le grossissement le plus élevé informe sur la structure locale des domaines et le plus faible sur la structure du réseau. Nous allons acquérir les images dans différentes zones de l'échantillon afin d'obtenir un $g(r)$ représentatif de tout le système. Les images sont enregistrées sous forme de fichier raw pour le calcul du $g(r)$.

II.1.3.7.2. Normalisation

La question de la normalisation a été abordée, à savoir si le $g(r)$ devrait être normalisé par l'intensité moyenne de la petite boîte (A_i) ou de la grande boîte (A_L). La normalisation s'apprécie par la limite du $g(r)$ lorsque r est très grand devant la longueur de corrélation notée ξ (environ 4 à 5 fois ξ). Si le $g(r)$ est normalisé, alors il est égal à 1 lorsque $r \gg \xi$. Dans le cas contraire, le contraste obtenu par le calcul du $g(r)$ est arbitraire. De plus on ne peut pas superposer les corrélogrammes des différentes échelles entre eux. On obtient des fonctions d'autocorrélation non normalisées lorsque l'intensité de la petite boîte (A_i) est différente de l'intensité de la grande boîte (A_L). Lorsque $g(r \gg \xi) = 1$, la somme des intensités des pixels présents dans la couronne comprise entre r et $r+dr$ divisée par le nombre de pixels présents (N_j) doit être constant, c'est-à-dire :

$$\frac{1}{N_j} \sum_j A_j = C^{\text{te}} \quad \text{II. 23}$$

L'expression :

$$g(r) = \frac{1}{\langle A \rangle^2} \left[\frac{1}{N_i} \sum_i A_i \left(\frac{1}{N_j} \sum_j A_j \right) \right] \quad \text{II. 24}$$

Avec $\langle A \rangle$ l'intensité moyenne de la normalisation et r la distance entre i et j devient

$$g(r) = \frac{C^{te}}{\langle A \rangle^2} \left(\frac{1}{N_i} \sum_i A_i \right) \quad \text{II. 25}$$

L'expression entre parenthèse est l'intensité moyenne (A_i) de la petite boîte de ω . En normalisant par l'intensité moyenne de la grande boîte, l'expression devient :

$$g(r) = \frac{C^{te} \times A_1}{A_L^2} \quad \text{II. 26}$$

Dans le cas où $A_i = A_L$, le $g(r)$ est égal à C^{te}/A_L . Nous avons vu que la limite du $g(r)$ dépend de l'échelle de l'observation. **La Figure II.36a**, montre que le zoom 4 ($39.68\mu\text{m} \times 39.68\mu\text{m}$) ne suffit pas pour atteindre la limite du $g(r)$. Le zoom 1 dans le cas de ce système permet d'atteindre la limite mais ne permet pas au corrélogramme d'aller plus loin dans la description du système comme avec l'objectif $\times 20$ (**La Figure II.36b**). En changeant d'objectif, on ne change pas que le grossissement (comme le zoom) mais aussi la résolution. Entre les objectifs $\times 63$ et $\times 20$, il y a une différence de contraste. L'histogramme des images est artificiellement modifié en raison de la mauvaise résolution du $\times 20$. C'est ce qui explique que pour le même r , $g(r)$ du $\times 20$ soit plus faible que celui du $\times 63$ (**Figure II.36b**), malgré que les deux fonctions ont atteint la limite. Un profil du $g(r)$ proche de 1 traduit une apparence homogène des systèmes. Avec l'objectif $\times 20$, les systèmes paraissent plus homogènes.

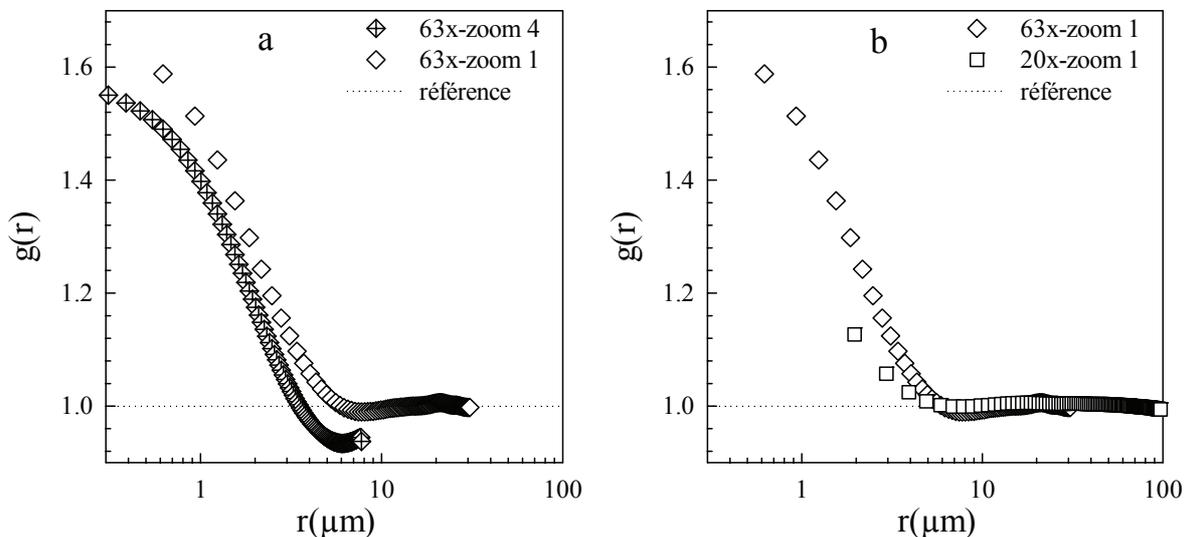


Figure II 36 : $g(r)$ des images de la **Figure II.35** la ligne en pointillée représente la référence d'un système homogène et la limite du $g(r)$. a) $g(r)$ des images obtenues avec l'objectif $\times 63$ pour le zoom 1 et zoom 4. b) $g(r)$ des images obtenues avec l'objectif $\times 63$ et $\times 20$ pour le zoom 1

II.1.3.7.3. Superposition des $g(r)$

Le $g(r)$ final s'obtient en superposant les trois courbes sur une même courbe (**Figure II.37**). Le zoom 4 permet une meilleure description de la structure locale des domaines alors que le

zoom 1 donne une bonne appréciation des connectivités entre les domaines. Le $g(r)$ du zoom 4 traduit donc la continuité du $g(r)$ du zoom 1 vers les petites distances. Lorsque ce dernier n'est pas normalisé, parce que les domaines ou les liens entre les domaines sont étendus dans l'espace, on se sert de l'objectif $\times 20$ pour obtenir la normalisation du $g(r)$. Nous corrigeons l'artéfact lié à la faible résolution du $\times 20$ par un facteur de correction. Le facteur de correction est le rapport au carré de l'écart type relatif du $\times 63$ sur l'écart type relatif du $\times 20$ puisque les contrastes théoriques sont reliés à ces deux écarts type. La superposition des deux fonctions précédentes se fait ensuite sur la fonction corrigée du $\times 20$. Après ces opérations, on établit une fonction d'autocorrélation complète (**Figure II.37b**) en considérant pour chaque zoom, la partie du $g(r)$ qui donne la meilleure description.

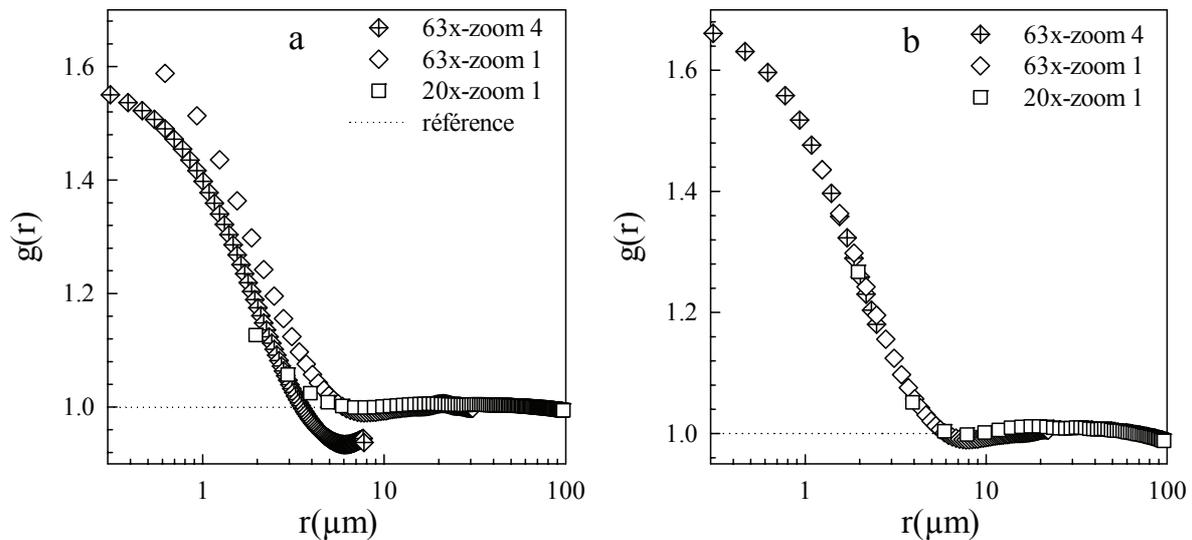


Figure II.37 : a) résultat brut des $g(r)$ pour différents zooms et différents objectifs. b) Superposition des $g(r)$.

II.1.3.8. Interprétation du $g(r)$

Ce paragraphe consiste à montrer la manière dont les résultats qui vont être présentés plus loin ont été obtenus. Nous avons montré comment nous déterminons la turbidité d'un système et le rapport des densités locales (D/d). Cette partie présente la détermination des caractéristiques du gel : le contraste, la longueur de corrélation et un paramètre supplémentaire que nous désignons par le paramètre bêta. La fonction la mieux adaptée pour décrire les profils des $g(r)$ (**Figure II.38**), est une fonction exponentielle étirée dont l'exposant est bêta.

$$g(r) = 1 + B_1 \times \exp \left[- \left(\frac{r}{\xi} \right)^\beta \right] \quad \text{II. 27}$$

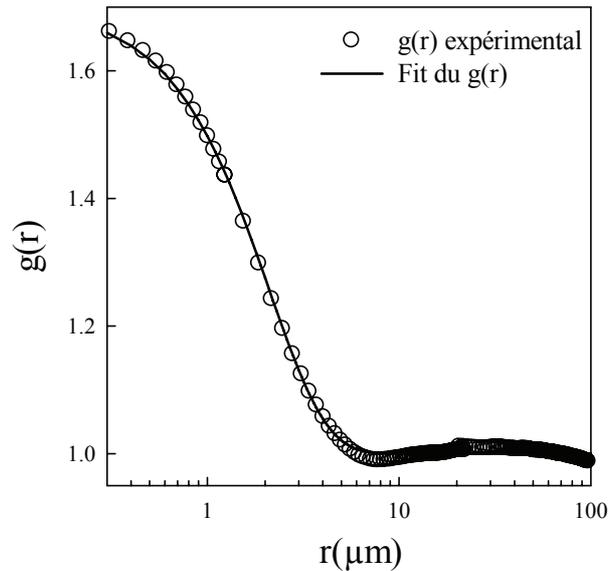


Figure II 38 : Ajustement théorique, Eq. II.65, du $g(r)$ expérimental (ligne pleine)

Les paramètres qui permettent d'ajuster la fonction théorique sur le $g(r)$ expérimental sont : B_1 (le contraste), ξ (la taille des domaines), et β (le facteur d'étirement de la fonction).

II.1.3.9. Gélification en présence de la rhodamine

Nous avons étudié, l'influence de la concentration de rhodamine sur la structure du gel de β lg à 100g/l. Nous avons concentré la rhodamine de 2.5ppm à 50ppm. Les $g(r)$ ont été calculés sur une pile de 6 images pour les zooms 1 et 4 de l'objectif $\times 63$ sans aucun traitement d'image. Les 6 images de chaque zoom sont prises dans différentes zones. Les images de la **Figure II.39** sont celles du zoom 1. Elles sont toutes normalisées à la même intensité moyenne pour permettre une comparaison visuelle.

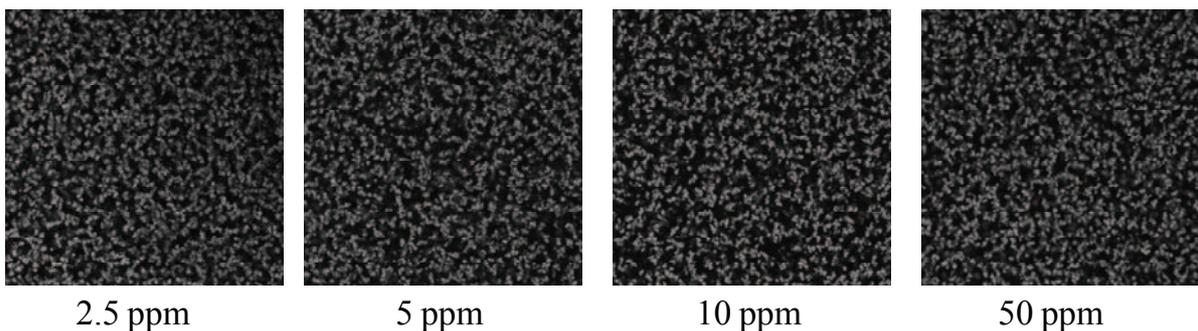


Figure II 39 : Images de gels pour différentes concentrations de rhodamine. Dimension : $158.72\mu\text{m} \times 158.72\mu\text{m}$, intensité moyenne des images $A = 47$.

Les $g(r)$ des systèmes sont présentés sur la **Figure II.40**. Les systèmes ont tous le même profil $g(r)$. De plus, les longueurs de corrélation de tous les systèmes sont identiques. La présence de rhodamine n'influence pas la structure des gels.

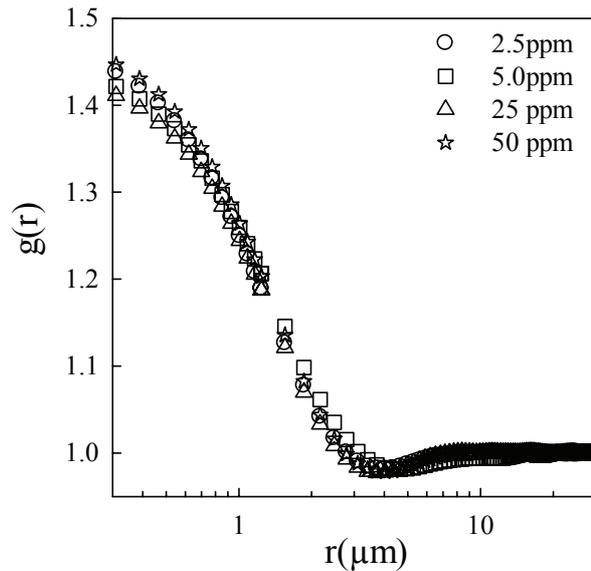


Figure II 40 : Comparaison des $g(r)$ des gels de β lg à 100g/l pour différentes concentrations de rhodamine.

II.1.3.10. Méthode de « box counting »

Cette méthode permet entre autre de déterminer la dimension fractale des gels si certaines conditions sont préalablement bien remplies (voir traitement d'image). La méthode d'analyse par « box-counting » consiste à compter le nombre (N) de boîtes de taille « L » d'intensité non nulle qui recouvre la surface d'une coupe (Dàvila, Toldrà, Sagner, Carretero & Parés, 2007; Mellema, Heesakkers, Van Opheusden & Van Vliet 2000; Pugnaroni, Matia-Merino & Dickinson, 2005). Ensuite, on trace la fonction $N(L)$, en représentation log-log (log pour logarithme décimal). Si le système est homogène à toutes les échelles, jusqu'à la limite définie par la taille de la coupe, $N(L) \sim L^{-2}$, dans le cas fractal, $N(L) \sim L^{1-df}$. La représentation en échelle log-log, permet de calculer df à partir de la valeur de la pente. Cette méthode exige que les images soient binarisées. Pugnaroni et al lorsqu'ils ont étudié la structure de gels, en apparence similaire à ceux que nous étudions, par la méthode de « box-counting », ont choisi pour binariser les images un seuil égal à l'intensité moyenne des images. Tous les pixels d'intensités plus faibles que l'intensité moyenne étaient éteints alors que tous les autres étaient allumés. Le choix de l'intensité moyenne comme seuil pour la binarisation n'a pas été justifié. Or Mellema et al avaient déjà observé que la valeur du seuil affecte celle de la dimension fractale. Nous avons fait la même observation sur quelques uns de nos systèmes (**ako et al**). Nous n'utiliserons donc pas cette méthode pour caractériser nos systèmes en raison de l'influence du seuillage sur les valeurs des dimensions fractales. La **Figure II.41** illustre la méthode de « box-counting ».

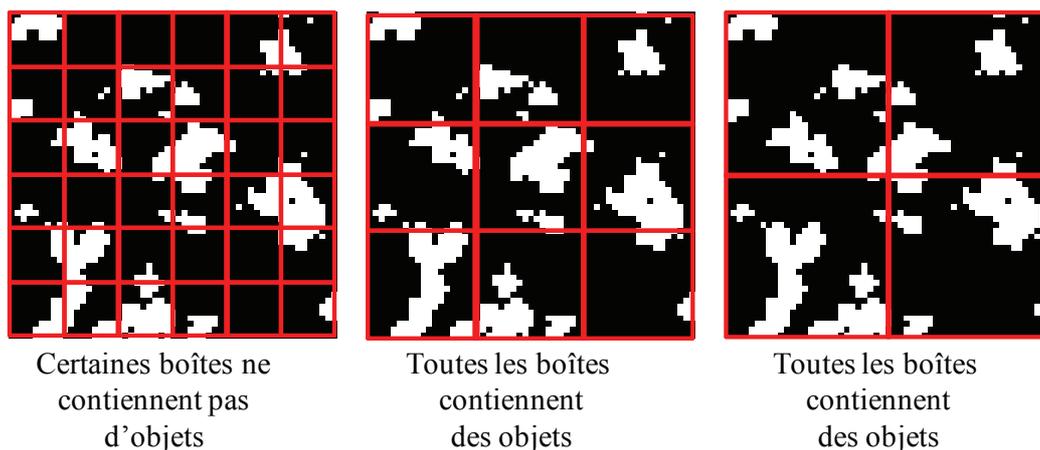


Figure II 41 : Illustration de la méthode de « box-counting » utilisée pour l'analyse de la structure des gels, les domaines blancs représentent les domaines protéiques..

II.1.3.11. Conclusion

La β lg est fourni sous forme de poudre composé en quantité égale du variant génétique A et B et de sel. Elle est dialysée pour la débarrasser des composants minéraux puis lyophilisée pour une meilleure conservation. Pour chaque application, le lyophilisat est solubilisé dans l'eau Mili Q en présence de 200ppm d'anti bactérien puis marqué par la rhodamine à 5ppm. La solution marquée est mise entre lame et lamelle puis scellée par un « GENE FRAME ». Le récipient est placé dans un bain marie sur la face lamelle pour être chauffé jusqu'à la formation du gel. Nous avons vu qu'il n'y a pas d'influence de la rhodamine sur la structure des systèmes par des mesures en spectrophotomètre UV-visible et grâce à la nouvelle méthode d'analyse par la fonction d'autocorrélation ($g(r)$). Cependant, nous avons constaté que 5ppm de rhodamine, provoque une précipitation prématurée des systèmes dont la concentration est inférieure à 5g/l. Nous éviterons donc ces conditions. Toutes les études qui seront réalisées au dessus de 5g/l, contiendront 5ppm de rhodamine. Nous avons considéré que la rhodamine se fixe en proportion égale sur les deux variant génétiques (A et B) même si cela n'a pas été prouvé. L'analyse des images par la méthode de corrélation de paire de pixel ne nécessite aucun traitement préalable des images. Nous allons grâce à cette méthode, étudier la structure des systèmes en fonction du pH, de la force ionique, de la nature du sel, de la concentration en β lg et de la température. Les systèmes seront étudiés à chaud et à froid. Plusieurs diagrammes de phase seront établis à l'issue de ces études. Une partie sera également consacrée à l'étude des propriétés rhéologiques de quelques systèmes.

II.2. Technique de diffusion du rayonnement

Ce paragraphe a pour but d'expliquer brièvement le principe de la diffusion du rayonnement et d'introduire les méthodes et les équations utilisées dans la suite de ce travail. Plusieurs techniques de diffusion du rayonnement complémentaires ont été utilisées, ceci afin d'assurer

une exploration de la structure sur une large gamme d'échelle spatiale : depuis les échelles très locales de quelques nanomètres exploitées par SAXS jusqu'à des échelles de plusieurs centaines de nanomètres avec les techniques de diffusion de la lumière (SLS, DLS et 3D cross corrélation dynamique LS). Une approche plus complète sur la théorie de la diffusion des rayonnements est décrite dans les ouvrages de Berne et Percora (Berne & Percora, 1976), Higgins et Benoît (Higgins & Benoit, 1994), Brown (Brown, 1996). Il existe deux types d'interactions entre rayonnement et matière : l'absorption et la diffusion. Le phénomène de diffusion peut avoir lieu sous trois formes différentes :

- ✓ la diffusion non-élastique où la radiation diffusée n'a pas la même longueur d'onde que la lumière incidente ($\lambda \neq \lambda_0$).
- ✓ la diffusion élastique où la lumière diffusée a la même longueur d'onde que la lumière incidente ($\lambda = \lambda_0$).
- ✓ la diffusion quasi-élastique où la radiation présente, par effet Doppler, une longueur d'onde différente de la source. L'amplitude de cette variation dépend de la vitesse et de la direction du mouvement de chaque particule individuelle.

Pour caractériser les polymères, trois types de radiation sont utilisées :

- ✓ la lumière visible avec une longueur d'onde comprise entre 400 et 700nm
- ✓ les rayons X dont la longueur d'onde est proche de 0.1nm
- ✓ les neutrons dont la longueur d'onde est comprise entre 0.1 et 1nm

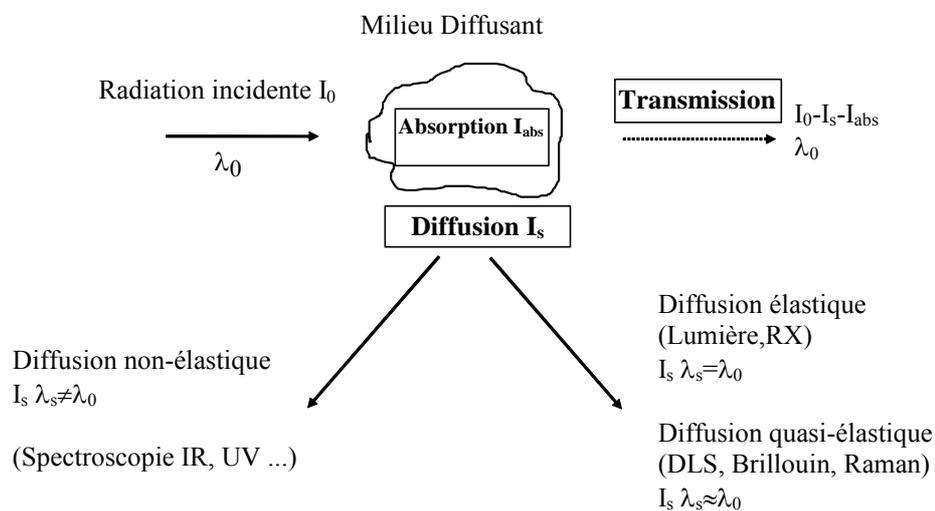


Figure II 42 Les différents types d'interactions entre le rayonnement et la matière

II.2.1. Diffusion statique du rayonnement

II.2.1.1. Principe de la diffusion

Il s'agit d'une méthode d'analyse non destructrice, particulièrement adaptée et fréquemment utilisée pour l'étude des solutions colloïdales et de leur processus d'agrégation.

Les particules en suspension dans l'échantillon diffusent alors les photons dans toutes les directions de l'espace. Le rayonnement diffusé est alors mesuré en fonction de l'angle θ .

Dans le cas de la diffusion de la lumière, l'intensité diffusée est collectée par un photomultiplicateur et est convertie en nombre de photons, puis les données sont traitées par un corrélateur et des programmes d'analyse.

Dans le cas de la diffusion des rayons-X, le rayonnement diffusé est mesuré au niveau d'un détecteur 2D. Les profils d'intensité sont alors obtenus par une moyenne radiale de ce rayonnement en utilisant un programme d'analyse.

A chaque angle θ de mesure on associe un vecteur de diffusion q défini par :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{II. 28}$$

où λ est la longueur d'onde du rayon incident dans le milieu, $\lambda = \lambda_0/n$ avec λ_0 la longueur d'onde du rayon incident.

Pour un liquide pur, les photons diffusés proviennent essentiellement des fluctuations de densité au sein du liquide. Si on ajoute des particules dans ce liquide, il existe également des fluctuations de la concentration des particules au sein du liquide. Ces fluctuations de concentration, qui dépendent des caractéristiques des particules en solution, sont détectées en diffusion du rayonnement.

On définit l'intensité diffusée relative (I_r) comme étant l'intensité mesurée ($I_{\text{mesurée}}$) corrigée par l'intensité diffusée par le solvant (I_{sol}) (fluctuations de densité) divisée par l'intensité diffusée par une référence ($I_{\text{réf}}$) :

$$I_r = \frac{I_{\text{mesuré}} - I_{\text{sol}}}{I_{\text{réf}}} \quad \text{II. 29}$$

L'intensité diffusée relative est donc directement liée aux fluctuations de concentration et elle est donnée par la relation suivante :

$$I_r = \text{KCRT} \left(\frac{\partial \pi}{\partial c} \right)^{-1} S(q) \quad \text{II. 30}$$

- K est une constante, appelée pouvoir de diffusion, qui dépend de l'appareillage utilisé et du pouvoir diffusant de l'échantillon.
- C est la concentration de particules
- R est la constante des gaz parfaits
- T est la température (K)

- $\frac{\partial \pi}{\partial C}$ est la compressibilité osmotique
- $S(q)$ est le facteur de structure de la particule

Aux faibles concentrations, on peut écrire la compressibilité osmotique de la manière suivante :

$$\frac{\partial \pi}{\partial c} = RT \frac{1}{M} (1 + 2A_2 MC + \dots) \quad \text{II. 31}$$

où M est la masse molaire de la particule et A_2 le second coefficient du viriel. S'il n'existe pas d'interactions entre les particules ($A_2 = 0$), on obtient alors :

$$I_r = KCMS(q) \quad \text{II. 32}$$

Le calcul de $S(q)$ nécessite de connaître la fonction de corrélation de paire $g(r)$ de la particule. Ceci n'est possible que dans le cas de particules avec des géométries simples et bien déterminées. Par exemple, dans le cas d'une sphère homogène de rayon R , le facteur de structure est donné par la relation suivante :

$$S(q) = \left(\frac{3(\sin(qR) - qR \cos(qR))}{(qR)^3} \right) \quad \text{II. 33}$$

Le rayon de giration R_g est alors calculé de la manière suivante :

$$R_g^2 = \frac{3}{5} R^2 \quad \text{II. 34}$$

Si le calcul de la fonction de corrélation de paire, et donc celui de $S(q)$, n'est pas possible, des simplifications sont possibles dans certains cas limites, illustrés sur la **Figure II.43**.

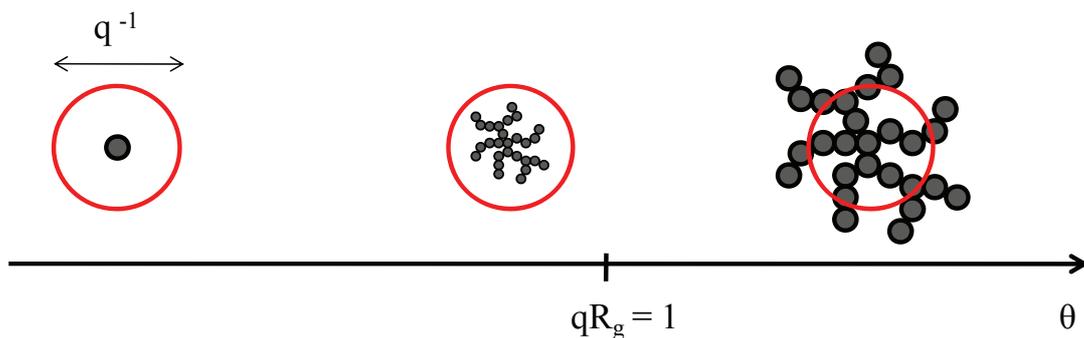


Figure II 43 Schématisation de l'échelle spatiale sondée en fonction de q et de la taille des particules ou des agrégats considérés

- si $qR_g < 1$, on obtient, grâce à des développements limités, la relation suivante :

$$S(q) = 1 - \frac{q^2 R_g^2}{3} \quad \text{II. 35}$$

- si $qR_g \gg 1$, dans le cas d'objets auto-similaires, $S(q)$ suit une loi de puissance de la forme :

$$S(q) \propto (q)^{-D_f} \quad \text{II. 36}$$

où D_f est la dimension fractale des agrégats, qui relie la masse et le rayon de giration des agrégats :

$$M \propto (R_g)^{D_f} \quad \text{II. 37}$$

Dans le cas de particules polydisperses (mais avec des particules de même contraste), on détermine une masse moyenne en poids :

$$M_w = \frac{\sum_i M_i C(M_i)}{\sum_i C(M_i)} \quad \text{II. 38}$$

et un rayon de giration moyen en z :

$$R_{gz}^2 = \frac{\sum_i R_{gi}^2 M_i C(M_i)}{\sum_i M_i C(M_i)} \quad \text{II. 39}$$

Dans le cas de solutions concentrées, on peut également utiliser les **équations** II.32. et II.36., mais on détermine alors une masse apparente M_a ($M = M_a$) et un rayon apparent R_a ($R_{gz} = R_a$) ou une longueur de corrélation ξ ($\xi = R_a/\sqrt{3}$). Le facteur de structure prend alors en compte les interactions entre les particules. Si la diffusion de la lumière et des rayons-X sont comparables dans leur principe, leurs diffusions ne résultent pas du même type d'interaction entre l'onde et la matière. En lumière, c'est la différence entre l'indice de réfraction du solvant et celui du soluté qui est responsable du contraste tandis qu'en diffusion des rayons-X, le contraste est dû à la différence de densité électronique entre le solvant et le soluté.

II.2.1.2. Diffusion statique de la lumière

Pour la lumière visible le contraste (K) est déterminé par la polarisabilité et peut être exprimé en fonction de l'incrément de l'indice de réfraction :

$$K = \frac{4\pi^2 n^2}{\lambda^4 N_a} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \left(\frac{n_{ref}}{n} \right)^2 \frac{1}{R_{ref}} \quad \text{II. 40}$$

avec :

- $n_{\text{réf}}$ est l'indice de réfraction de la référence
- n est l'indice de réfraction du solvant
- $\frac{\partial n}{\partial C}$ est l'incrément d'indice de réfraction
- N_a est le nombre d'Avogadro
- $R_{\text{réf}}$ est le rapport de Rayleigh de la référence

La référence utilisée est le toluène. La diffusion de lumière classique exige que les échantillons observés soient transparents (absence de diffusion multiple). Dans le cas des échantillons turbides, une autre technique spécifique a été utilisée : la diffusion de la lumière par cross corrélation dynamique.

II.2.1.3. Diffusion des rayons X aux petits angles : SAXS

Les rayons X sont des radiations électromagnétiques de haute énergie. Sous un flux de rayons X tous les électrons d'un atome vont osciller et émettre des rayons X en retour. La diffusion des rayons X est isotrope, la longueur de diffusion (b) d'un atome est directement proportionnelle au nombre d'électrons que celui-ci possède.

La définition du pouvoir diffusant des particules est donc différente pour la diffusion de la lumière et la diffusion des rayons-X :

$$\left(\frac{\partial b}{\partial c}\right)_p = \frac{b_x N_a (v_0 z_s - v_s z_0)}{v_0 M_m} \quad \text{II. 41}$$

- v : volume molaire (indice 0 pour solvant et s pour les solutés)
- z : nombre total d'électrons par molécule (indice 0 pour solvant et s pour les solutés)
- M_m : masse molaire des monomères constituant la particule de soluté
- $b_x = 0.282 \cdot 10^{-12} \text{cm}$

Le contraste (K_x) s'écrit donc de la façon suivante :

$$K_x = \frac{1}{N_a} \left(\frac{\partial b}{\partial c}\right)^2 = \left[\frac{0.22(v_0 z_s - v_s z_0)}{v_0 M_m}\right]^2 \quad \text{II. 42}$$

Si les mesures en SAXS sont comparables aux mesures en lumière dans leur principe, elles permettent d'explorer les structures avec des vecteurs d'onde (q) plus grands, donc sur des échelles spatiales plus petites ($0.1 < q^{-1} < 100 \text{nm}$) que celles accessibles en LS.

II.2.2. Diffusion dynamique de la lumière

Nous avons jusqu'à présent étudié la moyenne temporelle de l'intensité diffusée. En diffusion dynamique on s'intéresse aux fluctuations de l'intensité diffusée autour de sa valeur moyenne,

liées aux fluctuations de densité et de concentration des particules en solution. L'importance de ces fluctuations est fonction de l'échelle spatiale d'observation q^{-1} . La description donnée ici restera très générale, pour obtenir des informations plus détaillées, se référer à l'ouvrage de Brown.

Expérimentalement, on mesure, grâce à un corrélateur, la fonction d'auto-corrélation temporelle de l'intensité diffusée $G_2(t)$. Cette fonction d'auto-corrélation de l'intensité diffusée permet d'appréhender la dynamique du système. En effet, elle nous renseigne sur la dynamique des centres diffusants en mesurant la corrélation moyenne de l'intensité diffusée entre les instant t et $t+\Delta t$.

$$G_2(t) = \langle I(t).I(t + \Delta t) \rangle$$

II. 43

Si pendant le temps Δt , et à une échelle d'observation q^{-1} , la configuration de la solution a été peu modifiée, la corrélation entre deux instants est encore importante. Si, par contre, les mouvements observables à q^{-1} sont très rapides pendant le Δt choisi, la corrélation devient minimale.

Pour $\Delta t=0$, $G_2(0)$ est maximale et est égale à la moyenne de l'intensité diffusée au carrée, $\langle I(t)^2 \rangle$. Pour $\Delta t \rightarrow \infty$, les intensités diffusées aux instants t et $t+\Delta t$ deviennent indépendantes, $G_2(\infty)$ est minimale et est égale au carré de l'intensité moyenne diffusée $\langle I(t) \rangle^2$.

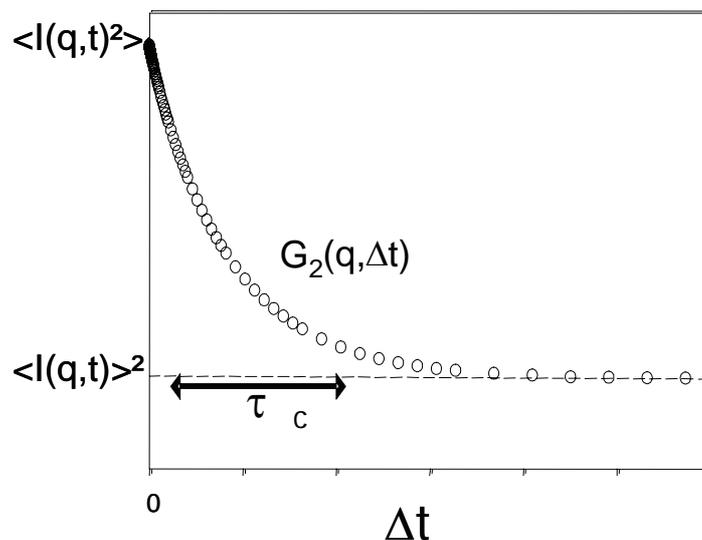


Figure II 44 Evolution schématique de la fonction $G_2(\Delta t)$

La relaxation de $G_2(\Delta t)$ en fonction de Δt peut être caractérisée par un temps de corrélation caractéristique, τ_c , tel que pour $\Delta t \gg \tau_c$ $G_2(\Delta t)$ est très proche de sa valeur asymptotique. τ_c nous apporte des renseignements sur la dynamique de la solution à l'échelle spatiale q^{-1} .

Mais on ne peut pas relier directement les fluctuations de l'intensité aux mouvements des unités de diffusion ; ces dernières sont reliées aux fluctuations du champ électrique diffusé, et donc à la fonction d'auto-corrélation du champ électrique $G_1(\Delta t)$. La relation de Siegert relie

$G_1(\Delta t)$ et $G_2(\Delta t)$ dans le cas où la distribution des fluctuations de l'intensité est gaussienne autour de sa valeur moyenne :

$$G_2(\Delta t) = (G_1(0))^2 + (G_1(\Delta t))^2 = \langle I(q) \rangle^2 + G_1(\Delta t) \quad \text{II. 44}$$

Par souci de clarté, nous utiliserons la notation t en remplacement de Δt . Notons $g_1(q,t)$ et $g_2(q,t)$ les fonctions normalisées de $G_1(q, t)$ et $G_2(q,t)$ respectivement :

$$g_1(t) = \frac{G_1(t)}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{et} \quad g_2(t) = \frac{G_2(t)}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{II. 45}$$

La relation de Siegert devient alors :

$$g_2(t) = 1 + \beta |g_1(t)|^2 \quad \text{II. 46}$$

où β est un facteur compris entre 0 et 1 qui tient compte de la détection non-idéal et dépend de l'appareil utilisé. Si l'on néglige la contribution du solvant à l'intensité diffusée, cette contribution relaxant d'ailleurs beaucoup plus vite que les fluctuations de concentration, $g_1(q,t)$ n'est fonction que de la dynamique du soluté dans la fenêtre de temps mesurée par le corrélateur (10^{-6} à 10 secondes environ). Pour définir un temps de corrélation caractéristique pour la fonction $g_1(q,t)$, on utilise en général :

- une moyenne arithmétique $\langle \tau \rangle$ définie par:

$$\langle \tau \rangle = \int_0^{\infty} |g_1(t)| dt \quad \text{II. 47}$$

- une moyenne harmonique $\langle 1/\tau \rangle$

$$\langle 1/\tau \rangle = -\frac{\partial}{\partial t} (\ln |g_1(t)|)_{t \rightarrow 0} \quad \text{II. 48}$$

Pour des particules diluées monodisperses et pour $qRg \ll 1$, la fonction de corrélation $g_1(q, t)$, est définie par une simple exponentielle avec un temps caractéristique τ :

$$|g_1(q, t)| = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{II. 49}$$

Dans ce cas, le temps de relaxation τ peut être relié au coefficient de diffusion mutuel D_0 par la relation suivante :

$$\tau = \frac{1}{D_0 q^2} \quad \text{II. 50}$$

On remarquera que dans le cas de petites molécules monodispersées :

$$\langle \tau \rangle = \langle 1/\tau \rangle^{-1} \quad \text{II. 51}$$

Le rayon hydrodynamique R_h associé aux molécules est défini comme le rayon de la sphère dure équivalente ayant le même coefficient de diffusion mutuelle D_0 . R_h est donné par la formule de Stokes-Einstein :

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_0} \quad \text{II. 52}$$

où k est la constante de Boltzmann et η la viscosité de la solution.

Pour des particules diluées monodisperses et pour $qR_g \gg 1$, la relaxation de g_1 provient non seulement de la diffusion translationnelle, mais aussi de la diffusion rotationnelle et de la flexibilité de la particule. On peut également utiliser les **équations** II.47. et II.48., mais on détermine alors un coefficient de diffusion apparent D_{app} supérieur à D_0 .

Pour des particules diluées polydisperses la fonction de corrélation $g_1(q,t)$, est définie par une somme d'exponentielles :

$$|g_1(q,t)| = \frac{\sum_i M_i^2 N_i \exp(-D_i q^2 t)}{\sum_i M_i^2 N_i} \quad \text{II. 53}$$

avec N_i nombre de molécules de masse M_i et de coefficient de diffusion D_i .

Dans ce cas, les fonctions de corrélation expérimentales peuvent être décrites par une distribution de temps de relaxation :

$$g_1 = \int A(\tau) \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) d\tau \quad \text{II. 54}$$

Notons que pour $qR_g > 1$, l'analyse devient très complexe, car les modes internes vont influencer la fonction de distribution des temps de relaxation.

Des programmes d'analyse existent pour traiter ce type de résultats et déterminer $A(\tau)$.

- Le programme REPES effectue la transformée de Laplace inverse de la fonction $g_2(t)$, sans présupposer de forme pour $A(\tau)$. Le principe de l'ajustement s'écrit :

$$g_2(q,t) - 1 = \beta \left[\int A(\tau) \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) d\tau \right]^2 \quad \text{II. 55}$$

avec $A(\tau)$ la distribution des temps de relaxation. Cette méthode présente toutefois un inconvénient : des données légèrement bruitées peuvent conduire à une grande incertitude sur

la distribution. Pour diminuer les effets du bruit, la distribution peut être lissée par un paramètre de régularisation (prob); cependant des distributions larges peuvent être représentées par plusieurs pics.

