

Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques

Laurence Donato

▶ **To cite this version:**

Laurence Donato. Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques. Sciences du Vivant [q-bio]. ENSIA (AgroParis-Tech), 2004. Français. NNT : 2004EIAA0142 . pastel-00003705

HAL Id: pastel-00003705
https://pastel.hal.science/pastel-00003705

Submitted on 2 Jun 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Nationale Supérieure
des Industries Agricoles et Alimentaires

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Discipline: Sciences Alimentaires

Présentée et soutenue publiquement par:

Laurence DONATO

Lundi 22 Novembre 2004

Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques

Directeur de thèse: M. J.-L. DOUBLIER

JURY

Mme. S. TURGEON	Université Laval, Québec	Rapporteur
M. C. SANCHEZ	ENSAIA-INPL, Nancy	Rapporteur
M. G. CUVELIER	ENSIA, Massy	Président du jury
M. T. NICOLAI	CNRS, Le Mans	Examinateur
M. J. -L. DOUBLIER	INRA, Nantes	Examinateur
M. P. BOULENGUER	Degussa Food Ingredients, Baupte	Invité

A Fanch,
Toujours à mes côtés.

A ma grand-mère, Tavia Donato
Toujours dans mes pensées.

«Ce qui compte ce n'est pas l'énormité de la tâche mais la magnitude du courage» *Matthieu Ricard*

Avant-Propos

Cette thèse, financée par le ministère de la recherche, a été réalisée à l'Institut national de la Recherche Agronomique, au sein de l'Unité de Physico-Chimie des Macromolécules du Centre de Recherche de Nantes, sous la direction conjointe de M. Jean-Louis Doublier, Directeur de Recherche et Directeur de l'Unité, et de Mme Catherine Garnier, Chargée de Recherche.

Certaines expériences ont été effectuées au Laboratoire Polymères, Colloïdes, Interfaces (UMR 6120, CNRS-Université du Maine, Le Mans), sous la direction de M.Taco Nicolai.

Mme Sylvie Turgeon et M. Christian Sanchez, ainsi que M. Gérard Cuvelier, M.Taco Nicolai et M. Patrick Boulenguer ont accepté d'évaluer ce travail et je les en remercie.

J'exprime toute ma reconnaissance à M. Jean-Louis Doublier pour ses conseils, son aide et aussi pour sa grande patience lors de la rédaction de ce mémoire. Je remercie également Mme Catherine Garnier pour son implication dans ce travail et ses conseils prodigués tout au long de cette thèse.

Merci aussi à…

M. Bruno Novales pour sa disponibilité et son aide précieuse dans les travaux d'analyse de texture d'images.

Mme Sylvie Durand qui m'a porté main forte dans les expériences de DSC et aussi pour sa bonne humeur quotidienne et sa sympathie.

Mme Gwénaelle André-Leroux pour m'avoir initiée à la modélisation moléculaire et surtout… pour son aide, son soutien et son amitié.

M. Jacques Lefebvre et M. Denis Renard pour leurs conseils avisés et leurs encouragements.

A toutes les personnes du LPCM qui ont contribué à la réalisation de ce travail dans un cadre agréable.

L'équipe du laboratoire PCI au Mans, à M. Dominique Durand, à M. Taco Nicolai qui ont conjugué aide apportée à mon travail et gentillesse, à Jean-Christophe Gimel pour les essais d'analyse d'images et les cours de diffusion de la lumière et à Anne. Merci pour leurs encouragements et leur sympathie.

Met Dank Aan Taco Nicolai voor haar raad en steun, voor haar waardevolle medewerking.

Merci aussi à toutes celles et ceux qui ont partagé, sont entrés ou ont entrouvert la porte de mon bureau: Gaëlle, Anissa, Isabelle, Jane, Dominique, Benoît, Thomas, Najet, Damien, Patricia, Jaspreet… Merci pour leur soutien et les chaleureux moments partagés.

Merci à Stéphanie pour son aide lors de l'impression de ce rapport …

Merci aux participantes des SP du jeudi soir: Gwen, Steph maman, Steph petite, Jasmine, Aurélie, Véro, qui apportaient du soleil à mes jours de pluie…

Un dernier mot pour ma famille et pour Fanch qui m'ont appris à mépriser les hauts et aidé à repriser les bas.

Publications :

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont fait l'objet des publications et communications suivantes:

Donato, L., Garnier, C., Novales, B., Durand, S. & Doublier, J.-L. (**2004**) "Heat-induced gelation of Bovine Serum Albumin/Low Methoxyl Pectin systems and the effect of calcium ions." *Biomacromolecules,* sous presse.

Donato, L., Garnier, C., Novales, B., & Doublier, J.-L. (**2004**) "Gelation of globular protein in presence of Low Methoxyl Pectin: effect of Na^+ and/or Ca^{2+} on rheology and microstructure of the systems." *Food Hydrocolloids,* sous presse.

Donato, L., Garnier, C., Nicolai, T. (**2004**) "Influence of NaCl or $CaCl_2$ concentration on the structure of heat-set Bovine Serum Albumin gels at pH 7", en préparation pour *Biomacromolecules*.

Communications orales:

Donato, L., Garnier, C., & Doublier, J.-L. (**2002**) "Création de texture dans les mélanges protéines globulaires/pectines: caractérisation rhéologique et microscopique". Rencontres Physique-Biologie du Grand Ouest, 4-5/07/2002, Rennes, France. Publication dans les Proceedings.

Donato, L., Garnier, C., Novales, B., & Doublier, J.-L (**2003**) “Heat-induced gelation of bovine serum albumin- low methoxyl pectin systems”. Biopolymères: applications santé, alimentaires et cosmétiques (Polymerix), 21-22/05/2003, Rennes, France. Publication dans les Proceedings.

Donato, L., Garnier, C., Novales, B., & Doublier, J.-L. (**2003**) “Heat-induced gelation of bovine serum albumin- low methoxyl pectin systems”. 12th Gums and Stabilizers for the Food Industry Conference, 24-27/07/2003, Wrexham, Wales. Publications dans *Gums and stabilisers for the Food Industry 12*, (**2004**). Editeurs: Phillips G.O., Williams P.A. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 227-235.

Donato, L., Garnier, C., Novales, B., & Doublier, J.-L. (**2003**) “Gelation of Bovine Serum albumin in presence of low methoxyl pectin”, 08/12/2003, Centre de Recherché Nestlé, Vers-Chez-les-Blancs.

Donato, L., Garnier, C., Novales, B., & Doublier, J.-L. (**2004**) “Influence de la force ionique sur les propriétés mécaniques et la microstructure de mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées en présence de calcium”, 24-25/03/2004, Cinquièmes journées de rencontre des jeunes rhéologues, Gourette, France.

Donato, L., Garnier, C., Novales, B., & Doublier, J.-L. (**2004**) “Gelation of bovine serum albumin in presence of low methoxyl pectin : Effects of Na^{+} and Ca^{2+} on rheology and microstructure” *Food Colloids 2004*, 19-21/04/2004, Leeds, UK.

Publication dans *Food Colloids: Interaction, Microstructure and Processing* Editeur: Dickinson, E., The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 48-58.

Affiches:

Donato, L., Garnier, C., & Doublier, J.-L. (**2003**) “Heat-induced gelation of bovine serum albumin-low methoxyl pectin systems: ultrastructure and rheological properties”, ISFRS, 9-13/02/2003, Zurich, Suisse.

Donato, L., Garnier, C., Novales, B., & Doublier, J.-L. (**2003**) “Gelation of globular protein in presence of low methoxyl pectin: effect of Na^{+} and/or Ca^{2+} ions on rheology and microstructure of the systems”. *Food Colloids 2004*, 19-21/04/2003, Leeds, UK.

Table des matières

AVANT-PROPOS **3**

PUBLICATIONS : **5**

TABLE DES MATIÈRES **8**

LISTE DES FIGURES **12**

Chapitre 1 ..... **12**

Chapitre 2 ..... **15**

Chapitre 3 ..... **16**

Chapitre 4 ..... **17**

Chapitre 5 ..... **20**

Chapitre 6 ..... **22**

Annexes **24**

INTRODUCTION **26**

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **28**

I.1 Les biopolymères étudiés **28**

I.1.1 Les pectines 28

I.1.2 Les protéines globulaires 39

I.2 Les mélanges de biopolymères **63**

I.2.1 Stabilité des mélanges de biopolymères 63

1.2.2 L'incompatibilité thermodynamique 68

I.2.3 Les interactions de déplétion-floculation 70

I.3 Les mélanges ségrégatifs Protéines globulaires/Polyosides **72**

I.3.1 Etude des mélanges ségrégatifs protéine globulaire native/polyoside 72

I.3.2 Etude des mélanges ségrégatifs protéine globulaire dénaturée/polyoside 75

I.3.3 Les gels de biopolymères mixtes 77

I.3.4 Conclusions 99

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 100

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES 102

II.1 Matériels 102

II.1.1 Echantillons utilisés et préparation des solutions mères 102

II.1.2 Préparation des mélanges 104

II.2 Méthodes 105

II.2.1 Caractérisation des échantillons et des solutions 105

II.2.3 Diffusion de la lumière 112

II.2.4 Diagrammes d'état des mélanges SAB/pectines LM après traitement thermique 118

II.2.5 Mesures rhéologiques 118

II.2.6 Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL) 120

II.2.7 Analyse Enthalpique Différentielle (AED) 124

III. CARACTÉRISATION DE LA STRUCTURE DES GELS DE SAB : - INFLUENCE DE NACL OU $CACL_2$ - INFLUENCE DU TEMPS DE CHAUFFAGE 128

III.1 Etude de la complexation SAB native/Calcium par modélisation moléculaire. 129

III.1.1 Hypothèse de départ 129

III.1.2 Positionnement des ions Ca^{2+} et optimisation 129

III.1.3 Conclusion 131

III.2 Diagramme d'état des gels de SAB 132

III.2.1 Observations visuelle de la turbidité des systèmes 132

III.2.2 Concentrations critiques de gélification 133

III.2.2 Conclusions 135

III.3 Mesure de la turbidité des systèmes 135

III.4 Etude de la structure des gels par diffusion de la lumière 139

III.4.1 Influence de la nature du solvant : NaCl ou $CaCl_2$ 139

III.4.2 Influence de la durée du traitement thermique 146

III.5 Description de la structure des gels par analyse des clichés MCBL 148

III.5.1 Observation des systèmes 149

III.5.2 Analyse d'image par la fonction de corrélation de paires 150

III.6 Discussion et conclusions 152

III.6.1 Influence de la nature du solvant (NaCl ou $CaCl_2$) sur la structure des gels 152

III.6.2 Influence du temps de chauffage sur la structure des gels 153

III.6.3 Comparaison avec la structure des gels de β-Lactoglobuline 154

IV. GÉLIFICATION THERMIQUE DES MÉLANGES SAB/PECTINES LM EN PRÉSENCE OU NON DE CALCIUM 157

IV.1 Systèmes en absence de calcium 157
IV.1.1 Etablissement des diagrammes d'état des mélanges..... 157
IV.1.2. Rhéologie et Ultrastructure des mélanges..... 160
IV.1.3 Discussion et conclusions..... 167
IV.2. Systèmes en présence de calcium 169
IV.2.1. Gélification des pectines LM en présence de calcium..... 169
IV.2.2. Gélification de la SAB et des mélanges en présence de calcium..... 172
IV.2.3 Conclusions..... 181
IV.3 Ultrastructure des systèmes par analyse d'images..... 183
IV.3.1 SAB seule..... 183
IV.3.2 Mélanges à concentration en SAB fixe..... 186
IV.3.3 Mélanges à concentration en pectines LM fixe..... 190
IV.4. Discussion et conclusions 195

V. INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE ET DE LA NATURE DES SELS AJOUTÉS SUR LA GÉLIFICATION THERMIQUE DES MÉLANGES SAB/PECTINES LM 197
V.1 Etude calorimétrique de la SAB et des mélanges SAB/pectines LM..... 198
V.1.1 Etude de la SAB seule..... 198
V.2 Rhéologie et Ultrastructure des mélanges SAB/pectines LM dans l'eau 202
V.3 Influence de la force ionique (en NaCl) 204
V.3.1 Gélification de la SAB..... 205
V.3.2 Gélification du mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 %..... 206
V.3.3 Discussion et conclusions..... 210
V.4 Influence de la force ionique (en $CaCl_2$)..... 212
V.4.1 Gélification des pectines LM..... 212
V.4.2 Gélification de la SAB..... 214
V.4.3 Gélification du mélange SAB 8 %/pectines LM 0,85 %..... 216
V.4.4 Conclusions..... 218
V.5 Influence de la force ionique (en NaCl/$CaCl_2$)..... 219
V.5.1 Gélification des biopolymères seuls..... 219
V.5.2 Mélanges SAB 8 %/pectines LM 0,85 %..... 222
V.5.3 Discussion et conclusions..... 227
V.6 Conclusion sur l'influence de la force ionique apportée par des sels de différentes natures 227

VI. GÉLIFICATION THERMIQUE DES MÉLANGES *β*-LG/PECTINES LM : - EFFET DE LA NATURE DU SOLVANT - COMPARAISON AVEC LES SYSTÈMES À BASE DE SAB 229
VI.1 Gélification des systèmes à base de *β*-Lg..... 230
VI.1.1 Etude des systèmes à base de *β*-Lg dans l'eau..... 230

VI.1.2 Etude des systèmes à base de β-Lg dans NaCl 100 mM 237
VI.2 Comparaison avec les systèmes à base de SAB 245
VI.2.1 Influence de la nature du solvant sur la gélification des protéines seules 245
VI.2.2 Gélification des mélanges 247
VI.3 Conclusions 255

CONCLUSION GÉNÉRALE 257

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 264

ANNEXES 285
ANNEXE I. Diffusion de la lumière 286
I.1. Diffusion statique de la lumière 286
I.2. Diffusion dynamique de la lumière 297
I.3 Diffusion en milieu turbide 301
ANNEXE II. Etude rhéologique aux faibles déformations : essai harmonique 304
ANNEXE III. Analyse d'image par la méthode de co-occurrence 305
ANNEXE IV Comparaison des lots de SAB 85640 et R16077 308

RÉSUMÉ 312

ABSTRACT 313

Liste des figures

Chapitre 1

Figure I.1. Représentation schématique des zones "lisses" et "chevelues" des pectines. D'après Voragen et al. (1995). 29

Figure I.2. Schéma récapitulatif de la composition chimique des différentes parties structurales de la chaîne pectique. D'après Voragen *et al*., (1995). (GalA : Acide galacturonique ; Rha : Rhamnose ; Xyl : Xylose ; Gal : Galactose). 31

Figure I.3 Représentation schématique de la gélification des pectines LM: (**a**) les chaînes de pectines se rapprochent deux à deux autour des ions calcium (dimérisation) selon (**b**) le schéma d'interactions électrostatiques de la «boîte-à-œufs», (**c**) puis les dimères s'agrègent entre eux pour former un gel. D'après Axelos et Thilbault (1991). 37

Figure I.4 Représentation schématique de réseaux obtenus par l'agrégation de protéines globulaires (présentes en concentration croissante de gauche à droite) : (**a**) gel filamenteux et (**b**) coagulum. D'après Doi (1993). 43

Figure I.6 Représentation des trois domaines I (violet), II (noir), III (rouge) constitutifs de la SAH, d'après He & Carter (1992) (issue des données de la Protein Data Bank, source détaillée sur la Figure I.5). 46

Figure I.7 Conformations de la SAB en fonction du pH. D'après Peters (1975) et Carter & Ho (1994). 47

Figure I.8 Répartition des charges sur HSA à pH 7 (structure tridimensionnelle). En jaune les acides aminés chargés négativement (acide aspartique, acide glutamique); en rouge les acides aminés chargés positivement (histidine, lysine, arginine); en bleu les zones neutres (issue des données de la Protein Data Bank, source détaillée sur la Figure I.5).. 48

Figure I.9 Structures de gels de 10 % SAB en microscopie électronique (deux grossissements). **A**: gel fibrillaire clair obtenu à pH 6,5, dans l'eau; **B**: gel turbide obtenu

en présence de NaCl 125 mM à pH 6,5; **C**: coagula obtenu à pH 5,1. D'après Clark *et al.* (1986). 52

Figure I.10 Observations en microscopie électronique à balayage de gels de SAB (5 %) (**A**) en présence de $CuSO_4$ (**B**), $FeSO_4$ (**C**), $ZnSO_4$ (**D**) ou $MgSO_4$ (**E**) 4mM dans NaCl 100 mM à pH 7. Barre d'échelle 2 μm. D'après Aryana (2002). 54

Figure I.11 Structure tridimensionnelle du monomère de la β-Lg d'après Brownlow *et al.* (1997). Les hélices α sont représentées par des cylindres, les feuillets β par des flèches rectangulaires et les zones désordonnées par des traits fins (code correspondant dans la Protein Data Bank: 1beb.pdb (http://www.rcsb.org/pdb/)). 56

Figure I.12 a. États multimériques de la β-Lg en fonction du pH. D'après Hambling *et al.* (1992). Selon le pH, les monomères (β) s'associent par deux (β_2) ou par huit (β_8) et pour des pH extrêmes la protéine est dénaturée (dénat.). **Figure I.12 b.** Transitions conformationnelles de la β-Lg en fonction du pH. La déscription des conformations Q, N, R, S se trouve dans le texte. D'après Hambling *et al.* (1992). 56

Figure I.13 Répartition des charges sur la β-Lg à pH 7 (structure tridemensionnelle). En jaune les acides aminés chargés négativement (asparagine, acide glutamique); en rouge les acides aminés chargés positivement (histidine, lysine, arginine); en bleu les zones neutres (issue des données de la Protein Data Bank, source détaillée sur la Figure I.11). 58

Figure I.14 Modèle de fixation du calcium et du sodium (l'ion étant symbolisé par la lettre M) proposé par Powell-Baker *et al.* (1965). 59

Figure I.15. Représentation schématique de la formation d'un gel de β-Lg à pH 7 dans NaCl 100 mM. D'après Aymard *et al* (1996). 60

Figure I.16. Comportement des mélanges de polymères en solution d'après Picullell & Lindman (1992) adapté pour les mélanges de biopolymères de Toltstoguzov (1991)..... 63

Figure I.17 Représentation schématique d'un diagramme de phase de type associatif (**a**) et ségrégatif (**b**) en coordonnées triangulaire d'un mélange polymère 1 (P1)/polymère 2 (P2)/solvant (S). 65

Figure I.18. Représentation schématique d'un diagramme de phase de type ségrégatif en coordonnées cartésiennes d'un mélange polymère 1 (P1)/polymère 2 (P2)/solvant (S).. 66

Figure I.19 Représentation schématique du mécanisme de décomposition spinodale (**a**) et de nucléation et croissance (**b**). D'après Syrbe (1997). 67

Figure I.20 Représentation schématique du processus de déplétion-floculation: la différence de pression osmotique induit l'exclusion du polymère et entraîne la floculation des

particules. D'après Asakura et Oosawa (1954, 1958). La description des étapes (a, b, c, d) est faite dans le texte.....70

Figure I.21. Diagrammes de phase d'un mélange polymère 1 (P1) non gélifiant/polymère 2 (P2) gélifiant/solvant (**a**) et polymère 1 (P1) gélifiant/polymère 2 (P2) gélifiant/solvant (**b**). Les concentrations minimales pour qu'une gélification ait lieu sont indiquées pour P1 et P2 par C1gel et C2gel, respectivement. D'après Zasypkin *et al.* (1997) 79

Figure I.22 Microstructure des gels thermiques observées par MEB de gels de *β*-Lg pure (12%) (**a**) et de gels obtenus à partir des mélanges *β*-Lg (12 %)/Pectines LM (0,1%) (**b**); *β*-Lg (12 %)/Pectines LM (0,5 %) (**c**); *β*-Lg (12 %)/Pectines LM (1 %) (**d**). D'après Dumay *et al.* (1999).....81

Figure I.23 Microstructure des gels thermiques observés par MET obtenus à partir de *β*-Lg pure en présence de 25 mM NaCl (10 %) (**a**) et du mélange *β*-Lg (10 %)/sodium polypectate (1 %) (**b**) à pH 6,5. D'après Ndi *et al.* (1996).....82

Figure I.24 : Clichés de microscopie électronique à balayage obtenus avec le système protéines du lactosérum (8%)/ pectine (3,5%) à pH 7 à 20°C après traitement thermique. Barre d'échelle 10 *μ*m. a. Protéines légèrement dénaturées pendant 2 min 45 s à 75 °C puis mélangés à la pectine. Le mélange est alors chauffé 2 min à 120°C. b. Mélange chauffé jusqu'à 105 °C à 2,5 °C.min^{-1}. c. Mélange chauffé 2 min à 120 °C.....83

Figure I.25 Classification de la microstructure des gels obtenus avec les mélanges protéines de lactosérum/polyosides anioniques à un pH supérieur au point isoélectrique. La taille des particules constitutives diminue et la connectivité augmente dans le sens Type IÒTypeÒ II Type III. D'après Syrbe (1997). 84

Figure I.26 Modules conservatifs G' obtenus à 25 °C (1 Hz) après un traitement thermique (20 min à 80°C) pour les mélanges protéines du lactosérum (12 %) (¿) et pour les mélanges protéines du lactosérum (12 %) /polyosides de différentes natures. Exemples de synergie pour les mélanges contenant : amidon (˜), guar (¢), caroube(p), *κ*-carraghénanes(Í), xanthane (Ú). Exemple d'effet antagoniste en présence de matodextrine(È).D'après Fernandes (1998). 86

Figure I.27 Module G' obtenu après 2 h à 75 °C (1 Hz) pour les mélanges *β*-Lg (5%)/*κ*-carraghénanes en fonction de la concentration en polyoside. D'après Capron *et al.* (1999b). 87

Figure I.28 Interaction entre SAB et polyoside anionique (alginate ou pectine) selon le modèle de liaisons par segments de chaînes. D'après Cai & Arntfield (1997).....89

Figure I.29 Observations à 20 °C par MCBL des gels de mélanges protéines de lactosérum marquée avec du Fast Green FCF (8 %)/Pectines LM (DM 35%) (1%) obtenus après un traitement thermique (80 °C, 30 min) dans l'eau (**a**) et en présence de 50 mM (**b**); 100 mM (**c**) et 200 mM (**d**) de NaCl à pH 8. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 10 μm. D'après Beaulieu (2002). 92

Figure I.30 Modules d'Young (E) des gels de SAB (8%) et du mélange SAB (8 %)/alginate (1 %) obtenus après un traitement thermique (90 °C, 23 min) et mesurés à 20 °C **a.** en fonction de la force ionique (mM NaCl) à pH 5,9. **b.** en fonction du pH pour I = 75 mM NaCl. D'après Neiser *et al.* (1998). 94

Figure I.31 Modules d'Young (E) et du obtenus après un traitement thermique (90 °C, 23 min) et mesurés à 20 °C **a.** mélange SAB (8 %)/alginate (1 %) en présence ou non de $CaCl_2$ (14 mM) en fonction de la force ionique (mM NaCl) à pH 6,6 et 6,2 **b.** pour la SAB (8 %) et le mélange SAB (8 %)/alginate (1 %) en présence ou non de calcium en fonction du pH pour I = 75 mM NaCl. D'après Neiser *et al.* (1999). 98

Chapitre 2

Figure II.1 Représentation schématique des géométries utilisées avec l' AR2000 (a) et le LS 40 (b). 109

Figure II.2 : Viscosité intrinsèque ($[\eta].10^{-3}$ L.g^{-1}) d'une solution de pectine LM (barres vides) et de pectine LM-FA (barres pleines) dans NaCl 100 mM à pH 7 mesurée à 20°C avant ou après un traitement thermique à 80°C de 15, 30, 60 min (2 mesures pour chaque condition). 110

Figure II.3 Schéma de l'appareil de mesure en diffusion de lumière pour les systèmes transparents (λ_{laser} = 532 nm). 113

Figure II.4 Schéma de l'appareil de mesure en diffusion de lumière en milieu turbide. (λ_{laser} = 685 nm) D'après Urban & Schurtenberger (1998). 115

Figure II.5 Schéma de fonctionnement du MCBL: 121

Figure II.6 Représentation schématique du système d'analyse enthalpique différentielle (AED). 125

Figure II.7 Représentation simplifiée d'un thermogramme d'AED dans le cas d'une transition endothermique. A_0: aire du pic; T_0: Température initiale; T_M température à l'instant t, T_1 et T_2: Températures de début et de fin de transition; dH/dT : flux différentiel d'énergie entre l'échantillon et la référence. 126

Chapitre 3

Figure III.1 Localisation des trois poches potentielles de fixation des ions calcium sur la structure de la HSA native. Les ions calcium sont représentés par des billes. 131

Figure III.2 Observations macroscopiques des gels de SAB en fonction de la concentration en NaCl (mM) (**a**); en $CaCl_2$ (**b**); obtenus après 12 h à 80 °C. A : systèmes transparents (limité par); B : systèmes turbides (p); C : systèmes opaques (˜). La dernière concentration où un précipité est visible est symbolisée par Í. A titre d'exemple, une série de photographies des systèmes obtenus dans NaCl 200 mM (Figure III.2a) et dans $CaCl_2$ 1 mM (Figure III2.b) sont présentées. 132

Figure III.3 Concentrations critiques de gélification de la SAB à pH 7 après 12 h (symboles vides) et 48 h (symboles pleins) de chauffage à 80 °C en fonction de la concentration en NaCl **(a)** ou en $CaCl_2$ **(b)**. Les valeurs inférieures et supérieures de la barre d'erreur indiquent, respectivement, la plus grande concentration en protéines testée où aucun gel n'est observé et la plus faible concentration où un gel est observé après 48 h de chauffage. 134

Figure III.4 Evolution de la turbidité réduite pour différentes concentrations en SAB dans NaCl 100 mM (**a**) et 50 mM (**b**) au cours du chauffage à 80 °C (profil de température : trait pointillé). 136

Figure III.5 Dépendance en concentration de SAB de la turbidité réduite mesurée au bout de 48 h à 80°C pour différentes concentrations en NaCl. 137

Figure III.6 Evolution de la turbidité réduite pour différentes concentrations en SAB dans 1,5 mM (**a**) et 0,75 mM (**b**) $CaCl_2$ au cours du chauffage à 80 °C (profil de température : trait pointillé). 138

Figure III.7 Dépendance en concentration de SAB de la turbidité réduite mesurée au bout de 48 h à 80°C pour différentes concentrations en $CaCl_2$. 138

Figure III.8 *I(q)/KC* en fonction du vecteur d'onde *q* pour des systèmes de concentrations variables en SAB (en %, indiquées sur la figure) en NaCl 50 mM (après un chauffage de 48 h à 80 °C)**.** 141

Figure III.9 *I(q)/KC* en fonction du vecteur d'onde *q* pour des systèmes de concentrations variables en SAB (en %, indiquées sur la figure) en $CaCl_2$ 0,5 mM (après un chauffage de 48 h à 80 °C)**.** 142

Figure III.10 Facteur de structure *S(q)* pour des systèmes de concentrations variables en SAB obtenus après un chauffage de 48 h à 80 °C et pour les différentes concentrations en

NaCl **(a)** et $CaCl_2$ **(b)** indiquées sur les figures. La courbe indiquée par le trait continue correspond à l'équation III.2 143

Figure III.11 Masse molaire apparente m_a en fonction de la longueur de corrélation *Ra* pour des systèmes de concentrations variables en SAB obtenus après chauffage de 48 h à 80 mesurée pour différentes concentrations en NaCl et $CaCl_2$. La droite tracée indique une pente égale à 2. 143

Figure III.12 Masse molaire apparente m_a pour des systèmes de concentrations variables en SAB obtenus après chauffage de 48 h à 80°C pour différentes concentrations en NaCl **(a)** et $CaCl_2$ **(b)**. 145

Figure III.13 *I(q)/KC* en fonction du vecteur d'onde *q* dans NaCl 50 mM pour SAB 1% obtenus après un chauffage de 30 min, 5h, 12h et 48 h à 80 °C. 147

Figure III.14 Masse molaire apparente m_a pour des systèmes de concentrations variables en SAB dans $CaCl_2$ 0,5mM obtenus après un chauffage de 30 min, 12 h, 48 h et 96 h à 80 °C. 148

Figure III.15 Images obtenues en MCBL pour différentes concentrations en SA*B*-RITC (en %, indiquées sur la figure) après une heure à 20°C suite au traitement thermique (30 min à 80°C) dans NaCl 200 mM **(a)**, $CaCl_2$ 1,5 mM **(b)** et $CaCl_2$ 3 mM **(c)**. Barre d'échelle : 25 µm. 149

Figure III.16 Evolution de la fonction de corrélation de paires g(r) en fonction de r pour différentes concentrations en SAB dans $CaCl_2$ 1,5 mM **(a)** et $CaCl_2$ 3 mM **(b)**. 151

Chapitre 4

Figure IV.1 Diagramme d'état des mélanges SAB/pectines LM dans NaCl 100 mM (observés à 20 °C après un traitement thermique de 1 h à 80 °C). Mélanges opaques présentant une apparence homogène (¯) ou une séparation de phase macroscopique (®). Trait pointillé: séparation des deux zones. 158

Figure IV.2 Diagrammes d'état des mélanges SAB/pectines LM (concentrations en pectines entre 0,21 et 1,3 %) observés à 20 °C (**a**) et après une centrifugation (2600 g, 3h) (**b**). Mélanges présentant une phase homogène (¯) ou une séparation de phase macroscopique (®) (traitement thermique de 30 min à 80 °C). 159

Figure IV.3 Gélification de la SAB 2 % (˜) et des mélanges SAB 2 %/pectines LM 0,21 (¯), 0,43 (r) et 0,85 (c) % dans NaCl 100 mM à pH 6,8 (trait en pointillé: profil de température). 161

Figure IV.4 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): SAB 2 % (˜); mélange SAB 2 %/pectines 0,43 % (p) dans NaCl 100 mM à pH 6,8 (symboles pleins : G'; symboles vides: G''). 162