- Le programme GEX permet d'ajuster les distributions larges et continues de temps de relaxation que REPES a tendance à découper en plusieurs pics. Son expression est la suivante :

$$A(\Gamma) = \frac{|s| \tau^{p-1} \tau_a^{-p} \exp\left(-\left(\frac{\tau}{\tau_a}\right)^s\right)}{\Gamma\left(\frac{p}{s}\right)} \quad \text{II. 56}$$

où p , s et τ_a sont des paramètres ajustables, τ_a détermine la position de la distribution sur l'axe des temps de relaxation, p et s déterminent la largeur de la distribution et l'asymétrie de la courbe. Γ représente la fonction gamma.

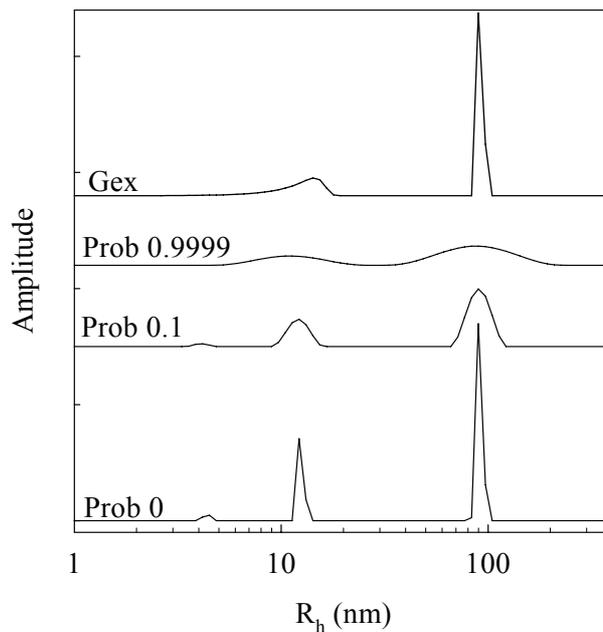


Figure II 45 : Exemple de distributions obtenues par différents programmes (REPES ou GEX) et différents paramètres d'analyse

L'analyse des données de diffusion de la lumière dynamique nécessite un soin particulier car différentes distributions peuvent correspondre approximativement à une même fonction d'auto-corrélation. Le choix des paramètres d'analyse pour les programmes REPES et GEX peut conduire à des distributions de formes différentes, comme le montre la **Figure II.45**.

II.2.3. Diffusion statique de la lumière en milieu turbide (3DLS)

La diffusion de la lumière classique nécessite l'absence de diffusion multiple au sein des échantillons : les photons collectés par le détecteur n'ont été diffusés que par une seule particule. S'il existe de la diffusion multiple, l'interprétation des résultats devient difficile, voire impossible car l'intensité diffusée perd sa relation avec le vecteur d'onde initial. L'objectif de cette méthode consiste à mesurer la contribution de la diffusion multiple par corrélation croisée, afin de déterminer la fraction de lumière diffusée une seule fois (Urban, 1999; Urban & Schurtenberger, 1998).

Les concepts physiques et les théories de ces techniques classiques ($S(q)$, R_a , M_a , R_h ...) qui permettent de lier l'intensité diffusée (diffusion simple) à la structure des systèmes, restent donc parfaitement valables pour le traitement de l'intensité diffusée mesurée en 3DLS, une fois la diffusion multiple soustraite et la correction pour la turbidité de l'échantillon prise en compte.

Dans le cas des systèmes transparents, on a une simple diffusion des photons : ce qui signifie que les photons issus directement de la source laser et qui rencontrent une particule diffusante sont diffusés une seule fois par cette particule avant d'atteindre le photomultiplicateur (PM) qui les compte.

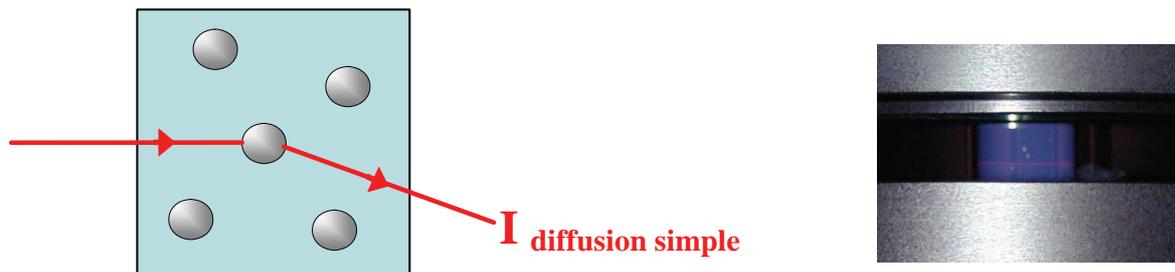


Figure II 46 : Diffusion simple de la lumière dans le cas des systèmes transparents

L'intensité totale mesurée à chaque vecteur d'onde q est donc issue de la diffusion simple de chaque particule et va ainsi permettre la mesure des caractéristiques structurales des particules par les méthodes décrites précédemment pour la SLS et la DLS.

Dans le cas des systèmes turbides, en plus de la diffusion simple, une partie des photons sont diffusés de manière multiple et vont rencontrer plusieurs particules à la manière d'un jeu de billard.

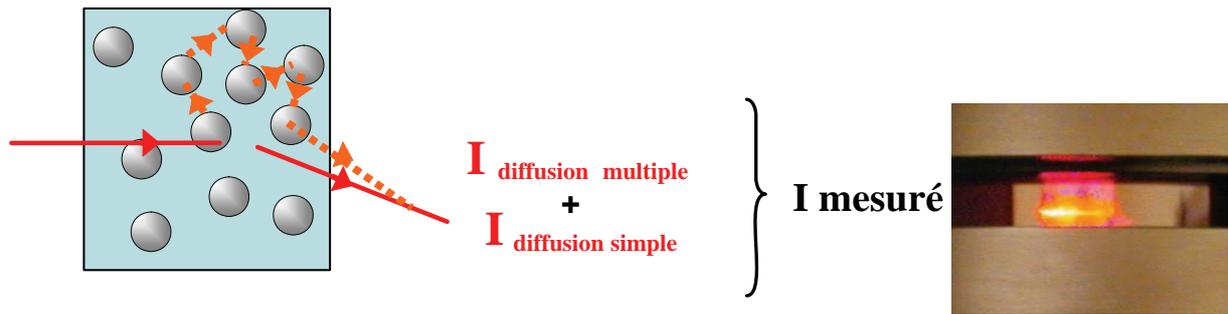


Figure II 47 : Diffusion multiple de la lumière dans le cas des systèmes turbides. La couronne autour du faisceau sur la photo correspond à ce phénomène.

Il en résulte que l'intensité diffusée totale, qui est mesurée directement au niveau du PM correspond à la somme des 2 contributions :

$$I_{\text{mesurée}}(q) = I_{\text{diffusion simple}}(q) + I_{\text{diffusion multiple}}(q) \quad \text{II. 57}$$

Afin d'analyser correctement l'intensité diffusée par les systèmes turbides et d'obtenir la masse molaire apparente M_a et la longueur de corrélation R_a , il faut soustraire la part de diffusion multiple de l'intensité diffusée totale.

Cette opération peut être effectuée en utilisant une nouvelle technique de diffusion de la lumière, la diffusion en corrélation croisée 3D (3DLS). Cette technique est fondée sur la diffusion de 2 sources cohérentes entre elles, dont la corrélation croisée va permettre d'évaluer, puis de soustraire la part de la diffusion multiple dans l'intensité totale, pour finalement récupérer la part de la lumière diffusée simplement une fois. La corrélation croisée 3D est donc une technique mélangeant la diffusion statique classique (SLS) avec la diffusion dynamique (DLS) en corrélation croisée.

Pour cela, on réalise deux expériences simultanées de diffusion de la lumière sur le même volume de diffusion et au même vecteur d'onde grâce à deux sources laser différentes, et on enregistre l'intensité diffusée grâce à deux détecteurs différents. On corrèle alors les signaux reçus par les deux détecteurs, par l'intermédiaire de la fonction de corrélation croisée $G_{1,2}$:

$$G_{1,2} = \langle I_1(t) I_2(t + \Delta t) \rangle \quad \text{II. 58}$$

Dans le cas d'une diffusion simple, les fonctions d'auto-corrélation et de corrélation croisée fournissent les mêmes informations. En cas de diffusion multiple, seule la diffusion simple est corrélée sur les deux détecteurs ; la lumière diffusée de façon multiple provoque des fluctuations non corrélées qui contribuent au bruit de fond et qui résultent en une diminution de l'intercepte de la fonction de corrélation croisée. Il est donc possible, dans le cas d'échantillons turbides, de corriger l'intensité relative mesurée $I_{\text{mesurée}}$, afin de soustraire la contribution de la lumière diffusée de façon multiple.

$I_{\text{mesurée}}$ est corrigée par la fraction de photons diffusée une seule fois (F_s) ; pour cela, on compare l'intercepte de la fonction de corrélation croisée de l'échantillon étudié (B) avec celui d'un échantillon transparent (B_0). F_s est calculée grâce à la relation suivante:

$$F_s = \left(\frac{B}{B_0} \right)^{0.5} \quad \text{II. 59}$$

• $I_{\text{mesurée}}$ est également corrigée par la transmission (T_r), calculée de la manière suivante:

$$T_r = \exp(-\tau_\lambda L) \quad \text{II. 60}$$

- τ_λ : turbidité à la longueur d'onde λ
- L : épaisseur de la cuve

Après ces corrections, on obtient :

$$I_{\text{corrigée}} = \frac{I_{\text{mesurée}} F_s}{T_r} \quad \text{II. 61}$$

II.2.4. Caractéristiques des appareillages utilisés

II.2.4.1. Diffusion de la lumière classique

L'appareillage utilisé est décrit sur la **Figure II.48**. Les expériences ont été réalisées sur un système ALV couplé à un laser solide (Millenia, Spectra Physics) polarisé verticalement avec une longueur d'onde fixe de 532 nm.

Le photomultiplicateur transforme le faisceau diffusé en impulsions électriques d'amplitude et de durée directement utilisables par l'analyseur. La corrélation de photons est assurée par un corrélateur digital ALV-5000/E multitau. On obtient alors la fonction d'auto-corrélation de l'intensité $G_2(t)$ et on déduit, grâce à la relation de Siegert, la fonction d'auto-corrélation normalisée du champ électrique $g_1(t)$.

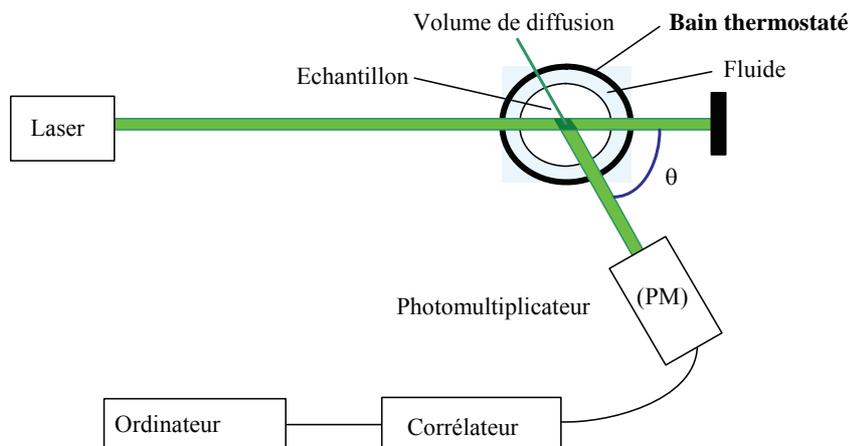


Figure II 48 : Principe schématique d'une expérience de diffusion de la lumière

Les mesures sont effectuées sur une gamme d'angles allant de 10° à 140° , ce qui correspond à des valeurs de q allant de $2.7 \cdot 10^{-3}$ à $3 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ (soit à une échelle spatiale (q^{-1}) de 35 à 370 nm). Un bain thermostaté permet de régler la température entre 10°C et 80°C . Le fluide entourant la cellule de diffusion peut être la décaline ou l'huile de silicone. Le corrélateur permet de sonder une échelle temporelle comprise entre $0.2\mu\text{s}$ et quelques dizaines de secondes.

II.2.4.2. Diffusion de la lumière en milieu turbide

L'appareil utilisé est une version commerciale de l'instrument de corrélation croisée 3D (LS Instruments, Fribourg), dont un schéma est représenté sur la **Figure 49**. La longueur d'onde du laser est de 685 nm. Les mesures sont réalisées à des angles allant de 10° à 140° , soit des valeurs de q de $3 \cdot 10^{-3}$ à $3 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$. La corrélation de photons est réalisée, comme la diffusion de la lumière classique, par un corrélateur digital ALV-5000E.

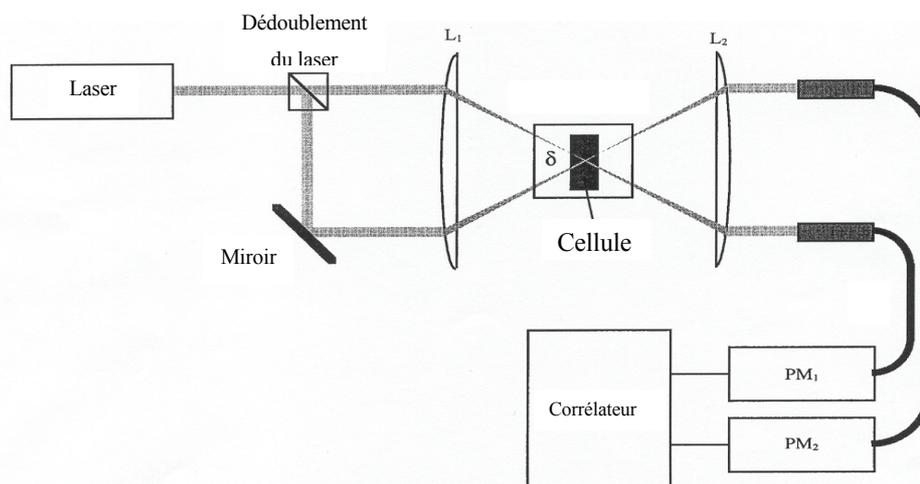


Figure II 49 Principe de fonctionnement d'un appareil de diffusion de la lumière à corrélation croisée

II.2.4.3. Diffusion des rayons X aux petits angles : SAXS

Les mesures de SAXS ont été réalisées dans le laboratoire de physique de l'état condensé de l'université du Maine sur un dispositif commercialisé par Rigaku[©]. L'appareil est équipé d'un générateur de rayons X (Rigaku-UltraX18) avec un tube en anode de cuivre connecté à un système optique confocal multicouche Max-Flux[®] d'Osmic[©] et de trois pinholes d'un diamètre de $300\mu\text{m}$, le tout sous vide à 10^{-5} bars. La source est un faisceau dont le rapport (K_β/K_α) de monochromaticité entre les raies alpha et bêta du cuivre est de 10^{-4} avec une longueur d'onde égale à 1.54 \AA . L'intensité diffusée est enregistrée par détecteur « André Gabriel » placé à 1.5m des échantillons. Le temps d'acquisition des données varie de 1000s à

10000s. Les échantillons ont été mis dans des capillaires borosilicatés (Hilgenberg GmbH[®]) de diamètre 1.5mm avec une épaisseur de 10µm puis scellés pour résister au vide. Les mêmes équations théoriques que celle de la diffusion de la lumière sont utilisables en SAXS.

II.2.5. Turbidimétrie

La turbidimétrie est une technique très proche de celles utilisées en diffusion du rayonnement qui sont décrites plus haut, puisqu'elle est fondée sur la mesure des photons non transmis suite à un phénomène de diffusion ou d'absorption au contact de particules. Cette technique est beaucoup plus simple d'usage que les techniques classiques de diffusion du rayonnement (SLS, SAXS) et permet dans certains cas, de relier la valeur de turbidité λ à la structure des systèmes via leur facteur de structure $S(q)$.

II.2.5.1. Théorie de la turbidimétrie

Dans notre cas, la détermination de la turbidité des solutions a été faite dans une gamme de longueurs d'ondes λ éloignées de la zone d'absorption. Seul le phénomène de diffusion des photons incidents est donc à l'origine de la turbidité du milieu.

La mesure de la turbidité (τ) du milieu correspond à la détermination de la quantité de photons « perdus » par unité de longueur lors du passage rectiligne de la lumière incidente à travers un échantillon turbide. Pour un échantillon isotrope la turbidité est ainsi directement exprimable par :

$$\tau = \ln\left(\frac{I_0}{I_{tr}}\right) \frac{1}{L} \quad \text{II. 62}$$

- I_0 : intensité incidente du laser
- I_{tr} : intensité transmise correspondant à l'intensité mesurée par le détecteur spectrophotométrique
- L : trajet optique de la radiation incidente dans l'échantillon turbide (cm).

La turbidité (τ) peut ainsi être directement reliée au facteur de structure $S(q)$ et aux paramètres de taille des systèmes par l'équation.II.63 :

$$\tau = HCM \int_0^{2\pi} \int_{\alpha} S(q, R) (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta. d\theta. d\phi \quad \text{II. 63}$$

avec α : angle d'acceptance de l'appareil (dans le cas idéal $\alpha=0$) et H : constante d'appareil

$$H = \frac{4\pi^2 n^2}{\lambda^4 N_a} \left(\frac{\delta n}{\delta C}\right)^2 = K \left(\frac{n}{n_{ref}}\right)^2 R_{ref} \quad \text{II. 64}$$

- K ; constante de contraste utilisée en diffusion de la lumière
- n_{ref} : indice de réfraction de la référence

- N_a : nombre d'Avogadro
- $R_{réf}$: rapport de Rayleigh de la référence
- n : indice de réfraction du milieu et son incrément avec la concentration ($\partial n/\partial C$) qui dépendent tous les deux de la longueur d'onde λ du rayon incident.

Expérimentalement, la turbidité est obtenue indirectement à partir des valeurs de transmittance (T_r) ou d'absorbance (A) du milieu qui sont les paramètres directement mesurables avec un spectrophotomètre :

$$T_r = \frac{I_{tr}}{I_0} = 10^{-A} \quad \text{II. 65}$$

Le spectrophotomètre a une réponse linéaire sur une gamme d'absorbance comprise entre 0.2 et 3.5 à 280 nm. Nous avons donc fait varier la taille de la cuve (entre 1 et 10mm), c'est à dire le chemin optique afin de rester dans cette gamme où le signal reçu est cohérent avec l'intensité incidente.

II.2.5.2. Appareillage expérimental

Les mesures de turbidité ont été effectuées avec un Spectrophotomètre UV Cary 50, (Varian, France) muni d'une cellule chauffante à circulation d'eau (cellule 1×1 Cary, France) pilotée par ordinateur. Les cuves utilisées étaient des cellules rectangulaires en verre et en quartz (type Glass et QS Hellma, France) de différents trajets optiques : $L= 1, 0.5, 0.2, 0.1$ cm. Généralement la turbidité (τ) des systèmes a été mesurée à une seule longueur d'onde $\lambda=685\text{nm}$ ou 680nm ; quelques balayages en λ ont également été effectués sur la gamme : $230\text{nm} < \lambda < 1100\text{nm}$.

Résultats et Discussions

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Etude de la gélification à chaud de la bêta-lactoglobuline

III.1.1. Introduction

A une concentration 100g/l de β lg, une solution de β lg gélifie sans qu'on y ajoute du sel et pour tous les pH. C'est pour cette raison que nous avons choisi cette concentration pour étudier la gélification de la β lg et caractériser la structure des gels en fonction des variables : force ionique (NaCl) et pH. Nous allons suivre l'évolution de la turbidité en fonction de ces dites variables puis à l'aide de la fonction exponentielle étirée qui permet de décrire la fonction de corrélation de paire des pixels, extraire les paramètres structuraux caractéristiques des gels : le contraste et la longueur de corrélation. Nous comparerons également les résultats obtenus avec ceux de la diffusion de lumière et de la turbidimétrie classique afin de décrire complètement la structure des gels, depuis quelques dizaines de nm jusqu'au micron. Cette première partie sera suivie de l'étude en fonction de la concentration de protéine. Cette étude permettra entre autre d'établir des diagrammes de phases complets en fonction de la force ionique et de la concentration de protéine.

III.1.2. Etude des systèmes à 100g/l de β lg

III.1.2.1. Etude en fonction de la force ionique à pH7

III.1.2.1.1. Evolution de la turbidité des gels

La turbidité des gels augmente avec la force ionique comme le montre la **Figure III.1**. Les turbidités en MCBL ont été mesurées selon la méthode présentée dans le chapitre II. Les résultats du spectrophotomètre (symbole \circ) peuvent directement être comparés à ceux du MCBL (symbole \square) comme l'indique la **Figure III.2**. L'augmentation de l'hétérogénéité entraîne celle de la turbidité. L'évolution de la turbidité en fonction de la force ionique par spectrophotométrie a été obtenue à 540nm. Cette évolution est forte entre 0.05M et 0.2M. A 0.05M (NaCl) les échantillons sont transparents et très opaques à 0.2M. L'intervalle de forces ioniques où la comparaison entre les deux techniques est possible est très restreint. La combinaison des deux techniques permet de mesurer la turbidité des systèmes sur une large gamme de force ionique (Ako, Durand, Nicolai & Becu, 2009a).

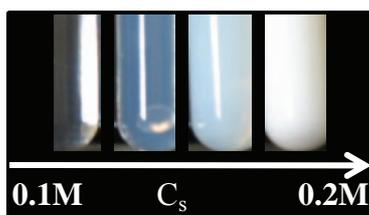


Figure III. 1 : Illustration de l'apparence des gels en fonction de l'augmentation de la force ionique

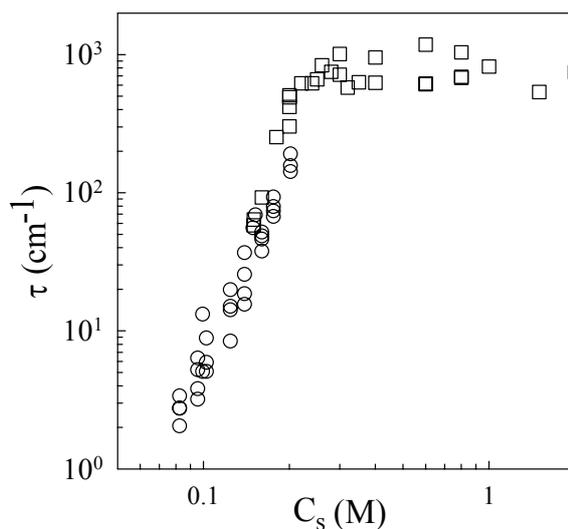


Figure III. 2 : Dépendance de la turbidité en fonction de la concentration de NaCl (\circ = spectrophotomètre et \square = MCBL)

III.1.2.1.2. Evolution du rapport des densités locales (D/d)

Parmi les échantillons dont la turbidité a été mesurée en MCBL, certains ne sont pas caractérisables par le MCBL parce qu'ils sont homogènes à l'échelle des objectifs utilisés. Lorsque le rapport D/d est plus faible que 2, les systèmes sont considérés comme homogènes, c'est le cas des échantillons à forces ioniques plus faibles que 0.20M. Les **Figures III.3** et **III.4** montrent respectivement les images et l'évolution du rapport des densités locales en fonction de la concentration de NaCl.

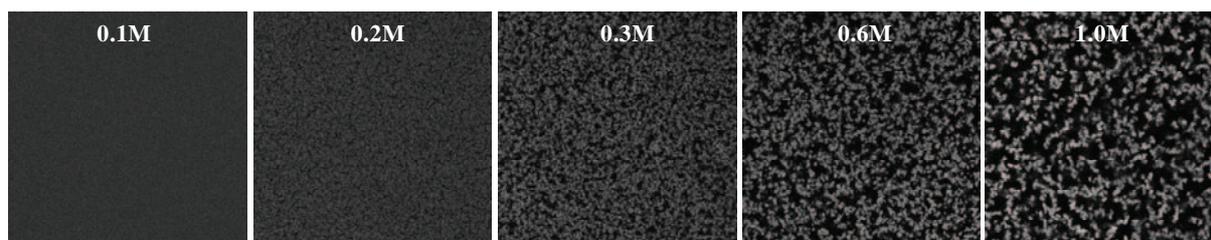


Figure III. 3 : Images confocales de gels en fonction de la concentration de NaCl. Taille des images $160\mu\text{m} \times 160\mu\text{m}$

Les images sont homogènes en dessous de 0.2M et deviennent hétérogènes lorsque la force ionique augmente. Des domaines apparaissent et sont légèrement visibles à 0.2M, ces domaines évoluent en intensité avec l'augmentation de la force ionique, indiquant que les domaines deviennent de plus en plus riches en protéine. A 0.20M, D/d monte brutalement puis évolue vers une stabilisation aux environs de 0.60M. L'évolution du rapport D/d exprime l'augmentation de la turbidité des systèmes en fonction de la force ionique.

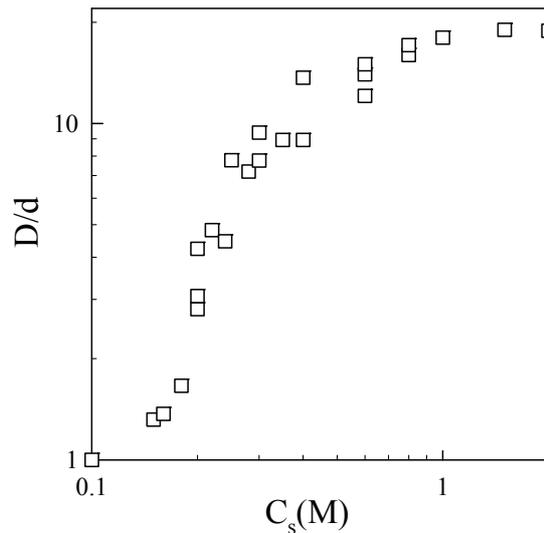


Figure III. 4 : Dépendance du rapport des densités locales en fonction de la force ionique

La **Figure III.5** montre les concentrations des domaines basées sur les résultats du rapport D/d.

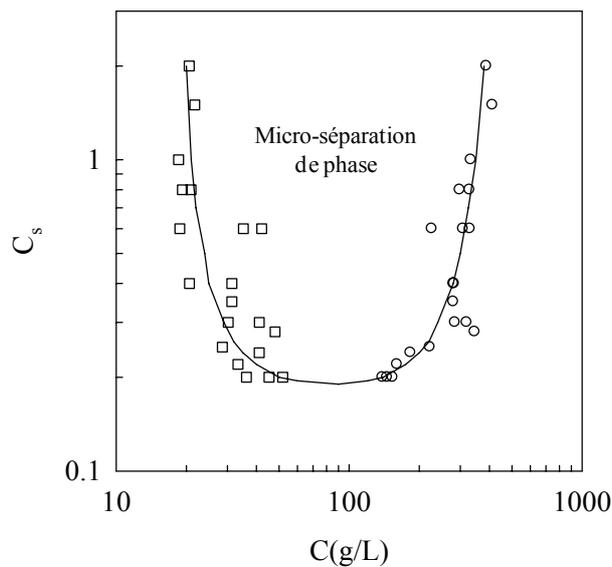


Figure III. 5 : Evolution des concentrations des phases en fonction de la force ionique pour 100g/l de protéine (domaines riches en protéines (cercle) et domaines pauvres en protéines (carré)). La courbe pleine est un guide.

Au dessus de 0.2M on observe la micro-séparation de phase. L'évolution des concentrations des domaines (riches et pauvres) est très faible lorsque la concentration en sel dépasse 0.3M. Elle varie de 300g/l à 400g/l pour les domaines riches et de 30g/l à 20g/l pour les domaines pauvres. L'étude de la diffusion de particules a montré que les domaines pauvres sont liquides.

III.1.2.2. Etude de la structure des gels à 100g/l de β lg

Pour l'étude de la structure nous avons déterminé la fonction de corrélation de paire des pixels et son ajustement par une fonction exponentielle étirée pour déduire les paramètres caractéristiques de la structure comme indiqué dans le chapitre précédent (Ako et al., 2009a; Ako, Nicolai, Durand & Brotons, 2009b).

III.1.2.2.1. Evolution du $g(r)$ pour les différentes forces ioniques

Le $g(r)$ du système à 0.15M est égal à l'unité sur toute la distance explorée. Ce résultat traduit le fait que ce système est homogène à l'échelle d'observation du confocal. Au fur et à mesure qu'augmente la force ionique, le $g(r)$ décroît à partir d'une valeur maximale (contraste) correspondant à B_1 , jusqu'à l'unité. La décroissance à partir de $0.3\mu\text{m}$ (résolution maximale de l'appareil) est d'abord lente sur une courte distance traduisant des objets localement homogènes ensuite brutale au-delà de cette distance. La taille (ξ) des objets est obtenue après ajustement des résultats expérimentaux par la fonction exponentielle étirée de l'équation III.1

$$g(r) = B_1 \times \exp\left[-\left(\frac{r}{\xi}\right)^\beta\right] + 1 \quad \text{III. 1}$$

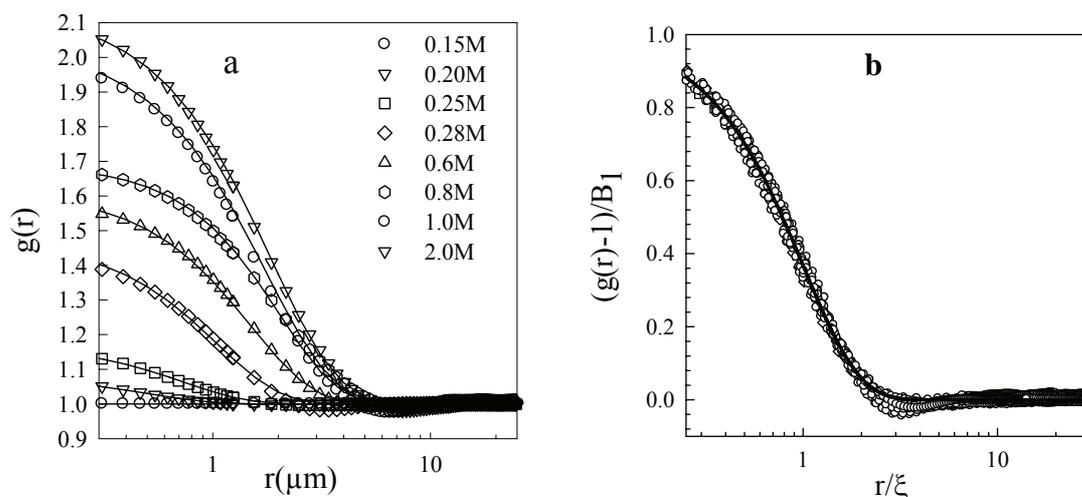


Figure III. 6 : Représentation semi-log de l'évolution du $g(r)$ pour différentes forces ioniques (a) et superposition de toutes les évolutions sur une courbe maîtresse (b). Les courbes continues correspondent à l'ajustement avec la même valeur d'étirement $\beta = 1.5$.

III.1.2.2.2. Evolution de B_1 et de σ_r^2

La **Figure III.7** montre que B_1 et l'écart type relatif augmentent en fonction de la force ionique. A faible force ionique, la valeur de σ_r^2 est proche de celle d'une solution de rhodamine et sa valeur est sensible aux fluctuations aléatoires des intensités des pixels. B_1 est moins sensible à cette fluctuation et son évolution stagne à faible force ionique. L'évolution de l'écart type traduit l'évolution de l'hétérogénéité des systèmes. Lorsque la force ionique est supérieure à 0.2M, l'amplitude des fluctuations de concentration et l'écart type relatif sont identiques. L'évolution de ces deux paramètres est rapide au début puis s'amortit pour une concentration supérieure à 0.3M.

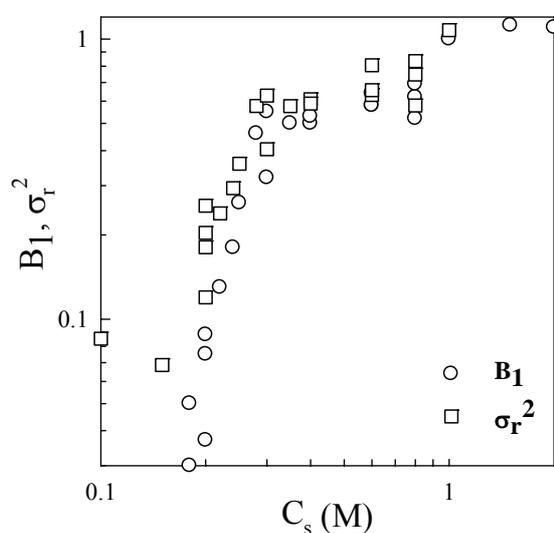


Figure III. 7 : Dépendance de B_1 et σ_r^2 en fonction de la force ionique

III.1.2.2.3. Comparaison avec la diffusion de lumière

Avec la diffusion de lumière, la masse molaire apparente des objets peut être déterminée lorsqu'on connaît l'expression du facteur de structure $S(q)$. Le facteur de structure est la Transformée de Fourier de la fonction de corrélation de paire $g(r)$. On peut alors calculer la masse apparente des systèmes par l'expression suivante :

$$\int (g(r)-1)4\pi r^2 dr = \frac{M_a}{N_a C} \quad \text{III. 2}$$

D'où

$$M_a = \frac{8\pi}{3} C N_a B_1 \xi^3$$

III. 3

pour $C_s > 0.2M$

Avec N_a le nombre d'Avogadro et C la concentration moyenne de protéine. L'évolution de M_a et de ξ pour les forces ioniques plus faibles que 0.2M a déjà été déterminée par la diffusion de lumière, nous pouvons donc comparer les deux techniques et obtenir l'analyse des gels sur une large gamme de concentration en NaCl (**Figure III.8**).

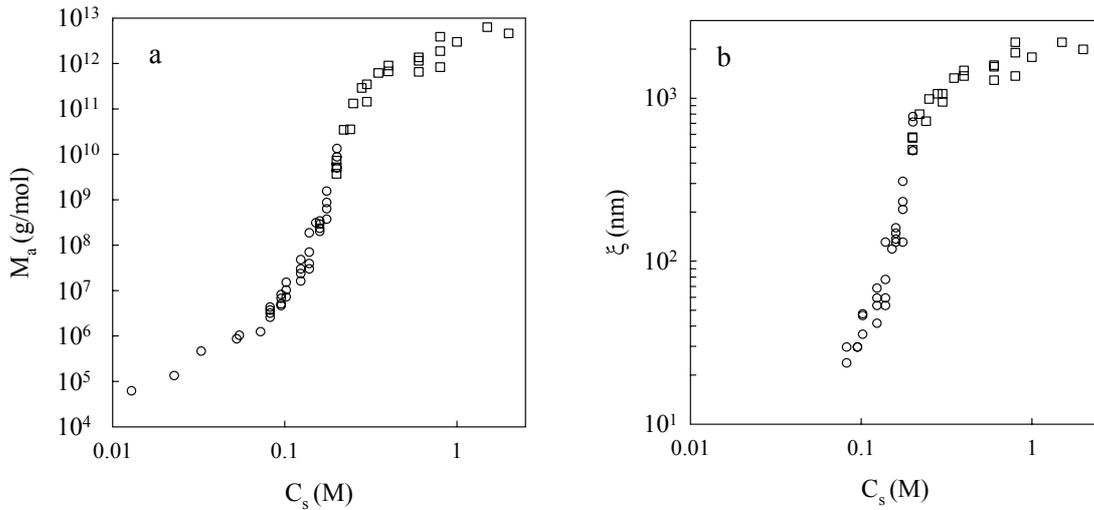


Figure III. 8 : Evolution de la masse molaire apparente (a) et de la longueur de corrélation (b) en fonction de la force ionique.

La **Figure III.8a** montre une variation de M_a lente au départ, lorsque $C_s < 0.05M$, puis une montée exponentielle dans un intervalle restreint de force ionique puis une évolution lente lorsque la force ionique est supérieure à 0.3M. La longueur de corrélation aussi évolue fortement entre 0.1M et 0.2M suivie d'une variation lente à forte force ionique. En dessous de 0.07M, la longueur de corrélation ne peut pas être déterminée par la diffusion de lumière car elle est trop petite.

III.1.2.2.4. Etude locale de la structure par SAXS

L'étude locale de la structure des gels a été réalisée en utilisant la technique de diffusion des rayons-X aux petits angles (Ako et al., 2009b). Avec cette technique la structure locale des systèmes homogènes et hétérogènes peut être étudiée. La **Figure III.9** montre l'évolution de I_r/KC en fonction de q pour différentes forces ioniques, de 0 M à 0.5M. L'évolution de I_r/KC traduit également celle du facteur de structure, elle présente un pic aux environs de $2\pi/q_{\max} =$

22nm. La présence de ce pic traduit l'existence d'un ordre dans le système. On le voit bien pour 0M et moins bien pour 0.05M. Lorsque $C_s > 0.05M$, l'ordre dans le système disparaît. A forte force ionique, le facteur de structure local des systèmes hétérogènes évolue avec une pente de -4 selon la loi Porod comme le montre la droite de la **Figure III.9**. $S(q) \propto q^{-4}$ indique la présence de microdomaines homogènes comme nous l'avons observé au MCBL. Le préfacteur de $S(q)$ est proportionnel au facteur de contraste. Il est similaire pour tous les systèmes qui présentent une micro-séparation de phase mais décroît légèrement lorsque la force ionique augmente. Si on considère 300 g/l comme la concentration en protéine des domaines, la taille des domaines est de l'ordre du micron en accord avec le résultat du MCBL. La dépendance en q du facteur de structure s'écarte légèrement de la loi Porod à $q > 0.15\text{nm}^{-1}$, ce résultat prouve que les domaines sont homogènes en dessous d'environ 10 nm.

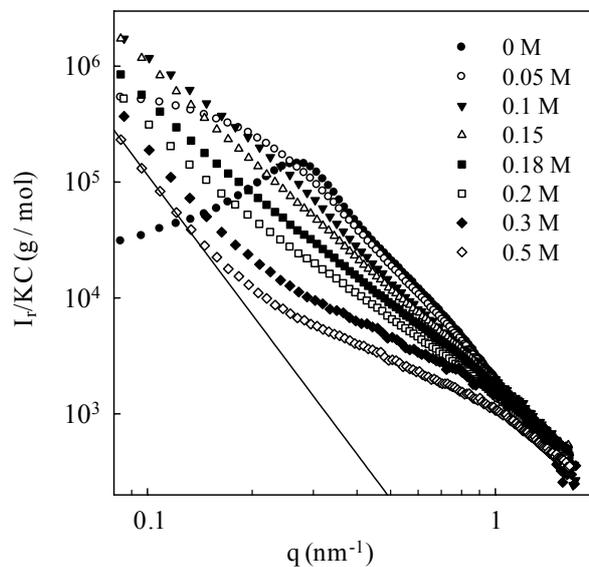


Figure III. 9 : Evolution de I_r/KC en fonction de q pour différentes forces ioniques

III.1.3. Etude en fonction du pH sans sel

III.1.3.1. Evolution de la turbidité et de D/d en fonction du pH

Nous avons varié le pH des solutions, de pH 2 à pH4.7 et de pH 8 à pH 5.3. Les solutions entre les pH 4.8 et 5.3 précipitent à température ambiante. La turbidité des systèmes augmente à partir du pH 4.1 jusqu'à 4.7 et décroît du pH5.3 jusqu'à 5.8.

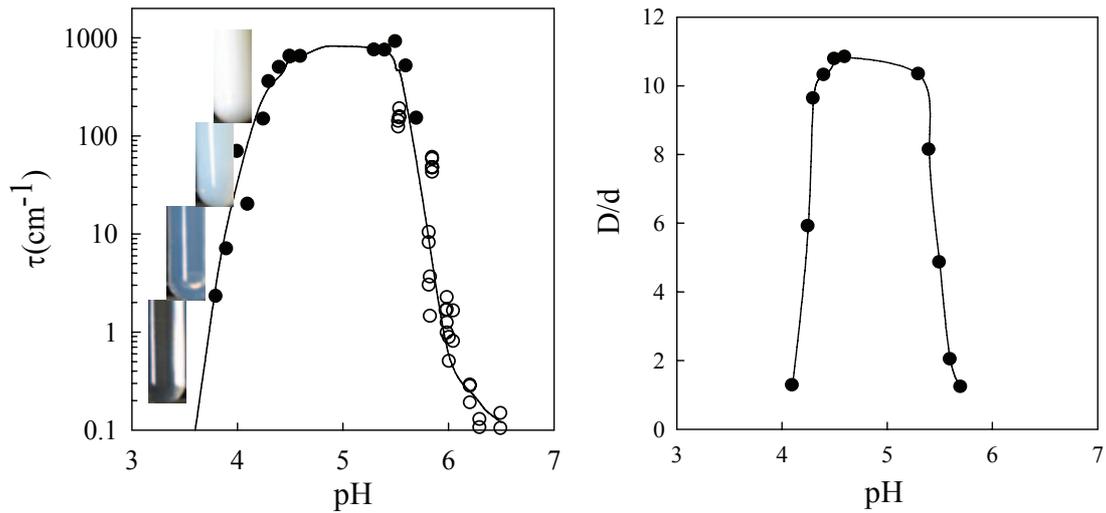


Figure III. 10 : Evolution de la turbidité en fonction du pH à gauche et évolution du rapport D/d en fonction du pH à droite (● = MCBL et ○ = Spectrophotomètre)

Les systèmes au pH4.1 et 5.8 sont à peine caractérisables au microscope confocal car les domaines sont très faiblement définis. La **Figure III.10** à gauche montre l'évolution de la turbidité en fonction du pH. On peut également y voir les photos de quelques gels qui illustrent l'évolution de la turbidité. Des données obtenues par le spectrophotomètre UV-Visible ont aussi été ajoutées pour compléter les résultats du confocal pour les échantillons qui sont faiblement turbides. A droite on a l'évolution du rapport D/d en fonction du pH. La turbidité comme le rapport D/d évolue sous forme d'une courbe en cloche, l'évolution n'est pas symétrique par rapport à 5.2.