Figure IV.5 Observations par MCBL des systèmes au cours du processus thermique dans NaCl 100 mM à pH 6,8: SA*B*-RITC 2 % (**a**); mélanges SA*B*-RITC 2 %/pectines LM 0,21 (**b**); 0,43 (**c**) et 0,85 (**d**) %. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm. 163

Figure IV.6. Observations par MCBL par double localisation des structures finales des mélanges SA*B*-RITC 2 %/pectines LM-FA 0,21 (**a**) et 0,43 % (**b**) dans NaCl 100 mM à pH 6,8. Première rangée: clichés résultant de l'excitation de la RITC et de la FA Deuxième rangée: Superposition des deux clichés en codant arbitrairement les couleurs, les protéines apparaissent en rouge et les pectines en vert. Barre d'échelle 25 µm. 164

Figure IV.7 Modules G' des mélanges SAB/pectines LM (en fin de cinétique, après 1 h à 20 °C) en fonction de la concentration en Pectines LM pour 2 ( ), 4 (c), 8 (r) % de SAB, dans NaCl 100 mM à pH 6,8). 165

Figure IV.8 Observations par MCBL des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8: SA*B*-RITC et mélanges SA*B*-RITC /pectines LM. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm. 166

Figure IV.9 a. Gélification des pectines LM 0,21 (®), 0,43 (¢) et 0,85 (p) % dans NaCl 100 mM à pH 6,8 en présence de 3 mM $CaCl_2$. 170

Figure IV.9 b. Spectres mécaniques correspondants en fin de cinétique (mesures à 20 °C) (symboles pleins G', symboles vides G''). 171

Figure IV.10 Gélification de la SAB 2 % (˜) et des mélanges SAB 2 %/pectines LM contenant 0,21 (¯), 0,43 (r) et 0,85 (c) % de Pectines LM dans NaCl 100 mM à pH 6,8 en présence de $CaCl_2$ 3 mM. 172

Figure IV.11 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): SAB 2 % (˜); mélange SAB 2 %/pectines 0,85 % (¢) dans NaCl 100 mM à pH 6,8 (symboles pleins : G' ; symboles vides : G''). 174

Figure IV.12 Observations par MCBL des systèmes au cours du processus thermique dans NaCl 100 mM à pH 6,8 en présence de 3 mM $CaCl_2$: SA*B*-RITC 2 % (**a**); mélanges SA*B* RITC 2 %/pectines LM 0,21 (**b**); 0,43 (**c**) et 0,85 (**d**) %. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm. 176

Figure IV.13. Gélification de la SAB 2 ( ), 4 (¯) et 8 (r) % en absence (symboles vides) et en présence de 3 mM $CaCl_2$ (symboles pleins) dans NaCl 100 mM à pH 6,8. 178

Figure IV.14 Gélification de la SAB 8 % (˜) et des mélanges SAB 8 %/pectines LM 0,21 (¿), 0,43 ( ) et 0,85 (¢) % dans NaCl 100 mM en présence de 3 mM $CaCl_2$ à pH 6,8..... 179

Figure IV.15 Modules G' des gels de Pectines (¿) et des mélanges SAB/pectines LM (en fin de cinétique, après 1 h à 20 °C) en fonction de la concentration en Pectines LM pour 2 (˜), 4 (¢), 8 ( ) % de SAB dans NaCl 100 mM à pH 6,8 en présence de 3 mM $CaCl_2$ 180

Figure IV.16 Observations par MCBL des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8 en présence de 3 mM de $CaCl_2$: SA*B*-RITC; mélanges SA*B*-RITC/pectines LM. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm. 181

Figure IV.17 a. Carte factorielle obtenue avec les images des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8 : SA*B*-RITC 2 (S2, S2T, S2C); 4 (S4T, S4C); 8 (S8T,S8C) % en absence (S2, S2T, S4T, S8T) ou en présence de $CaCl_2$ 3 mM (S2C, S4C, S8C). 184

Figure IV.17 b. Représentation simplifiée de la carte a. avec pour chaque système une image représentative placée au milieu du groupe de 10 images. Les nombres entre parenthèse correspondent à la valeur de G' obtenue après une heure à 20 °C. 184

Figure IV.17 c. Carte factorielle des paramètres de co-occurrences associés à la carte de la Figure IV.17a 185

Figure IV.18 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8: SA*B*-RITC à 2 (S2, S2C) %; mélanges SA*B*-RITC 2%/pectines LM 0,21 (a, a'); 0,43 (b, b'); 0,85 (c, c') % en absence (S2, a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ (S2C, a', b', c') 187

Figure IV.19 Carte factorielle avec obtenue avec les structures finales de systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8: SA*B*-RITC à 4 (S4, S4C) %; mélanges SA*B*-RITC 4%/Pectines LM 0,21 (a, a'); 0,43 (b, b'); 0,85 (c, c') % en absence (S4, a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ S4C, a', b', c'). 189

Figure IV.20 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8: SA*B*-RITC à 8 (S8, S8C) %; mélanges SA*B*-RITC 8%/Pectines LM 0,21 (a, a'); 0,43 (b, b'); 0,85 (c, c') % en absence (S8, a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ (S8C, a', b', c'). 189

Figure IV.21 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des mélanges Pectines LM 0,21%/SA*B*-RITC 2 (a, a'); 4 (b, b'); 8(c, c') % en absence (a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ (a', b', c') dans NaCl 100 mM à pH 6,8.....191

Figure IV.22 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des mélanges Pectines LM 0,43 %/SA*B*-RITC 2 (a, a'); 4 (b, b'); 8 (c, c') % en absence (a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ (a', b', c') dans NaCl 100 mM à pH 6,8.....192

Figure IV.23 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des gels des mélanges Pectines LM 0,85 %/SA*B*-RITC 2 (a, a'); 4 (b, b'); 8(c, c') en absence (a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ (a', b', c') dans NaCl 100 mM à pH 6,8.....194

Chapitre 5

Figure V.1 : Thermogramme de la SAB 0,1 %, NaCl 100 mM à pH 6,8 (microcalorimètre Microcal, vitesse de chauffage (v) = 1 °C.min^{-1}). 198

Figure V.2 : Thermogrammes de la SAB 1 % (trait plein), 1,5 % (trait discontinu), 2 % (trait en pointillé), NaCl 100 mM à pH 6,8 (microcalorimètre Setaram DSC III, v = 1 °C.min^{-1}). 199

Figure V.3 : Thermogrammes de la SAB 2 % dans l'eau et dans un milieu de force ionique égale à 100 mM apportée par NaCl, $CaCl_2$ ou NaCl/$CaCl_2$ à pH 6,8 (microcalorimètre Setaram DSC III, v = 0,2 °C.min^{-1}).....200

Figure V.4 : Thermogrammes de la SAB 2 % dans NaCl 100 mM (trait plein) et du mélange SAB 2 %/ Pectines LM 0,85 %, NaCl 100 mM à pH 6,8: en absence (trait discontinu) et en présence de $CaCl_2$ 3 mM (trait en pointillé) (microcalorimètre Setaram DSC III, v = 0,2 °C.min^{-1}). 202

Figure V.5 Gélification de la SAB 8 % (●) et du mélange SAB 8 %/pectines LM 0,85 (■) % dans l'eau à pH 6,8 (trait en pointillé: profil de température). 202

Figure V.6 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): SAB 8 % (●); mélange SAB 8 %/pectine 0,85% (■) (symboles pleins: G' ; symboles vides : G'').. .203

Figure V.7 Observations par MCBL des structures finales des systèmes dans l'eau à pH 6,8: SA*B*-RITC 8 % (**a**), mélanges SA*B*-RITC 8 %/pectines LM 0,85 % (**b**). Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.....204

Figure V.8 Gélification de la SAB 8 % avec I= 9 (▼), 12 (●), 25 (p), 50 (¿) 100 (¢) mM (addition de NaCl) à pH 6,8. 206

Figure V.9 Gélification des mélanges SAB 8 %/Pectines LM 0,85 % avec I = 21,5 (■), 37,5 (◆), 62,5 (▲), 112,5 (●) mM (addition de NaCl) à pH 6,8. 207

Figure V.10 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C) : I = 100 mM (NaCl) : SAB 8 % (▼) I= 112,5 mM (NaCl) mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 % (●) (symboles pleins: G'; symboles vides: G''). 208

Figure V.11 Observations par MCBL des structures finales des mélanges SA*B*-RITC 8 %/Pectines LM 0,85 % avec I = 12,5 (**a**) ; 37,5 (**b**) ; 62,5 (**c**) et 112,5 mM (**d**) (addition de NaCl) à pH 6,8. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm. 208

Figure V.12. Carte factorielle obtenue avec les structures finales des gels SA*B*-RITC 8%/Pectines LM 0,85 % pour I variant entre 12,5 et 112,5 mM (addition de NaCl) à pH 6,8. Pour chaque système une image représentative est placée au milieu du groupe de 10 images. 209

Figure V.13 Gélification des Pectines LM 0,85 % avec I = à 21,5 ($CaCl_2$ 3 mM) (■) mM et 24,5 mM ($CaCl_2$ 4 mM) (●)à pH 6,8. 213

Figure V.14 Spectres mécaniques en fin de cinétiques (mesures à 20 °C) des pectines LM 0,85 % avec I = à 21,5 ($CaCl_2$ 3 mM) (■) mM et 24,5 mM ($CaCl_2$ 4 mM) (●) (addition de $CaCl_2$) à pH 6,8 (symboles pleins: G'; symboles vides : G''). 213

Figure V.15. Gélification de la SAB 8 % avec I = 9 (■), 12 (●), 25 (▲), 50 (▼), 100 (◆) mM (addition de $CaCl_2$) à pH 6,8. 214

Figure V.16 Spectres mécaniques en fin de cinétiques (mesures à 20 °C) : SAB 8 % avec I = 9 (■) et 100 mM (◆) (addition de $CaCl_2$) à pH 6,8. (symboles pleins: G' ; symboles vides : G''). 215

Figure V.17 Observations par MCBL des structures finales des gels SA*B*-RITC 8 % avec I = 9 (**a**), 12 (**b**) ; 25 (**c**) ; 50 (**d**) et 100 mM (**e**) (addition de $CaCl_2$) à pH 6,8. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm. 215

Figure V.18 Gélification des mélanges SAB 8 %/pectines LM 0,85 % avec I = 21,5 ($CaCl_2$ 3 mM) (◆) et 24,5 ($CaCl_2$ 4 mM) (■) mM à pH 6,8. 217

Figure V.19 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C) (addition de 3 et 4 mM $CaCl_2$) à pH 6,8 :mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 %; I = 21,5 mM (◆) et 24,5 (■) mM SAB 8 % I = 9 mM (▲) et 12 mM (●) (symboles pleins: G'; symboles vides: G''). 217

Figure V.20 Observations par MCBL des structures finales des mélanges SA*B*-RITC (8 %)/Pectines LM (0,85 %) avec I = 21,5 (**a**) ; 24,5 (**b**) mM (addition de $CaCl_2$) à pH 6,8. Barre d'échelle 25 µm. 218

Figure V.21. Gélification des pectines LM 0,85 % avec I = 24,5 (▲), 42,5 (▼), 62,5 (◆), 112,5 (●) mM (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM)) à pH 6,8. 220

Figure V.22 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): Pectines LM 0,85 % avec I = 24,5 (▲) et 112,5 (●) mM (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM)) à pH 6,8. (symboles vides : G'; symboles pleins: G''). 220

Figure V.23 Gélification de la SAB 8 % avec I = 12 (▼), 25 (▲), 50 (◆), 100 (●) mM (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM) à pH 6,8.....221

Figure V.24 Comparaison des modules G' finaux mesurés après 1 h à 20 °C des gels SAB (8 %) pour des forces ioniques variables résultant de l'addition de NaCl, $CaCl_2$ ou NaCl/$CaCl_2$ à pH 6,8 (3 mesures pour chaque condition).....222

Figure V.25 Gélification des mélanges SAB 8 %/pectines LM (0,85 %) avec I = 24,5 (▼), 42,5 (■), 62,5 (◆) et 112,5 (●) mM (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM) à pH 6,8. 222

Figure V.26 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C) (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM) : mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 %; I =24,5 mM (▼) (**a**); 112,5 mM (●) (**b**); SAB 8 %: I = 25 mM (■) (**a**), pectines LM 0,85 %: I = 112,5 mM (◆) (**b**) (symboles vides : G'; symboles pleins: G''). 223

Figure V.27 Comparaison des modules G' mesurés après 30 min à 80 °C pour les mélanges SAB (8 %)/Pectines LM (0,85 %) pour des forces ioniques variables résultant de l'addition de NaCl ou NaCl/$CaCl_2$ à pH 6,8 (3 mesures pour chaque condition). 224

Figure V.28 Observations par MCBL des structures finales des mélanges SA*B*-RITC (8 %)/ Pectines LM (0,85 %) avec I = 24,5 (**a**) ; 42,5 (**b**) ; 62,5 (**c**) et 112,5 mM (**d**) (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM) à pH 6,8. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.....225

Figure V.29 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des gels SA*B*-RITC 8%/Pectines LM 0,85 % pour I comprise entre 24,5 et 112,5 mM (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM) à pH 6,8.....226

Chapitre 6

Figure VI.1 Gélification dans l'eau : β-Lg 8 % (△), mélanges β-Lg 8 %/pectines LM 0,21 (○) ; 0,43 (□) ; 0,85 (◇) % en absence (symboles vides) ou en présence (symboles pleins) de 3 mM $CaCl_2$ à pH 6,8 (trait en pointillé: profil de température).....231

Figure VI.2 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): β-Lg sans calcium (p), mélanges β-Lg 8%/pectines LM 0,85 % en absence (®) et en présence de calcium (y) (G' symboles pleins, G'' symboles vides).....233

Figure VI.3 Observations par MCBL des structures finales des systèmes en absence et en présence de $CaCl_2$ 3 mM dans l'eau: β-Lg-RITC (**a**), mélanges β-Lg-RITC/Pectines LM 0,21 (**b**), 0,43 (**c**) et 0,85 (**d**) %. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.....234

Figure VI.4. Carte factorielle des structures finales dans l'eau des mélanges de β-Lg-/Pectines LM 0,21 (a, a'); 0,43 (b, b'), 0,85 (c, c') en absence (a, b, c) ou en présence de $CaCl_2$ 3 mM (a', b', c') à pH 6,8. Pour chaque système une image représentative est placée au milieu du groupe de 10 images.....236

Figure VI.5 Gélification dans NaCl 100 mM: β-Lg 8 % (r), mélanges β-Lg 8 %/pectines LM 0,21 (™) ; 0,43 (£) ; 0,85 (¯) % en présence (symboles pleins) ou en absence (symboles vides) de 3 mM $CaCl_2$ à pH 6,8 (trait en pointillé: profil de température).....238

Figure VI.6 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): β-Lg sans calcium (p), mélanges β-Lg 8 %/pectines LM 0,85 % en absence (¿) et en présence de calcium (˜) (G' symboles pleins, G'' symboles vides).....238

Figure VI.7 Comparaison des modules G' finaux dans l'eau (barres vides) ou NaCl 100 mM (barres pleines) à pH 6,8 pour des gels de β-Lg (8 %) en fonction de la concentration en pectines LM (2 mesures pour chaque condition).....239

Figure VI.8 Comparaison des modules G' finaux en présence de $CaCl_2$ 3 mM dans l'eau (barres vides) ou NaCl 100 mM (barres pleines) à pH 6,8 pour des gels de β-Lg (8 %) en fonction de la concentration en Pectines LM (2 mesures pour chaque condition).....239

Figure VI.9 Observations par MCBL des systèmes en absence et en présence de $CaCl_2$ 3 mM dans NaCl 100 mM à pH 6,8: β-Lg-RITC (**a**); mélanges β-Lg-RITC/Pectines LM 0,21 (**b**), 0,43 (**c**) et 0,85 (**d**) % après une heure à 20 °C. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm. 241

Figure VI.10 Carte factorielle des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM : β-Lg 8% en présence de calcium (B'); mélanges β-Lg 8% /Pectines LM 0,21 (a, a') ; 0,43 (b, b') , 0,85 (c, c') en absence (a, b, c) ou en présence de $CaCl_2$ 3 mM (a', b', c') à pH 6,8. Pour chaque système une image représentative est placée au milieu du groupe de 10 images.....244

Figure VI.11 Gélification des systèmes dans l'eau : SAB 8 % (r), mélanges SAB 8 %/Pectines LM 0,21 (™); 0,43 (£); 0,85 (¯) % en présence (symboles pleins) ou en absence (symboles vides) de 3 mM $CaCl_2$ à pH 6,8.....245

Figure VI.12 Comparaison des modules G' finaux dans l'eau des systèmes à base de SAB (barres vides) et à base de *β*-Lg (barres pleines) en fonction de la concentration en pectines LM à pH 6,8 en absence (a) et en présence (b) de 3 mM $CaCl_2$ (2 mesures pour chaque condition). 248

Figure VI.13 Observations par MCBL des systèmes en absence et en présence de $CaCl_2$ 3 mM dans l'eau à pH 6,8 : SA*B*-RITC (**a**), mélanges SA*B*-RITC/Pectines LM 0,21 (**b**), 0,43 (**c**) et 0,85 (**d**) %. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.....249

Figure VI.14 Carte factorielle des structures finales des systèmes dans l'eau à pH 6,8 : SA*B*-RITC 8 % (S, S'), des mélanges SA*B*-RITC (8%) /Pectines LM 0,21 (a, a') ; 0,43 (b, b') , 0,85 (c, c') en absence (S, a, b, c) ou en présence de $CaCl_2$ 3 mM (S', a', b', c'). Pour chaque système une image représentative est placée au milieu du groupe de 10 images.....250

Figure VI.15 Comparaison des modules G' finaux dans NaCl 100 mM des systèmes à base de SAB (barres vides) et à base de *β*-Lg (barres pleines) en fonction de la concentration en pectines LM à pH 6,8 en absence (a) et en présence (b) de 3 mM $CaCl_2$ (2 mesures pour chaque condition). 252

Figure VI.16 Carte factorielle obtenue des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM : SAB (S); *β*-Lg (B) 8%; mélanges de SAB ou *β*-Lg 8%/Pectines LM 0,21 (Sa, Ba); 0,43 (Sb, Bb) , 0,85 (Sc, Bc) à pH 6,8.....253

Figure VI.17 Carte factorielle obtenue des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 3 mM : SAB (S') et *β*-Lg (B') 8%; mélanges de SAB (S) ou *β*-Lg (B) 8%/Pectines LM 0,21 (Sa', Ba'); 0,43 (Sb', Bb'), 0,85 (Sc', Bc') à pH 6,8.....255

Annexes

Figure A.1 Schéma du principe de diffusion de la lumière 287

Figure A.2 Représentation schématique d'un agrégat de m-mères 288

Figure A.3 Evolution de la fonction de corrélation de paire $g_m(r)$ dans le cas d'agrégats dilués monodispersés. 289

Figure A.4 Répartition de la matière à l'intérieur d'un agrégat fractal 290

Figure A.5 Observation de la structure des systèmes en fonction du vecteur de diffusion q. 291

Figure A.6 Evolution de la fonction de corrélation de paire g(r) du système dans le cas non agrégés.....294

Figure A.7 Evolution de la fonction de corrélation de paire dans le cas d'agrégats concentrés polydispersés (courbe en trait épais) et dans le cas dilué (courbe en trait fin). 295

Figure A.8 Deux types d'évolution de I (q) en fonction de q depuis le cas dilué (courbe en trait épais) jusqu'au cas concentré (courbes entraits fins) pour (par exemple) des chaînes de polymères linéaires (a) et des agrégats colloïdaux (b).....295

Figure A.9 Fluctuations temporelles de l'intensité diffusée.....297

Figure A.10 Evolution de G_2 (q,t) rn fonction du temps 298

Figure A.11 Evolution de g_1 (q,t) en fonction de log (t) 299

Figure A.12 Diffusion de la lumière en milieu turbide 301

Figure A.13 Comparaison des modules G' finaux obtenus en fonction des lots pour **a**. la SAB 8% et **b.** pour le mélange SAB 8% /Pectines LM 0,85 % en absence (symboles vides) et en présence (symboles pleins) de 3 mM $CaCl_2$. (¢): lot n° 85640 et (y) lot R16077 . Les deux traitements thermiques utilisés sont symbolisés par des traits pleins ou pointillés. 308

Figure A.*14* Comparaison des structures finales obtenues pour les différents lots de SAB pour la protéine seule(8 %) et pour le mélange SAB 8% /Pectines LM 0,85%, en absence (a) et en présence (b) de 3 mM $CaCl_2$. 309

Introduction

Les produits alimentaires transformés forment des systèmes complexes structurés par un ensemble d'ingrédients tels que les protéines, les polyosides, les lipides, les minéraux, l'eau et l'air. Au cours de la transformation des aliments, ces éléments structuraux peuvent être modifiés conférant ainsi au système de nouvelles fonctionnalités. Les interactions existant entre ces différents composants déterminent la structure finale, la texture et la stabilité du produit obtenu. Ces critères déterminent en outre la qualité du produit fini. Une meilleure connaissance de la structure et des propriétés physico-chimiques des composants a ainsi conduit à des applications différenciées et spécifiques.

Parmi ces composants, les protéines et les polyosides correspondent aux deux types de biopolymères les plus fréquemment utilisés dans l'industrie alimentaire pour contrôler les propriétés mécaniques, structurales ainsi que la stabilité et les propriétés organoleptiques des produits (Dickinson & Mc Clements, 1995). Les propriétés texturantes et structurantes de ces deux types de polymères en mélange dépendent de leurs interactions et de leurs capacités à former des structures organisées (Tolstoguzov, 1991). D'un point de vue industriel, une meilleure compréhension des mélanges protéines/polyosides représente un enjeu important car ils sont déjà largement mis en jeu dans les produits alimentaires transformés (Norton & Frith, 2001). C'est dans ce contexte que nous avons choisi de travailler sur un système modèle, composé d'un mélange protéine globulaire/polyoside anionique.

Les polyosides (amidons, galactomannanes, carraghénanes, pectines, alginates, xanthane...) sont généralement employés pour leur rôle dans le contrôle de la texture pouvant aller du simple épaississement jusqu'à la gélification. Les protéines globulaires (notamment celles du lactosérum) représentent une source de protéines utilisables comme agents texturants dans les produits alimentaires. En effet, sous l'influence d'un traitement thermique, ces protéines se dénaturent et s'agrègent et peuvent former un réseau gélifié selon les conditions de milieu et

de concentration (Clark & Farrer, 1996). Le comportement thermodynamique des mélanges protéines/polyosides a été largement étudié (Doublier *et al.*, 2000; Turgeon *et al.*, 2003). Les systèmes mixtes des biopolymères présentent dans la majorité des cas des phénomènes de démixtion qui se traduisent par une séparation de phase au sein des mélanges (Tolstoguzov, 1991). Lorsque l'un ou les deux polymères en présence dans le mélange gélifient, il y a compétition entre cinétique de démixtion et de gélification. Il en résulte une variété de structures possibles pour le système. Il est ainsi possible de contrôler la microstructure finale des mélanges de biopolymères en jouant sur les paramètres intrinsèques et/ou extrinsèques du système, qui influencent les cinétiques de gélification et de démixtion et, par conséquent, les interactions entre biopolymères.

Récemment, l'attention a été portée sur les gels mixtes où les deux biopolymères sont gélifiants (Norton & Frith, 2001). Comparés aux gels de protéines pures ou de polyosides purs, une plus grande variété de textures et de propriétés fonctionnelles peut être obtenue en réponse aux exigences de l'industrie alimentaire. Une meilleure compréhension des mécanismes régissant les interactions entre les biopolymères permet ainsi de mieux contrôler les propriétés texturantes et structurantes du système.

Notre étude vise ainsi à comprendre les mécanismes impliqués dans la formation de nouvelles structures et textures (au sens mécanique ou rhéologique du terme) au sein de mélanges protéines globulaires/polyosides anioniques. Le choix du système modèle découle de cet objectif. L'albumine de sérum bovin (SAB) est une protéine largement étudiée dans le domaine médical et elle a été aussi souvent utilisée comme 'modèle' de protéine globulaire pour ses propriétés physico-chimiques. Elle a cependant été peu utilisée pour l'étude des systèmes mixtes protéines/polyosides. Pour une partie de ce travail la SAB sera comparée avec la β-Lactoglobuline *(*β-Lg), protéine globulaire plus répandue dans les produits alimentaires du fait de son origine laitière. Pour le polyoside, le choix s'est porté sur la pectine faiblement méthylée (pectines LM). Ce polyoside est fréquemment utilisé dans l'industrie alimentaire pour ses propriétés gélifiantes en présence d'ions calcium, présents naturellement dans de nombreux systèmes.

I. Etude Bibliographique

I.1 Les biopolymères étudiés

I.1.1 Les pectines

I.1.1.1 Origine et Utilisation

C'est en 1825 que le chimiste français Bracconot donne le nom de «pectine» (du grec pektos signifiant «prise en gelée» en grec) aux substances extraites de fruits et qui gélifient en milieu sucré et acide. Depuis le début du XX^{ème} siècle, les pectines sont produites industriellement et sont utilisées comme agent gélifiant des denrées alimentaires (n° de code européen: E440).

Les pectines sont des polyosides complexes entrant dans la composition des parois cellulaires de la plupart des végétaux supérieurs. Elles sont majoritairement présentes dans la lamelle moyenne et la paroi primaire. Elles participent à la cohésion de la cellule et au maintien des parois par le biais d'interactions mécaniques et chimiques avec les autres constituants de la paroi. La quantité de substances pectiques dans le végétal varie fortement en fonction de son origine botanique et de son histoire (mode de culture, période de croissance...). Bien que les pectines puissent être extraites d'un grand nombre de végétaux, les sources industrielles principales sont le marc de pomme et les écorces d'agrumes (citron, orange).

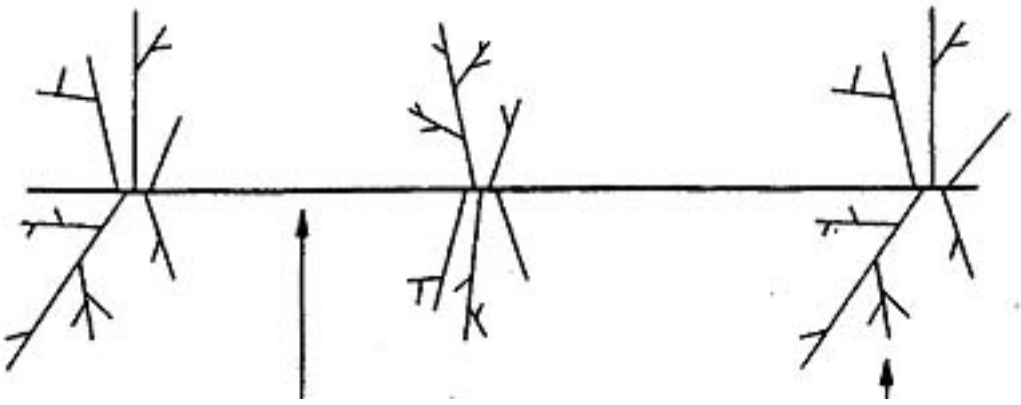
D’un point de vue nutritionnel, les pectines sont considérées comme des fibres solubles ayant une forte capacité de rétention d'eau. Plusieurs effets bénéfiques pour la santé ont été rapportés concernant l'élimination des métaux lourds et la diminution du taux de cholestérol plasmatique (Voragen *et al.*, 1995).

I.1.1.2 Structure et propriétés physico-chimiques

- *Structure*

La structure chimique des pectines est variable selon la source, la localisation et la méthode d'extraction (Thakur *et al.*, 1997). Une composition chimique et une structure génériques de la pectine ont toutefois été établies dans la littérature. Le modèle communément admis présente la pectine comme une chaîne principale d'acide galacturonique insérée par des résidus rhamnosyls auxquels se lient les chaînes latérales. L'insertion des unités rhamnose sur la chaîne principale forme les «coudes» pectiques. Une représentation schématique de la structure des pectines résume celles-ci en une région dite «lisse» homogalacturonique et des régions dites «chevelues» constituées par des régions rhamnogalacturoniques (Figure I.1) (Voragen *et al.*, 1995).

Figure I.1. Représentation schématique des zones "lisses" et "chevelues" des pectines. D'après Voragen et al. (1995).



Régions « lisses » **Régions « chevelues »**

La chaîne principale est constituée des acides α-D-galacturoniques liés entre eux par des liaisons α (1"4). La fonction carboxylique en position O-6 peut être estérifiée par le méthanol, ou suite à une réaction chimique, par des groupements amides. Les fonctions hydroxyde secondaires (en position O-2 et O-3) peuvent être estérifiées par l'acide acétique. On définit le degré de méthylation (DM) comme le rapport du nombre de carboxylates méthylés sur le

nombre total de carboxyles présents. De même, on définit un degré d'acétylation (DAc) comme le pourcentage de résidus galacturosyles estérifiés par un groupement acétyle.

Le substituant méthanol joue un rôle majeur dans les propriétés des pectines. On distingue ainsi deux grandes catégories.

- les pectines "hautement méthylées" (HM pour High Methoxyl) ayant un DM>50 %, majoritairement présentes dans la nature.