III.1.3.2. Etude de la structure des gels sans sel à 100g/l

III.1.3.2.1. Evolution des g(r) pour les différents pH sans sel

Nous avons calculé comme précédemment, la fonction d'autocorrélation des images confocales pour les différents pH (Figure III.11)

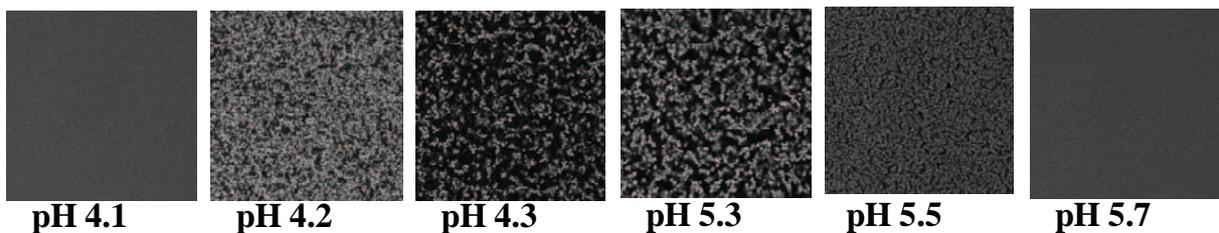


Figure III. 11 : Images confocales des gels en fonction du pH sans sel pour 100g/l. Taille des images 160μm×160μm

Les résultats de l'évolution des $g(r)$ sont montrés sur la **Figure III.12**. Nous avons trouvé que pour les systèmes à pH plus bas que 5.2, l'exposant β de l'exponentiel varie légèrement entre 1.2 et 1.5 alors que les $g(r)$ des systèmes à pH plus hauts que 5.2 ont le même exposant ($\beta=1.5$) comme le montre la **Figure III.13**.

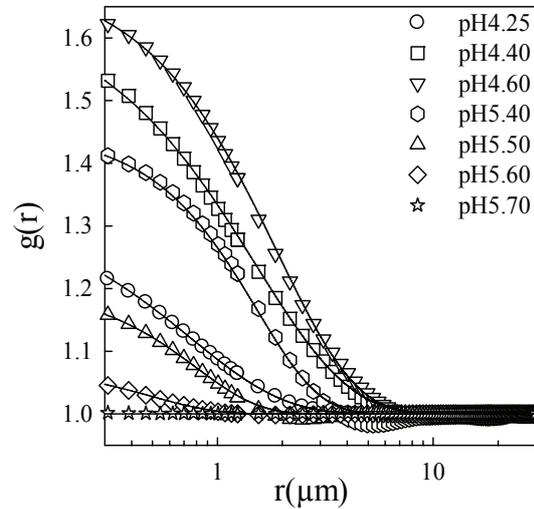


Figure III. 12 : Evolution des $g(r)$ des gels à 100g/l pour différents pH. Les courbes pleines correspondent à l'ajustement par l'exponentiel étiré. L'exposant β varie pour les pH plus bas que 5.2 entre 1.5 et 1.2.

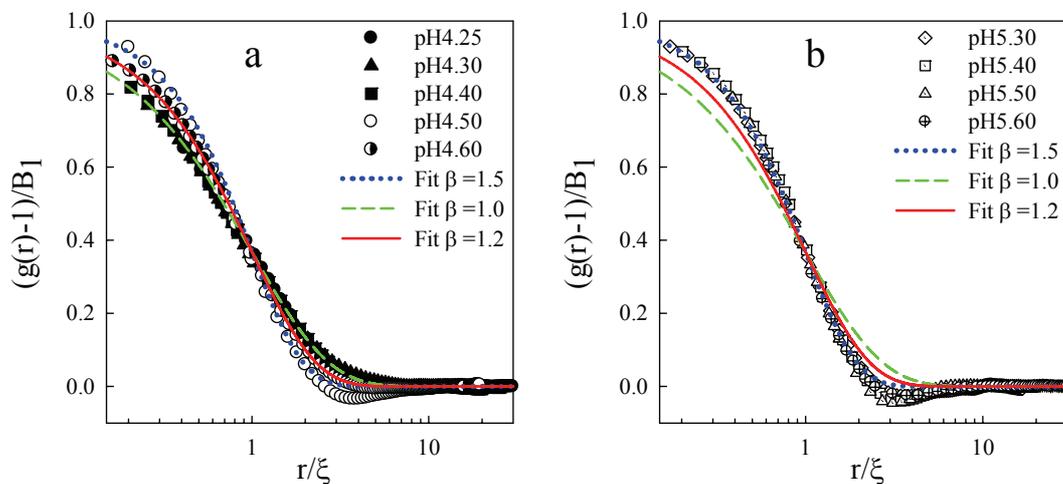


Figure III. 13 : Superposition des $g(r)$ sur une courbe maîtresse (a) systèmes à pH plus bas que 5.2 (b) systèmes à pH plus hauts que 5.2. Les valeurs de β pour les superpositions sont indiquées dans les graphes

III.1.3.2.2. Evolution de (B_1) et de (ξ)

L'évolution des $g(r)$ pour les différents pH montre que le facteur de contraste varie beaucoup lorsqu'on se rapproche du pH isoélectrique de même que les longueurs de corrélation. Nous avons vu aussi que l'exposant de la fonction exponentielle étirée n'est pas le même pour tous les systèmes.

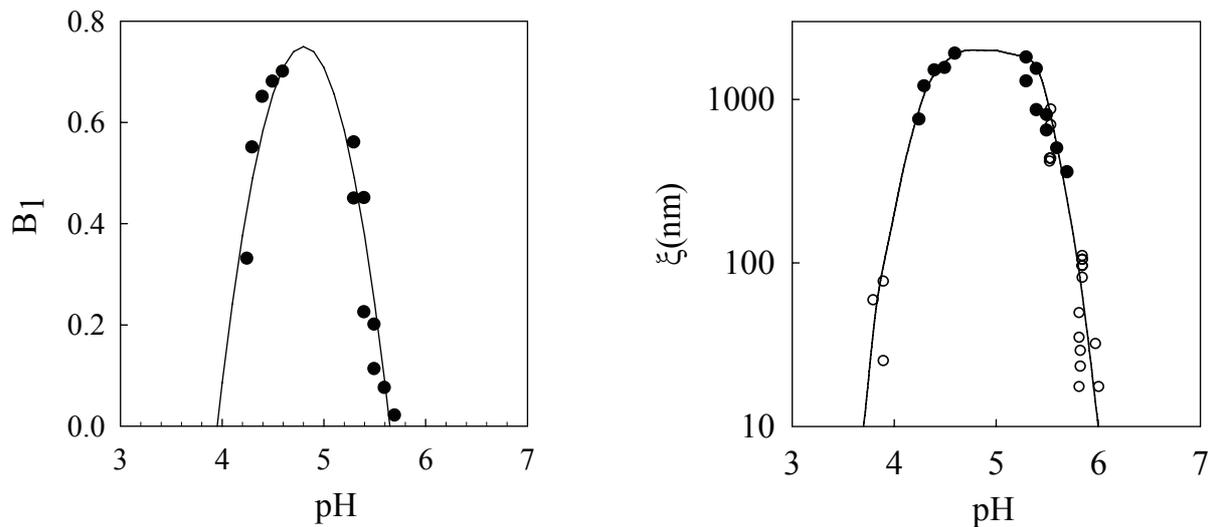


Figure III. 14 : Evolution de B_1 (à gauche) et de la longueur de corrélation (à droite) en fonction du pH. Les valeurs de ξ des systèmes dont β est plus petit que 1.5 sont sous estimées. (●=MCBL ; ○ = Diffusion de lumière). Les courbes continues sont des guides

Il n'est donc pas judicieux de comparer les paramètres (B_1) et (ξ) entre des systèmes n'ayant pas le même exposant β . Lorsque β est petit, la solution à l'équation $g(r) = 1$ pour le même facteur de contraste entraîne une longueur de corrélation plus grande que lorsque β est grand. Les valeurs de ξ augmentent lorsqu'on se rapproche du pH isoélectrique. Nous avons déterminé pour chaque pH, les concentrations des microdomaines riches et pauvres en protéines. La **Figure** ci-dessous montre pour chaque pH les concentrations dans les deux domaines. Entre les pH 4.1 et 5.6 les gels sont hétérogènes et loin du pI, les gels sont homogènes à l'échelle du MCBL.

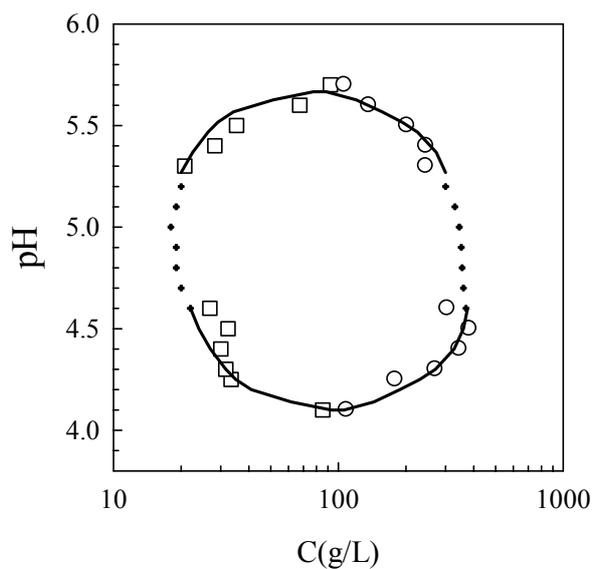


Figure III. 15 : Evolution de la concentration dans les microdomaines riches (cercles) et pauvres (carrés) en protéines en fonction du pH

III.1.3.2.3. Etude locale de la structure par SAXS

L'étude de la structure locale des gels a été réalisée également par SAXS comme pour les gels à pH7 pour les différentes forces ioniques (**Figure III.16**).

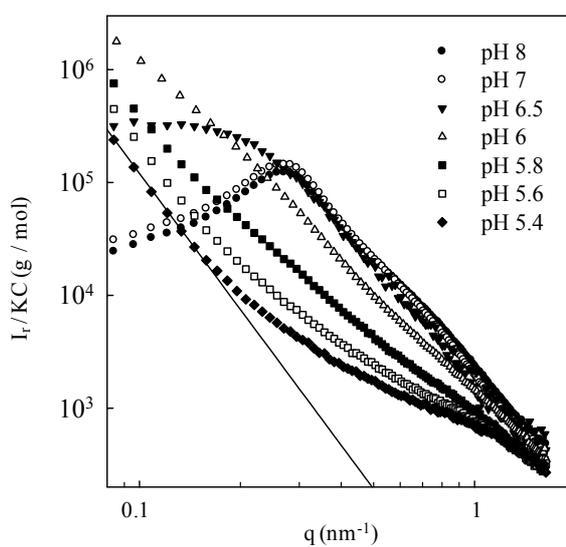


Figure III. 16 : Evolution de I_r/KC en fonction de q pour différents pH

Les gels à pH8,7 et 6.5 ont une structure similaire à celle qui a été décrite dans le premier cas c'est-à-dire à pH7 à 0M et 0.05M. On observe cependant que l'évolution de $S(q)$ pour les grandes valeurs de q est légèrement différente lorsqu'on compare les systèmes hétérogènes dans les deux cas, en fonction de la force ionique ou du pH. Il apparaît que la structure locale à des échelles d'environ 10nm dépend de la façon dont on induit la microséparation de phase des gels.

III.1.3.2.4. Diagramme de phase

Nous avons préparé dans cette étude pour chaque pH, plusieurs forces ioniques afin de déterminer le point de transition gel homogène et hétérogène (avec des microdomaines identifiables à l'échelle du confocal). Les résultats de cette étude sont présentés sur la **Figure** ci-dessous. Les barres d'erreur indiquent les forces ioniques pour lesquelles le rapport D/d est compris entre 2 et 10. Nous venons de voir qu'entre les pH4.1 et 5.7 il n'y a pas besoin d'ajouter du sel pour induire la microséparation de phase. Lorsqu'on s'éloigne du point isoélectrique la force ionique pour induire la formation des gels avec des microdomaines augmentent. Les forces ioniques pour induire la microséparation de phase des systèmes à pH 2 et à pH8 sont presque égales et pourtant à pH2 la protéine est plus chargée qu'à pH8. Les interactions électrostatiques ne permettent pas à elles seules d'expliquer le mécanisme de microséparation de phase.

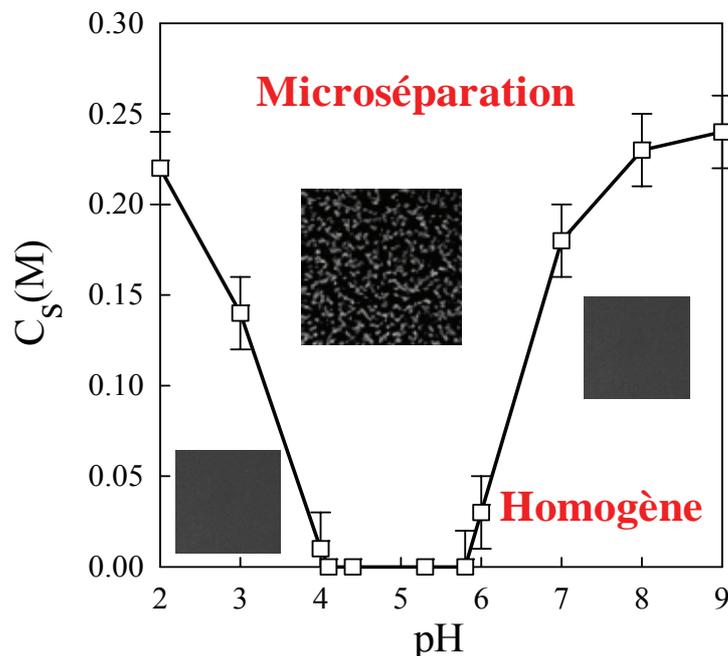


Figure III. 17 : Diagramme de phase de la transition gel homogène/gel hétérogène à l'échelle de la MCBL. En abscisse le pH et en ordonné la concentration de NaCl

III.1.4. Etude en fonction de la concentration de β lg à 0.25M (NaCl) à pH7

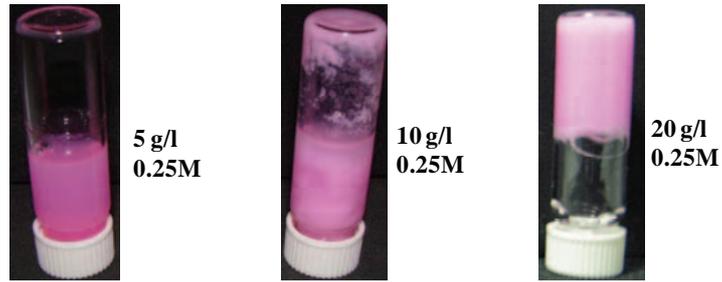


Figure III. 18 : influence de la concentration de protéine sur la formation de gel

La **Figure III.18** montre que lorsque la concentration de protéine est faible ou lorsque la concentration de sel est élevée, certains systèmes ne gélifient pas. Nous avons vu aussi qu'à pH7 pour avoir des gels avec des microdomaines, il faut être au-dessus de 0.2M. Afin d'étudier la structure des gels hétérogènes sur un plus large domaine de concentration de protéine nous avons fait le choix de 0.25M, aussi à cette concentration de NaCl tous les gels à 100g/l sont hétérogènes avec des microdomaines à tous les pH. Plus la force ionique est élevée moins il y a de systèmes qui gélifient sans précipiter.

III.1.4.1. Evolution de la turbidité et du rapport D/d

Différentes concentrations de β lg à 0.25 NaCl ont été préparées à pH7 puis chauffées pour former le gel. Nous avons mesuré la turbidité de ces systèmes et le rapport de concentration entre les domaines riches et pauvres en protéine. Les résultats présentés sur la **Figure III.19a** montrent une croissance de la turbidité en fonction de la concentration alors que celle de droite montre une décroissance du rapport D/d. La turbidité étant proportionnelle à la concentration (**Figure III.19a**), nous utiliserons la turbidité normalisée (**Figure III. 20**) par la concentration en protéine (C) afin de mieux comparer les systèmes entre eux.

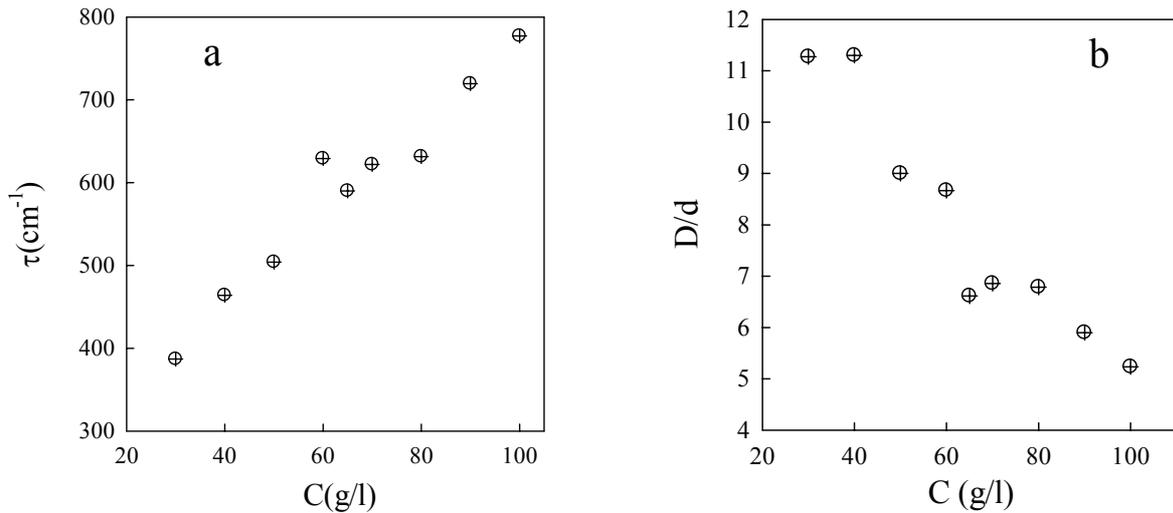


Figure III. 19 : Evolution de la turbidité (a) et du rapport D/d (b) en fonction de la concentration de β lg

La **Figure III.20** montre l'évolution de τ/C en fonction de C . On observe une évolution décroissante de la turbidité absolue, évolution qui va dans le sens de celle du rapport des densités locales.

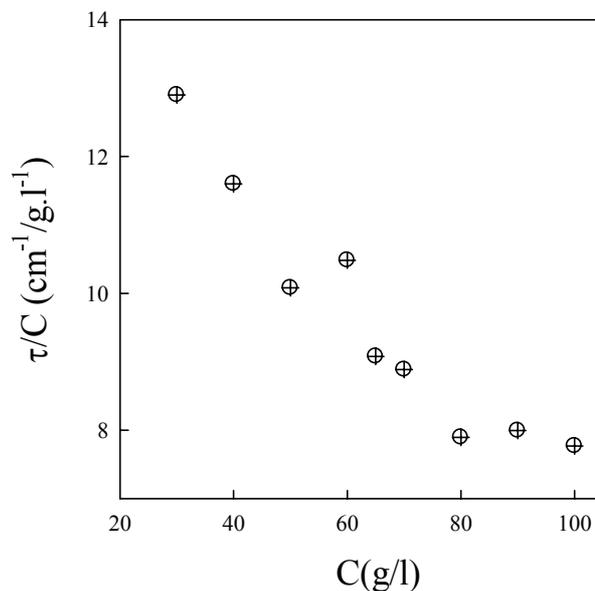


Figure III. 20 : Evolution de la turbidité normalisée par C en fonction de la concentration de β lg.

La turbidité des systèmes baisse lorsque la concentration augmente jusqu'à 80 g/l puis se stabilise lorsque la concentration est plus élevée. La baisse de la turbidité traduit une diminution de la taille des objets qui diffusent. Donc à faible concentration on formerait des objets plus gros qu'à concentration plus forte, cette observation peut traduire un processus de nucléation/croissance. La taille des objets dans un tel processus est limitée par la

concentration de matière du système. Lorsque la concentration est forte, ici supérieure à 80g/l, la gélification du système empêche les objets de croître. Le temps de gélification du système diminue lorsque la concentration augmente (Clark, Kavanagh & Ross-Murphy, 2001) donc le temps de croissance des objets diminue également. Puisque les objets ont besoin de temps pour croître, leurs tailles diminuent au fur et à mesure que ce temps est réduit par augmentation de la concentration.

Nous avons observé dans les résultats précédents que la concentration locale varie très peu entre 300g/l et 400g/l lorsque la force ionique est supérieure à 0.3M. On pense que le processus de transfert de matière du solvant vers les domaines riches est limité par une règle d'équilibre au sein même des domaines de telle sorte que ces domaines ne puissent pas indéfiniment s'enrichir. En revanche aucune règle n'imposerait l'appauvrissement des domaines moins denses en protéine. Nous pensons que c'est la balance entre les répulsions électrostatiques et les forces attractives qui fixe, selon qu'elle est plus du côté répulsif ou du côté attractif, l'enrichissement des domaines. Nous présentons le diagramme de composition des phases de ces systèmes sur la **Figure III.21**.

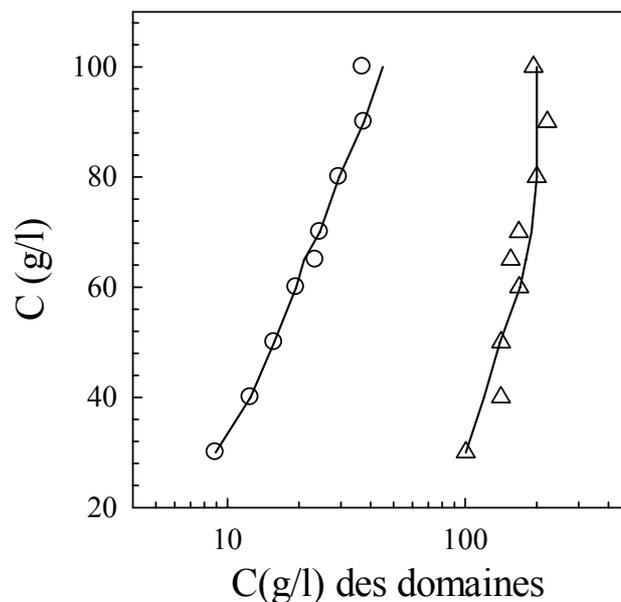


Figure III. 21 : Evolution de la concentration moyenne de β lg en fonction de la concentration dans les domaines pauvres (cercles) et riches en protéine (triangle)

Nous voyons que la concentration des domaines riches évolue peu. En revanche celle des domaines pauvres évolue constamment lorsque la concentration moyenne de départ de β lg augmente. Par extrapolation nous pouvons penser que le système à 200g/l paraîtra homogène à l'échelle du MCBL. La densification locale et la croissance des objets se font avec le même mécanisme. A température et à pH constant, elles sont déterminées par la force ionique.

III.1.4.2. Evolution des $g(r)$ pour différentes concentrations de β lg

Quelques images confocales des systèmes sur lesquels le calcul du $g(r)$ a été fait sont présentées sur la **Figure III.22**. Les intensités moyennes des images sont identiques. Aucun traitement d'image n'a été effectué.

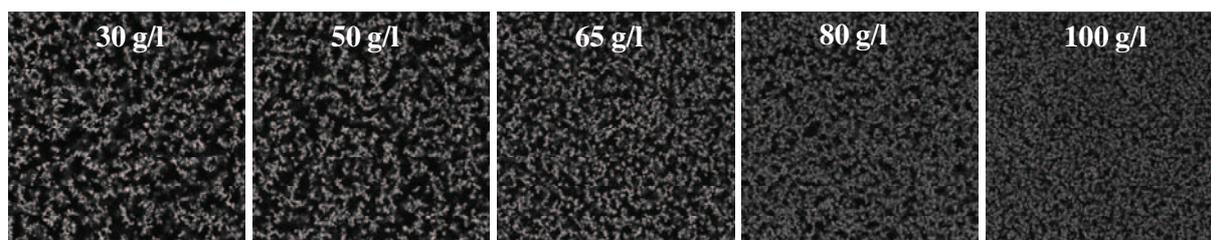


Figure III. 22 : Images confocales des systèmes en fonction de la concentration de β lg à 0.25M NaCl.
Taille des images = $160\mu\text{m} \times 160\mu\text{m}$

Les $g(r)$ sont présentés sans les ajustements théoriques (**Figure III.23a**), le contraste des systèmes augmente lorsque la concentration diminue. La superposition des $g(r)$ des systèmes se fait sur deux courbes maîtresses. Les valeurs de β pour les deux ajustements sont indiquées dans la **Figure III. 23b**. le profil des $g(r)$ des fortes concentrations montrent un creux vers $r/\xi = 3$ plus significatif que pour les $g(r)$ des faibles concentrations. Si on compare les systèmes à un ensemble de blobs, ce creux peut signifier une diminution de l'interface entre les blobs et le solvant sans changement significatif de la structure locale des gels. Nous pensons que c'est l'ajustement du creux qui est la cause de cette légère hausse du paramètre β . Nous avons aussi étudié l'évolution des $g(r)$ des systèmes en fonction de la concentration de β lg cette fois ci à 0.5M. Bien évidemment certaines concentrations n'ont pas pu être étudiées parce que ces systèmes précipitent. C'est ce qui nous a amenés à effectuer une étude à 0.25M afin de couvrir le maximum de concentrations.

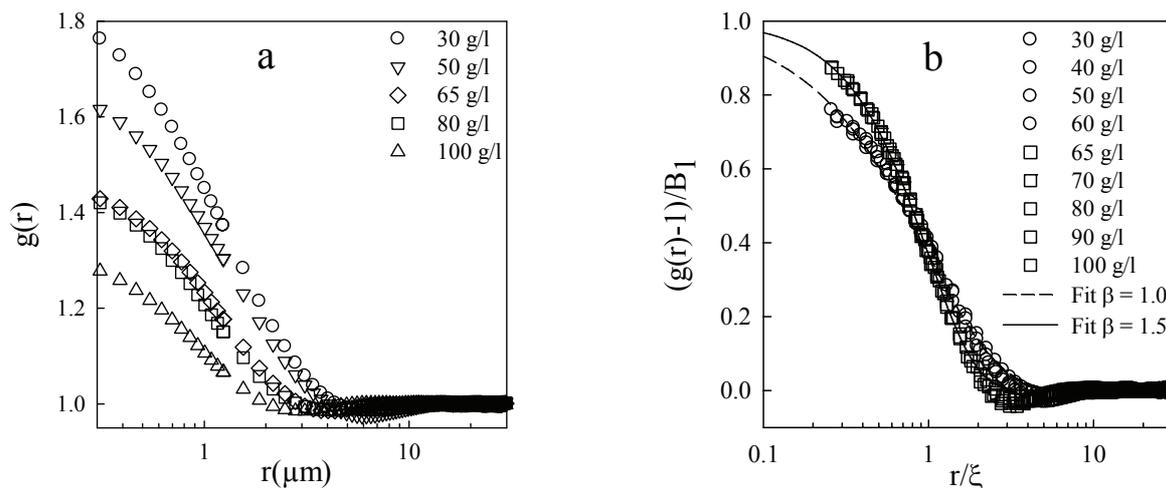


Figure III. 23 : Evolution des $g(r)$ pour différentes concentrations (a) et superposition des $g(r)$ sur une courbe maîtresse (b).

III.1.4.3. Synérèse des gels en fonction de la concentration de $\beta l g$

Nous avons vu dans le paragraphe précédent qu'à 0.25M (voir photo fig. III.18) certaines concentrations donnent des solutions colloïdales tandis que d'autres précipitent. A l'aide de la MCBL nous pouvons quantifier la couche d'eau expulsée dans la limite autorisée par la distance focale de l'objectif, c'est-à-dire, 200 μm maximale pour l'objectif $\times 63\text{W}$ que nous utilisons. Pour effectuer la mesure de la couche d'eau expulsée après la formation du gel, nous avons chauffé les systèmes à 0.5M sur la face B, c'est-à-dire, face lame en bas. Puisque l'observation se fait par la face lamelle, il est donc possible en parcourant l'échantillon du bas vers le haut de déterminer la hauteur de la couche d'eau. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la **Figure III.24**. L'amplitude de l'intensité transmise (A) est tracée en fonction de l'épaisseur (z) parcourue pour différentes concentrations de $\beta l g$ à 0.5M. L'écart entre $z = 0\mu\text{m}$ et les premiers maxima pour chaque système représente l'épaisseur de la couche de déplétion. Cette épaisseur diminue (**Figure III.24b**) lorsque la concentration augmente.

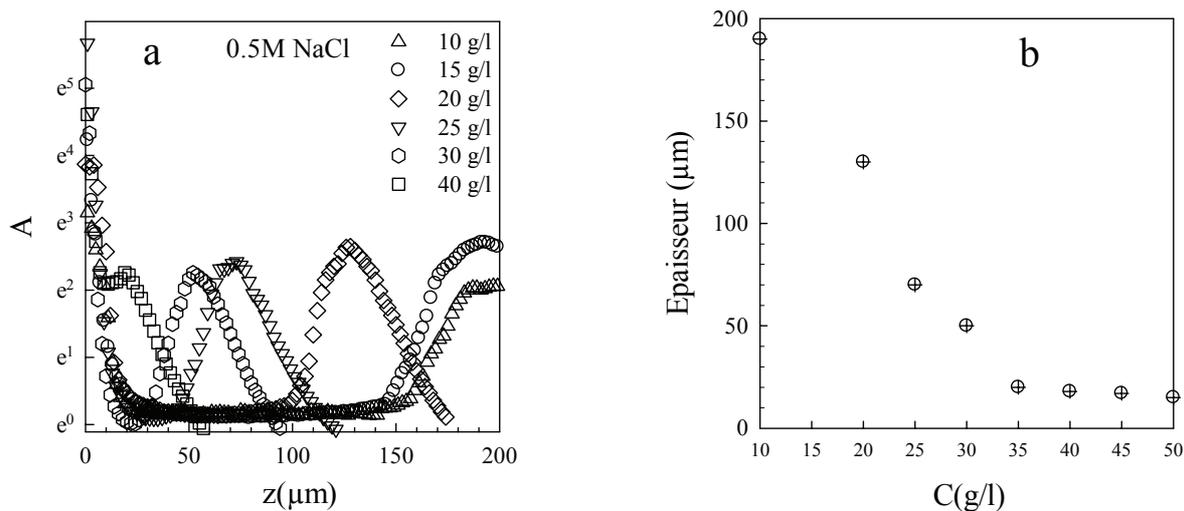


Figure III. 24 : Evolution de l'intensité transmise en fonction de l'épaisseur z parcourue pour différentes concentrations (a) et évolution de l'épaisseur d'eau expulsée après la formation du gel en fonction de la concentration de βlg (b)

Le diagramme de phase de la force ionique en fonction de la concentration de βlg montre les différents états des systèmes à la fin de la gélification, voir figure III. 25

III.1.4.4. Diagramme de phase

Pour chaque concentration de βlg , nous avons déterminé le point de transition sol et gel (avec précipité, avec des microdomaines ou pour un système homogène). Les résultats de ce travail sont présentés sur la **Figure III.25** :

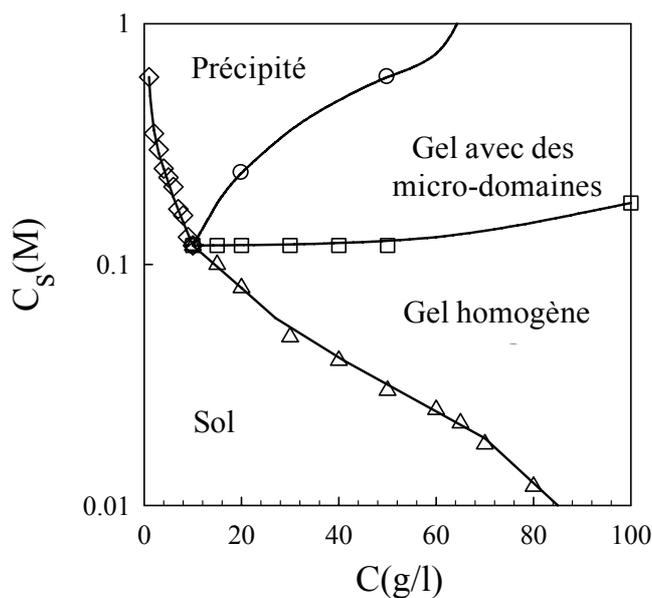


Figure III. 25 : Diagramme de phase des systèmes à pH7 après chauffage à 80°C

A 10mM de NaCl la concentration de gélification de la β lg se situe au dessus de 80g/l à pH7. Dans cette condition, les gels qui sont formés sont homogènes. Nous n'avons pas observé des précipités de ces gels quand la force ionique atteint 1 M de NaCl. Pour avoir des gels hétérogènes, il faut une concentration de protéine supérieure à 10g/l et une force ionique supérieure ou égale à environ 12mM de NaCl. Cette force ionique limite augmente légèrement lorsque la concentration de protéine augmente à partir de 50 g/l. Entre 10g/l et 50g/l, les systèmes vont de sol à précipité en passant par les deux types de gels, c'est-à-dire, homogènes et hétérogènes. A une concentration plus faible que 10g/l nous n'avons pas observé la formation de gels. En revanche, la force ionique pour provoquer la formation de précipité augmente quand la concentration diminue à partir de 10g/l.

III.1.5. Résumé et conclusion

L'évolution croissante de la masse molaire apparente et de la longueur de corrélation en fonction de la force ionique, reflète l'augmentation de l'amplitude et de l'échelle des fluctuations de concentration. On peut également provoquer cette évolution en réduisant la densité de charges des protéines en amenant le pH vers le point isoélectrique. L'aspect visuel des gels dépend de la force des interactions électrostatiques entre les domaines. Il change complètement, de transparent à opaque avec l'augmentation de la concentration ionique ou quand le pH s'approche du pI. La diffusion des rayons X aux petits angles a montré des pics d'interactions dans l'allure du facteur de structure signifiant la présence d'un certain ordre dans les systèmes homogènes. Cet ordre local est provoqué par répulsion électrostatique et s'affaiblit avec la décroissance de la densité de charge des protéines lorsque le pH s'approche du pI ou avec l'augmentation de la concentration en sel qui écrante les interactions. Moins d'ordre entraîne l'augmentation de la diffusion aux plus petites valeurs de q et conduit à la disparition du pic d'interaction. Lorsque la force ionique est supérieure à 0.2M à pH7 ou lorsque le pH est compris entre 4.1 et 5.6, la forte attraction entre les protéines provoque la micro-séparation de phase. La concentration locale des domaines denses en protéine varie légèrement entre 300g/l et 400g/l en présence de fortes forces ioniques, c'est-à-dire, supérieures à 0.3M. Lorsque la force ionique varie de 0.07M à 0.2M à pH7, la structure des gels est fractale avec une dimension fractale de 2. Cependant la force ionique nécessaire pour induire la micro-séparation de phase des gels, ne peut pas être expliquée seulement par la densité de charge des protéines. Nous avons vu dans le diagramme de phase en fonction du pH qu'il faut presque la même force ionique pour provoquer la micro-séparation de phase à pH2 comme à pH7 et 8 alors que la densité de charge positive des protéines est largement plus élevée que la densité de charge négative à ces deux derniers pH.

L'influence de la concentration en protéine sur la concentration critique de NaCl pour provoquer la micro-séparation de phase est moins significative par rapport au pH. La force ionique critique est la même entre 10g/l et 50g/l la variation entre 50g/l et 100g/l est faible. En

revanche en dessous de 10g/l la force ionique augmente considérablement alors que dans ces conditions, on ne forme pas de gels. La densité locale des domaines riches en protéines varie peu alors que celle des domaines pauvres varie beaucoup. L'évolution de la taille des domaines diminue lorsque la concentration augmente.

La combinaison des techniques comme la diffusion des rayons-X aux petits angles, la diffusion de lumière et la microscopie confocale a permis d'étudier la structure des gels sur un large domaine de force ionique, de pH et de concentration en établissant des diagrammes de phases, en mesurant les concentrations des domaines et en suivant l'évolution des paramètres structuraux.

III.2. Etude de la gélification « à froid » des agrégats de la bêta-lactoglobuline

La préparation des gels de β lg à froid se fait en ajoutant du sel à une solution d'agrégats protéiques à température ambiante. Pour préparer les agrégats protéiques, nous avons chauffé 80g/l de solution de β lg native en présence de 10mM dans un bain marie à 80°C pendant environ 16h. A partir de cette solution mère, nous avons préparé différentes concentrations par dilution avec de l'eau milli Q contenant du sel. Nous avons aussi varié la concentration de sel pour une concentration d'agrégats protéiques donnée. Nous avons observé que la gélification est très lente à 20°C et que la vitesse de gélification augmente avec la température. Nous avons alors choisi 60°C pour étudier l'évolution du système et l'influence du sel, de la concentration de protéine et de la taille des agrégats. La figure III.26 illustre les deux étapes de la gélification à froid.

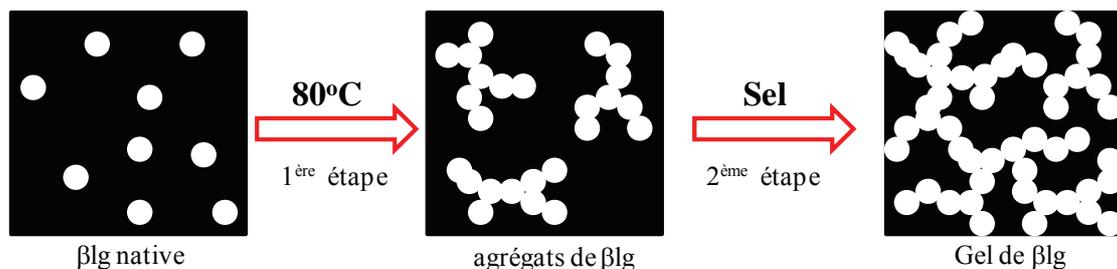


Figure III. 26 : Illustration de la méthode de gélification des agrégats protéiques

III.2.1. Comparaison entre la structure des gels à froid et des gels à chaud

III.2.1.1. Ressemblance

Après le mélange de la solution des pré-agrégats, environ 10 min s'écoulent avant que l'on commence la mesure de la turbidité. Nous avons utilisé une cellule de 2mm pour les mesures de turbidité du système à 20g/l en présence de 0.3M NaCl. La température de la cellule a été montée à 60°C. La turbidité a été mesurée à différents temps en fonction de la longueur d'onde. L'ajustement des résultats expérimentaux présentés dans la **Figure** III. 27 est le même que celui qui a été utilisée pour les gels à chaud.

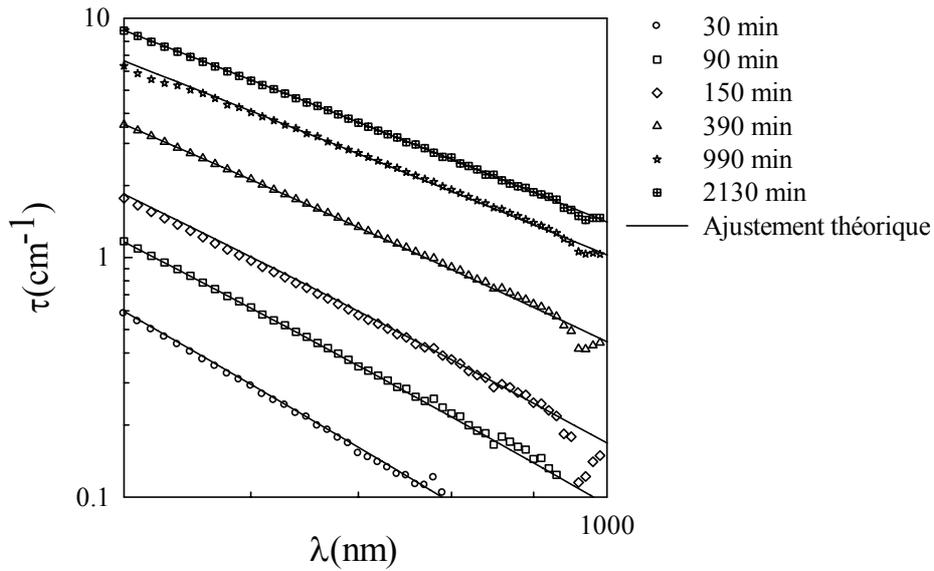


Figure III. 27 : Evolution de la turbidité en fonction de la longueur d'onde à différents temps

Les valeurs absolues de turbidité augmentent avec le temps. En revanche, la dépendance en longueur d'onde ne varie pas. L'évolution du gel en fonction du temps ne modifie pas la structure locale. Elle est identique à la structure locale des gels à chaud. Nous obtenons donc la même évolution de la masse molaire apparente avec la longueur de corrélation. C'est-à-dire :

$$M_a = a \times R_a^2 \quad \text{III. 4}$$

La **Figure III.28** montre la dépendance de M_a avec ξ pour plusieurs systèmes avec différentes forces ioniques, différentes concentrations, différentes températures et différents tailles de pré-agrégats.