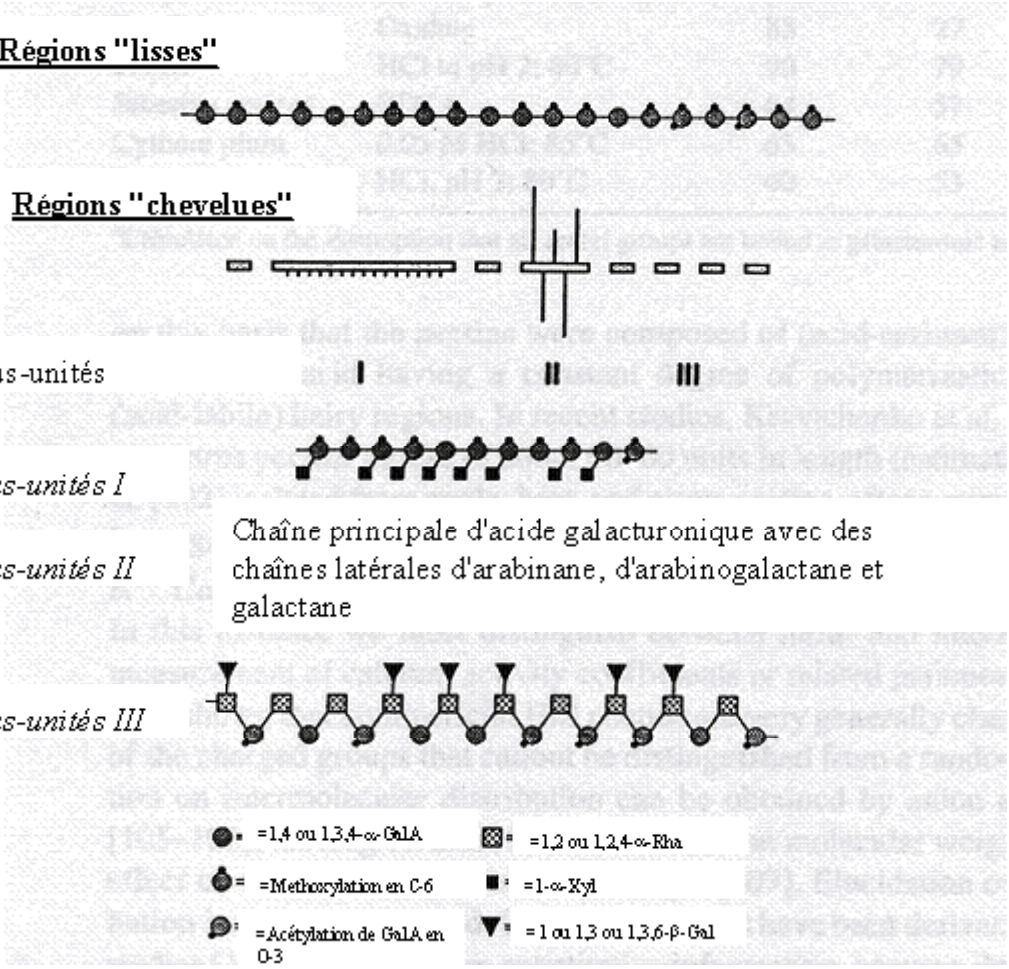
- les pectines "faiblement méthylées" (LM pour Low Methoxyl) ayant un DM<50 % obtenues à partir des pectines HM par différentes réactions chimiques.

La distribution des groupements esters méthoxyles peut être regroupée ou aléatoire.

La chaîne rhamnogalacturonique est constituée par un enchaînement répétitif de deux unités polyosidiques : (1"2)-*α*-L-rhamnosyle- (1"2)-*α*-D-acide galactosyluronique (Lau *et al.*, 1985).

De nombreux oses peuvent se lier sur les résidus rhamnosyle en O-4 ou sur les chaînes galacturoniques. La proportion de résidus rhamnosyle branchés varie suivant la provenance des pectines. On retrouve principalement trois oses majoritaires (L-arabinose, D-galactose et D-xylose) et d'autres minoritaires (D-glucose, D-mannose, L-fucose, acide D-glucuronique). Le D-galactose et le L-arabinose donnent lieu à de longues chaînes latérales. L'arrangement entre les divers composés pectiques entre eux est résumé sur la Figure I.2 (Voragen *et al.*, 1995).

Figure I.2. Schéma récapitulatif de la composition chimique des différentes parties structurales de la chaîne pectique. D'après Voragen *et al.*, (1995). (GalA : Acide galacturonique ; Rha : Rhamnose ; Xyl : Xylose ; Gal : Galactose).



Cependant, le modèle structural des pectines a été récemment remis en cause par Vincken *et al.* (2003). Dans ce nouveau modèle, les constituants homogalacturoniques sont considérés comme des chaînes latérales des chaînes rhamnogalacturoniques. Toutefois, la validité de ce modèle reste à confirmer.

- *Propriétés physico-chimiques*

- Masse molaire

Les mesures de masse molaire des pectines montrent une grande variabilité suivant la source et la méthode d'extraction. En effet, certaines méthodes d'extraction, visant à purifier les échantillons, peuvent entraîner des dépolymérisations des chaînes de pectine. Le tableau I.1 illustre à titre indicatif les différentes estimations de $\overline{M_w}$ (masse molaire moyenne en poids)

trouvées dans la littérature pour des échantillons de pectines de provenances différentes en utilisant des techniques analytiques différentes.

Tableau I.1. Exemples de $\overline{M_w}$ *mesurées pour différentes pectines*

Origine	$\overline{M_w}$ (kDa)	Technique analytique	Source
Pomme	70	Diffusion de la lumière	Malovikova *et al.*, 1993
Pomme	34,8	Chromatographie d'exclusion stérique	Malovikova *et al.*, 1993
Citron	21 à 250	Diffusion de la lumière	Ousalem *et al.*, 1993
Citron	32 à 336	Chromatographie d'exclusion stérique	Ousalem *et al.*, 1993
Orange	84,5 à 102,8	Diffusion de la lumière	Kar & Arslan, 1999

- Solubilité

Les pectines se comportent comme des polyélectrolytes grâce à la présence de groupements carboxyliques dans leur squelette. La solubilité des pectines dans l'eau est donc liée à l'état d'ionisation des groupes carboxyles mais aussi au degré de polymérisation et à leur distribution. En effet, l'ionisation des fonctions carboxyliques permet l'individualisation des chaînes grâce aux répulsions électrostatiques entre les charges et donc la solubilisation du polymère. Bien que le pH, la température, la nature et la concentration des pectines aient un rôle important sur la solubilité, celle-ci peut être augmentée en empêchant les associations moléculaires (présence de substituant, augmentation du DM) ou en augmentant la force ionique (écrantage des charges) (Thakur *et al.*, 1997). Dans un milieu aqueux, il se produit d'abord un gonflement des chaînes, puis celles-ci s'individualisent et la solubilisation proprement dite a lieu. Ce processus se traduit par une augmentation de la viscosité du milieu.

- Flexibilité

La flexibilité des polyélectrolytes peut être évaluée sur la base de mesures de la viscosité intrinsèque ($[\eta]$) en fonction de la force ionique du milieu. En effet $[\eta]$ diminue quand la force ionique augmente, du fait de l'écrantage des interactions électrostatiques entre les chaînes du biopolymère. Smidsrød & Haug (1971) ont ainsi proposé un paramètre empirique

caractérisant la flexibilité des molécules, *B*, qui est indépendant de la masse molaire. Ce modèle est basé sur le fait qu'il existe une relation linéaire (de pente égale à *S*) entre la viscosité intrinsèque et l'inverse de la racine carré de la force ionique de la solution, le paramètre B se définissant alors par :

$$B = S/[\eta]_{100}^{1,3} \qquad \textit{Equation I.1}$$

avec $[\eta]_{100}$, la viscosité intrinsèque mesurée dans NaCl 100 mM.

Les pectines sont considérées comme des molécules semi-flexibles avec des valeurs de B variant de 0,017 à 0,074 mesurées par Axelos & Thibault (1991a) et de 0,02 pour les pectines HM par Michel *et al.* (1984). Elles se rapprochent de la flexibilité des alginates (B = 0,04 (Smidsrød & Haug, 1971).

La flexibilité ainsi définie est donc dépendante principalement de la contribution électrostatique des chaînes à la viscosité intrinsèque. La nature des substituants et le nombre de charges portées par les chaînes peuvent l'influencer. Il a été montré que l'augmentation de groupes rhamnosyles augmente la flexibilité; elle serait maximale pour un DM autour de 50 %. En revanche, l'amidation entraîne une plus forte rigidité (Axelos & Thibault, 1991a).

Un autre paramètre permet d'évaluer la rigidité des macromolécules. Il s'agit de la longueur de persistance (L_p). Celle-ci estime la longueur maximum sur laquelle l'axe longitudinal d'une chaîne peut être considéré comme rectiligne. Par des mesures de viscosité intrinsèque et de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS), les mesures de L_p pour les pectines contenant 0,6 % d'unités rhamnose varient de 45 à 126 Å (Cros *et al.*, 1996), ce qui correspond à quelques dizaines de monomères: la rigidité de la chaîne est donc locale. Des valeurs supérieures (135 Å) ont été calculées par modélisation moléculaire pour l'acide homogalacturonique (Braccini *et al.*, 1999), l'insertion des résidus rhamnosyles n'influençant pas les calculs de ce paramètre. Le fait que les interactions pectines/solvant ne sont pas prises en compte dans ce calcul pourrait expliquer ces différences (Axelos *et al.*, 1996).

- Dégradation chimique des pectines

Les substances pectiques en solution peuvent subir deux grands types de dégradation :

- les désestérifications, réaction classique qui libère le méthanol et forme des pectates,

- les dépolymérisations, s'effectuant soit par hydrolyse (acide ou enzymatique) des liaisons α (1" 4), soit par des réactions de β-élimination qui provoquent la rupture des liaisons glycosidiques adjacentes à un groupe estérifié entre les résidus d'acides galacturoniques et l'apparition d'une double liaison entre les carbones C-4 et C-5 (Morris *et al.*, 2002).

Ces deux types de réactions dépendent essentiellement du pH et de la température. En milieu acide (pH = 1-3), à température inférieure à 10 °C, la désestérification prédomine alors qu'à plus forte température la dépolymérisation a lieu plus rapidement et peut conduire à une dégradation totale des pectines (Voragen *et al.*, 1995). En milieu neutre ou alcalin, à basse température, les substances pectiques sont désestérifiées sans incidence notable sur leur degré de polymérisation, une élévation de température favorise les réactions de β-élimination (Kim *et al.*, 1978).

I.1.1.3 Gélification des pectines

- *Les gels de biopolymères*

Un gel se définit par une association locale de macromolécules entre elles conduisant à la formation d'un réseau infini. Un gel peut être «chimique» ou «physique» selon la nature des interactions existantes entre les constituants du réseau.

Le point de gel correspond au moment (concentration, température…) où le réseau est formé. La caractérisation des gels fait appel à de nombreuses techniques. L'observation macroscopique de la gélification se traduit par l'absence d'écoulement du système. La structure des gels peut être déterminée par des techniques d'observation dont l'échelle de mesure varie du nm à plusieurs μm en fonction de la méthode: les méthodes rhéologiques ou la diffusion du rayonnement, telles que la diffusion de la lumière, la diffusion des rayons X (SAXS) et la diffusion de neutrons (SANS). La caractérisation mécanique des gels c'est à dire l'évaluation de leur rigidité peut faire appel à diverses techniques de rhéologie aux faibles ou aux fortes déformations (Clark & Ross-Murphy, 1987).

- *Les gels de pectines*

Les gels de pectines sont des gels physiques formés par associations locales entre chaînes macromoléculaires au niveau de zones de jonctions. La nature exacte de la zone de jonction

dépend de la structure chimique des pectines et doit être d'une longueur minimale pour être stable compte-tenu des caractéristiques du milieu. Outre un nombre non négligeable de facteurs intrinsèques (masse moléculaire, charge...) et extrinsèques (température, pH, force ionique, nature des ions dans le milieu...), les mécanismes de gélification sont principalement gouvernés par l'appartenance des pectines aux familles HM ou LM (Voragen *et al.*, 1995).

- *Gélification des pectines HM*

Une application connue depuis fort longtemps de ce type de pectine réside dans la fabrication des confitures: en présence de sucre et en milieu acide, les pectines HM présentes dans les fruits gélifient. Les zones de jonction de ce type de gels sont formées de segments de deux molécules, ou plus, qui sont stabilisés par une combinaison de liaisons hydrogène et hydrophobe. La gélification a lieu en milieu acide (pH < 3,5), permettant le rapprochement des chaînes de pectines par un écrantage des charges et une augmentation des liaisons hydrogène et en présence de co-soluté (généralement du saccharose) destiné à promouvoir les interactions hydrophobe en diminuant l'activité de l'eau. La gélification se produit au cours du refroidissement dans les conditions appropriées. La vitesse de gélification augmente si la température ou le pH diminue et si le DM ou la teneur en co-solutés augmente. Les gels obtenus ne sont pas thermoréversibles (Thakur *et al.*, 1997).

- *Gélification des pectines LM*

- Structure des gels de pectines LM

Le mode de gélification des pectines LM est totalement différent de celui des pectines HM. Il requiert la présence d'ions divalents et conduit à des gels qui peuvent être thermoréversibles. Une augmentation de la température se traduit par affaiblissement des zones de jonctions et une diminution de la force du gel (Axelos & Thibault, 1991b).

Bien que les propriétés des gels de pectines LM soient bien connues (et employées industriellement), la nature des gels d'un point de vue structural reste encore discutée.

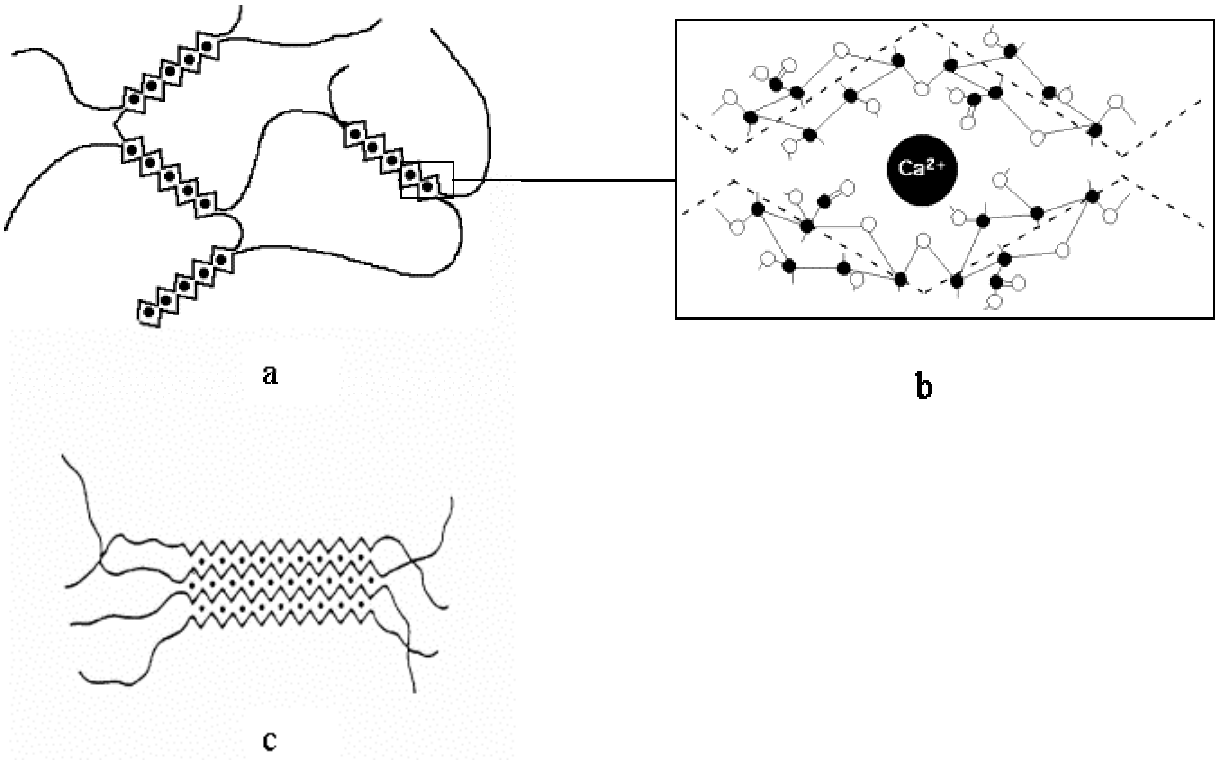
Le calcium est le principal ion utilisé pour la gélification des pectines LM car il est naturellement présent dans les fruits ou ajouté artificiellement. Comme les pectines LM, la gélification des alginates a également lieu en présence de calcium. L'agrégation des chaînes d'alginate a été présentée comme un phénomène électrostatique suivant le modèle de la

«boite-à-œufs» proposé par Grant *et al.* (1973). Par homologie avec l'alginate, ce modèle a été appliqué aux pectines LM.

Le modèle de la boîte-à-oeufs (Figure I.3b) est basé sur la formation de cavités électronégatives entre deux chaînes pectiques pouvant accommoder les ions divalents. Les zones de jonction s'établissent dans les régions galacturoniques par des liaisons ioniques au niveau des fonctions carboxyliques. Outre les deux oxygènes carboxyliques, deux atomes d'oxygène d'origine hydroxylique, deux oxygènes cycliques ainsi que deux autres atomes participant aux liaisons entre unités galacturoniques contribuent à la liaison du calcium grâce à leur paire d'électrons libres. Il a été suggéré que sept fonctions acides consécutives sur les chaînes galacturoniques participant à la zone de jonction sont nécessaires à la formation d'une zone de jonction stable (Axelos & Thibault, 1991b). La gélification du système se ferait en deux temps. Dans un premier temps, les zones de jonction entre segments de chaînes galacturoniques en présence de calcium se forment conduisant ainsi à une dimérisation des chaînes polymériques (Figure I.3a). Dans un second temps, une agrégation des dimères formés a lieu pour former le réseau gélifié (Figure I.3c) (Axelos & Thibault, 1991b).

Ce modèle d'association moléculaire a récemment été remis en cause par Braccini & Perez (2001) dans une étude de modélisation moléculaire. Les données énergétiques obtenues pour le modèle boîte-à-œufs indiquent que ce modèle ne permet pas une association efficace avec le calcium. L'appariement des chaînes galacturoniques serait de faible énergie et les cavités créées par les chaînes pectiques constitueraient des espaces trop grands pour que des interactions avec le calcium aient lieu. L'arrangement antiparallèle des acides galacturoniques avec la conformation en hélice 2_1 serait plus favorable d'un point de vue structural et énergétique pour l'appariement des chaînes avec le calcium. Ce modèle suppose également que les chaînes se dimérisent puis s'assemblent pour former des agrégats plus grands avec une forte contribution des forces de van der Waals et des liaisons hydrogène.

Figure I.3 Représentation schématique de la gélification des pectines LM: (**a**) les chaînes de pectines se rapprochent deux à deux autour des ions calcium (dimérisation) selon (**b**) le schéma d'interactions électrostatiques de la «boîte-à-œufs», (**c**) puis les dimères s'agrègent entre eux pour former un gel. D'après Axelos et Thilbault (1991).



- Facteurs intrinsèques influençant la gélification des pectines LM

Plusieurs caractéristiques propres à la structure des pectines LM peuvent influencer la structure et les propriétés des gels formés telles que la masse molaire ou la composition chimique.

La masse molaire des pectines LM est un facteur déterminant de la force des gels: plus celle-ci est grande plus les gels formés sont rigides.

Le DM et la distribution des groupes carboxyles libres sont deux facteurs clés de la gélification des pectines LM. Plus le DM est faible, plus l'affinité des ions calcium pour les chaînes pectiques est grande donnant ainsi des gels plus rigides. De plus, lorsque les charges sont réparties de façon aléatoire (suite à une dégradation chimique des pectines), un gel se forme pour des concentrations en calcium plus faibles que lorsque cette répartition se fait sous

forme de blocs (résultat d'une dégradation par voie enzymatique des chaînes pectiques) (Powell *et al.*, 1982).

En outre, la formation des zones de jonctions est limitée par la présence des coudes pectiques formés par les unités rhamnose. De plus, l'amidation des pectines LM conduirait à la formation de zones de jonction entre groupes amide *via* des liaisons hydrogène. Le calcium ne se lierait donc pas à ce niveau et le modèle de la boîte-à-œufs serait modifié (Voragen *et al.*, 1995).

- Facteurs extrinsèques influençant la gélification des pectines LM

La concentration en pectines LM, la concentration et la nature des ions présents dans le milieu, le pH et la température sont des facteurs qui interviennent ensemble, ou séparément dans les propriétés des gels de pectines LM.

Ainsi on peut définir une concentration critique de gélification des pectines LM en deçà de laquelle le réseau n'est pas formé. Garnier *et al.* (1993) ont montré que cette concentration varie selon les conditions de milieu. Dans une solution de 100 mM NaCl, en régime dilué, l'augmentation de la concentration en pectines LM induit une augmentation de la concentration en calcium nécessaire pour que la gélification ait lieu; en régime semi-dilué, la quantité de calcium nécessaire est indépendante de la concentration en pectines. Au-delà d'une certaine concentration en calcium, un phénomène de contraction du gel entraînant une synérèse se produit.

En augmentant la force ionique (ajout de NaCl), la quantité de calcium nécessaire à la gélification diminue. Il y aurait coopérativité de la fixation du calcium sur les pectines, c'est à dire que la liaison d'un ion calcium faciliterait la liaison avec les autres, ceci étant valable en milieu salin et le phénomène inverse aurait lieu dans l'eau. Cette distinction est d'autant plus marquée que la concentration en polymère est faible (Garnier *et al.*, 1994).

Les liaisons de nature électrostatique régissant majoritairement la gélification des pectines LM, dépendent également du pH du milieu. Plus le pH est bas, plus la concentration en calcium ou la concentration en pectines LM nécessaire pour l'obtention d'un gel est grande (Axelos & Thibault, 1991b). Cependant, il a été montré que la formation d'un gel de pectines LM est possible en absence de calcium, en abaissant le pH (pH < 4) (Gilsenan *et al.*, 2000). Ce comportement est interprété en relation avec la structure compacte des chaînes pectiques à

des pH faibles. La protonation des groupements carboxyliques entraîne une diminution des répulsions électrostatiques leur permettant d'établir des liaisons hydrogène. Toutefois les liaisons hydrogène étant affaiblies par la protonation, une interaction optimale nécessiterait une ionisation résiduelle.

La gélification des pectines LM se produit lors du refroidissement et les gels obtenus peuvent être thermoréversibles. Cette thermoréversibilité a récemment été remise en question par Cardoso *et al.* (2003). Ils ont montré une hystérèse thermique des gels de pectines LM: les propriétés rhéologiques (aux faibles déformations) des gels lors du refroidissement ne suivent pas la même évolution que lors du chauffage. Une thermostabilité est observée même aux températures élevées. Ceci a été montré pour deux lots de pectines LM de caractéristiques chimiques différentes à pH 3 et pH 7. Ils attribuent ce comportement à la formation d'interactions non ioniques (liaisons hydrogène et hydrophobe) permettant des associations stables entre chaînes pectiques même à température élevée. L'étude de l'effet du vieillissement du gel pendant 20 h avant le chauffage montre également un phénomène d'hystérèse qui a été attribué à une réorganisation structurale qui stabilise le gel.

I.1.2 Les protéines globulaires

I.1.2.1 Généralités

Les protéines sont des chaînes polypeptidiques ayant quatre niveaux de structure différents. La structure primaire correspond à la séquence d'enchaînement des acides aminés, reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Les protéines globulaires comportent des régions ordonnées périodiquement où la chaîne polypeptidique linéaire présente une structure tridimensionnelle régulière de type hélices α ou feuillets β. Ces différentes régions, dont l'organisation est maintenue par des liaisons hydrogène entre acides aminés, constituent la structure secondaire de la protéine. Notons que certaines régions protéiques ne sont pas structurées dans ce type de conformation, leurs formes irrégulières constituant des boucles. La structure tertiaire correspond à une organisation tridimensionnelle des éléments de la structure secondaire, et résulte d'interactions non-covalentes (forces de van der Waals, ponts hydrogène) et parfois de ponts disulfures. La structure quaternaire se définit par l'état d'oligomérisation de la protéine c'est-à-dire par l'état d'association des différentes sous-unités de structure tridimensionnelle.

La protéine peut ainsi se présenter sous forme de monomère avec une seule entité, sous formes de dimère avec l'association de deux protéines etc…

La structure dite « native » d'une protéine correspond à une conformation cœur/surface thermodynamiquement stable dans un environnement donné (pH et force ionique modérés, température ambiante). Elle résulte d'un repliement qui met en jeu de nombreuses interactions inter- et intra moléculaires. D'un point de vue thermodynamique, l'énergie libre de l'état natif est plus basse que celle de l'état déplié. La différence d'énergie libre (ΔG) entre les deux états correspond à la mesure de la stabilité conformationnelle des protéines et est égale à :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad \textit{Equation I.2}$$

La variation d'entropie (ΔS) est à relier aux changements de configuration des groupements polaires et apolaires de la protéine et des molécules d'eau. La variation d'enthalpie (ΔH) est à relier à l'énergie dépensée pour ces changements de conformations. Tout facteur affectant les interactions du système modifie la stabilité de la protéine. D'après l'équation I.2, on voit que la température (T) affecte directement l'équilibre thermodynamique. Parmi les autres paramètres qui régissent cette équation, le pH joue sur les interactions électrostatiques et de van der Waals et l'addition de sels modifie les interactions électrostatiques et hydrophobes de la protéine. Les sels peuvent ainsi altérer la solubilité de la protéine. On distingue deux effets du sel sur la conformation:

- effet de 'salting in' : à faibles concentrations en sels, les répulsions électrostatiques entre les protéines diminuent du fait de l'écrantage des charges, résultant en une augmentation de solubilité de la protéine. L'efficacité des différents sels sur la stabilité des macromolécules suit la série d'Hoffmeister (Damodaran, 1989): $F^- < SO_4^{2-} < Br^- < I^- < ClO_4^- < SCN^-$.

- effet de 'salting out': au-delà d'une certaine concentration en ions, un écrantage total des répulsions électrostatiques a lieu conduisant à une précipitation de la protéine (Relkin, 1996).

Le changement de conformation des protéines entraîne des modifications de leurs propriétés physico-chimiques, telles que leurs propriétés émulsifiantes ou moussantes, mais également de leurs propriétés gélifiantes.

I.1.2.2 Gélification des protéines globulaires

La gélification des protéines globulaires, suite à un traitement thermique, a des applications qui s'étendent du simple usage domestique (cuisson d'un œuf) à des activités de transformations alimentaires plus complexes, pouvant aboutir à un contrôle de la texture du produit fini (Clark *et al.*, 2001). Les gels de protéines sont des gels «physiques», formés par l'association de protéines en un réseau tridimensionnel continu. La présence de liaisons disulfures (chimiques) participe à la structuration du gel mais reste un mécanisme secondaire par rapport à l'agrégation, celle-ci étant principalement sous le contrôle des interactions hydrophobe.

La transition de l'état «sol» à l'état «gel» est complexe et plusieurs théories tentent de l'expliquer (Gosal & Ross-Murphy, 2000; Clark *et al.*, 2001). Le couple temps/température est l'élément majeur de la gélification des protéines globulaires. Plus la température est élevée, plus la cinétique de gélification est rapide et plus le temps de gélification est réduit. En outre, les conditions du milieu y jouent un rôle clé.

La formation des gels de protéines globulaires sous l'effet des traitements thermiques peut se résumer en trois étapes dépendantes des conditions du milieu et de concentration (Grinberg *et al.*, 1992; Cayot & Lorient, 1998; Tobitani & Ross-Murphy, 1997a) : la dénaturation des protéines, l'agrégation des protéines dénaturées et la formation de fibres ou d'amas d'agrégats, suivie par l'association de ces structures en réseau.

- *Dénaturation des protéines*

Un changement des variables externes du système protéine/solvant, tel qu'une température (ou une pression) élevée, un pH extrême ou encore la présence de sel, d'alcool ou de tensioactif en grande quantité, peut être à l'origine d'une dénaturation. Celle-ci se définit comme une modification majeure de la structure native de la protéine, sans rupture cependant des liaisons peptidiques impliquées dans la structure primaire (Tanford *et al.*, 1959; Gosal & Ross-Murphy, 2000). Plusieurs niveaux de dénaturation peuvent être distingués selon le traitement appliqué lors du procédé. La dénaturation peut être localisée ou impliquer la molécule dans son ensemble dans une réaction de « tout ou rien » reflétant ainsi la nature coopérative de cette transition état natif-état désordonné. Ce changement coopératif se produit sur une gamme étroite de températures de l'ordre de 60 à 80°C, en fonction de la nature des protéines et des conditions du milieu (Mulvihill & Donovan, 1987).

L'énergie libre du système est alors dominée par les contributions entropiques-réaction endothermique- et l'élévation de température conduit à un remaniement de la structure compacte de la protéine globulaire. Elle résulte principalement en une rupture des liaisons hydrogène et en des changements dans les interactions de van der Waals stabilisant les structures secondaires et tertiaires. La dénaturation provoque l'exposition des résidus hydrophobes, initialement enfouis dans le cœur de la protéine, conduisant ainsi à la formation de liaisons intermoléculaires avec des molécules d'eau. Le renforcement des interactions hydrophobe peut par exemple produire une agrégation rapide des molécules au point isoélectrique, sans aucun déploiement de la protéine (Van Kleef, 1986). En outre, en exposant les groupements sulfydryle des résidus cystéine libres ou nouvellement libres, la dénaturation peut être responsable de la formation de ponts disulfures intermoléculaires.

- *Agrégation des protéines dénaturées*

D'une manière générale, le processus d'agrégation/gélification des protéines dénaturées est un mécanisme fortement dépendant de la température, de la vitesse de chauffage, de la concentration en protéines et des conditions de milieu (pH, nature et concentration des sels en solution) (Damodaran & Kinsella, 1982). A des températures élevées, la contribution enthalpique devient plus importante et se traduit alors par un phénomène exothermique. Les protéines dénaturées vont s'associer entre elles pour former des agrégats. Les interactions hydrophobe et ioniques entre molécules gouvernent le mode d'agrégation interparticulaire et déterminent si la suspension de protéines globulaires est stable ou si les protéines s'agrègent pour former un gel ou un précipité. Les échanges de ponts disulfures sont nettement favorisés lorsque la température augmente mais ils ne sont pas indispensables à la formation d'un réseau protéique (Hegg, 1982; Wang & Damodaran, 1990). La cinétique de cette étape d'agrégation contrôle les caractéristiques du système final.