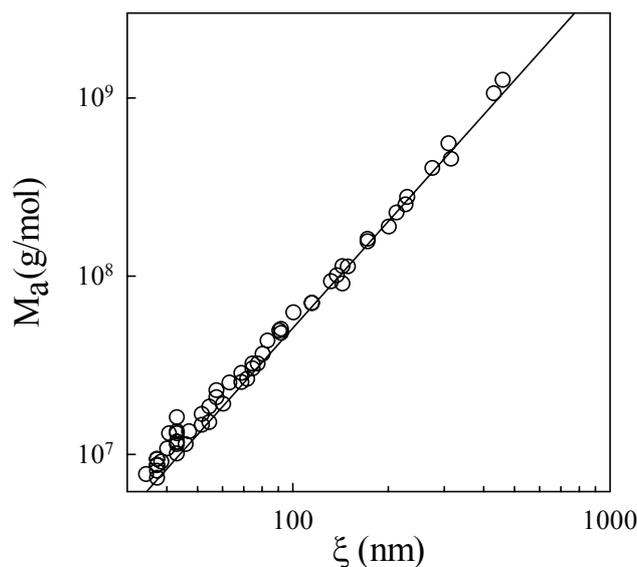


Figure III. 28 : Evolution de M_a en fonction de R_a . La pente de la droite est 2

Les résultats de l'étude de la structure des gels de bêta-lactoglobuline montrent que les deux types de gels, gels à froid et gels à chaud, ont la même structure, c'est-à-dire, que leurs facteurs de structure peuvent être décrits avec la même équation. Les gels à froid sont donc également fractals avec une dimension fractale égale à 2.

III.2.1.2. Différences

Après la deuxième étape de la gélification à froid, nous avons remis les systèmes à chauffer à 80°C afin de comparer l'hétérogénéité des gels à froid avec l'hétérogénéité des gels à chaud. Lorsque la force ionique augmente, les gels deviennent de plus en plus hétérogènes. L'hétérogénéité augmente aussi lorsque la concentration de protéine diminue. A 50g/l, quelle que soit la force ionique, les gels à froid sont homogènes à l'échelle du MCBL alors que les gels à chaud à 20g/l précipitent dès que la force ionique devient supérieure à 0.25M. Nous comparons, sur la **Figure III.29**, les images des gels à 100g/l obtenus à chaud avec les images des gels à 20g/l obtenus à froid pour les mêmes forces ioniques.

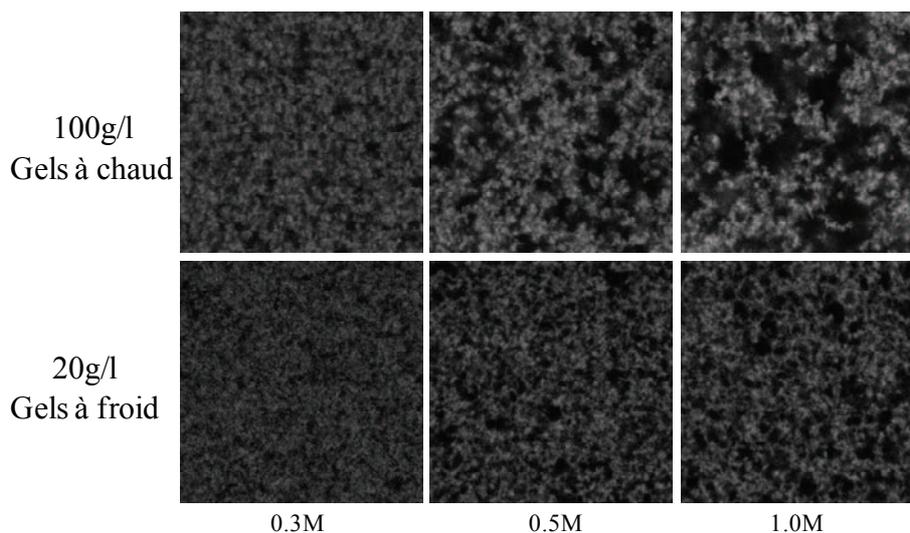


Figure III. 29 Images confocales des gels à froid et à chaud. Dimension des images 40x40 μ m

Malgré que la concentration de protéine soit 5 fois supérieure, les gels à chaud sont plus hétérogènes. Nous n'avons pas observé pour les gels à froid, de micro séparation de phase comme dans le cas des gels à chaud. Nous avons essayé d'augmenter la force ionique ou de diminuer la concentration de protéine. Dans le premier cas, on n'arrive pas à bien mélanger la solution aqueuse avec la solution de pré-agrégats à température ambiante, et on forme de gros morceaux de gels difficiles à solubiliser par la suite. Dans le second cas, on ne forme pas de gels même à 80°C. Nous avons observé des objets en formes d'aiguilles dans un milieu plutôt visqueux. La différence significative entre les deux types de gels est que, dans le cas des gels à froid on n'observe pas la micro séparation donc la turbidité des gels n'est mesurable qu'à l'échelle de la diffusion de lumière et de la spectrophotométrie UV-visible.

Pour étudier l'influence du calcium (**Figure III.30**), nous avons commencé à étudier un mélange à 15 mM CaCl_2 pour 20 g/l de protéine, mais ce système donne des précipités pendant le mélange sous vortex. Nous avons donc réduit la concentration jusqu'à obtenir un système homogène à température ambiante. Nous avons également préparé un système à 5mM CaCl_2 . Nous avons observé que ce système est entièrement homogène même à 80°C. Pour avoir un gel, nous ne pouvons varier la concentration qu'entre 5mM et 13 mM de CaCl_2 . La concentration de CaCl_2 nécessaire pour obtenir un gel est à peine supérieure à 13 mM quand on augmente la concentration de protéine à 50 g/l. Nous avons étudié l'évolution de la turbidité en fonction du temps pour différentes concentrations de protéines entre 20g/l et 50g/l à 10mM de CaCl_2 à 60°C. L'évolution de la turbidité est très rapide dès les premières minutes à 60°C puis se stabilise rapidement quand la concentration diminue. Comme nous l'avons observé pour le NaCl, la valeur de τ_f diminue quand la concentration augmente.

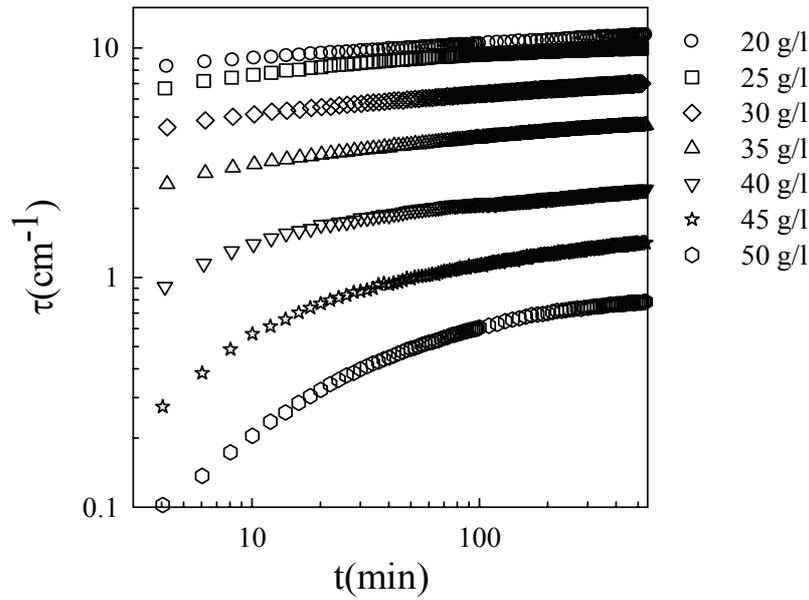


Figure III. 30 : Evolution de la turbidité en fonction du temps des systèmes à 60°C pour différentes concentrations de β lg à 10mM (CaCl_2)

Nous avons obtenu par la même fonction d'ajustement que celle utilisée par NaCl l'évolution de la turbidité en fonction de la longueur d'onde et ainsi les paramètres M_a et ξ . M_a dépend de ξ avec la même loi de puissance en présence du calcium comme en présence du sodium ($M_a = a \cdot \xi^2$). En revanche, M_a est systématiquement plus grand dans le cas du Calcium. Le préfacteur (a) est égal à 6×10^3 en présence du sodium et à 9.5×10^3 en présence du calcium comme le montre la **Figure III.31**.

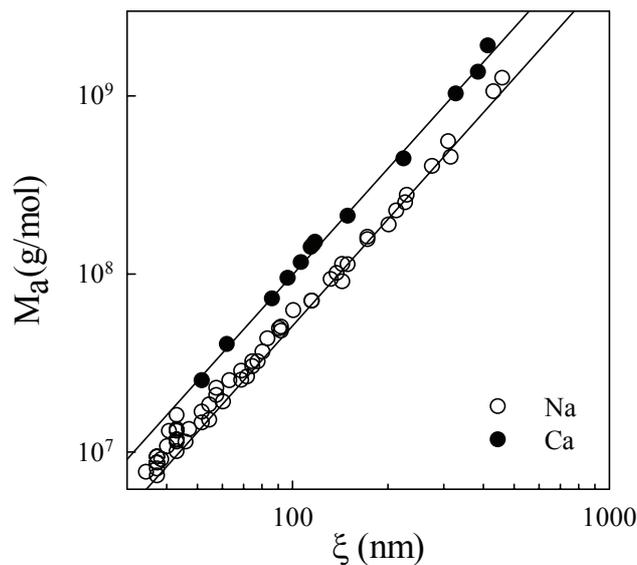


Figure III. 31 : Comparaison de l'évolution de M_a en fonction de ξ pour le sodium et le calcium

Nous pouvons donc dire que le calcium n'affecte pas la structure des gels par rapport au sodium mais augmente simplement le préfacteur (a). Marangoni et al (2000) ont trouvé que la dimension fractale des gels à froid de WPI en présence du calcium est plus grande qu'en présence du sodium. Selon ces auteurs, les gels à froid préparés avec le calcium seraient donc plus ordonnés probablement à cause de la double valence du calcium qui permet des ponts entre les agrégats. Les méthodes que ces auteurs ont utilisées sont différentes de la notre. En effet, ils ont montré que les deux méthodes, rhéologique et « box-counting », donnent les mêmes résultats. Mais nous savons que la méthode de « box-counting » donne des résultats qui varient selon le seuil de l'intensité choisie pour binariser les images et par conséquent n'est pas fiable. Plusieurs auteurs ont utilisé la méthode rhéologique pour déterminer une dimension fractale des gels de protéine globulaire (Marangoni et al., 2000; Stading, 1993) malgré que la relation entre la structure des gels et leur module élastique ne soit pas théoriquement bien défini.

Nous avons choisi la concentration 20g/l de protéine pour étudier l'influence du CaCl_2 sur la structure des gels, parce que cette concentration donne une structure à l'échelle du confocal en présence de NaCl. La **Figure III.32** montre l'évolution des $g(r)$ pour les différentes forces ioniques et pour les deux types de sels (sodium et calcium). A droite, nous présentons les images les plus hétérogènes que nous ayons observées avec le sodium et le calcium. La concentration et la nature des sels sont indiquées dans la figure. Les traits pleins correspondent à l'ajustement de l'équation du $g(r)$. Les systèmes ont été chauffés dans un bain-marie à 80°C pendant environ 4j.

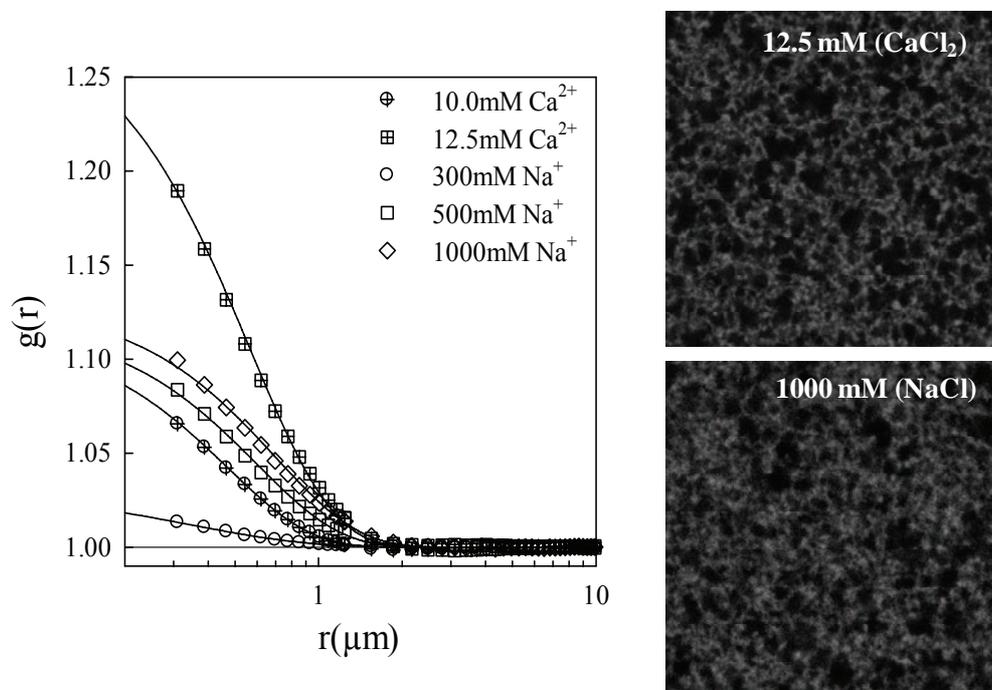


Figure III. 32 : Evolution des $g(r)$ des gels-à-froid en présence du calcium et du sodium. Les images des gels les plus hétérogènes sont présentées à droite

Nous retrouvons l'évolution de la densité locale ou de la longueur de corrélation telle que nous l'avons vu dans l'étude des gels à chaud en fonction de la concentration de sel. En revanche il est surprenant de voir que le système avec 1000 mM (NaCl) donne une densité locale beaucoup plus faible qu'un système avec 12.5 mM (CaCl₂). La raison de cette influence du calcium n'est pas bien comprise. La bivalence du calcium ne permet pas d'expliquer cette observation puisque la force ionique du sodium est largement supérieure à la force ionique du calcium. L'analyse des images ne permet pas de distinguer une influence particulière du calcium sur la structure des gels par rapport au sodium. Cependant elle montre que les gels à froid ne sont pas fractals alors que l'analyse par la diffusion du rayonnement du système à 300mM (NaCl) donne une dimension fractale égale à 2. Une structure est fractale par analyse de la fonction de corrélation de paire lorsque le $g(r)-1 = B_1 \times r^{df-3} f(r/\xi)$ avec $f(r/\xi)$ la fonction de coupure du $g(r)$. A l'échelle de la microscopie confocale, le $g(r)$ est dominé par la fonction de coupure uniquement.

III.2.2. Structure des gels à froid

III.2.2.1. Influence de la température

Lorsque la température augmente, l'évolution de la turbidité s'accélère. La valeur de stabilisation de la turbidité (τ_f) augmente aussi. La **Figure III.33** montre l'étude de l'influence de la température sur un gel à froid à 50g/l en présence de 0.3M. Les températures sont indiquées dans la **Figure** de même que le rayon de giration des pré-agrégats mesurés par la technique de diffusion de lumière. Dans tous les cas, la turbidité augmente d'abord linéairement puis très vite avant de commencer à se stabiliser au bout d'un temps très long. L'évolution de la turbidité peut être décrite par l'équation empirique suivante :

$$\tau = \tau_0 + \frac{(\tau_f - \tau_0)}{(1 + t_c / t)} \quad \text{III. 5}$$

τ_0 est la turbidité initiale de la solution juste après le mélange, τ_f est la turbidité finale et t_c est le temps caractéristique du processus de gélification. L'expression $(\tau - \tau_0)/(\tau_f - \tau_0)$ en fonction de (t_c/t) présente une courbe maîtresse pour des systèmes à différentes températures. La température finale du système à 20°C a été obtenue à partir de l'ajustement théorique. L'évolution de la turbidité du gel à cette température est tellement lente que le gel continue d'évoluer au-delà d'une semaine.

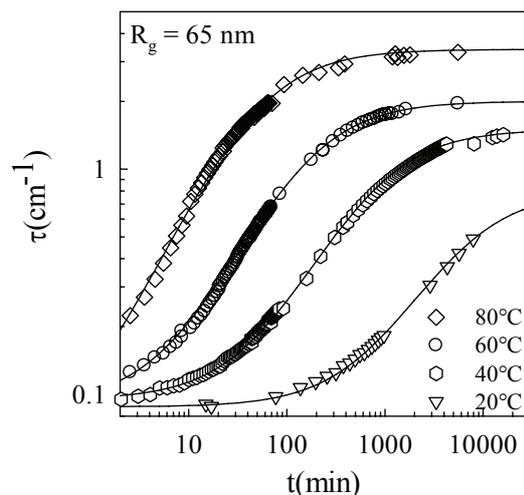


Figure III. 33 : Evolution de la turbidité des gels en fonction du temps pour différentes températures

La **Figure III.34** montre l'évolution du temps caractéristique en fonction de l'inverse de la température. Nous avons observé une évolution linéaire de t_c en fonction de $1/T$. En appliquant la loi d'Arrhenius on détermine l'énergie d'activation des systèmes, $E_a = 71$ kJ/mol. Cette énergie est largement plus faible que l'énergie d'activation des systèmes à chaud qui est de 350 kJ/mol à 0.1M.

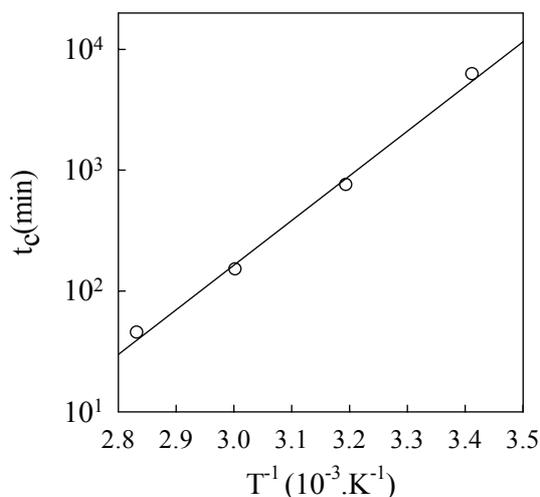


Figure III. 34 : Evolution du temps caractéristique de la gélification des systèmes en fonction de l'inverse de la température

L'évolution de la turbidité est due à l'évolution de la masse moléculaire apparente qui varie de 6.5×10^6 (20°C) à 7.0×10^7 (80°C) pour une longueur de corrélation qui varie de 60nm à 200nm. La masse molaire apparente finale et le rayon apparent du système à 20°C ont été déterminés à partir de la valeur de τ_f en considérant la relation déjà connue entre M_a et ξ ($M_a \propto \xi^2$).

III.2.2.2. Influence de la force ionique

Nous avons étudié l'influence de la concentration de NaCl sur la gélification à froid des solutions de pré-agrégats en variant la concentration de 0.05M jusqu'à 1M. Il est difficile d'aller plus loin puisque nous partons d'une solution de pré-agrégats très concentrée (80g/l) qu'on dilue avec une solution aqueuse plus concentrée dans les proportions nécessaires pour avoir la force ionique finale souhaitée. Au contact des deux solutions, de gros morceaux de gels se forment lorsque la concentration de sel de la phase aqueuse est élevée. Ces morceaux de gels ne se solubilisent alors plus correctement. La **Figure III.35** montre l'influence de la force ionique sur la turbidité des systèmes à 20°C. Les deux systèmes à gauche sont liquides même lorsqu'ils ont été chauffés à 60°C pendant plus d'une semaine. Lorsque la concentration de NaCl est supérieure à 0.1M les systèmes gélifient et la turbidité augmente mais très légèrement.

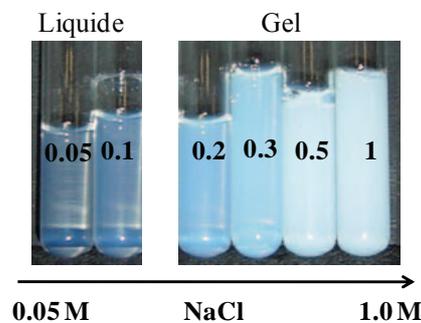


Figure III. 35 Photo des systèmes à froid en fonction de la force ionique. Cette photo montre l'évolution de la turbidité et l'état des systèmes

Nous avons suivi l'évolution de la turbidité à 60°C (**Figure III.36**) pendant environ une semaine. A 100mM, l'évolution de la turbidité est très lente puis l'évolution de la turbidité s'accélère lorsque la force ionique augmente.

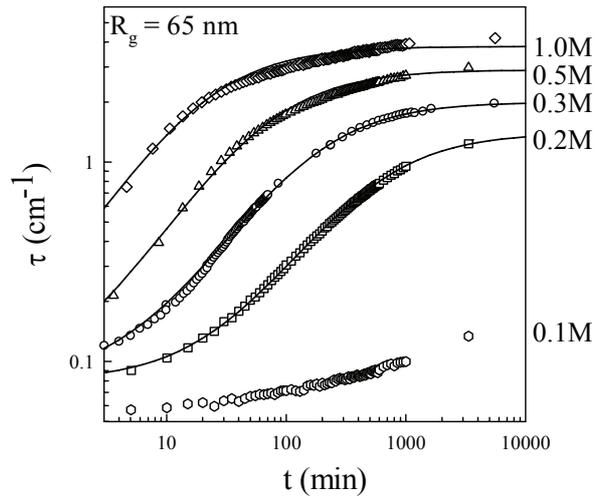


Figure III. 36 : Evolution de la turbidité en fonction du temps pour différentes forces ioniques, les courbes continues sont l'ajustement selon l'équation III.5

Plus la force ionique est élevée et plus vite on atteint la turbidité finale. Grâce à l'ajustement des résultats expérimentaux, nous pouvons déterminer le temps caractéristique de la gélification de même que la turbidité τ_f qui nous donne la masse molaire apparente (cercles vides). La **Figure III.37** montre que t_c décroît linéairement en fonction de la force ionique (cercles pleins).

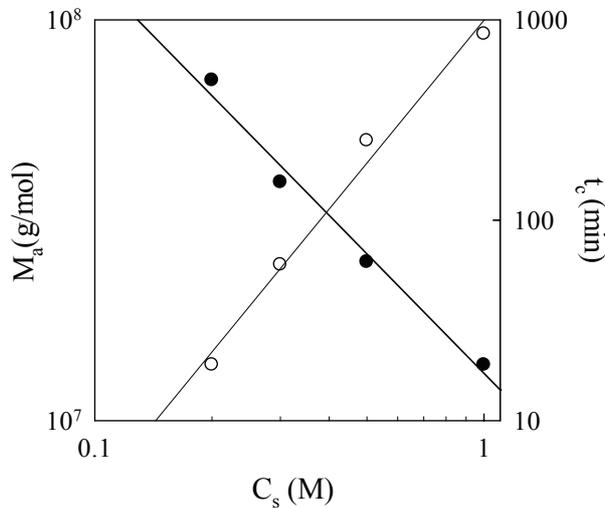


Figure III. 37 : Evolution de la masse molaire apparente (cercles vides) et du temps caractéristique de gélification (cercles pleins) en fonction de la force ionique

L'évolution de la masse molaire apparente en fonction de la force ionique a déjà été rapportée par plusieurs auteurs (Baussay et al., 2004; Mehalebi et al., 2008a; Pouzot et al., 2005). Cette étude nous permet de comparer les valeurs absolues des systèmes à froid et à chaud. Les valeurs absolues de la masse molaire apparente des gels à froid sont largement plus petites que celles des gels à chaud pour les mêmes forces ioniques.

III.2.2.3. Influence de la concentration des pré-agrégats

La concentration de pré-agrégats sur l'évolution du gel a une forte influence sur l'évolution de la turbidité. Nous avons testé les concentrations suivantes : 15g/l, 20g/l, 40g/l, 50g/l, 60g/l, 80g/l. A 15g/l ou à une concentration plus faible, les systèmes évoluent avec le temps mais ne gélifient pas. La **Figure III.38** montre la dépendance de la turbidité en fonction du temps pour différentes concentrations de pré-agrégats pour un rayon de giration $R_g = 33$ nm. Afin d'éliminer la dépendance linéaire de la turbidité avec la concentration, la **Figure III.38** présente l'évolution de τ/C en fonction du temps. Le système à 50g/l n'est pas présenté dans cette figure car ce système a été préparé à partir d'une solution dont la taille des pré-agrégats est supérieure à 33 nm. Plus loin nous étudierons l'influence du rayon de giration sur l'évolution de τ . Au départ, l'évolution de la turbidité est indépendante de la concentration. Elle est linéaire sur un temps relativement court environ une cinquantaine de minutes. Le domaine linéaire s'étend sur un intervalle plus grand pour 20 g/l. L'ajustement ne peut s'appliquer qu'à partir de $t > 200$ min. La turbidité finale diminue lorsque la concentration augmente.

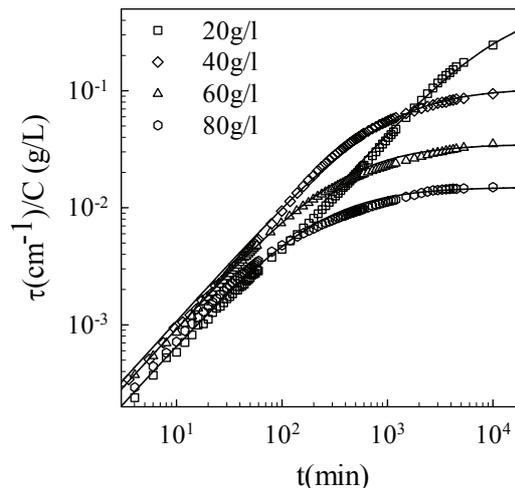


Figure III. 38 : Evolution de la turbidité normalisée par la concentration en fonction du temps pour différentes concentrations de β lg.

La **Figure III.39** montre l'évolution de M_a et de t_c en fonction de la concentration. Les deux paramètres croissent fortement lorsque la concentration diminue. A 20g/l la longueur de corrélation du gel devient trop grande et l'intensité de la lumière transmise par le spectrophotomètre trop faible pour être mesurée précisément. Pour cette raison il n'est pas possible de déterminer avec précision M_a et ξ en utilisant le turbidimètre mais il est certain que $M_a > 10^9$ g/mol

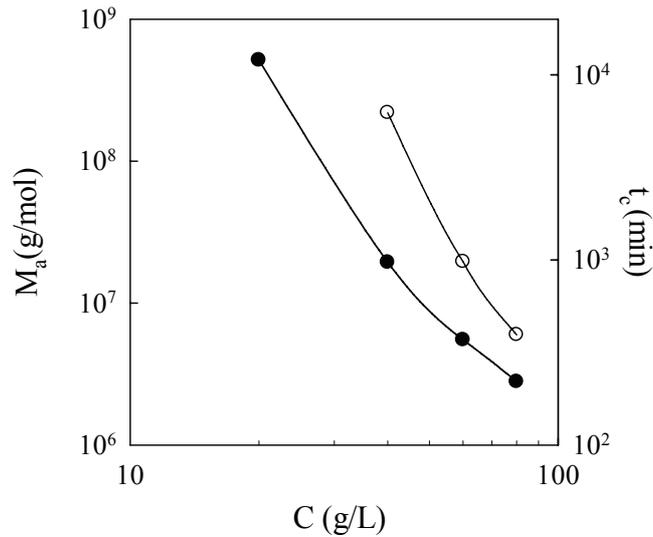


Figure III. 39 : Evolution de M_a (cercles vides) et t_c (cercles pleins) en fonction de la concentration de β lg.

III.2.2.4. Influence de la taille des pré-agrégats

Nous avons préparé plusieurs solutions-mères de sorte à avoir différentes tailles de pré-agrégats. Nous avons varié la concentration de protéines natives en maintenant toutes les autres conditions identiques (temps de chauffage, force ionique, température).

Des pré-agrégats de différentes tailles peuvent être obtenus de différentes manières. En jouant sur le temps de chauffage des solutions ou sur la température de chauffage. On peut aussi chauffer les solutions à différentes concentrations. Nous avons chauffé les solutions natives à différentes concentrations plus d'une demi-journée à 80°C en présence de 10mM (NaCl). Les tailles et les masses molaires des pré-agrégats ont été mesurées par la diffusion statique de lumière. Les tailles varient entre 19nm et 260nm et les masses molaires apparentes entre 2×10^6 g/mol et 70×10^6 g/mol. L'influence de la taille des pré-agrégats sur la structure des gels à froid a été étudiée à 50g/l en présence de 0.3M (NaCl) à 60°C.

La **Figure III.40** montre l'évolution de la turbidité en fonction du temps pour trois tailles distinctes d'agrégats.

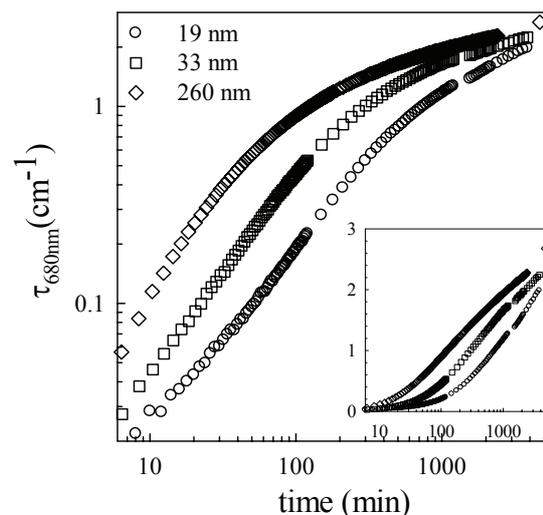


Figure III. 40 : Evolution de la turbidité en fonction du temps pour différentes tailles de pré-agrégats en log-log et lin-log (Encart)

L'évolution de la turbidité est plus rapide lorsque le rayon de giration augmente, en revanche, la turbidité finale est la même pour tous les systèmes. Les masses molaires apparentes M_a ($3-5 \times 10^7$ g/mol) et les rayons apparents R_a (120-130nm) explorée varient très peu et ne montrent pas de dépendance avec le rayon de giration R_g des pré-agrégats.

III.2.2.5. Evolution de la turbidité et du module élastique

Nous avons suivi l'évolution rhéologique des gels à froid en comparant directement les évolutions du module d'élasticité et de la turbidité afin de voir la corrélation entre ces deux paramètres. Le temps de gélification des systèmes n'est pas très précis car ils gélifient souvent très vite. Si les données rhéologiques montrent que les systèmes sont gélifiés, ils coulent néanmoins sous leur propre poids. On pense que dans tous les cas la micro-séparation de phase des systèmes préparés à froid se fait après le point de gélification ce qui les différencie des gels à chaud dont la structure est figée au point de gélification même si le module continue à évoluer. Dans le cas des gels à froid, au fur et à mesure que croissent M_a et R_a , les liens se renforcent entre les objets en entraînant une augmentation du module d'élasticité. Comme le montre la **Figure III.41**, le module d'élasticité suit globalement la même évolution que la turbidité. Cette évolution est moins rapide lorsqu'elle est comparée aux systèmes à chaud juste après leurs points de gel (Bryant & McClements, 2000; McClements et al., 1995). Le fait que la structure des systèmes à froid se forme et se fige après le point de gélification peut expliquer le fait que la taille des pré-agrégats n'est pas d'effet sur la turbidité finale des gels.

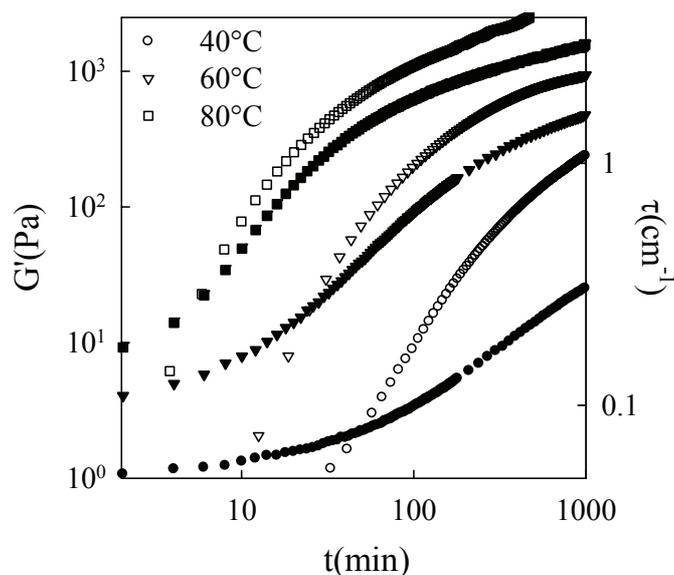


Figure III. 41 : Evolution du module élastique (symboles pleins) et de la turbidité (symboles vides) des gels en fonction du temps pour différentes températures

III.2.2.6. Conclusion

Nous avons observé en étudiant la gélification à froid de la β lg que l'ajout du sel dans une solution de pré-agrégats permet de former des agrégats plus grands qui s'auto-assemblent pour donner le gel. Les agrégats et le gel final ont la même structure, c'est-à-dire, la même dimension fractale ($df = 2$).

Nous avons étudié les systèmes sur une large gamme de force ionique en allant jusqu'à 1M (NaCl) et nous avons observé que contrairement aux gels préparés à chaud, les gels à froid sont fractals sur toute cette gamme de force ionique. NaCl a pour seul effet d'accroître M_a et R_a d'où l'évolution de la turbidité.

L'étude des gels à chaud à pH7, nous a appris que la structure de ces gels varie de fibrillaire à particulaire sur une fenêtre très réduite de force ionique (Mehalebi, 2008). L'évolution de M_a et de R_a est fortement dépendante de la force ionique. En MCBL on observe des micro-domaines très concentrés en protéines. Ce comportement, n'a pas été observé avec les gels à froid lorsque la force ionique est supérieure à 0.2M. En revanche la structure des gels à froid est semblable à celle des gels à chaud lorsque la force ionique de ce dernier est comprise entre 0.1M et 0.2M.

L'effet de la température sur la structure des gels est très modeste, même le calcium ne permet pas de créer des gels à froid avec des micro-domaines comparables aux gels à chaud. La différence entre les gels à froid et les gels à chaud vient du fait que ces derniers sont préparés à partir des protéines natives. En présence d'une forte force ionique, les natives donnent des agrégats localement denses qui s'auto-assemblent pour former la structure du gel final alors

que dans le cas des gels à froid, les agrégats de départ sont formés à très faible force ionique et sont donc beaucoup moins denses localement. Ces agrégats en s'auto-assemblant vont donner des gels dont la structure ne change plus même en présence d'une forte force ionique.

Une autre différence entre les deux systèmes est leur cinétique en fonction de la température. Le processus de dénaturation des natives est un processus coopératif. Ainsi à forte température, la dénaturation s'effectue très rapidement en accélérant la gélification des systèmes. En revanche l'énergie d'activation est plus élevée que dans le cas des gels à froid pour lesquels la gélification a lieu même à température ambiante.

Nous avons aussi trouvé que l'évolution du module d'élasticité des gels à froid suit celle de M_a et de R_a après le point de gélification ce qui implique que le réseau des gels à froid n'est pas totalement rigide, raison pour laquelle ces systèmes continuent d'évoluer après un long moment.

Conclusion générale

Conclusion

Cette thèse intitulée « Etude de la structure des gels de bêta-lactoglobuline par Microscopie Confocale à Balayage Laser » a été développée selon 3 axes :

- Développement d'une nouvelle méthode originale et quantitative d'analyse d'images par Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL) et application à des gels protéiques.
- Etude de la structure multiéchelle des gels de bêta-lactoglobuline (β lg) obtenus par chauffage des solutions de protéines natives (gels à chaud) en faisant varier largement le pH et la force ionique.
- Etude de la structure multiéchelle des gels de β lg obtenus à partir d'agrégats protéiques (gels à froid) par ajout de sel à pH7.

La première étape a consisté à développer une nouvelle méthodologie capable de fournir des données quantitatives pour caractériser les images confocales des gels protéiques. Dans un premier temps il a fallu choisir le marqueur et les objectifs du microscope. Les objectifs doivent avoir une bonne résolution et un champ d'observation assez grand pour une meilleure analyse statistique. Pour ces raisons nous avons associé deux objectifs, l'objectif à grossissement $\times 20$ pour un champ d'observation plus large et $\times 63$ pour la précision. Nous avons utilisé la rhodamine B pour marquer les protéines. La stabilité de l'émission sur une longue durée d'excitation a été vérifiée. Nous avons surtout vérifié que l'amplitude du signal est bien proportionnelle à la concentration de protéines.

Le MCBL mesure l'intensité ou l'amplitude de fluorescence d'une zone de l'échantillon. Cette zone est divisée en petites unités appelées pixels. L'amplitude moyenne du signal mesure la fluorescence de la zone de pixels considérée. En analyse quantitative il est très important que cette amplitude moyenne soit proportionnelle à la concentration de marqueur présent dans la zone considérée. Etant donné que l'amplitude moyenne change quand on varie l'intensité du laser, le gain (G) et la fenêtre du détecteur ou quand on change de détecteur, nous avons fixé une concentration de rhodamine comme référence. Nous avons montré que le marqueur se fixe de façon homogène sur les protéines et que ces dernières n'altèrent ni la fluorescence ni la relation entre l'amplitude moyenne et la concentration de protéines.

L'analyse quantitative des images que nous avons mis au point est basée sur la détermination de la fonction d'autocorrélation $g(r)$ des intensités de pixels. Cette fonction a été validée sur des modèles d'images. Cette fonction nous donne accès à l'amplitude (B_1) et à la longueur de corrélation (ξ) des fluctuations de concentrations. Ces grandeurs sont équivalents au M_a et R_a des domaines diffusants dans les expériences de diffusion de rayonnement. Pour obtenir ces paramètres nous avons utilisé une fonction exponentielle étirée pour ajuster les données expérimentales. Lorsque les $g(r)$ des systèmes sont ajustés avec le même exposant noté (β), on

peut obtenir une courbe maîtresse en déplaçant les $g(r)$ verticalement et horizontalement. Ceci montre que les structures des gels sont autosimilaires.

Nous avons appliqué systématiquement la méthode de détermination des paramètres structuraux des gels protéiques pour étudier les systèmes obtenus dans diverses conditions.

Nous avons ainsi étudié la structure multiéchelle des gels de bêta-lactoglobuline (β lg) obtenus par chauffage de solutions de protéines natives en faisant varier largement le pH et la force ionique. Selon les conditions expérimentales, les systèmes protéiques obtenus sont soit des gels homogènes ou hétérogènes, soit des agrégats solubles ou des précipités. Sans ajout de sel, les solutions à 100g/l gélifient. C'est pour cette raison que nous avons choisi de partir de cette concentration. Nous avons commencé par étudier l'influence de la force ionique à pH7. On observe que les systèmes deviennent de plus en plus turbides sur une gamme étroite de force ionique. L'étude de la structure de ces gels a montré que B_1 et ξ augmentent lorsque la force ionique augmente. Le même comportement a été observé pour des systèmes sans sel lorsque le pH tend vers le pI. Pour toutes ces expériences, les fonctions $g(r)$ ont pu être ajustées par la même exponentielle étirée avec un exposant $\beta = 1.5$. Notons que cependant cet exposant varie légèrement avec la force ionique lorsque le pH < pI.

La structure locale a été examinée par SAXS, pour les systèmes à pH loin du pI. Lorsque la force ionique est très faible, on observe un pic d'interaction qui traduit la présence d'un ordre local due aux répulsions électrostatiques. Ce pic d'interaction s'atténue pour même disparaître lorsque la force ionique augmente ou quand le pH tend vers le pI. Dans ces derniers cas, la densité de charge des protéines diminue ce qui facilite l'attraction des agrégats protéiques et conduit à une micro-séparation de phase. Cette micro-séparation de phase se produit dès que la force ionique est supérieure à 0.2M à pH7 ou quand le pH est compris entre 4.1 et 5.6 sans sel.

A partir de l'ensemble de ces résultats nous avons établi un diagramme de phase pH/force ionique pour les systèmes de β lg à 100g/l. Ce diagramme de phase montre qu'il faut environ 0.2M pour provoquer une micro-séparation de phase à pH2 et 8 alors que la densité de charge positive à pH2 est largement plus élevée que la densité de charge négative à pH8. Ce phénomène n'est pas encore compris.

Nous avons étudié la structure des gels en variant la concentration de β lg entre 10g/l et 100g/l en présence de 0.25M NaCl à pH7. La valeur de β change peu pour les systèmes compris entre 10 et 65g/l. Ces systèmes précipitent au-dessus d'une certaine force ionique. La transition entre gels homogènes et gels hétérogènes avec des micro-domaines est peu influencée par la concentration de β lg lorsqu'elle est supérieure à 10g/l. Quand la concentration en protéine n'est pas assez élevée pour gélifier la force ionique qu'il faut pour provoquer la précipitation des systèmes augmente de manière significative lorsque la concentration de protéine diminue à partir de 10g/l.