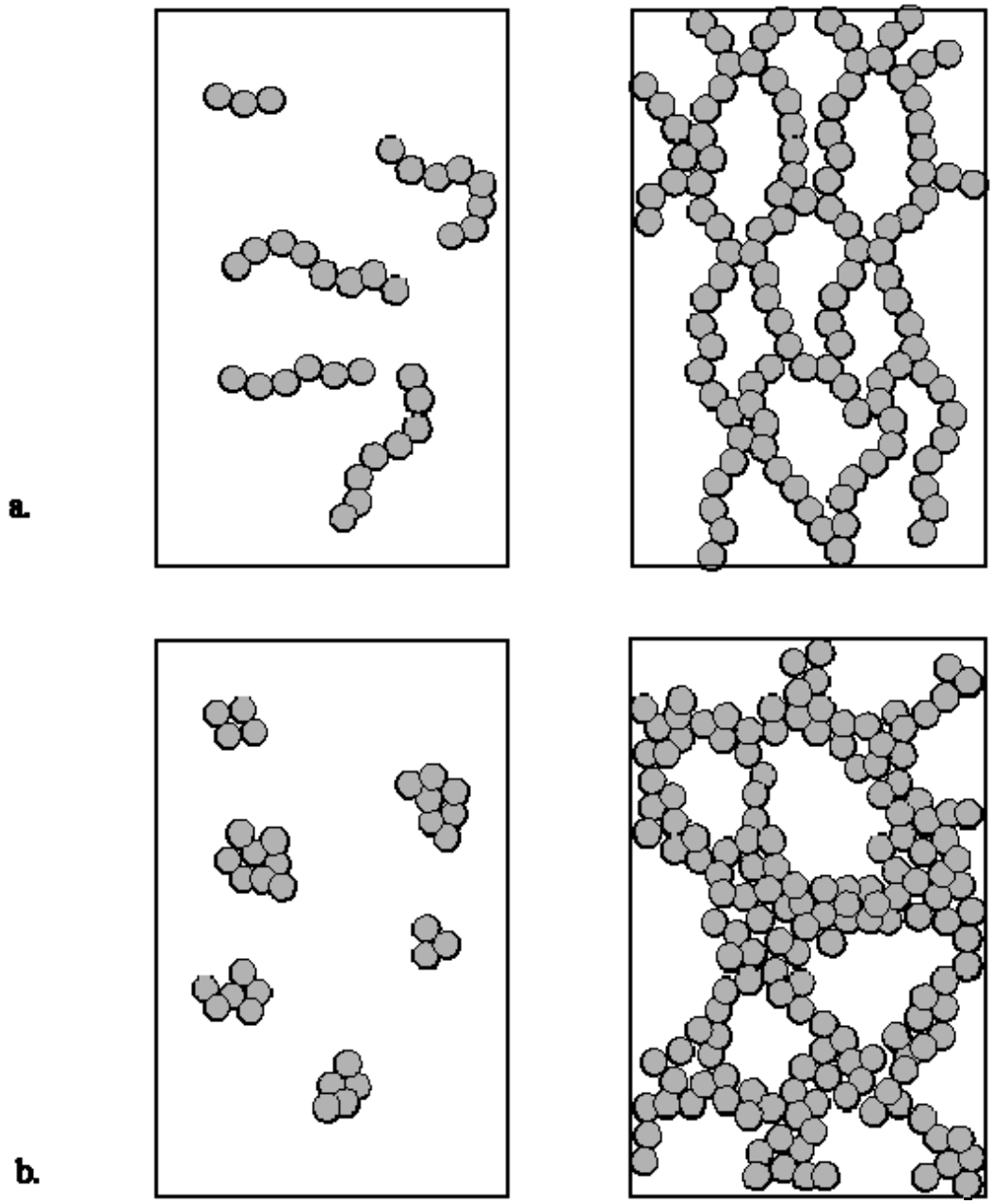
- *Formation de fibres ou d'amas d'agrégats et association de ces structures en réseau*

Une fois formés, les agrégats protéiques peuvent s'associer si leur nombre est suffisamment important. Les interactions entre agrégats sont de même nature que celles existantes entre les protéines. Ces interactions sont toutefois permises grâce à des conditions du milieu (pH, force ionique) permettant de rapprocher les éléments constitutifs de ce type de structure par la diminution de répulsions électrostatiques entre les agrégats.

L'étude des variations des conditions physico-chimiques du milieu a permis de mettre en évidence trois types de gels en fonction de la nature des agrégats formant la trame du gel: les gels filamenteux, les coagula et les gels inhomogènes (Doi, 1993).

- Les gels filamenteux (schématisés sur la Figure I.4a):

Figure I.4 Représentation schématique de réseaux obtenus par l'agrégation de protéines globulaires (présentes en concentration croissante de gauche à droite) : (**a**) gel filamenteux et (**b**) coagulum. D'après Doi (1993).



Ils sont formés lorsque les protéines sont fortement chargées et que ces charges ne sont pas écrantées (pH éloigné du pH isoélectrique et faible force ionique). D'un point de vue

cinétique, la première étape d'agrégation est limitante du fait des forces de répulsions électrostatiques existant entre chaînes protéiques. Ceci induit la formation d'agrégats fibrillaires (ou filaments) relativement fins qui prennent l'apparence de fibres très longues et flexibles (pH basique) ou de fibres plus courtes et rigides (pH acide). Clark & Lee-Tuffnell (1986) ont montré, par des études de dichroïsme circulaire, une conservation partielle, pour les agrégats formés, de la structure secondaire native voire une augmentation du nombre de feuillets β.

Le type d'agrégats obtenus peut donner lieu à la formation de structures auto-similaires. Les fibrilles d'agrégats s'assemblent alors de façon aléatoire pour former un réseau infini. On parle de gels filamenteux ou caténaires car les zones de jonction sont constituées de quelques protéines agrégées dont les liaisons à caractère permanent ou semi-permanent font suite à une agrégation physique. Il est à noter toutefois que chacune des étapes impliquées dans la formation de ce type de gels peut être décomposée en différents stades préliminaires de dissociation et/ou d'agrégation limitée de sous-unités (dimères) (Clark *et al.*, 2001).

- Les coagula (schématisés sur la Figure I.4b):

Ce type de gel se forme lorsque la charge de la protéine diminue et/ou que l'écrantage, induit par les sels présents, augmente, entraînant une agrégation rapide des protéines (Foegeding *et al.*, 1994). D'un point de vue cinétique, l'étape d'agrégation est déterminante. Les protéines agrégées forment des agrégats denses et sphériques, dont le diamètre varie selon la vitesse de chauffage appliquée au cours du traitement thermique. De manière générale, plus cette vitesse est lente et plus la taille des agrégats est importante. Une structure plus hétérogène du réseau est ainsi obtenue. On parle de gel colloïdal ou coagulum qui est de plus grande opacité, de plus faible élasticité et présente plus facilement des phénomènes de synérèse que le gel de type fibrillaire.

- Les gels inhomogènes:

Ils se définissent par l'existence d'un réseau contenant à la fois des régions de haute et de faible densité et traduisant l'existence d'une distribution de tailles de pores bimodale. La formation de ces inhomogénéités dépend de la vitesse de chauffage et du pH (Stading *et al.*, 1993).

I.1.2.3 L'albumine de sérum bovin

- *Origine et rôle :*

Les sérum albumines sont les protéines les plus abondantes du plasma sanguin avec une concentration, pour le sérum humain (Albumine de sérum Humain, SAH), de 0,5 $g.L^{-1}$. Elles remplissent de nombreuses fonctions physiologiques parmi lesquelles la régulation de la pression osmotique du sang (Carter & Ho, 1994) et le contrôle du pH sanguin (Figge *et al.*, 1991). D'autre part, elles montrent des propriétés d'intérêt majeur par leur capacité de liaisons réversibles à une grande variété de molécules biologiques. Dans le plasma humain, il a été démontré que la SAH joue un rôle principal pour la vectorisation des acides gras, des métabolites physiologiques -bilirubine et acides biliaires- ou encore le transport d'hormones comme la thyroxine et la testostérone. Les sérum albumines présentent de fait un intérêt thérapeutique évident puisque leur homologue humaine a prouvé des capacités de liaison réversible avec des molécules actives ainsi qu'un relargage contrôlé sur des cibles données (Peters, 1996).

- *Structure*

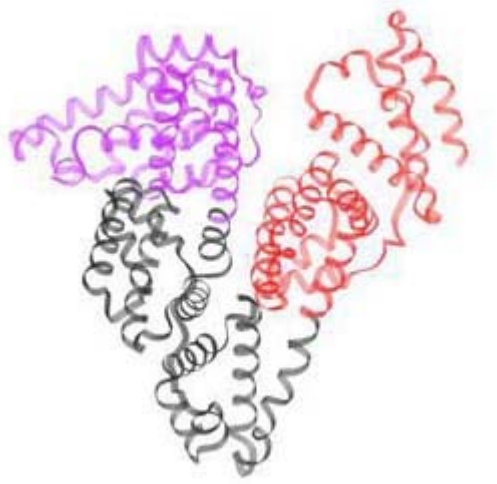
La séquence primaire de l'albumine de serum bovin (SAB), considérée dans ce travail, contient 582 acides aminés pour une masse molaire de ~ 66 $kg.mol^{-1}$ (Peters,1985) ; celle de SAH contient 585 acides aminés, la masse molaire est donc proche. Un alignement ClustalW de ces deux séquences, effectué sur le site SRS de l'EBI (http://srs.ebi.ac.uk), révèle une identité stricte de séquence SAH/SAB de 76% qui concerne toute la séquence protéique (Zdobnov *et al.*, 2002). A ce jour, la SAH a été cristallisée et sa structure 3D résolue à 2,8 puis 2,5 Å (He & Carter, 1992; Sugio *et al.*, 1999). Cependant, au vu de l'identité de séquence primaire, les caractéristiques structurales de ces deux protéines peuvent être raisonnablement considérées comme similaires. La SAH est une protéine essentiellement hélicoïdale, qui contient cependant quelques coudes et boucles. Elle montre un repliement en forme de cœur. Ses dimensions sont les suivantes: 80x80x30 Å (Figure I.5) (Sugio *et al*, 1999). Elle est formée de trois domaines homologues I (résidus 1-195), II (résidus 196-383), III (résidus 384-585) (Figure I.6). Ces domaines sont très proches au niveau de leur structure 3D. L'assemblage des trois domaines est cependant complètement asymétrique. Si les domaines I et II sont perpendiculaires et forment, par des interactions hydrophobe et des liaisons hydrogène un T, le domaine III forme un Y avec le domaine II. Malgré 17 ponts disulfures et

un groupement sulfhydryle libre, des études physico-chimiques sur la SAH ont montré une certaine flexibilité qui permettrait à cette protéine de changer assez aisément de conformation (Carter & Ho, 1994). Ces changements de conformation seraient dus à un réarrangement relatif entre les trois domaines sauf pour les deux hélices C-terminales du domaine III qui semblent bouger vers l'extérieur de la molécule (Sugio *et al*, 1999).

Figure I.5 Structure tridimensionnelle de la SAH cristalline, d'après He & Carter (1992) et Sugio *et al.* (1999). Les hélices α majoritaires sont présentées sous forme de bâtonnets et les coudes ou structures hélicoïdales en traits fins. (code correspondant dans la Protein Data Bank: 1bm0.pdb (http://www.rcsb.org/pdb/) (Berman *et al.*, 2000)

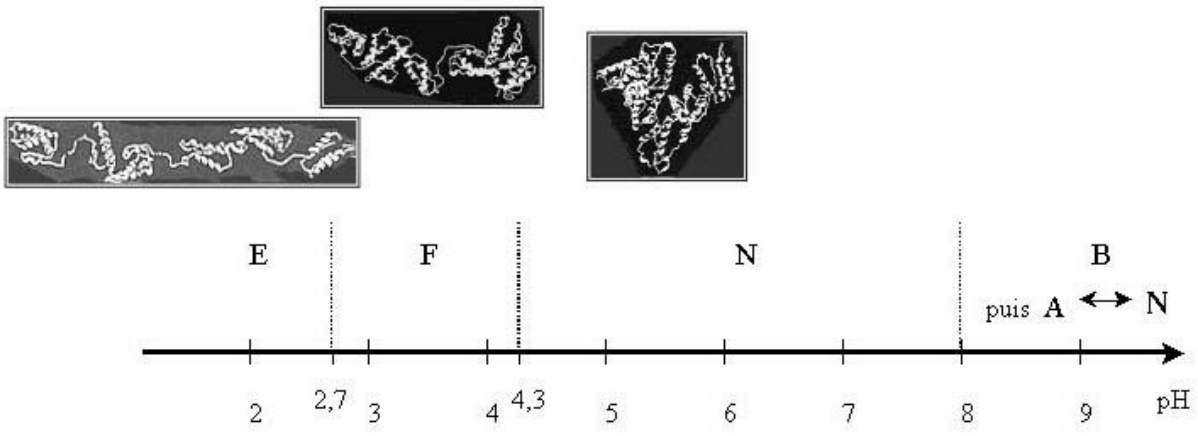


Figure I.6 Représentation des trois domaines I (violet), II (noir), III (rouge) constitutifs de la SAH, d'après He & Carter (1992) (issue des données de la Protein Data Bank, source détaillée sur la Figure I.5).



Il a été montré que la SAB présente elle aussi de nombreuses conformations natives et stables suite à la modification du pH du solvant (Peters, 1975). Ces différentes conformations n'induisent pas d'oligomérisation et les transitions conformationnelles sont toutes réversibles (Figure I.7).

Figure I.7 Conformations de la SAB en fonction du pH. D'après Peters (1975) et Carter & Ho (1994).



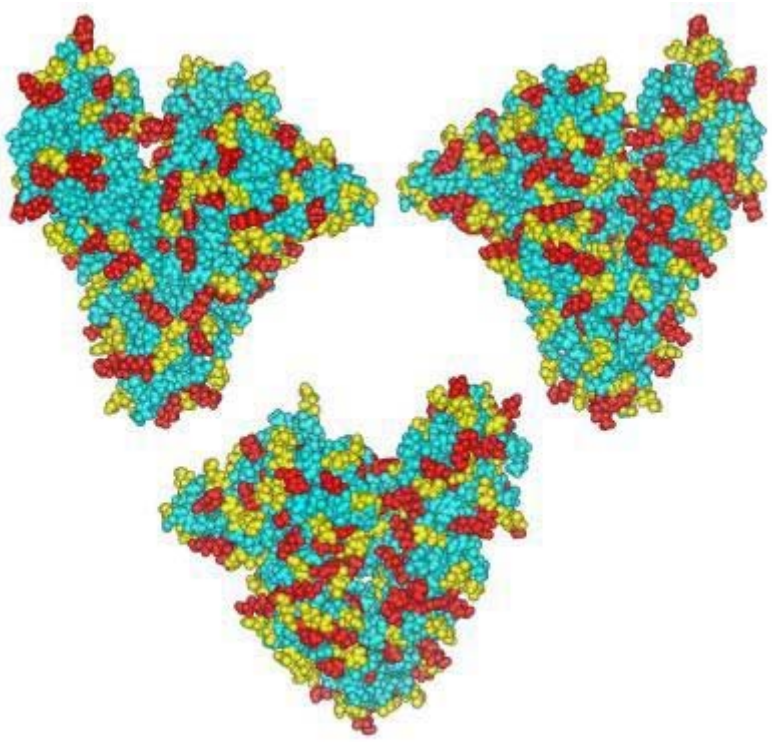
De pH 4,3 à pH 8, la molécule de SAB est sous sa forme N («Normale») ou «Native». En deçà, de pH 4,3 à pH 2,7, la SAB se présente sous la forme F («Fast»-Rapide). Elle doit son nom à une mobilité électrophorétique accrue par rapport à la forme N liée à une brutale augmentation de charge nette du fait d'une protonation d'environ 40 groupes carboxylates lors de la baisse de pH (Aoki & Foster, 1957). A des valeurs de pH inférieures à 3, la protéine se déplie vers une forme E («Expanded»-Etendue) sans changer de masse molaire. Cette conformation complètement allongée est due aux répulsions électrostatiques entre les boucles chargées positivement et est supprimée si on augmente la force ionique de la solution. Inversement, de pH 8 à pH 10, la protéine est sous la forme B («Basic»). Ce repliement est assez proche de la structure native, cependant les modifications de structure moduleraient, en l'augmentant, l'affinité de la protéine pour certains ligands (Carter & Ho, 1994). Enfin la forme A («Aged»-mature) a été mise en évidence à partir d'une solution de SAB à pH 9 et conservée à 3 °C pendant plusieurs jours. Elle se caractérise par une faible mobilité électrophorétique et serait liée à un réarrangement de ponts disulfures (Peters, 1975).