Dans la troisième partie nous avons étudié la gélification des agrégats protéiques préparés dans une première étape à chaud à 80°C. La gélification est obtenue dans une seconde étape par addition de beaucoup de sel quelle que soit la température y compris à 20°C. Pour préparer les agrégats protéiques, nous avons chauffé 80g/l de solution de β lg native en présence de 10mM. A partir de cette solution mère, nous avons préparé les différentes

concentrations par dilution en présence de beaucoup de sel ou en variant la force ionique pour une concentration d'agrégats protéiques donnée. Le temps de gélification des systèmes diminue avec l'augmentation de la taille des agrégats protéiques, de leur concentration, de la force ionique et de la température. Nous avons observé une légère évolution de la turbidité des systèmes en fonction de la force ionique du système à 50g/l. L'augmentation de la turbidité est plus significative avec la diminution de la concentration en agrégats protéiques ou avec l'augmentation de la température pour 0.3M NaCl. L'étude de ces systèmes par diffusion de la lumière a montré qu'on obtient des structures locales identiques aux systèmes étudiés précédemment (gel à chaud) mais pas de micro-séparation de phase. Les micro-domaines qu'on a pu observer ont été obtenus en ajoutant beaucoup de NaCl (0.5M par exemple) à 20g/l d'agrégats protéiques. Les données rhéologiques ont montré que les systèmes préparés à froid gélifient très vite, mais sont très fragiles, à tel point qu'ils coulent lorsqu'on retourne le récipient. En microscopie confocale, nous avons vu que les micro-domaines des gels (système à 20g/l) apparaissent bien après la gélification des systèmes. Quelques systèmes ont ainsi été préparés en présence de CaCl_2 . Nous avons observé qu'il faut une quantité très importante de NaCl (500mM de NaCl pour 10mM de CaCl_2 par exemple) par rapport à CaCl_2 pour avoir à peu près la même structure de gel.

Ce travail nous a permis de comprendre la structure des gels sur une plus grande échelle spatiale et l'influence des conditions expérimentales sur la structure des gels.

Ce travail se poursuit par l'étude de systèmes mixtes bêta-lactoglobuline / k-Carraghénane.

En effet, la présence du kappa-carraghénane influence beaucoup le réseau protéique et permet de créer des gels mixtes d'hétérogénéité variable à froid. Nous avons débuté l'étude de ces systèmes mixtes à la fin de la rédaction de cette thèse c'est pourquoi les résultats ne sont pas mentionnés ici.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Ako, K., Durand, D., Nicolai, T., & Becu, L. (2009a). Quantitative analysis of confocal laser scanning microscopy images of heat-set globular protein gels. *Food Hydrocolloids*, 23, 1111-1119.

Ako, K., Nicolai, T., Durand, D., & Brotons, G. (2009b). Micro-phase Separation Explains the abrupt Structural Change of Denatured Globular protein Gels on Varying the Ionic Strength or pH. *Soft Matter*, 2009, 5, 4033-4041.

Alting, A. C. (2003). Cold gelation of globular proteins. *Wageningen Centre for Food Sciences (WCFS)*, vol. Thesis.

Atkins, P. W., & De Paula, J. (2004). *Chimie Physique*. De Boeck, Oxford University Press.

Baussay, K., Le Bon, C., Nicolai, T., Durand, D., & Busnel, J. (2004). Influence of the ionic strength on the heat-induced aggregation of the globular protein β -lactoglobulin at pH7. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 21-28.

Berne, B., & Percora, R. (1976). *Dynamic light scattering*. New York: Wiley.

Brown, W. (1996). *Light scattering. Principles and developments*. Oxford: Clarendon Press.

Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I.,

North, A. C., & Sawyer, L. (1997). Bovine [beta]-lactoglobulin at 1.8 Å resolution -- still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5(4), 481-495.

Bryant, M. C., & McClements, D. J. (2000). Influence of NaCl and CaCl₂ on cold-set Gelation of Heat-denatured Whey Protein. *Journal of Food Science*, 65(5), 801-804.

Clark, A. H., Kavanagh, G. M., & Ross-Murphy, S. B. (2001). Globular protein gelation-- theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 383-400.

Conchello, J.-A., & Lichtman, J. W. (2005). Optical Sectioning Microscopy. *Nature Publishing Group (npg)*, 2, 920-931.

Dàvila, E., Toldrà, M., Saguer, E., Carretero, C., & Parés, D. (2007). Characterization of plasma protein gels by means of image analysis. *LWT*, 40, 1321-1329.

Donato, L., Garnier, C., Doublier, J. L., & Nicolai, T. (2005). Influence of the NaCl or CaCl₂ concentration on the structure of heat-set bovine serum albumin gels at pH7. *Biomacromolecules*, 6, 2157.

Dupont, M. (1965). Etude d'une étape réversible dans la thermodénaturation de la β -lactoglobuline bovine A. *Biochimica and Biophysica Acta*, 102, 500-513.

- Euston, S. R., Ur-Rehman, S., & Costello, G. (2007). Denaturation and aggregation of b-lactoglobulin: a preliminary molecular dynamics study. *Food Hydrocolloids*, *21*, 1081-1091.
- Gaucheron, F., ed (2003). *Minéraux et Produits laitiers*. Londre-Paris-New York (p. 164-166).
- Gibson, S. F., & Lanni, F. (1991). Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. *Optical society of America*, *8*, 1601-1613.
- Griko, V. Y., & Kutysenko, V. P. (1994). Differences in the process of b-lactoglobulin cold and heat denaturations. *Biophysical Journal*, *67*, 356-363.
- Hagiwara, T., Kumagai, H., & Nakamura, K. (1998). Fractal analysis of aggregates in heat-induced BSA gels. *Food Hydrocolloids*, *12*(1), 29-36.
- Higgins, J. S., & Benoit, H. C. (1994). *Polymers and neutron scattering*. Oxford: Clarendon Press.
- Kavanagh, G. M., Clark, A. H., & Ross-Murphy, S. B. (2000). Heat-induced gelation of globular proteins : part 4. gelation kinetics of low pH b-lactoglobulin gels. *Langmuir*, *16*, 9584-9594.
- Le Bon, C., Nicolai, T., & Durand, D. (1999). Kinetics of Aggregation and Gelation of Globular Proteins after Heat-Induced Denaturation. *Macromolecules*, *32*, 6120-6127.
- Luo, R., Sun, Y. F., Peng, X. F., & Yang, X. Y. (2006). Tracking sub-micron fluorescent particles in three dimensions with a microscope objective under non-design optical conditions. *Measurement Science and Technology*, *17*, 1358-1366.
- Marangoni, A. G., Barbut, S., McGauley, S. E., Marcone, M., & Narine, S. S. (2000). On the structure of particulate gels--the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, *14*(1), 61-74.
- McClements, D. J., & Keogh, M. K. (1995). Physical Properties of Cold-Setting Gels Formed from Heat-Denatured Whey Protein Isolate. *J. Sci. Food Agric.*, *69*, 7-14.
- Mehalebi, S. (2008). Agrégation et gélification de la b-lactoglobuline: Influence des interactions électrostatiques. *Polymères, Colloïdes, Interfaces*, vol. Ph.D. Le Mans: Univ. du Maine.
- Mehalebi, S., Nicolai, T., & Durand, D. (2008a). The influence of electrostatic interaction on the structure and the shear modulus of heat-set globular protein gels. *Soft Matter*, *4*, 893.
- Mellema, M., Heesakkers, J. W. M., Van Opheusden, J. H. J., & Van Vliet, T. (2000). Structure and scaling behavior of Aging Rennet-Induced Casein gels examined by Confocal microscopy and Permeametry. *Langmuir*, *16*, 6847-6854.
- Oliveira, K. M. G., Valente-Mesquita, V. L., Botelho, M. M., Sawyer, L., Ferreira, S. T., & Polikarpov, I. (2001). Crystal structures of bovine b-lactoglobulin in the orthorhombic space

group C222₁

Structural differences between genetic variants A and B and features of the Tanford transition. *European journal of biochemistry*, 268, 477-483.

Park, K. H., & Lund, D. B. (1984). Calorimetric Study of Thermal Denaturation of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 67, 1699-1706.

Pouzot, M., Durand, D., & Nicolai, T. (2004). Influence of the ionic strength on the structure of heat set globular protein gels of β -lactoglobulin. *Macromolecules*, 37, 614-620.

Pouzot, M., Nicolai, T., Visschers, R. W., & Weijers, M. (2005). X-ray and light scattering study of the structure of large protein aggregates at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 19, 231-238.

Pugnali, L. A., Matia-Merino, L., & Dickinson, E. (2005). Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: Quantification from confocal microscopy and image analysis. *Colloids and Surfaces B*, 42, 211-217.

Qi, X. L., Brownlow, S., Holt, C., & Sellers, P. (1995). Thermal denaturation of β -lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1248, 43.

Relkin, P. (1996). Thermal Unfolding of β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, and Bovine Serum Albumin. A thermodynamic Approach. *Critical Reviews in Food science and Nutrition*, 36(6), 565-601.

Renard, D., & Lefebvre, J. (1992). Gelation of globular proteins : effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation . A simple model and its application to β -lactoglobulin heat-induced gelation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, 287-291.

Snyder, M. A., Vlachos, D. G., & Nikolakis, V. (2007). Quantitative analysis of membrane morphology, microstructure, and polycrystallinity via LSCM: Application to NaX zeolite membranes. *Journal of Membrane Science*, 290, 1-18.

Stading, M. (1993). Rheological behaviour of biopolymer gels in relation to structure. *Food Science*. Göteborg, Sweden: Chalmers University of Technology.

Stading, M., & Hermansson, A. (1990). Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 4(2), 121-135.

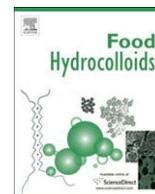
Susanto, A., Herrmann, T., & Hubbuch, J. (2006). Short-cut method for the correction of light attenuation influences in the experimental data obtained from confocal laser scanning microscopy. *Journal of chromatography A*, 1136, 29-38.

Tanford, C., Bunville, L., & Nozaki, Y. (1959). The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH7.5. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4032-4036.

Tanford, C. (1960). Ionization-linked Changes in Protein Conformation. I. Theory. *PROTEIN CONFORMATION THEORY*, 83, 1629-1634.

- Timasheff, S. N., Townend, R., & Mescanti, L. (1966). The optical rotary dispersion of the β -lactoglobulins. *J. Biol. Chem.*, *241*, 2496-2501.
- Townend, R., Kumosinski, T. F., & Timasheff, S. N. (1967). The circular dichroism of variants of β -lactoglobulin. *J. Biol. Chem.*, *242*, 4538-4545.
- Townend, R., Winterbottom, R. J., & Timasheff, S. N. (1960). Molecular interactions in β -lactoglobulin . II. Ultracentrifugal and electrophoretic studies of the association of β -lactoglobulin below its isoelectric point. *Journal of the American Chemical Society*, *82*, 3161-3168.
- Urban, C. (1999). Development of fiber optic based dynamic light scattering for a characterization of turbid suspensions. Zürich: ETH Zürich.
- Urban, C., & Schurtenberger, P. (1998). Characterisation of turbid colloidal suspensions using light scattering techniques combined with cross correlation methods. *Journal of Colloid and Interface Science*, *207*, 150-158.
- Weijers, M. (2005). Aggregate morphology and network properties of ovalbumin. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Universiteit.
- Weijers, M., Sagis, L. M. C., Veerman, C., Sperber, B., & van der Linden, E. (2002). Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength. *Food Hydrocolloids*, *16*, 269-276.
- Weijers, M., Visschers, R. W., & Nicolai, T. (2004). Influence of the ionic strength on the structure of heat-set globular protein gels at pH 7. Part II ovalbumin. *Macromolecules*, *37*, 8709.

PUBLICATIONS



Quantitative analysis of confocal laser scanning microscopy images of heat-set globular protein gels

Komla Ako, Dominique Durand, Taco Nicolai*, Lydiane Becu

Polymères, Colloïdes, Interfaces, UMR CNRS Université du Maine, 72085 Le Mans cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2008

Accepted 13 September 2008

Keywords:

Confocal laser scanning microscopy

Protein

Gel

Light scattering

ABSTRACT

Gels of the globular protein β -lactoglobulin were made by heating solutions at pH 7 and different NaCl concentrations (C_s). The influence of the ionic strength on the gel structure was studied by confocal laser scanning microscopy (CLSM). For $C_s < 0.2$ M the images were homogeneous, but at higher NaCl concentrations micro-phase separation was observed. The protein concentration in the two phases was determined from the images. It is shown how CLSM images can be quantitatively analysed in terms of the pair correlation function of the protein concentration fluctuations, yielding results that can be directly compared to those obtained from light scattering. The transition between so-called finely stranded and particulate gels is explained by a switch from net repulsive to net attractive interaction between growing protein aggregates.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the native state globular proteins have a compact well-defined structure stabilized by various interactions. Heating weakens the effective interaction and renders the structure more mobile. In many cases, this allows bond formation between different proteins leading to aggregation (Nicolai, 2007b; Nicolai & Durand, 2007). Aggregates of different sizes and structures are formed depending on the concentration, the pH and the ionic strength (Durand, Gimel, & Nicolai, 2002; Pouzot, Nicolai, Visschers, & Weijers, 2005). The size of the aggregates formed after intensive heat treatment increases with increasing concentration (Baussay, Le Bon, Nicolai, Durand, & Busnel, 2004; Mehalebi, Nicolai, & Durand, 2008b) and above a critical concentration, gels are formed (Clark, 1998; De la Fuente, Singh, & Hemar, 2002). The structure of the gels depends strongly on the strength of the electrostatic interactions (Nicolai, 2007b). Transparent gels that are homogeneous beyond length scales of a few tens of nanometers are formed when the electrostatic repulsion is strong, i.e. far from the isoelectric point (pI) and in the absence of added salt. Close to pI or at high ionic strength the gels are turbid and heterogeneous up to length scales of several micrometers. Based on microscopy images the transparent gels are sometimes called fine stranded gels and the turbid gels are sometimes called particulate gels (Ikeda & Morris, 2002; Langton & Hermansson, 1992).

Transparent gels or gels with moderate turbidity can be studied by scattering techniques (Nicolai, 2007a). The structure can be described in terms of the osmotic compressibility and the correlation length that characterize the amplitude and length scale of the concentration fluctuations of the gel. A detailed investigation using scattering techniques was done for gels formed by heat-denatured β -lactoglobulin (β -lg), which is the main protein component of whey (Mehalebi, Nicolai, & Durand, 2008a). A strong, but continuous, increase of the osmotic compressibility and the correlation length were found with increasing salt concentration and decreasing pH towards pI. The transition between transparent homogeneous gels and turbid heterogeneous gels occurred over a small range of the salt concentration and the pH.

When the correlation length exceeded about $1 \mu\text{m}$, the gels became too turbid for characterisation with light scattering techniques. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) allows one to investigate more heterogeneous gels (Loren, Langton, & Hermansson, 2007). Indeed a number of globular protein gels have already been studied using CLSM showing that close to pI or at high ionic strength they are heterogeneous on microscopic length scales (Mehalebi et al., 2008a; Verheul & Roefs, 1998). Generally, the images are shown for illustration and no quantitative analysis of the gel structure has been done, but there are exceptions (e.g. Mellema, Heesackers, van Opheusden, & van Vliet, 2000; Pugnaloni, Matia-Merino, & Dickinson, 2005).

The objective of the present work was to study the structure of heat-set β -lg as a function of the ionic strength by CLSM and to show how CLSM images can be analysed quantitatively in terms of the amplitude and the length scale of the concentration fluctuations. The results will be compared to those obtained by light

* Corresponding author.

E-mail address: Taco.Nicolai@univ-lemans.fr (T. Nicolai).

scattering for the same system in order to obtain a more complete picture of the variation of the gel structure as a function of the ionic strength. We will also show how the turbidity can be determined using CLSM.

2. Materials and methods

The β -lg used in this study was a gift from Lactalis (Laval, France). It consisted of a mixture of the variants *A* and *B* in about equal quantities and traces of α -lactalbumin. Solutions were prepared by dissolving the powder in pure water (Millipore) containing 3 mM azide to protect against bacterial growth. The solutions were dialyzed against the solvent after which the pH was set by addition of aliquots of concentrated (0.1 M) solutions of HCl or NaOH while vigorously stirring. The solutions were filtered through 0.45 μ m pore size filters (Anatope) after which the concentration was determined by measuring the UV absorption at 280 nm using the extinction coefficient 0.96 l g⁻¹ cm⁻¹ (Townend, Winterbottom, & Timasheff, 1960).

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) was used in the fluorescence mode. Observations were made with a Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems Heidelberg, Germany). Two different water immersion objective lenses were used: HCx PL APO 63 \times NA = 1.2 and 20 \times NA = 0.7. The theoretical resolution of these lenses was 0.3 μ m and 0.5 μ m, respectively, in the *x*-*y* plane.

β -lg was labelled with the fluorochrome rhodamine B isothiocyanate, by adding a small amount of a concentrated rhodamine solution to the β -lg solutions before heat treatment. Solutions were inserted between a concave slide and a coverslip and then hermetically sealed. The samples were heated overnight in a thermostated bath at 80 °C. The incident light was emitted by a laser beam at 543 nm which excited the rhodamine. The fluorescence light was recorded between 560 and 700 nm.

The turbidity characterizes the fraction of light that is transmitted through the sample, see below. Turbidity measurements were done at 20 °C using a UV-Visible spectrophotometer Varian Cary-50 Bio (Les Ulis, France). The turbidity (τ) was determined as a function of the wavelength in the range 350–1100 nm.

3. Results and discussion

3.1. Relationship between the CLSM signal and the protein concentration

The proteins were marked with rhodamine B that binds strongly to proteins. We found that the fraction of free rhodamine was negligible in all protein systems studied here. The measured signal (*A*) is proportional to the fluorescence intensity and the absolute values are set by the gain and the laser intensity. The possible values of *A* ranged from 0 to 255 in integer steps for the 8-bit format used in this study. Generally, the fluorescence intensity varies with the pixel position and it is important to choose the gain and the laser intensity in such a way that the whole range of intensities is properly described by the signal distribution *f*(*A*) and that saturation is avoided. The 8-bit format of the signal values means that it is not possible to properly describe the whole range of fluorescence intensities when it varies by more than a factor 100.

In order to relate *A* to the protein concentration we determined *f*(*A*) for unheated solutions with different protein and rhodamine concentrations. Unheated protein solutions are homogeneous on length scales accessible to CLSM so that on average the fluorescence intensity should be the same for each pixel. However, the amount of markers that fluoresce fluctuates in time so that the average fluorescence intensity spatially varies and a distribution of *A* is measured. The width of the distribution can be characterized by the normalized standard deviation:

$$\sigma = \langle A \rangle^{-1} \sqrt{n^{-1} \sum_{i=1}^n (A_i - \langle A \rangle)^2} \quad (1)$$

where $\langle A \rangle$ is the spatially averaged signal and A_i is the value of pixel *i*. The smallest value of σ is thus set by the intensity fluctuations of the markers. It decreases if the volume that is illuminated is larger or if the duration of illumination is longer. The illumination volume is determined by the optics and changes when different lenses are used, but is independent of the pixel size. The duration is determined by the scanning speed that, unfortunately, could not be varied with the equipment used for this study. However, σ could be decreased by increasing the marker concentration or by averaging repeated measurements. In the latter case one has to be sure that the spatial distribution of fluorochrome, and thus the proteins, remains the same for the duration of the repeated measurements.

When comparing solutions with widely different marker concentrations it is not possible to use the same gain and laser intensity. Therefore one needs to establish the relationship between these parameters and the signal value, but this relationship may not be constant, e.g. due to slow changes of the laser intensity. In practice, it is therefore better to determine the absolute signal value using a standard, similarly to what is done in scattering experiments. Here we have used rhodamine solutions of known concentration as standards.

The rhodamine concentration needs to be sufficiently high to give a significant signal, but not so high that it modifies the structure of protein gels. The possible influence of rhodamine on the structure was investigated by measuring the turbidity of gels formed by heating β -lg solutions containing different amounts of rhodamine. We found that the structure of protein gels was not significantly influenced by rhodamine for concentrations up to at least 10 ppm (g/g), which gives a largely sufficient signal. Unless specified otherwise we have used 5 ppm rhodamine to mark the proteins.

The signal and its standard deviation were the same within the experimental error for solutions containing rhodamine at a fixed concentration and different concentrations of β -lactoglobulin up to at least *C* = 100 g/L. This means that binding to β -lg does not influence the fluorescence of rhodamine. The same observation was made after heating the solutions. Fig. 1 shows $\langle A \rangle$ as a function of the protein concentration for a molar ratio of β -lg to rhodamine equal to 22. A linear relationship was found showing that *A* is indeed proportional to *C*.

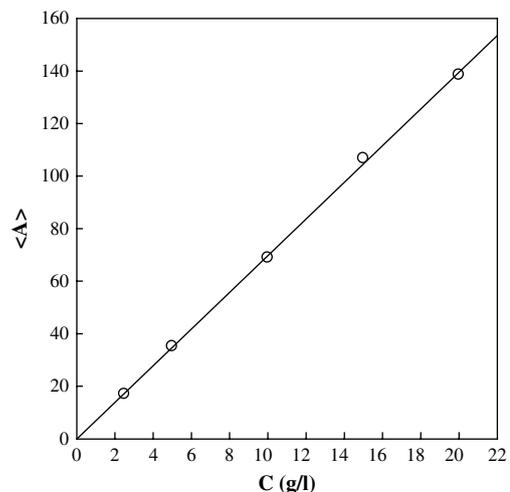


Fig. 1. Linear relationship between the detected signal and the protein concentration. The molar ratio β -lg/rhodamine was equal to 22.

3.2. Turbidity

In the measurements discussed so far $f(A)$ was determined for a single plane close to the sample surface, but the effect of the penetration depth on the signal was also studied. For transparent pure rhodamine solutions $f(A)$ was the same for penetration depths down to at least 100 μm . However, for turbid samples scattering of the incident and emitted radiation reduces the detected fluorescence with increasing penetration depth (z). In fact, by measuring $\langle A \rangle$ as a function of z one can determine the turbidity (τ) of the system. The turbidity can be calculated from the decrease of the transmitted light intensity (I_t) relative to the incident light intensity (I_0):

$$\frac{I_t}{I_0} = \exp(-\tau \cdot l) \quad (2)$$

Here l is the path length of the light which is equal to two times z because both the incident and emitted radiation travel a distance z through the sample. Since $\langle A \rangle$ is proportional to I_t , we may write:

$$\ln(\langle A \rangle) = -2\tau \cdot z + k \quad (3)$$

where k is a constant. By writing Eq. (3) we have assumed that the turbidity is the same for the incident and emitted light, which is not true since it decreases with increasing wavelength. The wavelength of the incident light is centred at 543 nm and that of the emitted light is centred at 580 nm. One would expect that by applying Eq. 3 the turbidity at an intermediate wavelength is found.

In order to verify Eq. 3 we have measured $\langle A \rangle$ as a function of z for rhodamine solutions containing different amounts of latex particles and calculated the transmission as $\langle A \rangle$ at z divided by $\langle A \rangle$ at $z=0$, see Fig. 2a. An exponential decrease was indeed observed. The turbidity is plotted as a function of the latex concentration in Fig. 2b. We have also determined τ as a function of the wavelength (λ) using a spectrophotometer. The agreement between the two measurements was very good if we used the values at $\lambda = 540$ nm, see Fig. 2b. This wavelength is slightly smaller than expected from the incident light (centred at 543 nm) and the emitted light (centred at 580 nm). Probably, there is a small additional source of light absorption in CSLM measurements. The range of the turbidity values that can be measured using CSLM extends to much larger values because the path length is smaller.

A mismatch of the refractive index of the medium with respect to that of the immersion liquid also leads to a dependence of the signal on z . In the present study we found that this occurred for high salt or protein concentrations. In this case it is necessary to correct the transmission values before calculating the turbidity, using the z -dependence of $\langle A \rangle$ of the transparent samples before heating. This was done by dividing $\langle A \rangle$ of the heated sample by that of the unheated sample. The correction is important only for weakly turbid samples.

3.3. Calculation of the pair correlation function

For isotropic systems, the pair correlation function of concentration fluctuations as a function of the distance r is defined as:

$$g(r) = \frac{\langle C(0) \cdot C(r) \rangle}{C^2} \quad (4)$$

If $A \propto C$, the pair correlation function can be calculated directly from the pixel signals at positions \vec{i} and \vec{j} :

$$g(r) = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m A_i \cdot A_j}{\sum_{i=1}^n A_i \cdot \sum_{j=1}^m A_j} \quad \text{with } r = |\vec{i} - \vec{j}| \quad (5)$$

The pixel positions were chosen randomly within the pixel area in order to ensure that r varies continuously. For large r , A_i and A_j are

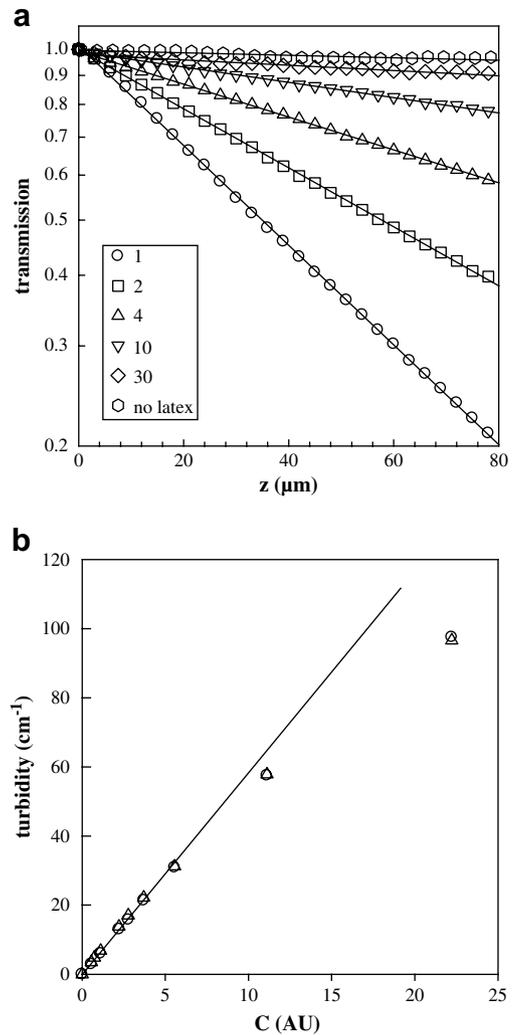


Fig. 2. a. Transmission a function of the penetration depth for latex solutions at different dilution factors of a stock solution, indicated in the figure. In all cases the rhodamine concentration was fixed at 5 ppm. b. Turbidity as a function of the concentration determined by CSLM (circles) and by a spectrophotometer at $\lambda = 540$ nm (triangles).

no longer correlated so that $g(r)$ becomes unity. In practice, $g(r)$ is calculated as a histogram with discrete intervals Δr . The interval is a compromise between increasing noise with decreasing Δr and the increasing loss of detail with increasing Δr . In order to avoid finite size effects, pixel positions i are chosen at a distance larger than the maximum value of r (r_{max}) from the edge of the image and $g(r)$ is calculated in the range $2 < r < r_{\text{max}}$.

By definition $(g(r) - 1) = \sigma^2$ for r smaller than the size of the illumination area, i.e. smaller than the resolution of the microscope lens. However, there is no correlation between the signal fluctuations of neighbouring pixels when it is caused by random variation of the fluorescence intensity of the marker. Therefore this source of signal fluctuation has no influence on $g(r)$ even though it does influence the value of σ . For systems that are homogeneous on length scales larger than the resolution of CSLM, $g(r)$ is unity at all values of r larger than the resolution, while σ depends on the volume and duration of illumination, and the marker concentration. In tests on pure rhodamine solutions we found this to be the case.

The minimum value of r that can be explored by CSLM depends on the resolution. The best resolution was obtained in this study

with the $63\times$ water immersion objective and is theoretically $0.3\ \mu\text{m}$ in the x - y plane, i.e. perpendicular to the objective, and about $0.6\ \mu\text{m}$ in the z -direction. In practice, the resolution is worse especially in the z -direction, e.g. due to non-ideal matching of the refractive indices. Fortunately, for isotropic systems such as protein gels it is sufficient to correlate pixel amplitudes as a function of r only in the x - y plane. A representative description of the system is obtained by averaging over many different planes.

We have verified that the same $g(r)$ is obtained when pixels are chosen in two or three dimensions. Fig. 3a shows a 2-D slice of a simulated particle gel made by off-lattice simulations of diffusion limited cluster-cluster aggregation (DLCA) of monodisperse spheres, see (Rotterreau, Gimel, Nicolai, & Durand, 2004) for details and the 3-D image. The particle diameter was taken as the unit of length. The pixel size was taken as 0.125, but there was no effect of the pixel size on $g(r)$ as long as it was less than unity. Gels formed by DLCA are found to be self-similar with a fractal dimension $d_f = 1.7$ – 1.8 over a range of length scales limited by the elementary particle size and the correlation length. The corresponding $g(r)$ obtained by correlating values in two or three dimensions is shown to be the same in Fig. 3b.

For self-similar systems $g(r) \propto r^{d_f-3}$ over a limited range of r between the elementary unit of the structure and either its overall

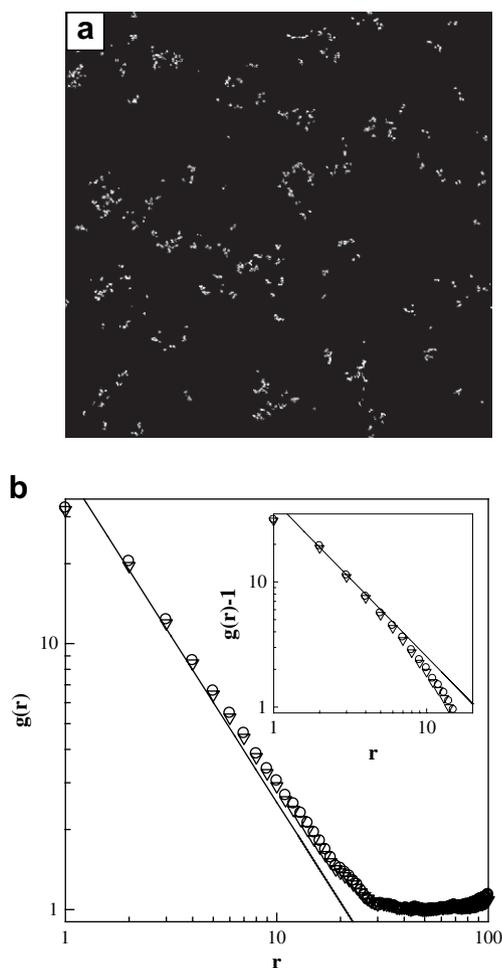


Fig. 3. a. 2-D slice of a simulated particle gel formed by diffusion limited cluster aggregation of monodisperse spheres with unit diameter at a volume fraction of 0.2%. b. Double logarithmic representation of the pair correlation function of the simulated gel shown in (a) calculated in two (circles) and three (triangles) dimensions. The distance r is in units of the diameter. The inset shows $g(r) - 1$ in the same representation. The solid lines have a slope of -1.25 .

size or the correlation length in the case of overlapping particles or gels. At longer distances $g(r)$ goes to unity and $g(r) - 1$ goes to zero in a system dependent manner. The power law decay represented by the solid lines in Fig. 3b describes $g(r)$ or $g(r) - 1$ only over a very limited range of r . Simulations show that the fractal structure of gels can only be observed for dilute systems.

We have also tested for real systems consisting of large spherical particles that 2-D and 3-D analysis yield the same results at distances larger than the resolution in the z -direction. By taking only data in the x - y plane one exploits the better resolution in this plane. However, one cannot avoid spurious fluorescence from planes above and below the plane in focus, which remains a serious limitation of the technique. This could in principle be resolved by deconvolution of the 3-D image if the so-called point spread function (psf) is known. We did not obtain satisfactory results using the theoretical psf, because in practice the psf depended on the system and the observation depth. To determine the psf experimentally and perform the deconvolution would be very laborious and has not been attempted.

A second advantage of using only x - y planes is that large distances can be explored without needing a large penetration depth. This is important for very turbid samples for which the signal decreases sharply with increasing penetration depth.

In order to obtain accurate values of $g(r)$ for large r one needs to use lower magnifications. For a given lens, the magnification can be increased with the numerical zoom, which changes the pixel size but not the volume of illumination. In practice, it was found sufficient to use only two different zooms to cover the r -range accessible with a given lens. The magnification can be further decreased by using a lens with lower resolution. In this case the illumination volume increases, which reduces σ and decreases $g(r) - 1$ by a constant factor. Correlation functions obtained at different magnifications need to be superimposed in the overlapping range of r . When different lenses are used, $g(r) - 1$ obtained with the lower resolution lens needs to be multiplied by a constant. This constant is equal to the ratio of σ^2 obtained with the two lenses if the effect of random fluorescence fluctuations can be neglected.

We stress that no segmentation was applied before the pair correlation function was calculated. Segmentation may be useful to highlight particular features of the structure on the image (Aguilera & Germain, 2007). However, in the case of protein gels no unambiguous criterion for segmentation exists. The calculated pair correlation functions were found to be different after segmentation and dependent on the choice of the threshold values. In our opinion, segmentation should be avoided especially if one wishes to compare the results of CLSM with those of scattering techniques.

3.4. Quantitative analysis of CLSM images of β -lg gels

Solutions containing 100 g/L β -lg and 5 ppm rhodamine were prepared at different NaCl concentrations (C_s) between 0 and 2 M at pH 7. Gels were formed by heating in sealed microscope slides for several hours at $80\ ^\circ\text{C}$. It was verified that longer heating did not lead to further structural change. For gels, the protein concentration at a given position does not fluctuate. However, the fluorescence intensity fluctuates randomly as discussed above. Therefore averages over several scans were taken to reduce the effect of these fluctuations on $f(A)$. Fig. 4 shows typical images as a function of the salt concentration. The images were homogeneous below 0.2 M NaCl, but the gel structure became heterogeneous up to length scales of several microns at higher ionic strength. The grey scale of the images shown in Fig. 4 is proportional to the protein concentration. No attempt was made to improve the visual appearance of the images by any of the standard methods used in microscopy (Aguilera & Germain, 2007).

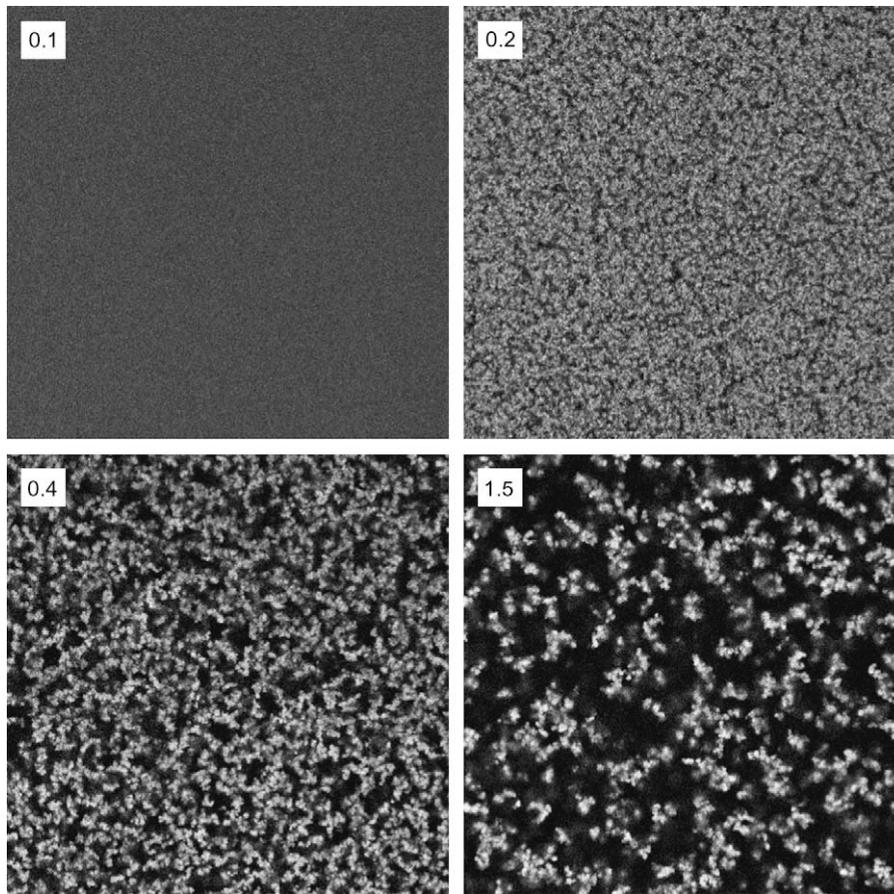


Fig. 4. CLSM images of heat-set β -lg gels with $C = 100$ g/L, pH 7 and different ionic strengths indicated in the figure. The width of the image is $160 \mu\text{m}$.

Since $A \propto C$, the protein concentration distribution $f(C)$ can be trivially obtained from the signal distribution $f(A)$. Whereas $f(C)$ represents the volume fraction of places with concentration C , $C \cdot f(C)$ represents the fraction of proteins situated in places with concentration C . In Fig. 5 we have plotted $f(C)$ and $C \cdot f(C)$ as a function of C for systems at different ionic strength. At ionic strengths larger than about 0.4 M , the distribution is bimodal indicating the formation of two distinct phases. The comparison between $f(C)$ and

$C \cdot f(C)$ shows that while the weight fraction of proteins in the dense phase is large, the volume fraction of the dense phase is small. Therefore the bimodal character of the distribution is more clearly seen with $C \cdot f(C)$.

The values of σ^2 give a rough indication of the heterogeneity of the gels and are plotted a function of C_s in Fig. 6. For $C_s = 0.15 \text{ M}$ and below, the value of σ^2 was equal to that of pure rhodamine solutions under the same conditions.

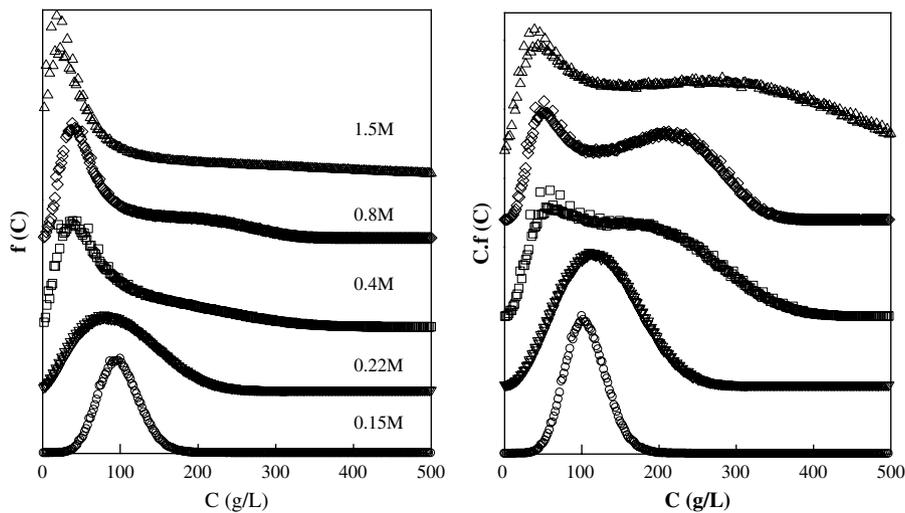


Fig. 5. Protein concentration distribution of the volume fraction (left) and of the weight fraction (right) of proteins of the in heat-set β -lg gels formed at pH 7 and different NaCl concentrations indicated in the figure.

The increase of the heterogeneity caused a strong increase of the turbidity. In Fig. 7 we have plotted the turbidity at $\lambda = 540$ nm as a function of the ionic strength, which shows a very strong increase between $C_s = 0.05$ M, where the solutions were transparent, and $C_s = 0.2$ M, where they were opaque. A broad range of turbidities could be measured by combining extinction measurements using a spectrophotometer and CLSM. In the small range of ionic strengths where both techniques could be applied the same values were found.

Pair correlation functions were calculated using a large number of independent planes (518×518 pixels). In this way we ensured that $g(r)$ was representative of the whole sample. A broad range of r could be covered by analysing images of the same system with different numerical zooms and with two different lenses. Fig. 8a shows examples of pair correlation functions of protein gels obtained at different ionic strengths. For $C_s < 0.2$ M, $g(r)$ is unity within the experimental noise over the whole range of r larger than the resolution, which was about 300 nm. At larger ionic strengths, the amplitude of $g(r)$ increased rapidly with increasing salt concentrations.

The images show that the protein gels are formed by connected protein rich domains, which is reflected in the shape of $g(r)$. At short distances $g(r)$ varies little which means that the domains are homogeneous. In this range $C \cdot g(r)$ is determined by the excess density of proteins in the domains compared to the average concentration. At larger r , $g(r)$ decreases sharply at a value of r that characterizes the size of the domains. The form of the decay of $g(r)$ is determined by the shape of the domains and the way they are connected. A very weak minimum was observed which is caused by the depletion of proteins between protein rich domains. At larger distances the system is homogeneous and $g(r)$ is unity.

The decay of $g(r)$ could be described by a stretched exponential decay:

$$g(r) = B_1 \exp \left[- (r/\xi)^\beta \right] + 1 \tag{6}$$

Of course, this description failed to describe the weak minimum observed at larger r where $g(r)$ became less than unity. The value of β was close to 1.5 at all ionic strengths, which means that $g(r) - 1$ could be superimposed within the experimental error by horizontal and vertical shifts, see Fig. 8b. B_1 is the amplitude of the concentration fluctuations and ξ is the correlation length of the concentration fluctuations. B_1 increased with increasing ionic

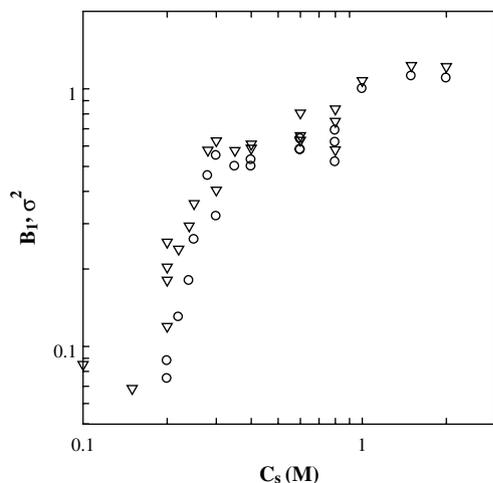


Fig. 6. Dependence of σ^2 (triangles) and B_1 (circles) on the NaCl concentration for heat-set β -lg gels formed at pH 7. B_1 was obtained from fits of $g(r)$ to Eq. (6), see Fig. 8.

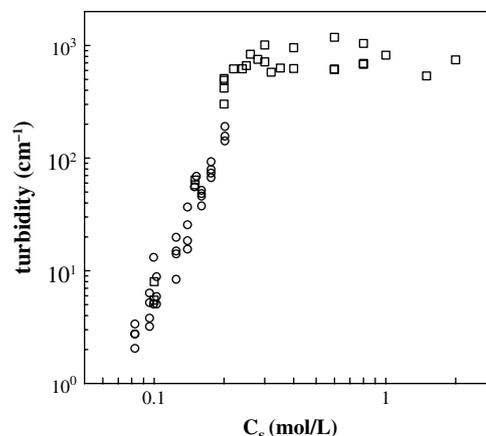


Fig. 7. Dependence of the turbidity at $\lambda = 540$ nm on the NaCl concentration for heat-set β -lg gels formed at pH 7. Circles represent data obtained with a spectrophotometer and squares represent data obtained with CLSM.

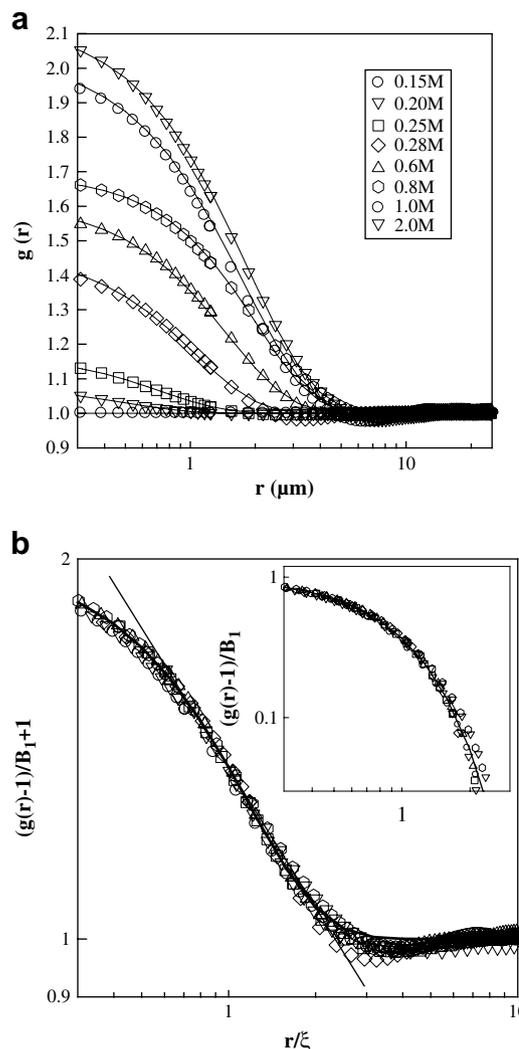


Fig. 8. a. Semi-logarithmic representation of the pair correlation functions of heat-set β -lg gels formed at pH 7 and different NaCl concentrations indicated in the figure. The solid lines represent fits to Eq. (6). b. Double logarithmic representation of the master curve of the data shown in (a) obtained by normalizing $g(r)$ with the amplitude and r with the correlation length. The straight line gives an approximate description of the data over a limited range of r and could mistakenly be interpreted as indicating a self-similar structure, see text. The inset shows $(g(r) - 1)/B_1$.

strength from less than 0.1 below 0.2 M to more than 1 at 1 M, see Fig. 6. σ^2 should be close to B_1 if the influence of random fluctuations of the fluorescence on $f(A)$ can be neglected. The comparison in Fig. 6 shows that this was indeed the case at high ionic strength, where B_1 and σ^2 were close, but at low ionic strengths B_1 goes to zero while σ^2 reached a constant value. ξ increased weakly with increasing ionic strength in the range where it could be studied with CLSM, see below.

3.5. Comparison with light scattering

With scattering techniques one measures the intensity I of the scattered radiation as a function of the scattering wave vector ($q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$, with λ the wavelength of the light in the medium and θ the angle of observation). The value of I extrapolated to $q=0$ is related to the osmotic compressibility while its q -dependence is described by the so-called structure factor ($S(q)$) (Brown, 1996; Nicolai, 2007a):

$$\frac{KI}{C} = M_a \cdot S(q) \tag{7}$$

where K is a constant and M_a is the so-called apparent molar mass that is proportional to the osmotic compressibility. $S(q)$ is proportional to the Fourier transform of the pair correlation function that characterizes the structure in real space:

$$S(q) \propto \int_0^\infty (g(r) - 1) \frac{\sin(qr)}{qr} 4\pi r^2 dr \tag{8}$$

As mentioned in the introduction, light scattering and turbidimetry have been used to analyse the structure of β -lg gels as a function of the NaCl concentration up to 0.2 M (Mehalebi et al., 2008a). At higher ionic strengths the gels were too turbid for these techniques. For $C_s < 0.05$ M transparent gels were obtained and scattering intensity was independent of q in the range covered by light scattering, which means that the transparent gels were homogeneous on length scales larger than about 20 nm. Between 0.08 M and 0.2 M NaCl, the structure factor could be described by the following equation:

$$S(q) = (1 + (q \cdot \xi)^2)^{-1} \tag{9}$$

where ξ is again the correlation length that characterizes the length scale of the concentration fluctuations. Eq. (9) implies that for $q \cdot \xi > > 1$, $S(q) \propto q^{-2}$, which is characteristic for self-similar structures with $d_f = 2$. Thus in this range of salt concentrations the structure of the gels was self-similar on length scales between that of the local structure and the correlation length.

The pair correlation function corresponding to $S(q)$ described by Eq. (9) is:

$$g(r) = B_2 \cdot r^{-1} \exp(-r/\xi) + 1 \tag{10}$$

where B_2 is a constant that depends on the local structure of the system. It is obvious that Eq. (10) cannot describe the structure of the more turbid and heterogeneous gels studied by CLSM. A qualitative change of the gel structure occurs between 0.2 and 0.3 M NaCl.

In general, the apparent molar mass can be calculated from $g(r)$ as follows:

$$\int (g(r) - 1) 4\pi r^2 dr = \frac{M_a}{N_a C} \tag{11}$$

Using for $g(r)$ Eq. (6) if $C_s > 0.2$ M or Eq. (10) if $C_s < 0.2$ M the integration can be analytically solved yielding:

$$M_a = \frac{8\pi}{3} C \cdot N_a \cdot B_1 \xi^3 \quad C_s > 0.2 \text{ M} \tag{12a}$$

$$M_a = 4\pi C \cdot N_a \cdot B_2 \xi^2 \quad C_s < 0.2 \text{ M} \tag{12b}$$

The numerical prefactor ($8\pi/3$) in Eq. (12a) was calculated using for β in Eq. (6) the value 1.5 that was found experimentally. However the prefactor depends only weakly on the value of β . We note that in deriving Eq. (12a) we ignored the contribution of $g(r)$ for larger r , where $g(r)$ became slightly negative. One may picture the gel as an ensemble of “blobs” with size ξ and molar mass M_a . The density of the blobs is proportional to $C \cdot B_1$ for $C_s > 0.2$ M and increases weakly with increasing ionic strength. For $C_s < 0.2$ M it is proportional to $C \cdot B_2 \cdot \xi^{-1}$ and decreases as a power law with increasing ξ , which is characteristic for fractal structures. B_2 was found to increase weakly with increasing ionic strength.

In Fig. 9 we compare the apparent molar mass and the correlation length obtained from light scattering for $C_s < 0.2$ M and from CLSM for $C_s > 0.2$ M. The combined results show that M_a varies weakly for $C_s < 0.05$ M, then increases exponentially over a relatively narrow range of NaCl concentrations between 0.1 and 0.2 M, and finally increases weakly for $C_s > 0.3$.

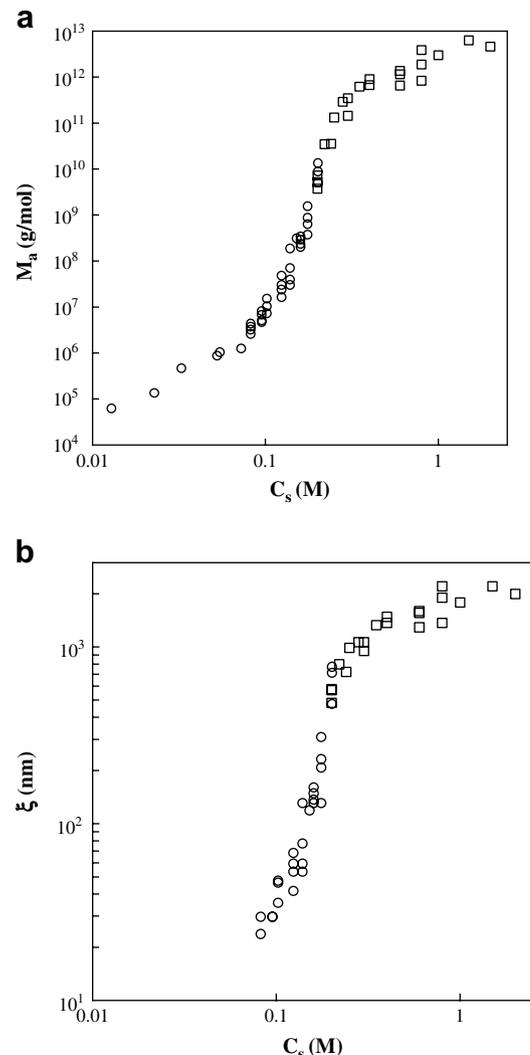


Fig. 9. Dependence on the NaCl concentration of the apparent molar mass (a) and the correlation length (b) of heat-set β -lg gels formed at pH 7. Circles represent data obtained with light scattering and squares represent data obtained with CLSM.

The correlation length also increased strongly between about 0.1 and 0.2 M followed by a weak increase at higher ionic strengths. The correlation length could not be determined with light scattering for $C_s < 0.07$ M. However, small angle X-ray scattering showed that at lower ionic strengths the gel structure was formed by thin branched proteins strands with a radius of a few nanometers that were relatively well ordered with a characteristic distance between the strands of about 15 nm (Nicolai, Pouzot, Durand, Weijers, & Visschers, 2006). With increasing ionic strength the local order disappeared and the structure became self-similar on length scales ranging from about 15 nm to ξ .

4. Discussion

The strong increase of M_a and ξ reflects the increase of the amplitude and the length scale of concentration fluctuations during the growth of the protein aggregates. We believe that this is caused by a transition from net repulsive to net attractive interaction between protein aggregates. In a narrow range of ionic strengths this leads to a sharp increase of the amplitude and the correlation length of the concentration fluctuations that are frozen-in by cross-linking. The structure factor of a system showing concentration fluctuations close to the critical point can be described by Eq. (9), as was found for the protein gels with NaCl concentrations between about 0.07 and 0.2 M.

For $C_s > 0.2$ M, the net attractive interaction induced micro-phase separation leading to the formation of domains with high protein density. The domains grew to a size of a few microns, and subsequently connected to other domains to form a space filling network. For $C_s > 0.2$ M, increasing the ionic strength led to a weak increase of the density and the size of the micro-domains. There is an important scatter of the values that is not caused by experimental error, but by the relatively large variability of the gel structure obtained for different preparations. This indicates that the extent of the micro-phase separation is probably sensitive to the thermal history. Preliminary measurements of gels formed at other temperatures indicated that the gel structure is indeed sensitive to the heating temperature for $C_s > 0.2$ M, while at lower ionic strengths the temperature only influenced the gelation kinetics.

The structure of micro-phase separated systems is different from that of homogeneous systems with large concentration fluctuations. For the analysis of CSLM we used Eq. (6) and for the analysis of light scattering we used Eq. (10). Very close to the transition both light scattering techniques and CSLM can be used and in principle we could use either equation to analyse the data. Unfortunately, the values of M_a and ξ near the transition are at the upper resolution limit of light scattering techniques and at the lower resolution limit of CSLM and the data are not precise enough to judge which function describes the data best. However, the variation of M_a and ξ with the ionic strength is very strong near the transition so that the uncertainty of the analysis method does not influence the qualitative features of ionic strength dependence shown in Fig. 9.

The average protein concentration of the dense phase was calculated by averaging the signal of areas where the dense phase was in the focal plane and that of the dilute phase from areas where no fluorescence of dense domains was detected. We verified for the latter cases that the signal of domains below or above the focal plane could be neglected. We have been careful to avoid border areas when taking the average. The protein concentration of the two phases is plotted in Fig. 10 as a function of the NaCl concentration. Phase separation was observed for $C_s > 0.2$. The concentration of the two phases varied weakly for $C_s > 0.3$ M from about 300 g/L to 400 g/L for the dense phase and from about 30 g/L to 20 g/L for the dilute phase. Diffusion of tracer particles in the gels showed that the dilute phase was not gelled.

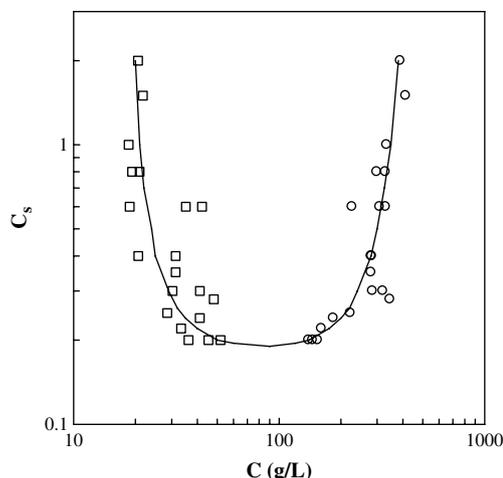


Fig. 10. Protein concentrations of the dense (circles) and the dilute (squares) phase in micro-phase separated β -lg gels formed as a function of the NaCl concentration. The average protein concentration of the systems was 100 g/L. The solid line is a guide to the eye.

We have observed the same phenomena in the absence of added salt when the pH was lowered towards the isoelectric point. The appearance of critical fluctuations and micro-phase separation happened over a narrow range of the pH between 6.1 and 5.7. Again the transition was induced by a reduction of the electrostatic repulsion. The mechanism described here for β -lactoglobulin gels probably also explains the transition between so-called finely stranded and particulate gels that was observed for other globular protein systems. We stress, however, that the micro-phase separation is kinetically controlled and does not represent a thermodynamic equilibrium. Preliminary measurements at other protein concentrations showed different densities of the two phases.

Some authors have concluded that protein gels that were visually very similar to ones studied here had a self-similar structure characterized by a fractal dimension. This interpretation was based on the calculation of pair correlation functions (Mellema et al., 2000; Pugnaroni et al., 2005) or on the so-called box counting method (Hagiwara, Kumagai, & Nakamura, 1996). The authors applied segmentation before the analysis and it was found that the fractal dimension depended on the choice of the threshold. The effect of segmentation is that the contrast is artificially increased leading to an increase of the amplitude of $g(r)$.

For self-similar systems: $g(r) = Br^{d_f-3}f(r/\xi) + 1$, where $f(r/\xi)$ is a cut-off function that is unity for $r < \xi$ and decays faster than a power law for $r > \xi$. When $g(r)$ is plotted in a double logarithmic representation d_f can be derived from the slope, but of course only if $r < \xi$ and $\langle g(r) \rangle > 1$. This condition was not satisfied in the experiments. If a line is nevertheless drawn, as was done in Fig. 8b, one obtains an apparent fractal dimension. The apparent fractal dimension deduced from the slope in Fig. 8b is 2.6. When applied to Fig. 8a such a procedure leads to decreasing apparent fractal dimension with increasing ionic strength. It would also lead to a decreasing fractal dimension with increasing threshold value as was reported in (Mellema et al., 2000). Since both $g(r)$ and $g(r) - 1$ should be described by the same power law decay, a good method to verify whether a fractal regime exists is to plot both representations.

Another method that is sometimes used is the so-called box counting method (Hagiwara et al., 1996). A grid of boxes with size L^2 pixels is placed on the image after segmentation and binarisation. The number of boxes containing at least one occupied pixel ($N(L)$) is plotted as a function of the box size in a double logarithmic representation. For homogeneous systems $N(L) \propto L^{-2}$, and for isotropic self-similar structures $N(L) \propto L^{1-d_f}$, with d_f the fractal

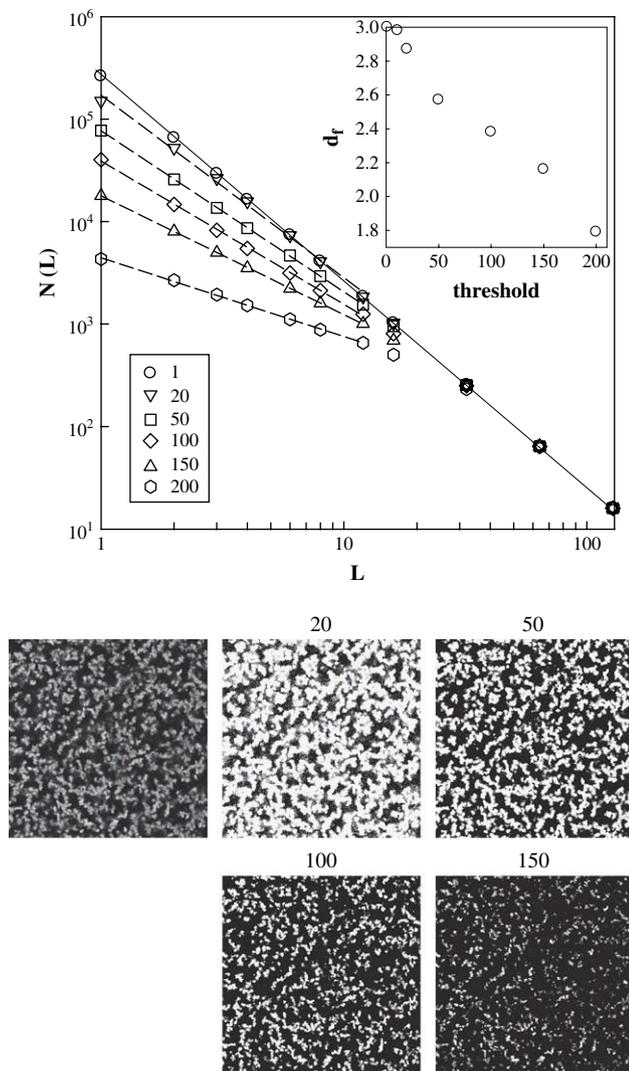


Fig. 11. Double logarithmic representation of $N(L)$ as a function of the box size obtained from a box counting analysis of a CLSM image of a β -lg gel at $C_s = 1$ M using different threshold values indicated in the figure. The solid line has slope -2 , and the dashed lines represent fits to the data for $L < 10$. The inset shows the effect of the threshold on the apparent fractal dimension. The image contained 512×512 pixels ($160 \times 160 \mu\text{m}$) and the average signal was 54. Below the graph the original image is shown (top left) together with binary images at different threshold values indicated in the figure.

dimension. We have applied this method to the protein gels studied here using the routine provided with the ImageJ program. An example of the results obtained for different thresholds is shown in Fig. 11. For L larger than the correlation length the slope is -2 because the system is homogeneous on larger length scales. At smaller length scales one can draw a straight line even though the calculation of $g(r)$ clearly showed that the system was not self-similar. From the slope an apparent fractal dimension could be derived that decreased with increasing threshold value, see inset of Fig. 11. Clearly, one should be careful when interpreting the results of the box counting method.

5. Conclusions

CLSM images of globular protein gels can be quantitatively analysed in terms of the amplitude and the correlation length of the concentrations fluctuations that are frozen-in by cross-linking. These parameters can be compared to the equivalent values

obtained from light scattering measurements. Addition of salt leads to a sharp increase of the amplitude and the correlation length of the concentration fluctuations over a narrow range of salt concentrations. Above a critical salt concentration micro-phase separation occurs, leading to the formation of dense protein domains with a diameter of a few microns. These domains cross-link to form a system spanning gel. The protein concentrations in the low and high density phases can be determined using CLSM and varied weakly with the salt concentration. The pair correlation function of gels showing micro-phases separation could be described by a stretched exponential decay with a stretched exponent independent of the salt concentration.

References

- Aguilera, J. M., & Germain, J. C. (2007). Advances in image analysis for the study of food microstructure. In D. J. McClements (Ed.), *Understanding and controlling the microstructure of complex foods* (pp. 261–287). Cambridge: Woodhead.
- Baussay, K., Le Bon, C., Nicolai, T., Durand, D., & Busnel, J. (2004). Influence of the ionic strength on the heat-induced aggregation of the globular protein β -lactoglobulin at pH7. *International Journal of Biological Macromolecules*, *34*, 21–28.
- Brown, W. (1996). *Light scattering: Principles and development*. Oxford: Clarendon Press.
- Clark, A. H. (1998). Gelation of globular proteins. In S. E. Hill, D. A. Ledward, & J. R. Mitchell (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (2nd ed.). (pp. 77–142) Gaithersburg: Aspen Publishers.
- De la Fuente, M. A., Singh, H., & Hemar, Y. (2002). Recent advances in the characterization of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science & Technology*, *13*, 262–274.
- Durand, D., Gimel, J. C., & Nicolai, T. (2002). Aggregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins. *Physica A*, *304*, 253–265.
- Hagiwara, T., Kumagai, H., & Nakamura, K. (1996). Fractal analysis of aggregates formed by heating dilute BSA solutions using light scattering methods. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, *60*, 1757–1763.
- Ikeda, S., & Morris, V. J. (2002). Fine-stranded and particulate aggregates of heat-denatured whey proteins visualized by atomic force microscopy. *Bio-macromolecules*, *3*, 382–389.
- Langton, M., & Hermansson, A. (1992). Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*, *5*, 523–539.
- Loren, N., Langton, M., & Hermansson, A. M. (2007). Confocal fluorescence microscopy (CSLM) for food structure characterisation. In D. J. McClements (Ed.), *Understanding and controlling the microstructure of complex foods* (pp. 232–260). Cambridge: Woodhead.
- Mehalebi, S., Nicolai, T., & Durand, D. (2008a). The influence of electrostatic interaction on the structure and the shear modulus of heat-set globular protein gels. *Soft Matter*, *4*, 893.
- Mehalebi, S., Nicolai, T., & Durand, D. (2008b). Light scattering study of heat denatured globular protein aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules*, *43*, 119.
- Mellema, M., Heesakkers, J. W. M., van Opheusden, J. H. J., & van Vliet, T. (2000). Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry. *Langmuir*, *16*, 6847.
- Nicolai, T. (2007a). Food structure characterisation using scattering methods. In D. J. McClements (Ed.), *Understanding and controlling the microstructure of complex foods* (pp. 288–310). Cambridge: Woodhead.
- Nicolai, T. (2007b). Structure of self-assembled proteins. In E. Dickinson, & M. E. Leser (Eds.), *Food colloids, self-assembly and material science* (pp. 35–56). Cambridge: RSC Publishing.
- Nicolai, T., & Durand, D. (2007). Protein aggregation and gel formation studied with scattering methods and simulation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *12*, 23.
- Nicolai, T., Pouzot, M., Durand, D., Weijers, M., & Visschers, R. W. (2006). Iso-scattering points during heat-induced aggregation and gelation of globular proteins indicating micro-phase separation. *Europhysics Letters*, *73*, 299–305.
- Pouzot, M., Nicolai, T., Visschers, R. W., & Weijers, M. (2005). X-ray and light scattering study of the structure of large protein aggregates at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, *19*, 231–238.
- Pugaloni, L. A., Matia-Merino, L., & Dickinson, E. (2005). Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: quantification from confocal microscopy and image analysis. *Colloids and Surfaces B*, *42*, 211.
- Rottureau, M., Gimel, J. C., Nicolai, T., & Durand, D. (2004). Monte Carlo simulation of particle aggregation and gelation: I growth, structure and size distribution. *European Physical Journal E*, *15*, 133–140.
- Townend, R., Winterbottom, R. J., & Timasheff, S. N. (1960). Molecular interactions in β -lactoglobulin. II. Ultracentrifugal and electrophoretic studies of the association of β -lactoglobulin below its isoelectric point. *Journal of the American Chemical Society*, *82*, 3161–3168.
- Verheul, M., & Roefs, S. P. F. M. (1998). Structure of particulate whey protein gels: effect of NaCl concentration, pH, heating temperature, and protein composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4909–4916.

Micro-phase separation explains the abrupt structural change of denatured globular protein gels on varying the ionic strength or the pH

Komla Ako,^a Taco Nicolai,^{*a} Dominique Durand^a and Guillaume Brotons^b

Received 6th April 2009, Accepted 30th June 2009

First published as an Advance Article on the web 13th August 2009

DOI: 10.1039/b906860k

Aqueous solutions of globular proteins gel after heat-induced denaturation. The structure of β -lactoglobulin gels was studied as a function of the pH (2–8) and the NaCl concentration (0–1 M) over a wide range of length scales (1 nm–100 μ m) using a combination of scattering techniques and microscopy. The gel structure depended on the strength of the electrostatic interaction that was varied by changing the charge density of the proteins (pH) or the screening length (ionic strength). Homogeneous so-called finely stranded gels were formed at strong interaction, while more heterogeneous so-called particulate gels were formed at weak interaction. It is shown that phase separation of growing irreversibly bound protein aggregates explains the abrupt transition between the two structures for small changes of the ionic strength or the pH. Phase separation was limited to the formation of protein rich domains with a radius of several microns that associated into the particulate gels. The structure of homogeneous gels is shown to be determined by the amplitude of the (critical) concentration fluctuations of protein aggregates that were frozen-in by gelation. The characteristic length scales of the homogeneous gels varied between about 20 nm and 1 μ m.

Introduction

Globular proteins are polypeptide chains with a well-defined compact structure in their native state. In aqueous solution globular proteins are charged with a charge density that varies with the pH and is net zero at the so-called iso-electric point (pI). In addition to electrostatic interactions, the proteins interact through hydrogen bonds, hydrophobic interactions *etc.* Net attraction between the globular proteins can be increased for instance by adding salt which may lead to phase separation into a low and a high density liquid or to crystallisation.^{1,2} However, if the net attraction is very strong the proteins form long lived bonds and equilibrium may not be reached within the duration of the experiment. In this case one observes precipitation of randomly flocculated proteins or a system spanning network.^{3–5} In some cases solutions of small aggregates have been observed,⁶ which was attributed to a combination of strong short range attraction and long range electrostatic repulsion.⁷

The details of the interaction that depend on the type of protein, pH, type and concentration of added salt and the temperature, are not yet fully understood.⁸ Nevertheless, the behaviour of native globular proteins in solution can be explained to some extent by considering them as spherical colloids with an effective short range binary interaction expressed in terms of the second virial coefficient.^{9,10}

When aqueous globular protein solutions are heated above their so-called denaturation temperature the internal mobility of the chains increases and they partially unfold. As a consequence they can bind to each other leading to aggregation and, at higher

concentrations, to gelation.^{11–14} Contrary to the case of native proteins, most often the bonds that are formed between denatured proteins are irreversible and can be even covalent in the form of disulfide bridges. Aggregation and gelation of denatured proteins is distinct from that of native proteins, because it occurs also at conditions where the electrostatic repulsion is strong and native protein solutions are perfectly stable. The interaction between denatured proteins involves both the formation of strong irreversible bonds and various weaker interactions that also occur between native proteins. For this reason the structure of heat-set globular protein gels can vary strongly depending on the strength of the electrostatic interaction. A few numerical simulations of irreversibly aggregating spherical colloids with long range attractive or repulsive interactions have been reported that show that widely different gel structures are obtained depending on the strength and range of the interaction.¹⁵

The visual aspect of heat-set globular protein gels ranges from crystal clear to opaque (egg white), see *e.g.* fig. 1. Electron

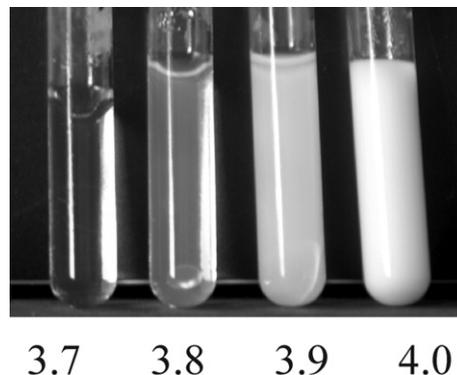


Fig. 1 β -lg gels ($C = 100$ g/L) formed in the absence of added NaCl at different pH indicated in the figure.

^aPolymères, Colloïdes, Interfaces, UMR CNRS Université du Maine, 72085 Le Mans cedex 9, France. E-mail: Taco.Nicolai@univ-lemans.fr

^bLaboratoire de Physique de l'Etat Condensé, UMR CNRS Université du Maine, 72085 Le Mans cedex 9, France

microscopy showed that the transparent gels are formed by more or less ordered cross-linked strands of aggregated proteins with a diameter close to that of the proteins. The opaque gels are formed by randomly aggregated protein rich domains with a diameter of a few microns. Recent observations of particulate β -lactoglobulin (β -lg) gel using environmental scanning electron microscopy showed that the domain size varied systematically with the heating temperature.¹⁶ Similar structures were observed with other globular proteins.¹⁷ Transparent, so-called finely stranded, gels are formed when electrostatic interaction is strong, while opaque, so-called particulate, gels are formed when it is weak. The electrostatic interaction can be weakened by reducing the charge density of the protein for instance by setting the pH closer to the isoelectric point (pI). Alternatively, the interaction can be screened by adding salt.

It was found that the transition between finely stranded and particulate gels occurs over a very small range of the pH or the ionic strength.^{18–20} The origin of this sharp transition has not yet been clearly established. It has been speculated that phase separation is involved,²¹ but so far no clear proof has been given. In a recent study²⁰ we have addressed the issue of the transition between finely stranded and particulate gels for β -lg that is the major protein component of whey. β -lg has a molar mass of 1.8×10^4 (g/mol), a radius of about 2 nm and pI = 5.2.²² Using scattering techniques the amplitude and the correlation length of the frozen-in concentration fluctuations could be determined. It was found that these parameters increased exponentially with increasing concentration of monovalent salt. They also increased very sharply at a critical pH when the pH was decreased towards pI. This explains the sharp increase of the turbidity and thus the transition from transparent to opaque gels in a narrow range of the salt concentration or the pH.

Highly turbid gels can not be studied using light scattering, but confocal scanning laser microscopy (CSLM) is a suitable technique to investigate the structure of heterogeneous protein gels. We have shown elsewhere in detail how the amplitude and the correlation length of the concentration fluctuations can be determined by a quantitative analysis of the images.¹⁸ Results obtained from CSLM were combined with those obtained by light scattering and in this way the structural transition between finely stranded gels and particle gels was completely described as a function of the salt concentration at pH 7. From these results it was concluded that phase separation occurred during aggregation at high salt concentrations. Phase separation stopped evolving when the dense protein domains had reached a size of a few microns and for this reason the expression micro-phase separation was used. The dense protein domains remained relatively small perhaps due to charge stabilisation, but clustered to form the characteristic particle gels. The strong increase of the heterogeneity of the gels on approaching the spinodal was induced by critical concentration fluctuations of the aggregates that were frozen in by cross-linking. This latter conclusion was corroborated by the observation that the structure factor close to the binodal was the same as that of binary liquids close to the critical point.

Here we extend these previous studies to include the whole pH range. We will map out the pH/salt concentration phase diagram at a fixed protein concentration of 100 g/L where gels are formed at all pH and ionic strengths. We will also show the effect of the

protein concentration and the heating temperature. The influence of micro-phase separation on the structure on the scale of nanometres will be studied using small angle X-ray scattering. The aim of this paper is to describe comprehensively the structural variation of denatured globular protein gels. Furthermore we will establish firmly that the well-known transition between finely stranded and particulate gels that was reported for many different globular proteins is caused by phase separation of growing irreversibly aggregated proteins. The particular protein that we have studied in much detail represents a large class of globular proteins. For these proteins the same phenomena that we discuss in this paper occur though the details such as the exact ionic strength and pH of the transition depend on the type of protein. We will discuss why this is the case.

Materials and methods

β -lg used in this study was a gift from Lactalis (Laval, France). It consisted of a mixture of the genetic variants A and B in about equal quantities and traces of α -lactalbumin. Solutions were prepared by dissolving the powder in pure water (Millipore) containing 3 mM NaN_3 to protect against bacterial growth. The solutions were dialyzed against the solvent after which the pH was set by addition of aliquots of concentrated (0.1 M) solutions of HCl or NaOH while vigorously stirring. After filtration through 0.45 μm pore size filters (Anatope), the concentration was determined by measuring the UV absorption at 280 nm using the extinction coefficient $0.96 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.²³

Confocal laser scanning microscopy

CLSM was used in the fluorescence mode. Observations were made with a Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems Heidelberg, Germany). Two different water immersion objective lenses were used: HCx PL APO 63x NA = 1.2 and 20x NA = 0.7.

β -lg was labelled with the fluorochrome rhodamine B isothiocyanate, by adding a small amount of a concentrated rhodamine solution to the β -lg solutions before heat treatment. Solutions were inserted between a concave slide and a cover slip and hermetically sealed. The samples were heated overnight in a thermostated bath at 80 °C. The incident light was emitted by a laser beam at 543 nm which excited the rhodamine. The fluorescence light was recorded between 560 and 700 nm. We verified that in all cases the fluorescence signal was proportional to the protein concentration.

The images were analysed in terms of the pair correlation function ($g(r)$) of the fluorescence intensities (A):

$$g(r) = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m A_i \cdot A_j}{\sum_{i=1}^n A_i \cdot \sum_{j=1}^m A_j} \text{ with } r = \left| \vec{i} - \vec{j} \right| \quad (1)$$

where the sum was taken over all the pairs of pixels (i, j) at a distance r . It was verified that when the proper precautions are taken, the fluorescence is proportional to the protein concentration so that $g(r)$ is equal to the pair correlation function of the concentration fluctuations. Since the systems studied here are isotropic it is sufficient to calculate $g(r)$ for a large number of independent 2D images. Results from several magnifications

were combined to increase the distance range r . The amplitude of the concentration fluctuations will be characterized in terms of an apparent molar mass (M_a) that is proportional to the osmotic compressibility and that can be obtained by integrating $g(r)$:

$$\int (g(r) - 1) 4\pi r^2 dr = \frac{M_a}{N_a C} \quad (2)$$

where C is the protein concentration and N_a is Avogadro's number. From the functional shape of $g(r)$ the correlation length (ξ) of the concentration fluctuations can be derived, see below.

Small angle X-ray scattering

SAXS measurements were carried out with a high brilliance laboratory set-up commercialized by Rigaku® (*via* Elexience in France). The X-ray source is a Rigaku-UltraX18 copper rotating anode coupled with i) an elliptical confocal Max-Flux® multi-layer optic (from Osmic®) and ii) a 1.5 m collimation through three pinholes setting up a beam at sample position of 2.10^7 photons/s with a FWHM of 300 μm , an angular divergence below half a millirad and a wavelength of 1,54 Å with a monochromaticity ratio K_β/K_α of 10^{-4} . The scattered intensity was recorded by a low-background 2D multiwire gaz detector (so-called "André Gabriel" design) with an active area diameter of 120 mm and a wire resolution of 200 μm . It is placed at 1.5 m from the sample and the whole instrument is evacuated to 10^{-5} Bars. Measurements covered a scattering vector range of 0.008–0.16 \AA^{-1} with a typical acquisition time of 10^3 – 10^4 s. Sample transmissions were measured with a 2 mm diode located in the beam-stop center in front of the detector. The measured 2D isotropic SAXS patterns were corrected for the dark counts and the 1D intensity curves were obtained by azimuthally averaging. The samples were measured in 1.5 mm diameter capillaries with borosilicate thin walls of 10 μm provided by Hilgenberg GmbH® and sealed for vacuum. The SAXS signal from the glass walls was checked to be much lower than the sample signal.

In dilute binary solutions the excess scattering intensity over that of the solvent normalized by that of a reference (I_r) is given by:^{24,25}

$$I_r = K \cdot C \cdot M_w \cdot S(q) \quad (3)$$

with K an optical constant, M_w the weight average molar mass of the solute at concentration C , and $S(q)$ the structure factor that is unity for $q \rightarrow 0$. At finite concentrations the same equation can be used if we replace M_w by the apparent molar mass (M_a). The value of K was obtained by comparison of the SAXS from native protein solutions with the results obtained by light scattering.

If the system with an average concentration C consists of two phases with concentration difference ΔC and smooth interfaces then the scattering from the interfaces is described by the so-called Porod law: $S(q) \propto q^{-4}$. From the prefactor the surface area per unit of volume can be calculated (s):²⁵

$$s = C \cdot M_a q^4 / (2\pi \cdot (\Delta C)^2 N_a) \quad (4)$$

If one of the phases consists of homogeneous spheres, then the radius of the spheres is equal to $3/s$.

Results

Effect of the pH at low ionic strength

Fig. 2 shows CSLM images of β -lg gels at $C = 100$ g/L formed by extensive heating at 80 °C at different pH and at low ionic strength (3 mM NaN_3). Of course, for three dimensional networks one should not expect a two dimensional cut to show a percolating network. The images show cross-sections of the network strands. Close to pI the gels consisted of a network of protein rich domains with a diameter of a few microns. Further from pI the gels were homogeneous on lengths scales larger than 0.5 μm and therefore showed no features visible with CSLM. Fig. 2 illustrates that the transition between the two types of gel occurred over a narrow pH range both above and below pI. A similar sharp transition was shown as a function of the ionic strength in ref. 18. As mentioned above, the transition seen with CSLM does not correspond to the transition between transparent and turbid gels illustrated in figure 1. The latter occurred slightly further from pI and at slightly lower ionic strengths.

We note that between pH 4.8 and pH 5.3 native β -lg solutions were not stable even at room temperature, because native β -lg aggregated with a rate that increased with increasing temperature.^{20,26} These aggregates were different from the ones formed

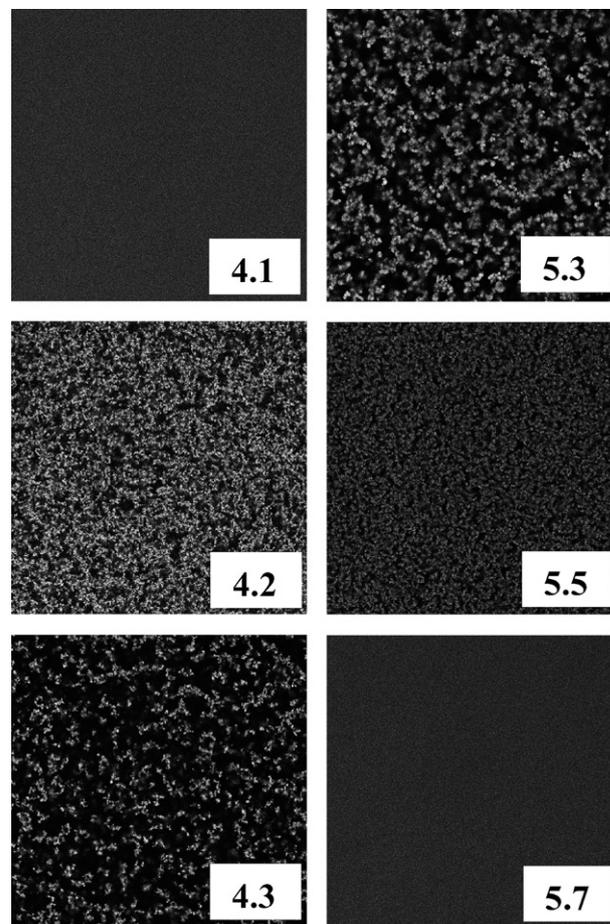


Fig. 2 Examples of CSLM images of β -lg gels ($C = 100$ g/L) formed in the absence of added NaCl at different pH indicated in the figure. The width of the image represents 160 μm .

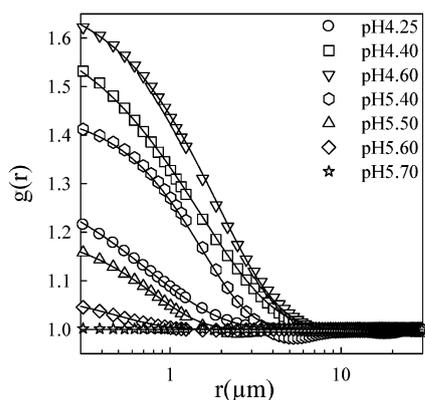


Fig. 3 Examples of pair correlation functions obtained from CSLM images of β -lg gels ($C = 100$ g/L) formed in the absence of added NaCl at different pH indicated in the figure. The solid lines represent fits to eq. 3.

above the denaturation temperature as native proteins were recovered by raising or decreasing the pH.

The CSLM images were analysed in terms of the pair correlation functions ($g(r)$) of the protein concentration fluctuations, see material and methods section and for more details ref. 18. Both the amplitude and the decay length of the frozen-in concentration fluctuations increased when the pH approached pI, see figure 3. In some cases a weak minimum was observed before $g(r)$ became unity. The minimum indicates that a given micro-domain weakly depleted other domains that were not bound to it, and was also observed at pH 7 as a function of the ionic strength.¹⁸ Apart from the weak minimum, the pair correlation functions could be well described by a stretched exponential decay, see figure 3:

$$g(r) = B_1 \exp[-(r/\xi)^\beta] + 1 \quad (5)$$

with $\beta = 1.5$ for $\text{pH} > \text{pI}$ as was found earlier at pH 7 at different NaCl concentrations. For $\text{pH} < \text{pI}$ somewhat smaller values of β were found (1.0–1.2). We stress that on length scales accessible to CSLM, *i.e.* larger than $0.3 \mu\text{m}$, the gels do not have a self similar structure characterized by a fractal dimension. The images could nevertheless be interpreted in terms of an apparent fractal dimension using the so-called box-counting, but we showed in ref. 18 that this was an artefact of the method.

The apparent molar mass (M_a) and the correlation length (ξ) can be calculated from $g(r)$ using eqs 2 and 5. They are characteristic of the amplitude and the length scale of the concentration fluctuations and can also be obtained with scattering techniques. M_a and ξ obtained from CSLM are shown as a function of the pH in figures 4a and 4b together with the results obtained from light scattering that were reported in ref. 20 for $\text{pH} > \text{pI}$ and that have been complemented here for $\text{pH} < \text{pI}$. With increasing pH, both M_a and ξ increased sharply between pH 3.9 and 4.2 and decreased sharply between 5.5 and 5.8. The variation of M_a and ξ caused a similar variation of the turbidity, see figure 4c. The very large values of the turbidity (τ) for micro-phase separated samples were determined using CSLM from the variation of the fluorescence intensity as a function of the penetration depth, see for more details ref. 18.

The average protein density of each phase was determined by measuring the fluorescence intensity and using a separately

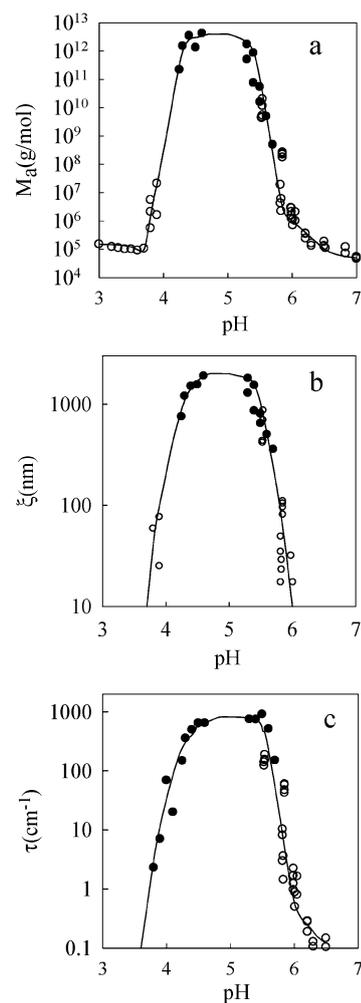


Fig. 4 Dependence on the pH of the apparent molar mass (a), the correlation length (b) and the turbidity (c) for β -lg gels ($C = 100$ g/L) formed in the absence of added NaCl. Data were obtained by light scattering (open symbols) and CSLM (closed symbols).

determined proportionality constant to calculate the corresponding protein concentration. The results at different pH are shown in figure 5. The contrast (ratio of the protein concentrations) between the two phases increased rapidly to about 10 with either increasing or decreasing pH towards pI, similar to what was found at pH 7 with increasing ionic strength. In strongly phase separated systems the protein density was about 300 g/L . From figure 5 we can conclude that the critical values of the pH for micro-phase separation were 4.1 and 5.6.

Small angle X-ray scattering

The local structure of the gels was investigated using small angle X-ray scattering (SAXS). The effect of the NaCl concentration on the structure factor up to 0.1 M at pH 7 has been reported in ref. 27. Here we extend these measurements to higher ionic strengths and also studied the effect of the pH in the absence of added salt. The focus is on the change of the local structure caused by micro phase separation either by increasing the NaCl

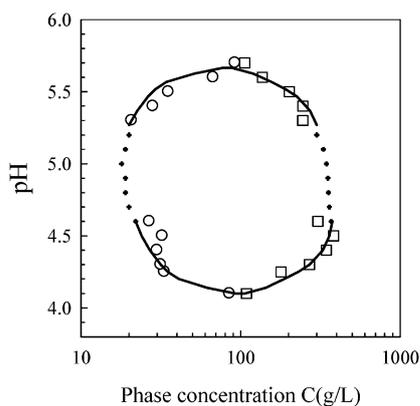


Fig. 5 Protein concentration of the protein rich (squares) and poor (circles) phases for micro-phase separated gels β -Ig gels ($C = 100$ g/L) formed in the absence of added NaCl as a function of the pH.

concentration at pH 7 or by decreasing the pH towards pI in the absence of added salt.

Fig. 6a shows KC/I_r as a function of q for gels formed at pH 7 at different C_s , while figure 6b shows gels formed in the absence of added NaCl at different pH. The results at pH 7 up to $C_s = 0.1$ M are close to those shown in ref. 27. The structure factor has a peak for gels formed in the absence of added salt at pH 7 and pH 8, which shows that the proteins strands that formed the gels

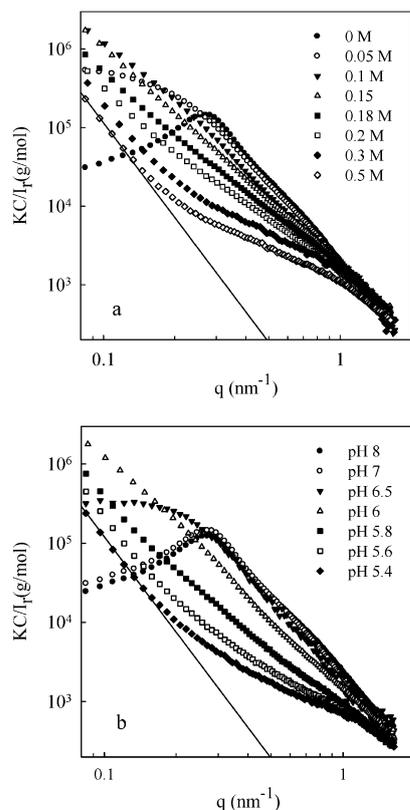


Fig. 6 Dependence of KC/I_r on the scattering wave vector for β -Ig gels ($C = 100$ g/L) formed at pH 7 at different NaCl concentrations (a) or in the absence of added NaCl at different pH (b). The solid lines have slopes -4 .

were situated at a preferred distance of about $2\pi/q_{\max} = 22$ nm. With increasing ionic strength or decreasing pH the degree of order decreased and the intensity at small q -values increased. This explains the increase of the turbidity of the gels with decreasing pH and increasing ionic strength. It was shown elsewhere that in a narrow range of the pH and the salt concentration the gel structure is self similar on length scales between the correlation length and about 15 nm.^{20,27} In this range $S(q) \propto q^{-d_f}$ where d_f is the so-called fractal dimension that was found to be close to two. The correlation length of these systems varies between more than a micron and a few tens of nm depending on the protein concentration and the strength of electrostatic interactions.

At high salt concentrations or lower pH, the q -dependence of M_a is compatible with the so-called Porod law: $S(q) \propto q^{-4}$, see straight lines in figure 6. This finding is in agreement with the formation of homogeneous micro-domains observed by CSLM. The prefactor of the power law is proportional to the contrast and the amount of surface per unit of volume, see materials and methods section. It was similar for all micro-phase separated systems, but decreased weakly with increasing ionic strength or decreasing pH. If we consider spherical domains with a protein density of 300 g/L we find that the average radius of the domains was about a micron in agreement with CSLM results.

The q -dependence for micro-phase separated samples deviated from the Porod law at $q > 0.15$ nm⁻¹, which means that the domains were homogeneous down to length scales of about 10 nm. The q -dependence at larger q -values was different close to pI in the absence of added salt compared to that at high ionic strength at pH 7. It appears that the organisation of the proteins in the micro-domains on small length scales is different depending on whether micro-phase separation is caused by increased screening or by decreased protein charge density. This might explain the different effect of micro-phase separation on the rheology of the gels.²⁰

Phase diagram

The variation of the gel structure with the NaCl concentration (C_s) was investigated by CSLM at pH 2, 3, 4, 6, 6.5, 8 and 9 in the same way as reported earlier for pH 7. At pH values larger than pI native β -Ig solutions remained stable at all NaCl concentration up to at least 1 M. Below pI aggregation of native β -Ig was observed above a certain NaCl concentration that decreased with increasing pH: $C_s = 0.5, 0.3$ and 0.1 M for pH 2, 3 and 4, respectively. The instability of native β -Ig limited the NaCl concentration range that could be investigated.

At all pH values micro-phase separation was observed for gels formed above a critical salt concentration, see figure 7, that increased sharply with increasing pH starting at pH 5.8 and decreasing pH starting at pH 4.1. We stress again that native β -Ig solutions are stable at the conditions shown of figure 7 except close to pI where slow aggregation was observed. Micro-phase separation only occurred once aggregates were formed. Interestingly, less salt is needed to induce micro-phase separation of aggregates at pH 2 than at pH 7 even though the charge density is higher at pH 2. This is probably related to the different structure of aggregates formed below and above pI, as will be discussed below.

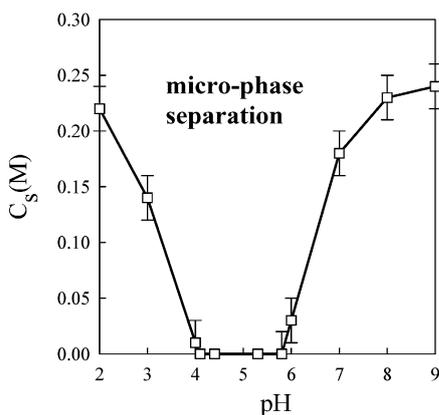


Fig. 7 State diagram that shows the conditions of pH and NaCl concentration at which β -lg ($C = 100$ g/L) forms homogeneous or micro-phase separated gels. The error bars indicate the range over which the ratio of the protein concentration in the two phases increases from 2 to 10.

The contrast between the two phases increased sharply at the critical concentration and stabilized at higher ionic strengths to a value in the range 15–20 at pH 2, 6 and 7; 20–30 at pH 3; and 30–40 at pH 4. The error bars in figure 7 indicate the range of C_s over which the contrast increased from 2 to 10. The pair correlation functions could be fitted to a stretched exponential with β values about 1.5 at pH 7, 6 and 2 and about 1.1 at pH 3 and 4. In all cases the correlation length stabilized at about $2 \mu\text{m}$, close to the average size of the micro-domains. It was shown in ref. 20 that M_w and ξ increased exponentially with increasing NaCl concentration at different pH above pI and we expect a similar behaviour at $\text{pH} < \text{pI}$, but this needs to be confirmed.

Concentration dependence

The effect of the protein concentration on the structure of heated β -lg solutions, was studied at pH 7 and different ionic strengths. Below 10 g/L no self supporting gels were formed, but above a critical NaCl concentration large protein flocs precipitated. For $C > 10$ g/L gels were formed, but at lower protein concentrations and higher salt concentrations a significant amount of solvent could be seen as a liquid layer on top of the turbid gels. The thickness of the solvent layer could be determined quantitatively using CSLM. To this end, gels were prepared by heating completely filled and sealed microscopy slides with the cover slide either up or down. In this way images could be made from the bottom and the top of the gels. Scans as a function of the penetration depth through the bottom showed that the protein density was constant and these scans were used to calculate the turbidity. Scans through the top of the gels showed a layer depleted in proteins, see figure 8. A thin protein poor layer could be seen even if the systems were macroscopically homogeneous. The origin of the protein poor top layer is most likely sedimentation of clusters of micro-domains before they formed a system spanning gel.

A general state diagram of the protein concentration as a function of the salt concentration is shown in figure 9. Above 10 g/L we observed with increasing ionic strength first the formation of homogeneous gels then micro-phase separated gels

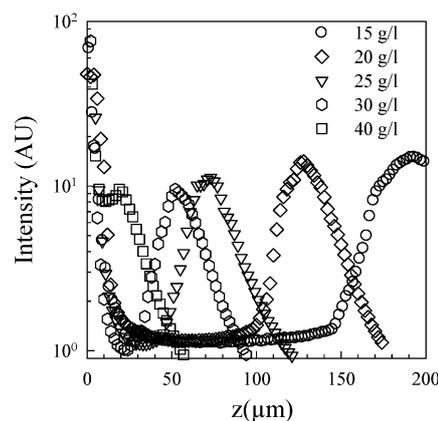


Fig. 8 Examples of the fluorescence intensity as a function of the depth (z) from the top of β -lg gels formed at different protein concentrations indicated in the figure. The intensity at the cover slip ($z = 0$) is very high due to adsorbed proteins. It is low at larger z showing a depletion layer of increasing thickness. The intensity increases when the protein gel surface is reached and subsequently decreases due to the effect of turbidity.

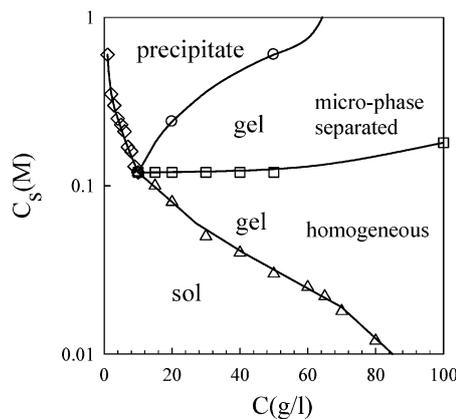


Fig. 9 State diagram that shows the conditions of protein and NaCl concentrations at which β -lg (pH 7) forms a sol, a homogeneous gel, a precipitate or a micro-phase separated gel.

and finally macroscopically heterogeneous systems. The transition between homogeneous (finely stranded) and more heterogeneous (particulate) gels is sharp and easily observed with CSLM. However, the transition to macroscopically heterogeneous gels (precipitates) is gradual. We have drawn the line when the protein poor top layer could be seen by the naked eye. The three lines join at $C = 10$ g/L and at lower protein concentrations only precipitation of flocculated micro-domains was observed above a critical NaCl concentration.

As might be expected the gel line decreased continuously with increasing protein concentration. The line of phase separation was almost constant between 8 and 50 g/L at $C_s = 0.12$ M, but was somewhat higher at 100 g/L. It also increased at lower concentrations where phase separation led to precipitation. Above 10 g/L micro-phase separation did not automatically lead to large scale sedimentation, because system spanning gels were formed. In this case significant sedimentation occurred before gelation only at higher ionic strengths, and with increasing

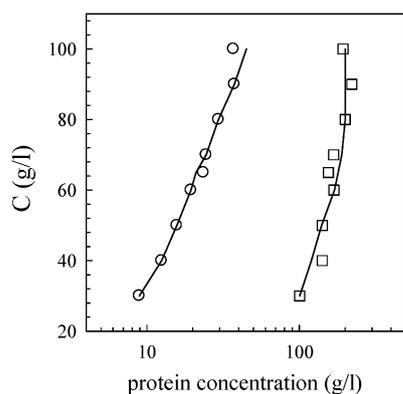


Fig. 10 Protein concentration of the protein rich (squares) and poor (circles) phases for micro-phase separated β -Ig gels (pH 7, $C_s = 0.25$ M) at different average protein concentrations.

protein concentration more salt could be added before the gels became macroscopically heterogeneous.

The amplitude (M_a) and length scale (ξ) of the frozen-in concentration fluctuations increased sharply with increasing ionic strength close to the critical NaCl concentration, but the variation became very weak at higher ionic strengths. Similarly, they increased sharply close to the critical pH when varying the pH towards pI. The pair correlation function of the micro-phase separated gels could be described by a stretched exponential with β between 1 and 1.5. The correlation length of micro-phase separated gels reached approximately $2 \mu\text{m}$ at higher ionic strengths and closer to pI.

The protein concentration dependence of the gel structure between 30 and 100 g/L was studied at a fixed NaCl concentration ($C_s = 0.25$ M). At this salt concentration, micro-phase separated gels were formed that were macroscopically homogeneous. The protein concentration of the two phases is shown for different average protein concentrations in figure 10. The density of both the protein rich and the protein poor phase increased with increasing average concentration, but the contrast between the two phases decreased almost linearly with increasing protein concentration from 11 to 5 between 30 and 100 g/L. The correlation length at this ionic strength was almost independent of the concentration ($\xi \approx 1 \mu\text{m}$). The turbidity at 540 nm increased linearly from 400 cm^{-1} to 800 cm^{-1} between $C = 30$ and 100 g/L , but τ/C decreased which is consistent with the observed decrease of the contrast.

It is clear from these observations that thermodynamic equilibrium is not reached, because in that case the densities of the protein poor phase should be on the line separating homogeneous from micro-phase separated systems shown in figure 9. In all cases the density of the protein poor phase is much higher indicating that phase separation is arrested by gelation.

Temperature dependence

It has already been reported that the heating temperature increases the rate of aggregation and gelation, but not the structure of the aggregates and the gels in the absence of micro-phase separation.^{20,28} We determined the critical NaCl concentration needed to induce micro-phase separation at $C = 100 \text{ g/L}$

at different pH for systems heated at 70°C . The critical NaCl concentration was found to be the same as for systems heated at 80°C even though the gelation rate was at least 100 times slower. The relatively small temperature difference has a dramatic effect on denaturation and thus the aggregation rate, but the effect on the interaction strength between the aggregates is insignificant. Even though we found no significant effect of the temperature on the critical NaCl concentration, an effect on the size of the micro domains has been reported by Bromley *et al.*¹⁶ We observed a moderate effect of the heating temperature on the structure of micro-phase separated gels, but we did not explore it in detail.

Discussion

As was mentioned in the introduction, the phenomena of phase separation, cluster formation and gelation have been observed for native globular protein solutions at certain conditions.^{3-5,14} For these systems it has been possible to explain some of these observations in terms of general colloidal interactions, at least semi-quantitatively.^{7,9,10} The situation that we investigated here was different as the protein solutions were perfectly stable before heating. Only when they were denatured by heating did the proteins start aggregating by a random irreversible aggregation process. The fact that the bonds were irreversible and that phase separation occurred only once randomly branched polydisperse aggregates were formed, makes these systems very different from native protein solutions. Unfortunately, the fractal structure of the aggregates, their polydispersity and the fact that thermodynamic equilibrium is not reached renders it difficult to interpret the results even semi-quantitatively in terms of current theories developed for interacting spheres. As far as we are aware no theoretical framework has yet been developed to describe these much more complicated systems. For a better theoretical understanding of this complicated situation one probably needs to resort to numerical simulations of the kind discussed by Dickinson.¹⁵ The following discussion of the results will have a more qualitative descriptive character.

The present study showed that the large aggregates that were formed in heated β -Ig solutions phase separated above a critical ionic strength for a given pH and within a critical range of the pH for a given ionic strength. The pH range in which phase separation occurred widened with increasing ionic strength until above 0.25 M NaCl it occurred at all pH. It is obvious, that electrostatic interaction plays a major role, but that does not explain by itself the phase diagram. Phase separation happened in a pH range of around pI, but not symmetrically. Clearly, phase separation is not solely determined by the charge density and the screening length. For instance, the critical ionic strength is about the same at pH 8 and pH 2, but the net positive charge of β -Ig at pH 2 is much higher than the net negative charge at pH 8.²² In aqueous solutions the attraction between the proteins increases with increasing ionic strength, but the exact relationship between the strength of the interaction and the ionic strength is far from simple.

Phase separation is most likely also related to the structure of the aggregates. At all pH the aggregates are self similar at large length scales with a fractal dimension close to two,^{29,30} except at pH 2 and low ionic strength where rigid rod-like aggregates are formed.³¹⁻³³ However, the local structure of the aggregates varies

with the pH. For $\text{pH} < \text{pI}$ the aggregates consist of strands of individual proteins, while for $\text{pH} > \text{pI}$ first thicker so-called pre-aggregates are formed that assemble into larger aggregates in a second step.^{34,35} In addition the branching density of the aggregates varies with the ionic strength and the pH. As a consequence the local density of the aggregates increases with decreasing charge density and increasing ionic strength.^{29,30,36}

The effect of the protein concentration on the critical ionic strength for phase separation was very small compared to the effect of the pH. The critical NaCl concentration was almost the same for a broad range of concentrations between 10 and 50 g/L, and increased at higher and lower protein concentrations. This was also found for phase separation of native globular proteins induced by adding salt and is expected for particle suspensions as a function of the interaction strength.¹⁰

Remarkably, the growth of the protein dense domains stopped when they have a diameter of about 2 μm almost independent of the pH and the ionic strength except close to the critical values where they are somewhat smaller. What causes the arrest of the domain growth is not yet known. One may speculate that it is caused by a combination of short range attraction and long range (electrostatic) repulsion as was suggested for the formation of finite aggregates in native protein solutions.⁷ However, even if the protein rich domains do not merge they do bind to each other forming larger clusters that precipitate at low protein concentrations and form a gel at high protein concentrations. Bromley *et al.*¹⁶ suggested that the dense micro domains are formed by nucleation and growth of monomeric or dimeric $\beta\text{-Ig}$. Our results do not exclude this possibility except that the unit involved is the fractal aggregate. A similar formation of dense particles from fractal protein aggregates has also been observed after addition of polysaccharides.^{37–40}

The SAXS measurements showed that the protein rich domains forming the micro-phase separated gels are homogeneous down to length scales of about 10 nm. CSLM showed that the pair correlation function of the domains is well described by a stretched exponential decay. Consequently, micro-phase separated (particulate) protein gels are not self similar on any length scale. At conditions where electrostatic interactions were strong, *i.e.* low ionic strength and far from the isoelectric point, the structure factor showed a peak indicating that the protein strands are ordered. With reducing interactions the order decreases and the amplitude and correlation length of the concentration fluctuations increases. Close to the conditions of phase separation the structure factor could be described by the so-called Ornstein-Zernike equation that describes critical fluctuations in binary mixture close to the critical point. The divergence of the turbidity and also M_a and ξ is caused by critical fluctuations that are frozen in by gelation.

The detailed description of heat-denatured globular protein gels given here was based on extensive investigation of one particular protein $\beta\text{-Ig}$. However, as mentioned in the introduction, a range of globular proteins show similar behaviour even though complete systematic studies as a function of the ionic strength and the pH have rarely been done. We are aware of only one other systematic study. Kitabatake *et al.*⁴¹ measured the turbidity of heated ovalbumin solutions at $C = 70$ g/L as a function of the NaCl concentration and the pH. They found that the gels were opaque in a pH range around pI that

broadened with increasing salt concentration. The transition between transparent and opaque gels was caused by the increasing amplitude of the frozen-in concentration fluctuations and is thus not the same as the transition between finely stranded and particulate gels. Nevertheless, the ionic strength and the pH where these transitions occur are close. We may therefore compare the turbidity data with the phase diagram of $\beta\text{-Ig}$ shown in figure 7. The overall shape of the phase diagrams of $\beta\text{-Ig}$ and ovalbumin in NaCl solutions are similar, but somewhat less salt was needed to induce phase separation for ovalbumin. The latter is corroborated by light scattering measurements on ovalbumin⁴² and $\beta\text{-Ig}$ ²⁷ gels that showed that the frozen-in concentrations fluctuations are larger in ovalbumin gels at the same ionic strength. We expect that the phase diagrams of different globular proteins are qualitatively similar, but quantitatively depend on the type of protein and the type of added salt.

Summary

Heat denatured $\beta\text{-Ig}$ aggregates in aqueous solution which leads to gelation above a critical concentration. At low ionic strength and pH values far from the iso-electric point, homogeneous transparent gels are formed. Within a certain region of the pH around pI aggregates micro-phase separate into dense spherical domains with a diameter of a few μm that are homogeneous down to a few tens of nm. The domains do not coalesce but stick together into larger randomly branched clusters. These clusters precipitate for $C < 10$ g/L and connect into opaque self supporting gels at higher concentrations. The region where micro-phase separation occurs broadens with increasing ionic strength until above 0.25 M NaCl it happens at all pH. The critical ionic strength to induce phase separation varies little with the protein concentration for $C > 8$ g/L, but the critical gel concentration decreases with increasing salt concentration. The turbidity increases sharply with increasing ionic strength and decreasing or increasing pH towards pI, before the onset of micro-phase separation. This is caused by critical concentration fluctuations of the aggregates that are frozen-in by cross-linking. The transition between finely stranded and particle (micro-phase separated) gels is thus not equivalent to the transition between transparent and turbid gels although a strong increase of the turbidity indicates the approach of the micro-phase separation. The detailed description given here for $\beta\text{-Ig}$ is valid for a broad class of globular proteins, but the values of the pH and the salt concentration where the structural changes occur depend on the type of protein.

Acknowledgements

We thank Jean-Christophe Gimel for his help with the analysis of the CSLM images and the regional council of the Pays de la Loire.

References

- 1 M. Mushol and F. Rosenberger, *J Chem Phys*, 1997, **107**, 1953–1962.
- 2 M. Broide, T. M. Tominc and M. D. Saxowsky, *Phys Rev E*, 1996, **53**, 6325–6335.
- 3 H. Sedgwick, K. Kroy, A. Salonen, M. B. Robertson, S. U. Egelhaaf and W. C. K. Poon, *Eur. Phys. J.E.*, 2005, **16**, 77–80.
- 4 R. Piazza, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2000, **5**, 38–43.

- 5 A. M. Kulkarni, N. M. Dixit and C. F. Zukoski, *Faraday Discuss.*, 2003, **123**, 37–50.
- 6 A. Stradner, H. Sedgwick, F. Cardinaux, W. C. K. Poon, S. U. Egelhaaf and P. Schurtenberger, *Nature*, 2004, **432**, 492–495.
- 7 F. Cardinaux, A. Stradner, P. Schurtenberger, F. Sciortino and E. Zaccarelli, *Europhys. Lett.*, 2007, **77**, 48004.
- 8 R. P. Sear, *Curr. Opin. Colloid Interface Science*, 2006, **11**, 35–39.
- 9 C. Gögelein, G. Nägele, R. Tuinier, T. Gibaud, A. Stradner and P. Schurtenberger, *J. Chem. Phys.*, 2008, **129**, 085102.
- 10 G. Pelicane, D. Costa and C. Caccamo, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2004, **16**, S4923–S4936.
- 11 A. H. Clark, in *Functional properties of food macromolecules*, eds. S. E. Hill, D. A. Ledward and J. R. Mitchell, Aspen Publishers, Gaithersburg, 1998, pp. 77–142.
- 12 M. A. De la Fuente, H. Singh and Y. Hemar, *Trends Food Sci. & Tech.*, 2002, **13**, 262–274.
- 13 T. Nicolai, in *Food Colloids, Self-Assembly and Material Science*, eds. E. Dickinson and M. E. Leser, RSC Publishing, Cambridge, 2007, pp. 35–56.
- 14 T. Nicolai and D. Durand, *Curr. Opin. Coll. Int. Sci.*, 2007, **12**, 23–28.
- 15 E. Dickinson, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2000, **225**, 2–15.
- 16 E. H. C. Bromley, M. R. H. Krebs and A. M. Donald, *Eur. Phys. J.E.*, 2006, **21**, 145–152.
- 17 M. R. H. Krebs, G. L. Devlin and A. M. Donald, *Biophysical Journal*, 2007, **92**, 1336–1342.
- 18 A. Komla, D. Durand and T. Nicolai, *Food Hydrocolloids*, 2009, **23**, 1111–1119.
- 19 M. Langton and A. Hermansson, *Food Hydrocolloids*, 1992, **5**, 523–539.
- 20 S. Mehalebi, T. Nicolai and D. Durand, *Soft Matter*, 2008, **4**, 893–900.
- 21 A. H. Clark, G. M. Kavanagh and S. B. Ross-Murphy, *Food Hydrocolloids*, 2001, **15**, 383–400.
- 22 J. E. Kinsella and D. M. Whitehead, Proteins in whey: chemical, physical and functional properties, *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, San Diego, 1989, vol. 33, pp. 343–437.
- 23 R. Townend, R. J. Winterbottom and S. N. Timasheff, *Journal of the American Chemical Society*, 1960, **82**, 3161–3168.
- 24 W. Brown, *Light scattering: principles and development*, Clarendon Press, Oxford, 1996.
- 25 J. S. Higgins and H. C. Benoit, *Polymers and neutron scattering*, Clarendon Press, Oxford, 1994.
- 26 P. R. Majhi, R. R. Ganta, R. P. Vanam, E. Seyrek, K. Giger and P. L. Dubin, *Langmuir*, 2006, **22**, 9150–9159.
- 27 M. Pouzot, D. Durand and T. Nicolai, *Macromolecules*, 2004, **37**, 8703–8708.
- 28 C. Le Bon, T. Nicolai and D. Durand, *Int. J. Food Sci. Tech.*, 1999, **34**, 451–465.
- 29 K. Baussay, C. Le Bon, T. Nicolai, D. Durand and J. P. Busnel, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2004, **34**, 21–28.
- 30 S. Mehalebi, T. Nicolai and D. Durand, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2008, **43**, 119–135.
- 31 P. Aymard, T. Nicolai and D. Durand, *Macromolecules*, 1999, **35**, 2542–2552.
- 32 W. S. Gosal, A. H. Clark and S. B. Ross-Murphy, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 2408–2419.
- 33 C. Veerman, H. Ruis, L. M. C. Sagis and E. van der Linden, *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 869–873.
- 34 P. Aymard, D. Durand and T. Nicolai, *International Journal of Polymer Analysis & Characterization*, 1996, **2**, 115–119.
- 35 D. Durand, J. C. Gimel and T. Nicolai, *Physica A*, 2002, **304**, 253–265.
- 36 M. Pouzot, T. Nicolai, R. W. Visschers and M. Weijers, *Food Hydrocolloids*, 2005, **19**, 231–238.
- 37 P. Croguennoc, D. Durand and T. Nicolai, *Langmuir*, 2001, **17**, 4372–4379.
- 38 K. G. de Kruif and R. Tuinier, *International Journal of Food Science and Technology*, 1999, **34**, 487–492.
- 39 K. Baussay, T. Nicolai and D. Durand, *Biomacromolecules*, 2006, **7**, 304.
- 40 A. Syrbe, P. B. Fernandes, F. Dannenberg, W. Bauer and H. Klostermeyer, in *Food macromolecules and colloids*, eds. E. Dickinson, P. Walstra and D. Lorient, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995, pp. 328–339.
- 41 N. Kitabatake and Y. I. Kinekawa, *Food Chemistry*, 1995, **54**, 201–203.
- 42 M. Weijers, R. W. Visschers and T. Nicolai, *Macromolecules*, 2004, **37**, 8709–8714.

Salt-Induced Gelation of Globular Protein Aggregates: Structure and Kinetics

Komla Ako, Taco Nicolai,* and Dominique Durand

Polymères, Colloïdes, Interfaces, UMR CNRS Université du Maine, 72085 Le Mans cedex 9, France

Received October 6, 2009; Revised Manuscript Received February 26, 2010

Aggregates of the globular protein β -lactoglobulin were formed by heating solutions of native proteins at pH 7, after which gels were formed by the addition of salt. The second step does not necessitate elevated temperatures and is therefore often called cold gelation. The structure of the gels was studied during their formation using light scattering and turbidity. Complementary confocal laser scanning microscopy measurements were done. We compared the structure with that of gels formed by heating native β -lactoglobulin under the same conditions. Whereas in the latter case, microphase separation occurs above 0.2 M NaCl, no microphase separation was observed during cold gelation up to at least 1 M NaCl. The dependence of the kinetics and the final gel structure on the protein concentration, the temperature, the salt concentration, and the aggregate size was quantified. A few measurements on gels formed by adding CaCl₂ confirmed the higher efficiency of this bivalent cation but revealed no qualitative differences with gels formed by adding NaCl.

Introduction

Globular proteins in aqueous solution denature when heated, leading in many cases to irreversible aggregation. Above a critical protein concentration, the proteins form gels with different structures and mechanical properties depending on the concentration, the amount and type of salt, and the pH.^{1–5} At lower concentrations, the aggregation process stops after some time, and stable suspensions of polydisperse self-similar aggregates are produced. Solutions of protein aggregates gel when the electrostatic repulsion between the aggregates is reduced. The latter can be done either by increasing the salt concentration, which screens the interaction, or by bringing the pH closer to the isoelectric point, which reduces the charge density of the proteins.^{6,7} Gelation of preheated protein aggregates occurs even at room temperature and is therefore often called cold gelation. Cold gelation can be used to manufacture products that are heat-sensitive. The expression “cold gelation” is somewhat misleading in the sense that the same process also occurs at high temperatures. Nevertheless, we will continue to use it in opposition with heat-induced gelation of native proteins.

Cold gelation has been studied most extensively for whey proteins^{8–15} but has been observed for other globular proteins as well.^{7,16–18} The most striking feature of cold gelation is that more transparent gels are formed than by heat gelation of native proteins under the same conditions. In previous work, attention was focused mainly on the rheology and the turbidity of the cold-set gels. Microscopy has been used to observe the gel structure under different conditions, and a few attempts have been made to analyze the gel structure quantitatively by applying the so-called box-counting method^{19,20} to the images. However, one should be careful when drawing conclusion from the results obtained by this method.²¹ (See below.) The objective of the study presented here was to characterize the structure of the gels directly using light scattering techniques complemented with confocal laser scanning microscopy (CLSM). The methodology we used was successfully previously applied for heat-

set globular protein gels.^{22,23} The second motive for this study was to compare the structure of heat-set gels formed in a single process with cold-set gels formed in two steps under the same conditions of pH and ionic strength. This comparison may enhance our understanding of protein aggregation and gelation in general.

We have studied β -lactoglobulin (β -lg) that is the main protein component of whey. It is easily obtained in large quantities and has been widely used as a model system to study globular protein gelation. The structural properties of aggregates and gels of this protein formed after heat-induced denaturation have been studied extensively in our group.^{21–27} Recently, we showed that the structure of heat-set gels changes qualitatively above a critical ionic strength (0.15 M NaCl at pH 7). Below the critical ionic strength, the gels are more homogeneous and consist of thin protein strands. At higher ionic strength, phase separation leads to the formation of dense domains with a size of a few micrometers, which cross-link and form a gel. This qualitative transition between so-called finely stranded and particulate gels is well-known for globular protein gels.^{7,28,29} We showed that it is caused by microphase separation of the growing aggregates above a critical salt concentration.

In the present study, we focus on cold gelation induced by the addition of NaCl at pH 7 because it allows us to compare the structure of cold-set gels with those of heat-set gels that were already investigated under these conditions. An important question we wished to answer was whether phase separation when it occurs during heat gelation also occurs during cold gelation. We have also done a few experiments on gels formed by adding CaCl₂ to see if these gels had a different structure because in the past, cold gelation was often induced by the addition of CaCl₂.

We will first show how the structure of the systems can be investigated using cross-correlation dynamic light scattering and turbidimetry. Remarkably, we did not observe phase separation during cold-gelation, even at very high ionic strengths (1 M NaCl). It turned out that the structure of all gels obtained by cold gelation was close to that of heat-set gels formed below the critical salt concentration for phase separation. In the second

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: taco.nicolai@univ-lemans.fr.

part, we show the effect on the gel structure of the temperature, the salt concentration, the protein concentration, and the size of the protein aggregates. We have taken care that the effects of aggregate size and concentration were decoupled, contrary to previous investigations.^{11,30} (See below.) An often neglected issue is the kinetics of the cold-gelation process. If the kinetics depends on the conditions, then one should not draw conclusions from differences found after a given time without consideration of the kinetics. For this reason we have in all cases studied the time dependence of the systems. Finally, we will show for a few systems the correlation between the evolution of the turbidity and the shear rheology, but we did not study the rheology in detail here.

Materials and Methods

Preparation and Characterization of β -lg Aggregate Solutions.

The β -lg used in this study was a gift from Lactalis (Laval, France). It consisted of a mixture of the genetic variants A and B in about equal quantities and traces of α -lactalbumin. We prepared solutions by dissolving the powder in pure water (Millipore) containing 3 mM Na₂N₃ to protect against bacterial growth. The solutions were dialyzed against the solvent, after which the pH was set at pH 7 by the addition of aliquots of concentrated (0.1 M) solutions of HCl or NaOH with vigorous stirring. After filtration through 0.45 μ m pore size filters (Anatope), we determined the concentration (C) by measuring the UV absorption at 280 nm using the extinction coefficient 0.96 L \cdot g⁻¹ \cdot cm⁻¹.

Solutions of native β -lg containing 10 mM NaCl were heated overnight at 80 °C. This produced transparent more-or-less viscous suspensions of aggregates with almost no unaggregated proteins (<5%). The reason for choosing this ionic strength was that while the critical gel concentration was still $C_g \approx 95$ g/L, it was easier to control the aggregate size than without added salt. The weight-average molar mass (M_w) and z -average radius of gyration (R_g) were determined for highly diluted solutions using light scattering in a manner discussed in detail elsewhere.²⁵ Aggregates with different sizes were prepared by heating solutions with different protein concentrations overnight at 80 °C.

Subsequently, protein aggregate solutions were mixed with salt solutions with strong agitation (vortex) to produce solutions with the desired protein and salt concentration. This method produced macroscopically homogeneous gels up to 1 M NaCl and 13 mM CaCl₂. At higher salt concentrations, gelation occurred during mixing. An alternative would be to dialyze the aggregate solutions against the salt solutions, but this method does not allow us to study the kinetics. There is also a problem of inhomogeneous gelation starting at the outside of the dialysis bag, which might influence the gel structure. Finally, there are practical difficulties in transferring the content of the dialysis bags to the cells used for light scattering and turbidity measurements.

Light Scattering. Light scattering experiments were done using a cross-correlation dynamic light scattering (DLS) instrument (LS instrument, Fribourg). The wavelength of the incident light was $\lambda = 681.5$ nm, and measurements were done varying the scattering angle (θ) from 10 to 140°. The temperature was set at $T = 20$ °C using a thermostat bath.

Cross-correlation allows one to determine the fraction of single scattered light of strongly scattering samples for which multiple scattering cannot be ignored. In brief, one needs to measure the electric field cross-correlation function of the scattered light and determine the ratio of the intercept and that of a transparent sample. The total scattered light intensity should be multiplied with this ratio and corrected for the reduced transmission to give the single scattered light intensity. The method was previously applied to study globular protein gels, and more details can be found in ref 31.

In dilute solutions, the singly scattering light intensity relative to a standard (I_r) is given by^{32,33}

$$I_r = KCM_w S(q) \quad (1)$$

where C is the protein concentration, M_w is the weight-average molar mass, and $S(q)$ is the structure factor that is a function of the scattering wave vector ($q = 4\pi n/\lambda(\sin(\theta/2))$, with n the refractive index of the solution and λ the wavelength of the incident light). K is an optical constant that depends on the refractive index increment (dn/dC), which for aqueous β -lg solutions is 0.185 g/L.³⁴ From the initial q dependence of $S(q)$, the z -average radius of gyration (R_g) can be calculated using

$$S(q) = \left[1 + \frac{(qR_g)^2}{3} \right]^{-1} \quad (2)$$

It turns out that for concentrated solutions of protein aggregates and gels, one can use in many cases the same equations, but instead of M_w , one measures an apparent molar mass (M_a) and radius (R_a). M_a is related to the osmotic compressibility and characterizes the amplitude of the concentration fluctuations, whereas R_a is related to the correlation length of the concentration fluctuations: $R_a = \xi\sqrt{3}$. For concentrated solutions and gels, the structure factor was analyzed using the following equation

$$S(q) = [1 + (q\xi)^2]^{-1} \quad (3)$$

Turbidity. Turbidity measurements were done using a UV-visible spectrophotometer Varian Cary-50 Bio (Les Ulis, France) with temperature controlled. The turbidity (τ) was determined as a function of wavelength in the range 400–1100 nm, where β -lg does not absorb light, or as a function of time for a limited number (five) of wavelengths in this range. The turbidity is related to the structure factor as follows

$$\tau = HCM_a \int_0^{2\pi} \int_0^\pi S(q)(1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta d\varphi \quad (4)$$

where H is another optical constant.³⁵ If the structure factor is given by eq 3, then eq 4 has an analytical solution

$$\tau = HCM_a 2\pi \left[\frac{-4}{a^2}(a + 2) + \frac{8a + 4a^2 + 8}{a^3} \ln(1 + a) \right] \quad (5)$$

with

$$a = \left(\frac{4\pi n \xi}{\lambda} \right)^2$$

Confocal Laser Scanning Microscopy. CLSM was used in the fluorescence mode. Observations were made with a Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems Heidelberg, Germany). Two different water immersion objective lenses were used: HCx PL APO 63 \times NA = 1.2 and 20 \times NA = 0.7. We labeled β -lg with the fluorochrome rhodamine B by adding a small amount of a concentrated rhodamine solution to the heat-denatured β -lg solutions before adding salt. Solutions were inserted between a concave slide and a coverslip and hermetically sealed (Gene Frame (ref AB-0577, Thermo Scientific, Epsom, U.K.).

The samples were heated in a thermostatted bath at 80 °C. The incident light was emitted by a laser beam at 543 nm, which exited the rhodamine. The fluorescence light was recorded between 560 and 700 nm. Two-dimensional confocal images were analyzed, as described in detail in ref 21. In brief, the pair correlation function ($g(r)$) of the fluorescence intensities (A) was calculated to be

$$g(r) = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m A_i A_j}{\sum_{i=1}^n A_i \sum_{j=1}^m A_j} \quad \text{with } r = |\vec{i} - \vec{j}| \quad (6)$$

where the sum was taken over all pairs of pixels (i, j) at a distance, r . It was verified that when the proper precautions are taken, the fluorescence is proportional to the protein concentration so that $g(r)$ is equal to the pair correlation function of the concentration fluctuations. Because the systems studied here are isotropic, it is sufficient to calculate $g(r)$ for a large number of independent 2D images. Results from several magnifications were combined to increase the distance range, r .

Rheology. Oscillatory shear experiments were done at 1 Hz using a stress-imposed rheometer (AR2000, Rheometrics) with a cone and plate geometry (40 mm, 0.58°). The imposed stress during oscillatory shear measurements was chosen within the linear response regime. The temperature was controlled with a Peltier system, and the geometry was covered with a thin layer of mineral oil to avoid evaporation.

Results

Gel Structure. The q -dependent single scattered light intensity of the gels was determined using cross-correlation scattering. As an example, Figure 1 shows the q dependence of I_r/KC at different times for a solution containing β -lg aggregates with $M_w = 7.8 \times 10^6$ g/mol and $R_g = 75$ nm at $C = 20$ g/L and 0.3 M NaCl. The solutions were kept at a temperature ($T = 60$ °C) chosen such that the aggregation process was slow enough so that the evolution was negligible during the measurements but still fast enough to obtain large structures within a few days. This system gelled after ~ 5 h, but the gel structure kept evolving for a period of days.

The starting solution was transparent and had almost no q -dependence, implying that ξ is much smaller than R_g of the aggregates, which is caused by repulsive interactions (excluded volume and electrostatic) between the aggregates. After the addition of salt, the repulsion decreased, leading to an immediate increase in the scattering intensity. With time, the scattering intensity and its q -dependence increased further because of gelation and subsequent restructuring, causing an increase in M_a and ξ . The solid lines through the data represent fits to eqs 1 and 3. As mentioned above, M_a and ξ represent the amplitude and the characteristic length scale of the concentration fluctuations of the system and are related to the osmotic compressibility and the correlation length of the system. A cartoon of the cold-gelation process is shown in Figure 2.

Up to the gel point, the system could be diluted, and the size of the aggregates could be determined using light scattering. We found that the structure factor of the aggregates formed during cold gelation was the same as those formed by heat-induced aggregation of native proteins and could be described by eq 2 (results not shown). The size of the aggregates increased rapidly as the gel time was approached.

Cross-correlation DLS is a time-consuming method and cannot be applied to rapidly evolving systems; however, once the structure factor is known, turbidimetry is a convenient rapid method to characterize the systems. We determined the wavelength dependence of the turbidity of the same system for which we measured the structure factor. (See Figure 3.) The solid lines represent fits to eq 5 and demonstrate that light scattering and turbidimetry are consistently described by the same structure factor using values of ξ that were in most cases almost the same

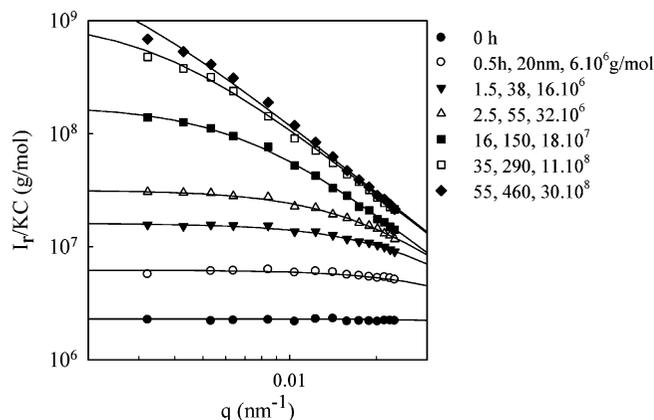


Figure 1. Dependence of the normalized scattering intensity on the scattering wave vector of a solution of protein aggregates at different times (hours) after the addition of 0.3 M NaCl ($C = 20$ g/L, $T = 60$ °C). The solid lines represent eq 3 with the values of ξ and M_a indicated.

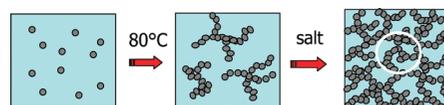


Figure 2. Cartoon of the cold-gelation process. Step 1: formation of preaggregates by heating at low ionic strength; step 2: gelation induced by addition of salt at any temperature. The radius of the white circle represents approximately the correlation length of the gel.

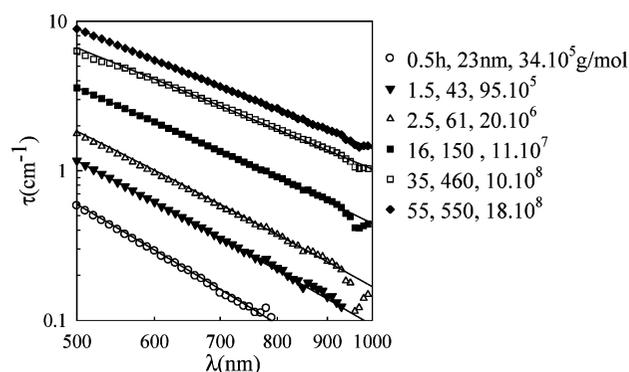


Figure 3. Wavelength dependence of the turbidity of a solution of protein aggregates at different times (hours) after the addition of 0.3 M NaCl ($C = 50$ g/L, $T = 60$ °C). The solid lines represent eq 5 with the values of ξ and M_a indicated.

and values of M_a that were somewhat smaller for the turbidity measurements. $M_a = b\xi^2$ was found with both methods, but the prefactor b was found to be almost two times smaller for the results obtained from turbidity measurements. We have not been able to trace the origin of this difference, but it is not important for the conclusions drawn from this study. In the following, values obtained with turbidimetry are shown.

We studied cold gelation at different protein concentrations (15–80 g/L), temperatures (20–80 °C), NaCl concentrations (0.2 to 1M), and aggregate sizes (20–500 nm). The kinetics and the values of M_a and ξ depend on the conditions, as will be discussed below, but in all cases, the gel structure could be described by eq 3. If the structure factor is given by eq 3, then it follows that $M_a \propto \xi^2$, which was indeed the case. M_a had the same power law dependence on ξ under all conditions tested in this study (Figure 4): $M_a = (6 \times 10^3)\xi^2$ with M_a in grams per mole and ξ in nanometers.

The same shape of the structure factor and the same power law relationship between M_a and ξ were previously found for

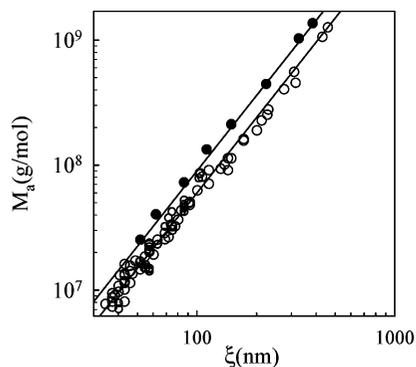


Figure 4. Apparent molar mass versus the correlation length of gels formed after the addition of different amounts of NaCl (○) or CaCl₂ (●) to solutions of β -lg aggregates with different sizes and concentrations at different temperatures. The solid lines represent $M_a = b\xi^2$ with $b = 6 \times 10^3$ in NaCl and 9.5×10^3 in CaCl₂.

heat-set gels formed between 0.1 and 0.2 M NaCl,²³ but the prefactor was somewhat larger and increased with increasing NaCl concentration ($b = 8.5 \times 10^3$ and 1.8×10^4 for 0.1 and 0.2 M, respectively). We may thus conclude that the cold gelation process does not lead to qualitatively different gel structures. This is perhaps not surprising considering that the aggregate structure is the same and that the aggregates are connected into a space filling structure by a random association process. However, the local structure of the preaggregates formed at low ionic strength is not the same as that of aggregates formed at higher ionic strength.

What is more surprising is that no phase separation process was observed. Phase separation leads to a heterogeneous particulate structure for heat-induced gelation of native proteins above 0.2 M NaCl. Heat-induced gelation of native proteins yielded a heterogeneous particulate gels, whereas “cold” gelation led to a more homogeneous finely stranded gel at exactly the same protein concentration, NaCl concentration, and temperature. The overall fractal structure of the aggregates was also the same in both situations. The only difference was the local structure of the aggregates, which was denser for the aggregates formed at high ionic strength during heat gelation than for the preaggregates formed at low ionic strength used in cold gelation.²⁷ We may conclude from this comparison that a higher local density is needed to induce phase separation.

It is well-known that cold gelation can also be induced by the addition of CaCl₂ and even at much lower concentrations than NaCl. Marangoni et al²⁰ concluded on the basis of dynamic shear measurements that the structure of the gels induced by NaCl and CaCl₂ was qualitatively different. We repeated a limited number of measurements with gels formed after the addition of CaCl₂. We found the same shape of the structure factor and the same power law relationship between M_a and ξ . However, the prefactor of the power law was slightly larger for gels formed in CaCl₂. (See Figure 4.) We conclude that the addition of CaCl₂ does not lead to a qualitatively different aggregation process but is simply effective at much lower concentrations.

Even if the systems did not show clear microphase separation, the correlation length could be quite large. This was already shown for heat-set β -lg gels,²² and the same is true for cold-set gels. As will be detailed below, the correlation length increased with increasing NaCl concentration and decreasing protein concentration. At $C = 20$ g/L, ξ became larger than $0.5 \mu\text{m}$, and structural features could be distinguished using CLSM. (See Figure 5.)

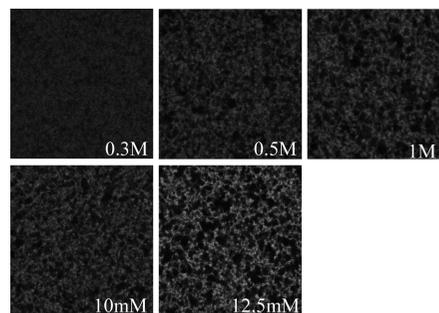


Figure 5. CLSM images of gels formed by the addition of different amounts of NaCl (top) or CaCl₂ (bottom) to solutions of protein aggregates ($C = 20$ g/L). The images represent $40 \times 40 \mu\text{m}$. Protein-rich domains are white. The protein density is proportional to the gray level.

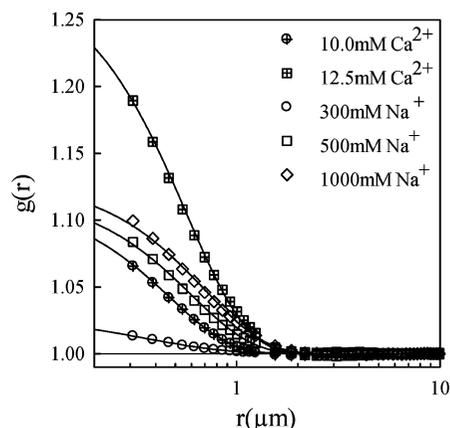


Figure 6. Pair correlation functions of the CLSM images shown in Figure 5. The solid lines are guides to the eye.

We calculated the pair correlation functions using eq 6, which showed that compared with heat-set gels the heterogeneity and the contrast remained small, even at 1.0 M NaCl. (See Figure 6.) For self-similar structures: $g(r) - 1 = Br^{d_f - 3} f(r/\xi)$ where d_f is the so-called fractal dimension and $f(r/\xi)$ is a cutoff function. The latter is needed to ensure that $g(r) = 1$ for $r \gg \xi$, where the system is homogeneous. The prefactor B depends on the density of the system on small length scales that are the elementary building blocks of the fractal structure. Clearly, on the length scales covered by CLSM, no fractal structure is observed, and the form of $g(r)$ is dominated by the cutoff function. However, as shown above, scattering experiments at 0.3 M NaCl showed that the systems had a fractal structure and were not microphase-separated.

Some authors used the so-called box-counting method to calculate an apparent fractal dimension.^{19,20} Obviously, this method gives a fractal dimension of 3 for box sizes larger than the correlation length. Over the limited range of box sizes between the resolution of CLSM and the correlation length, one can determine an apparent fractal dimension; however, the value depended on the threshold chosen for the binarisation, as we showed for heat-set gels in ref 21.

Figure 6 shows that the contrast between protein-rich and protein-poor domains of the gels increased sharply with increasing salt concentration and that calcium ions are much more efficient than sodium ions. The size of the protein-rich domains is $\sim 1 \mu\text{m}$ and is less dependent on the ionic strength.

Influence of the Temperature. Heat-induced gelation of globular proteins has a very strong temperature dependence because it involves as the first step denaturation, which is a highly cooperative process characterized by a large activation

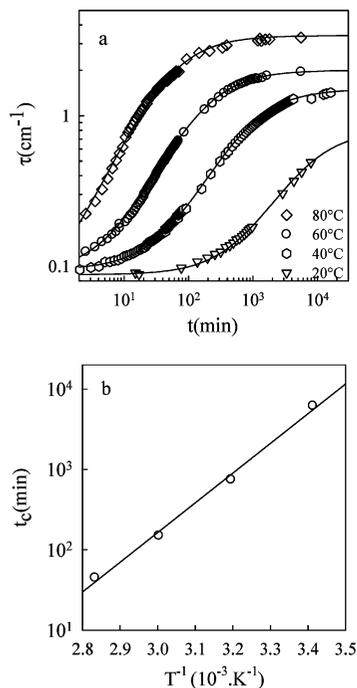


Figure 7. (a) Time dependence of the turbidity of a protein aggregate solution ($C = 50$ g/L) at different temperatures after the addition of 0.3 M NaCl. The solid lines represent fits to eq 6. (b) Arrhenius representation of the characteristic time of the turbidity increase shown in Figure 7a. The solid line represents a linear least-squares fit to the data.

energy. It has already been shown that cold gelation is also faster when the temperature is higher,¹² but as far as we are aware the temperature dependence has not yet been quantified. Figure 7a shows the turbidity at 680 nm as a function of time at different temperatures for β -I α aggregates with $R_g = 65$ nm at $C = 50$ g/L and 0.3 M NaCl. Increasing the temperature led to faster evolution of the system and to higher final values of the turbidity (τ_f) in agreement with findings by McClements et al. for whey proteins.¹²

In each case, the turbidity continued to increase long after the system had gelled. Initially, τ increased linearly with time, and the data can be described by the following empirical equation

$$\tau = \tau_0 + \frac{\tau_f - \tau_0}{1 + t_c/t} \quad (7)$$

where τ_0 is the turbidity of the aggregate solution just after the addition of salt and t_c is a characteristic time of the aggregation and gelation process. This universal behavior allowed us to determine τ_f and t_c even at 20 °C, where the system was still evolving after 1 week. The temperature dependence of t_c was consistent with an Arrhenius dependence with activation energy $E_a = 70$ kJ/mol (Figure 7b), which is much smaller than that for heat-induced gelation of native β -I α (350 kJ/mol at 0.1 M NaCl and pH 7³⁶). The increase in τ_f with increasing temperature is caused by an increase in M_a (and thus ξ) from about 6.5×10^6 at 20 °C to 7×10^7 g/mol at 80 °C (35 to 115 nm).

NaCl Concentration. The effect of the NaCl concentration up to 1 M was investigated for β -I α aggregates with $R_g = 65$ nm at $C = 50$ g/L and $T = 60$ °C. Figure 8a shows the evolution of the turbidity at different NaCl concentrations. At 0.1 M, a very slow increase in the turbidity was observed, but the system

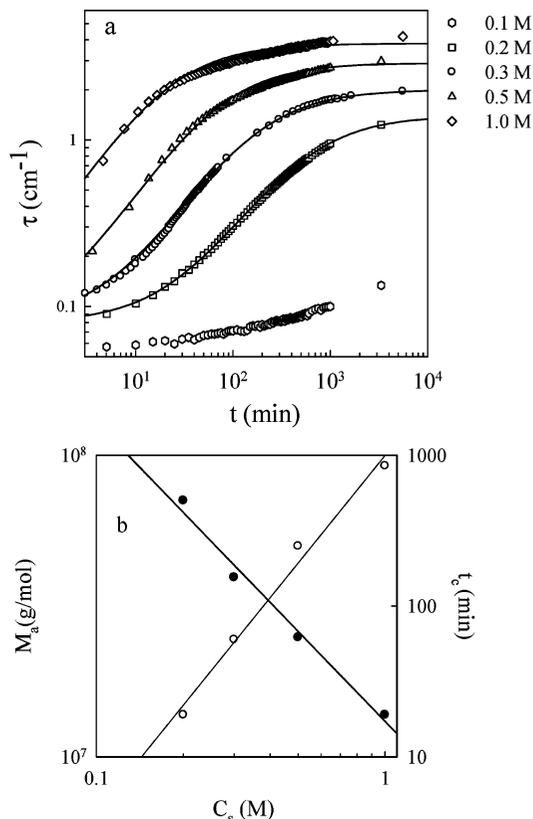


Figure 8. (a) Time dependence of the turbidity of a protein aggregate solution ($C = 50$ g/L, $T = 60$ °C) after the addition of different amounts of NaCl. The solid lines represent fits to eq 6. (b) NaCl concentration dependence of the characteristic time of the turbidity increase shown in Figure 8a (filled symbols) and of the apparent molar mass of the fully developed gels (open symbols). The solid lines represent linear least-squares fits to the data.

did not gel within a week. With increasing NaCl concentrations, the systems gelled increasingly rapidly until at 1 M, gelation occurred very soon (3 min) after mixing at room temperature. At even higher concentrations, the gel formed during mixing so that it was not possible to obtain macroscopically homogeneous systems.

The kinetics decreased with increasing salt concentration following approximately a power law relationship: $t_c \propto C_s^{-2}$. (See Figure 8b). Faster cold-gelation with increasing NaCl concentration was previously reported for whey protein aggregates.¹⁵ Faster aggregation with increasing ionic strength might be expected because salt screens the electrostatic repulsion and thus facilitates binding. Reduced repulsion also explains why the amplitude (M_a) and correlation length (ξ) of the protein concentration fluctuations (and thus the turbidity) increased with increasing ionic strength. An increase in the turbidity with increasing NaCl has been previously reported.³⁷ However, the effect of the NaCl concentration on the structure of cold-set gels is very small compared with that observed for heat-set gels of native proteins,^{22,28} for which M_a increased between 10⁷ g/L at 0.1 M and 10¹² g/L at 0.3 M.

Concentration of the Preaggregates. The effect of the concentration of aggregates was tested for β -I α aggregates with $R_g = 33$ nm at 0.3 M NaCl and $T = 60$ °C. Figure 9a shows the evolution of the turbidity at different protein concentrations between 20 and 80 g/L. At $C = 15$ g/L or less, the turbidity increased with time, but no gel was formed within a week. To eliminate the trivial linear dependence of τ on the concentration, we plotted in Figure 9a τ/C as a function of time. The initial

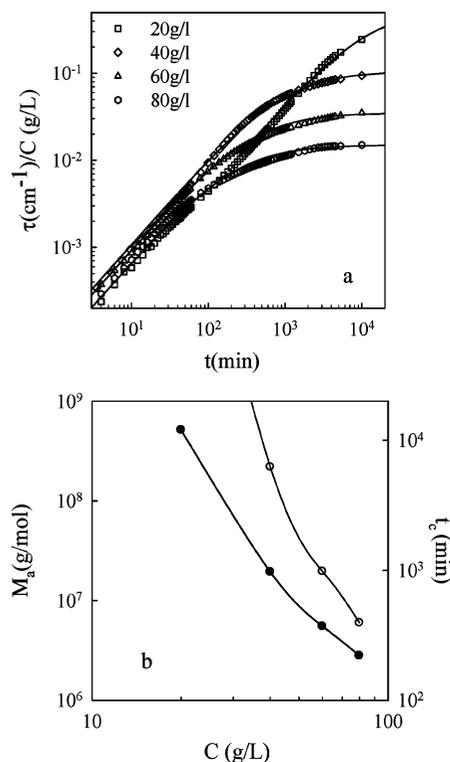


Figure 9. (a) Time dependence of the normalized turbidity of protein aggregate solutions at different concentrations ($T = 60^\circ\text{C}$) after the addition of 0.3 M NaCl. The solid lines represent fits to eq 6. (b) Protein concentration dependence of the characteristic time of the turbidity increase shown in Figure 9a (open symbols) and of the apparent molar mass of the fully developed gels (filled symbols). The solid lines are guides to the eye.

increase in the normalized turbidity did not depend much on the protein concentration, but τ/C stabilized quicker and at a lower value with increasing concentration. The evolution at 20 g/L could not be described well by eq 6 over the whole range. It appears as if the increase slowed down for a while after about 50 min before increasing again linearly. We have no explanation for this behavior that could be reproduced. We fitted the results for $t > 200$ min, where they could be well described with eq 6.

Figure 9b shows that both M_a and t_c increased strongly with decreasing protein concentration. At $C = 20$ g/L, the correlation length became larger than $1 \mu\text{m}$ so that the influence of the finite acceptance angle for the transmitted light in the spectrometer could no longer be neglected. Therefore, we could not determine M_a and ξ using the turbidimetry, but it is certain that $M_a > 10^9$ g/mol.

Size of the Preaggregates. We studied the effect of the aggregate size by preparing aggregates at different native protein concentrations. With increasing concentration, larger aggregates are formed. Ju and Kilara¹¹ used the same method to prepare aggregates of different size and to study the effect on cold-gelation induced by Ca^{2+} . However, because the heating time was relatively short, not all proteins had aggregated, and the fraction of aggregated proteins as well as their size increased with increasing protein concentration. The same was true for other methods that were used to obtain larger aggregates, that is, heating for different times at a given temperature¹¹ or heating at different temperatures for a given time.³⁰ Stronger gels were formed when more and larger aggregates were formed using any of these three methods. However, because the size and the concentration of the aggregates were correlated, it is difficult to distinguish the influence of each separately.

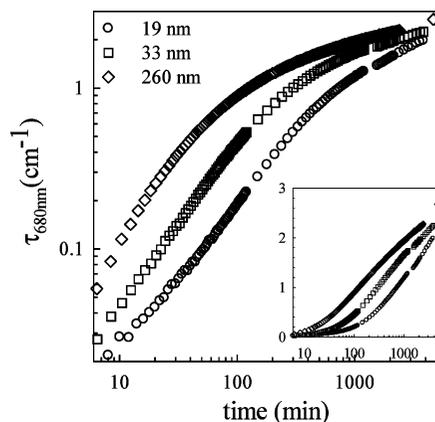


Figure 10. Log-log representation of the time dependence of the turbidity of solutions containing protein aggregates of different sizes ($C = 50$ g/L, $T = 60^\circ\text{C}$) after the addition of 0.3 M NaCl. The inset shows the same data in a lin-log representation.

The situation is even more complicated if the preheated protein solution still contains native proteins and is subsequently reheated after addition of salt. In this case, heat-induced gelation of monomers and “cold” gelation of the aggregates occurs together. Vardhanabhuti et al.¹⁴ studied gels formed at 80°C by mixtures of native and aggregated whey proteins in 0.2 M NaCl and showed that the structure changed from finely stranded to particulate with increasing fraction of native proteins.

We avoided this complication by heating overnight, making sure that almost all (95%) proteins were aggregated. Using different protein concentrations, we obtained aggregates with varying R_g between 19 and 260 nm ($M_w = (2 \text{ to } 70) \times 10^6$ g/mol). Cold gelation of these aggregates was induced at $C = 50$ g/L, 0.3 M NaCl, and $T = 60^\circ\text{C}$. Figure 10 shows examples of the evolution for three different sizes. The kinetics of the gelation process increased with increased size, but τ_f was almost the same. Over the whole range of preaggregates used here, the values of M_a ($(3 \text{ to } 5) \times 10^7$ g/mol) and R_a (69–75 nm) of the gels varied little and showed no systematic dependence on the preaggregate size.

Discussion

We observed that the addition of salt induced irreversible bond formation between the globular protein aggregates, leading to growth while maintaining the same self-similar structure as aggregates formed by heating native proteins. This observation is in agreement with two previous light scattering studies of large aggregates formed after reducing the pH³⁸ or adding CaCl_2 ³⁹ to solutions of small globular protein aggregates.

The larger scale structure of cold-set gels had not been studied before and was found here to be well described by eq 3 over a wide range of NaCl concentrations. The overall structure of the gels was thus self-similar and characterized by a fractal dimension of two. The only effect of adding more NaCl was an increase in M_a and ξ , which explains the increase in the turbidity with increasing salt concentration reported in the literature.¹⁵ However, the effect of the NaCl concentration was weak compared with that observed for heat gelation. Marangoni et al.²⁰ reported fractal dimensions of ~ 2.5 . However, these values were based on CLSM images analyzed using the box-counting method, which is not reliable in the present case, as mentioned above. They also used the so-called fractal gel model to deduce a fractal dimension from rheology data. However, they applied this theory to concentrated solutions (60–120 g/L)

for which the system is not fractal over significant length scales.⁴ They also reported a qualitative difference between gels formed by the addition of CaCl₂ or NaCl based on rheology. Here we find that both salts lead to gels with the same overall structure, although for CaCl₂ at much lower salt concentrations. Locally gels formed by CaCl₂ are denser, and it is possible that the rheology is different, but we did not investigate this point.

At pH 7, heat-set gels consist of a network of cross-linked protein strands at NaCl concentrations below about 0.2 M NaCl.²³ At very low ionic strength (less than about 0.05 M NaCl), electrostatic repulsion renders the strand structure ordered to some extent, reducing scattering of visible light, and thus leads to transparent gels. With increasing salt concentration, the repulsion decreases, and the concentration fluctuations increase. In a narrow salt concentration range between about 0.1 and 0.2 M NaCl, the gel structure could be well described by eq 3. Above ~ 0.2 M NaCl, the systems phase separate during heating, leading to the formation of dense protein domains with a radius of a few micrometers.²¹ For reasons that are not yet entirely clear, these domains do not ripen into a macroscopic phase but instead randomly aggregate into large flocks that precipitate at low protein concentrations and form a space-filling network at higher protein concentrations.

Because aggregates with the same overall self-similar structure were formed during cold-gelation, one might expect phase separation to occur also. But we did not observe it at pH 7 for NaCl concentrations up to at least 1M. The gel structure obtained by cold gelation over a broad range of ionic strengths was the same (eq 3) as that of heat-set gels of native proteins in a narrow range of NaCl concentrations between about 0.1 and 0.2 M. The temperature had only a modest effect on the gel structure and therefore cannot explain the difference. The only difference between heat and cold gelation is the local structure of the aggregates that are formed by native proteins at different NaCl concentrations. Protein aggregates formed at higher NaCl concentrations are more densely branched, yielding a higher density for aggregates with the same size.²⁷ The cold-set gels were formed with preaggregates prepared at relatively low ionic strength and thus were less densely branched. We verified by light scattering on dilute solutions that R_g did not change after the addition of salt, which entails that the local structure of preaggregates formed at low ionic strength does not change when salt is added. We speculate that the less dense local structure is the origin of the weaker increase in the concentration fluctuations with increasing NaCl concentration and the absence of phase separation.

Another remarkable difference between gelation of preaggregates and of native proteins is the kinetics of the process. The temperature dependence of the gelation rate of native proteins is determined by the denaturation process, which is highly cooperative and therefore characterized by a large activation energy. For this reason, native proteins gel within a day only above ~ 60 °C. At 80 °C, denaturation is fast, and protein gels are formed very rapidly. Cold gelation also is faster at higher temperatures, but the activation energy is much smaller. The temperature dependence is possibly caused by hydrophobic interactions that may be involved in some stage of the cross-linking process. Notice that we may safely exclude spurious side reactions, for example, induced by hydrolysis, as the origin of the cold gelation process because no further aggregation nor breakdown of preaggregates was observed for days when <0.05 M NaCl was added, even at elevated temperatures.

The objective of the present study was to determine the structure of cold-set gels and not their dynamic mechanical

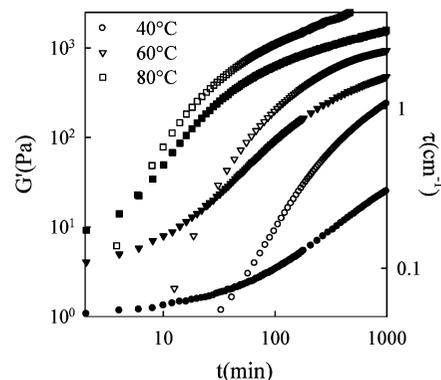


Figure 11. Comparison of the time dependence of the turbidity (filled symbols) and the storage shear modulus at 1 Hz (open symbols) of solutions containing protein aggregates ($C = 50$ g/L) after the addition of 0.3 M NaCl at different temperatures.

properties. However, we looked at the correlation between the evolution of the structure and the rheology for one sample at a few temperatures. (See Figure 11.) It is obvious from the comparison that the increase in the turbidity and thus M_a and ξ is correlated with the increase in the storage shear modulus. More surprisingly, most of the structural change occurred after G' became large enough to be measurable with a rheometer, that is, after the gel was formed. The relative increase in G' and τ was rapid just after the gel point but continued logarithmically for a long time. We conclude that initially the aggregates bind into a system spanning network without much change of the average distribution of the proteins. This is possible because the aggregates were already overlapping in solution. Subsequently, the gel structure becomes more heterogeneous and is reinforced. The reinforcement is partially because more aggregates are incorporated into the gel and partially due to restructuring as the network is not completely rigid. The latter also explains why the turbidity evolves for a long time after gelation.

The fact that most of the gel structure is set after the gel point could explain why the size of the preaggregates has little or no influence on the gel structure, although it does influence the kinetics. We have seen that up to the gel point, the preaggregates bind together to form larger aggregates with the same structure. Therefore, starting with larger preaggregates is equivalent to starting at a later point in the cold gelation process. The increase in the heterogeneity with increasing ionic strength and decreasing temperature may be rationalized by a decrease in the net repulsion between the proteins either by increasing hydrophobic interaction or by decreasing electrostatic repulsion.

The biggest effect on the structure was the protein concentration. A decrease in the protein concentration from 80 to 40 g/L led to an increase in M_a by more than an order of magnitude. A similar increase was observed for heat-set gels of native β -Ig at 0.15 M NaCl, that is, just below the critical salt concentration for phase separation.²³ In both cases, the net repulsion between the aggregates is very weak, allowing strong concentration fluctuations without phase separation. Lowering the concentration reduces excluded volume interactions, which explains the increase in the concentration fluctuations.

A slow down of the gelation process with decreasing concentration is expected because the protein strands are on average further apart and collide less often. If the kinetics is determined by the frequency of binary collisions, then one might expect that $t_c \propto C^{-2}$. This is what we observe between 40 and 80 g/L, but t_c at 20 g/L is somewhat longer than predicted by this simple

relationship. In comparison, the concentration dependence of heat gelation of native β -lg is weak,³⁶ but in this case, the rate-limiting step is denaturation and the formation of oligomers.

Conclusions

The structure of gels formed by the addition of salt to preheated β -lg aggregates is similar to that of gels formed by heating native proteins under conditions close to the critical point of phase separation. Under all conditions where macroscopically homogeneous gels could be formed after the addition of salt (up to 1 M NaCl or 13 mM CaCl₂), microphase separation was not observed. Varying the protein concentration, temperature, salt concentration, or aggregate size influenced the amplitude (M_a) and correlation length (ξ) of the frozen-in concentration fluctuations but did not change the form of the structure factor.

Increasing the temperature, the protein concentration, or the salt concentration led to faster gelation. The temperature dependence can be characterized by an activation energy of 70 kJ/mol. The heterogeneity of the gels increased weakly with increasing salt concentration and increasing temperature, but it increased strongly with decreasing protein concentration. The gel structure was insensitive to the size of the aggregates formed during preheating, but larger aggregates led to faster gelation.

References and Notes

- (1) Clark, A. H. Gelation of Globular Proteins. In *Functional Properties of Food Macromolecules*, 2nd ed.; Hill, S. E., Ledward, D. A., Mitchell, J. R., Eds.; Aspen Publishers: Gaithersburg, MD, 1998; pp 77–142.
- (2) De la Fuente, M. A.; Singh, H.; Hemar, Y. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13*, 262–274.
- (3) Foegeding, E. A.; Davis, J. P.; Doucet, D.; McGuffey, M. K. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13*, 151–159.
- (4) Nicolai, T. Structure of Self-Assembled Proteins. In *Food Colloids, Self-Assembly, and Material Science*; Dickinson, E., Leser, M. E., Eds.; RSC Publishing: Cambridge, MA, 2007; pp 35–56.
- (5) Nicolai, T.; Durand, D. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*, 23–28.
- (6) Bryant, M. C.; McClements, D. J. *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, *9*, 143–151.
- (7) Doi, E. *Trends Food Sci. Technol.* **1993**, *4*, 1–5.
- (8) Alting, A. C.; Hamer, R. J.; de Kruif, C. G.; Visschers, R. W. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5001–5007.
- (9) Barbut, S.; Foegeding, E. A. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 867–871.
- (10) Hongsprabhas, P.; Barbut, S. *Int. Dairy J.* **1997**, *7*, 827–834.
- (11) Ju, Z. Y.; Kilara, A. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3604–3608.
- (12) McClements, D. J.; Keogh, M. K. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *69*, 7–14.
- (13) Mleko, S.; Foegeding, E. A. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 139–143.
- (14) Vardhanabuti, B.; Foegeding, E. A.; McGuffey, M. K.; Daubert, C. R.; Swaisgood, E. *Food Hydrocolloids* **2001**, *15*, 165.
- (15) Bryant, M. C.; McClements, D. J. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 802–804.
- (16) Alting, A. C.; Weijers, M.; de Hoog, E. H. A.; van de Pijpekamp, A. M.; Cohen Stuart, M. A.; Hamer, R. J.; de Kruif, C. G.; Visschers, R. W. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 623–631.
- (17) Maltais, A.; Remondetto, G.; Gonzalez, R.; Subirade, M. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, C67–C73.
- (18) Navarra, G.; Giacomazza, D.; Leone, M.; Librizzi, F.; Militello, V.; Biagio, P. L. S. *Eur. Biophys. J.* **2009**, *38*, 437–446.
- (19) Alting, A. C.; Hamer, R. J.; de Kruif, C. G.; Visschers, R. W. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3150–3156.
- (20) Marangoni, A. G.; Barbut, S.; McGauley, S. E.; Marcone, M.; Narine, S. S. *Food Hydrocolloids* **2000**, *14*, 61–74.
- (21) Ako, K.; Durand, D.; Nicolai, T. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 1111–1119.
- (22) Mehalebi, S.; Nicolai, T.; Durand, D. *Soft Matter* **2008**, *4*, 893–900.
- (23) Pouzot, M.; Durand, D.; Nicolai, T. *Macromolecules* **2004**, *37*, 8703–8708.
- (24) Ako, K.; Nicolai, T.; Durand, D.; Brottons, G. *Soft Matter*, in print.
- (25) Baussay, K.; Le Bon, C.; Nicolai, T.; Durand, D.; Busnel, J. *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, *34*, 21–28.
- (26) Mehalebi, S.; Nicolai, T.; Durand, D. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43*, 129–135.
- (27) Pouzot, M.; Nicolai, T.; Visschers, R. W.; Weijers, M. *Food Hydrocolloids* **2005**, *19*, 231–238.
- (28) Barbut, S. *Food Res. Int.* **1995**, *28*, 437–443.
- (29) Langton, M.; Hermansson, A. *Food Hydrocolloids* **1992**, *5*, 523–539.
- (30) Hongsprabhas, P.; Barbut, S. *Food Res. Int.* **1996**, *29*, 135–139.
- (31) Nicolai, T.; Urban, C.; Schurtenberger, P. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *240*, 419–424.
- (32) Brown, W. *Light Scattering: Principles and Development*; Clarendon Press: Oxford, U.K., 1996.
- (33) Nicolai, T. Food Structure Characterisation Using Scattering Methods. In *Understanding and Controlling the Microstructure of Complex Foods*; McClements, D. J., Ed.; Woodhead: Cambridge, MA, 2007; pp 288–310.
- (34) Townend, R.; Winterbottom, R. J.; Timasheff, S. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3161–3168.
- (35) Pouzot, M.; Nicolai, T.; Durand, D.; Benyahia, L. *Macromolecules* **2004**, *37*, 614–620.
- (36) Le Bon, C.; Nicolai, T.; Durand, D. *Macromolecules* **1999**, *32*, 6120–6127.
- (37) Barbut, S.; Drake, D. *Food Res. Int.* **1997**, *30*, 153–157.
- (38) Vreeker, R.; Hoekstra, L. L.; Den Boer, D. C.; Agterof, W. G. M. *Food Hydrocolloids* **1992**, *6*, 423–435.
- (39) Wu, H.; Xie, J.; Morbidelli, M. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3189–3197.

BM9011437

RESUME

La bêta-lactoglobuline est une protéine globulaire qui forme le constituant majoritaire du sérum du lait ou petit lait. Par dénaturation thermique, cette protéine s'auto-assemble pour donner des gels présentant des textures très différentes selon les conditions environnementales, en particulier de pH et de force ionique. Ces gels sont couramment utilisés dans l'industrie alimentaire, cosmétique ou galénique pour leurs propriétés mécaniques et/ou nutritionnelles. La détermination de la structure de ces gels nécessite de couvrir une très large échelle spatiale (depuis quelques nm jusqu'à plusieurs dizaines de microns) et requière donc l'utilisation de techniques expérimentales complémentaires (diffusion de rayonnement et microscopies). Si les techniques microscopiques sont utilisées depuis longtemps pour observer de telles structures, les images sont le plus souvent analysées uniquement de façon qualitative. Le premier objectif de cette thèse a été de développer une nouvelle méthode originale et quantitative d'analyse des images obtenues par Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL) et de l'appliquer à des gels protéiques. L'analyse que nous avons mise au point est basée sur la détermination de la fonction d'autocorrélation $g(r)$ des intensités de pixels. Cette fonction nous donne accès à l'amplitude et à la longueur de corrélation des fluctuations de concentrations qui sont gelées par la formation du réseau protéique. Ces grandeurs sont équivalentes à la masse molaire apparente (M_a) et au rayon apparent (R_a) des domaines dans les expériences de diffusion de rayonnement.

La seconde partie de ce travail a constitué dans la caractérisation structurale des gels protéiques par microscopie confocale. Nous avons montré que l'amplitude et la longueur de corrélation des fluctuations de concentrations augmentent avec la force ionique. Le même comportement a été observé pour des systèmes sans sel lorsque le pH tend vers le point isoélectrique (pI). Pour tous ces gels, les fonctions $g(r)$ ont pu être ajustées par une même fonction exponentielle étirée. Les systèmes à un pH loin du pI ont été étudiés par SAXS. En effet, lorsque la force ionique est très faible, on observe un pic d'interaction qui traduit la présence d'un ordre local due aux répulsions électrostatiques. Ce pic d'interaction s'atténue pour même disparaître lorsque la force ionique augmente ou quand le pH tend vers le pI. A partir de l'ensemble de ces résultats nous avons établi un diagramme de phase pH/force ionique pour les systèmes de β lg à 100g/l. Ce diagramme de phase montre que l'évolution de l'amplitude des fluctuations de concentrations n'est pas uniquement due aux interactions électrostatiques.

Dans la troisième partie nous avons étudié la gélification des agrégats protéiques préparés dans une première étape par chauffage à 80°C. La gélification est obtenue dans une seconde étape par addition importante de sel quelle que soit la température. Elle peut même être réalisée à 20°C. Le temps de gélification des systèmes diminue avec l'augmentation de la taille des agrégats protéiques, de leur concentration, de la force ionique et de la température. Bien que les structures locales de ces gels soient identiques à celles des gels obtenus à chaud, on n'observe pas de micro-séparation de phase. Les données rhéologiques ont montré que les systèmes préparés à froid gélifient très vite mais continuent de couler lorsqu'on retourne le récipient. En microscopie confocale, nous avons vu que les micro-domaines apparaissent bien après la gélification.

En conclusion, ce travail nous a permis de développer une méthode quantitative d'analyse des images confocales, puis de comprendre la structure des gels protéiques sur une très large échelle spatiale en relation avec les conditions environnementales de leur formation.