- *Propriétés physico-chimiques*

- Charge

Le point isoélectrique de la SAB délipidée est de 5,2. Cependant, la présence d'acides gras à sa surface abaisse son point isoélectrique à environ 4,8 (Peters, 1975). A pH 7, la molécule d'albumine est très polaire, avec un potentiel de 100 charges négatives pour 82 charges positives. La charge négative nette est alors plus marquée du côté N-terminal, où elle est égale à –10 quand le domaine central montre une charge de –8 et le côté C-terminal est globalement neutre. S'il existe, de fait, une asymétrie électrique au niveau de la structure primaire, cette dissymétrie n'est, en revanche, pas évidente au niveau de la structure tertiaire où la distribution des charges apparaît uniforme (Carter & Ho, 1994) (voir la Figure I.8).

Figure I.8 Répartition des charges sur HSA à pH 7 (structure tridimensionnelle). En jaune les acides aminés chargés négativement (acide aspartique, acide glutamique); en rouge les acides aminés chargés positivement (histidine, lysine, arginine); en bleu les zones neutres (issue des données de la Protein Data Bank, source détaillée sur la Figure I.5).



- Fixation des ions:

La fixation des ions par l'albumine de sérum bovin a fait l'objet de nombreuses études dans les années 50-70 sur la base de mesures de pression osmotique, de force électrique au travers une membrane (Saroff & Lewis, 1963) ou du taux de complexation avec certains ions (Alberty & Marvin, 1951). Hormis les sels d'acides gras qui font partie des ligands organiques les plus importants, les anions inorganiques tels que les halogénures, les nitrates ou encore les thiocyanates se lient également à la SAB par l'intermédiaire de ponts ioniques. Le nombre d'anions fixés par molécule est d'autant plus élevé que la charge nette de la protéine est positive. Ainsi Alberty & Marvin (1951) ont montré que le nombre d'ions chlorure, fixés par la SAB en présence de NaCl 150 mM, augmentait avec le pH. A pH 3,1 où la charge nette de la protéine est fortement positive, une molécule de SAB peut fixer ~31 ions chlorure. A pH 5,2 (point isoélectrique), elle est de ~9 ions chlorure. A pH 7, ce nombre diminue très légèrement pour passer à ~8. Par ailleurs, la force avec laquelle les anions se lient à la SAB suit la séquence: $Cl^- < Br^- < NO_3^- < I^- < SCN^-$.

Concernant les liaisons de la SAB avec les cations, aucune liaison spécifique entre les ions sodium et la SAB n'a pu être mise en évidence (Alberty & Marvin, 1951; Powell Baker & Saroff, 1965). En revanche plusieurs cations métalliques divalents tels que Cu^{2+}, Ni^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{2+}, Au^{2+} se lient fortement aux albumines. Les constantes d'association Ka pour Cu^{2+}et Ni^{2+} sont respectivement égales à $1,5*10^{16}$ et $4*10^{9}$ M^{-1} (Giroux & Schoun, 1981). Les cations se lieraient probablement dans la région N-terminale qui porte une forte charge négative, propice à la formation des ponts ioniques (Peters, 1975). La liaison entre la SAB et le calcium, bien que jouant un rôle physiologique important, est relativement faible avec une constante d'association égale à $1,5*10^{3}$ M^{-1} (Powell Baker & Saroff, 1965 ; Peters, 1996). Sur les 2,4 mM de calcium circulant dans le système sanguin, environ 45 % est lié à la protéine. Ceci est lié principalement à la fonction de transporteur de la SAB, protéine majoritaire du plasma. Saroff & Lewis (1963) ont suggéré que la SAB pouvait lier les ions calcium via les groupes imidazoles ou amines et les fonctions carboxylates de la protéine. Jin & Wang (1991) ont montré depuis que le site de fixation serait surtout constitué des groupements carboxyliques de pairs Aspartique/Glutamique et qu'il y aurait une coordination de 7 ligands (Strynadka & James, 1989).

- *Gélification thermique de la SAB*

- Structure et propriétés mécaniques des gels de SAB

D'un point de vue structural, la forme et la taille de la protéine sont peu affectées par le traitement thermique. La quantification par dichroïsme circulaire des structures secondaires présentes dans les agrégats de SAB, obtenus après un traitement thermique de 2 h à 75 °C à pH 8, a mis en évidence une diminution du nombre d'hélices a et la formation de feuillets b. Ces événements ont lieu pour des concentrations en protéine inférieures à 2 %. Au delà de cette concentration, les structures secondaires ne varient plus (Clark & Lee-Tuffnell, 1986).

La température de dénaturation thermique de la SAB, mesurée par analyse enthalpique différentielle (AED) varie, selon les études, entre 60 et 80°C en fonction des conditions de mesures. En effet, de nombreux facteurs affectent les transitions thermiques mesurées. Une augmentation de la force ionique induit une dénaturation à des températures plus élevées du fait de l'écrantage des répulsions électrostatiques entre protéines (Yamasaki & Hiroshige, 1990 ; Barone *et al.*, 1992). Le pH, la présence d'agents tensioactifs ou d'acides gras peuvent également modifier l'allure des thermogrammes (Gumpen *et al.*, 1979; Yamasaki & Hiroshige, 1992; Kelley & Mc Clements, 2003).

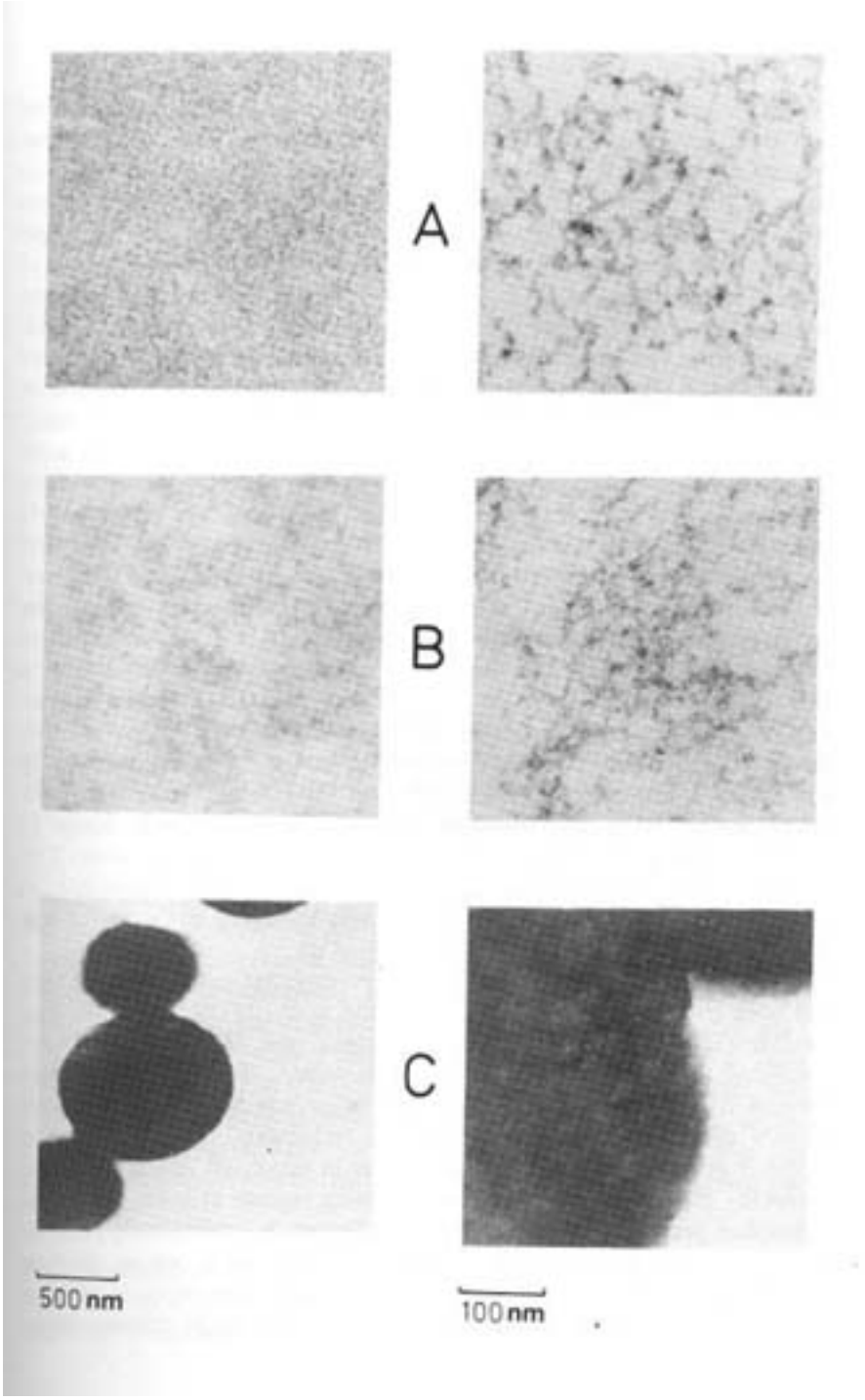
La structure des agrégats de SAB (obtenus après chauffage à 95 °C pendant 10 min) a été évaluée par diffusion de la lumière (Hagiwara *et al.*, 1997). Il a été montré que les agrégats de SAB forment des structures autosimilaires caractérisées par une dimension fractale égale à 2,1 à pH 7 et à 1,8 à pH 5,1 dans un milieu de force ionique égale à 100 mM. Ces valeurs sont inférieures à celles mesurées à partir des gels de SAB sur la base de caractérisations rhéologiques et de l'analyse des images obtenues par microscopie confocale à balayage laser (Hagiwara *et al.*, 1998). En effet, la dimension fractale évaluée selon ces deux méthodes se situait autour ~2,6-2,8 en fonction des différents milieux de préparation (force ionique égale à 100 mM ; pH 5,1 ou pH 7 en présence de $CaCl_2$ 0,5 ou 30 mM). Ces différences pourraient être liées à une interpénétration des agrégats dans les gels.

La structure finale des gels varie fortement en fonction des facteurs extrinsèques. La structuration des gels de SAB a été étudiée par diffusion des rayons X par Clark & Tuffnell (1980) en faisant varier les conditions de milieu. Pour de faibles valeurs du pH ou des faibles forces ioniques ou dans l'eau, la dépendance angulaire en fonction du vecteur d'onde (q) de l'intensité diffusée présentait un maximum indiquant l'existence de fortes répulsions entre les agrégats les maintenant à une certaine distance les uns des autres. Lorsque la concentration en sels augmentait ou que le pH diminuait ce maximum n'était pas visible et une forte augmentation de l'intensité diffusée était mesurée aux faibles valeurs de q. Dans ce cas, les

structures formées étaient plus hétérogènes du fait de la diminution des répulsions électrostatiques entre les agrégats. Il en a été déduit que dans les conditions de fortes répulsions entre les agrégats, l'association des agrégats sous forme de filaments formait un réseau dont la distribution des pores était uniforme. L'épaisseur des filaments serait égale à un ou deux monomères de SAB (~10 nm) mais l'arrangement des monomères dans les filaments n'a pas été établi. Le changement de structure mis en évidence en présence de fortes concentrations en sel ou à pH élevé serait lié à la formation d'un réseau avec une large distribution des pores et un plus grand nombre d'associations entre les filaments.

Ces résultats ont été complétés par des observations en microscopie électronique à balayage (Clark *et al.*, 1981; Clark & Lee-Tuffnell, 1986; Clark & Ross-Murphy, 1987). La Figure I.9 présente un exemple du type de gels observés pour la SAB dans différentes conditions de pH et de force ionique. Ces différentes structures montrent que le gel de SAB peut se présenter comme un réseau homogène (A) qui devient moins uniforme lorsque l'attraction entre les agrégats augmente par l'ajout de sel qui favorise l'agrégation à pH>pHi (B). En revanche, au point isoélectrique, la présence de sel n'influence pas la formation de gros conglomérats globulaires liés à une forte attraction entre les protéines (C). Ces observations ont été également décrites par Hegg (1982) qui a établi un diagramme des conditions d'agrégation de la SAB en fonction du pH et de la force ionique séparant les systèmes en trois catégories: transparents, opaques ou précipité.

Figure I.9 Structures de gels de 10 % SAB en microscopie électronique (deux grossissements). **A**: gel fibrillaire clair obtenu à pH 6,5, dans l'eau; **B**: gel turbide obtenu en présence de NaCl 125 mM à pH 6,5; **C**: coagula obtenu à pH 5,1. D'après Clark *et al.* (1986).



Les propriétés rhéologiques des gels de SAB ont fait l'objet de nombreuses études (Clark & Lee-Tuffnell, 1986; Paulsson *et al.*, 1986; Hines & Foegeding, 1993). Les propriétés des gels

varient en fonction du traitement thermique appliqué et des conditions de milieu choisies. Matsudomi *et al.* (1991) ont montré que la force du gel de SAB (4 %), obtenu par un chauffage à 90 °C à pH 8, augmentait de façon progressive avec le temps de chauffage. Le lien entre les facteurs contrôlant la dénaturation et la gélification de la protéine est difficile à établir. La gélification, dépendante de la concentration en protéines, est fortement influencée par le pH et la force ionique, ces deux facteurs jouant également un rôle important dans la dénaturation (Paulsson *et al*., 1986).

L'étude de la gélification thermique a également été abordée en tentant de modéliser à partir de résultats de rhéologie, le temps de gélification en fonction de la concentration en SAB et de la température du système (Tobitani & Ross-Murphy, 1997a, 1997b). A partir de ce modèle, des diagrammes d'état ont été établis permettant de prédire les conditions de gélification du système en fonction des paramètres étudiés.

- *Influence de la nature des ions présents dans le milieu sur la gélification de la SAB*

Un environnement minéral minimal est nécessaire à la formation d'un gel. Au-delà de la concentration seuil, il existe une concentration optimale en minéraux permettant d'obtenir un effet maximal sur la rigidité du gel (Relkin, 1996).

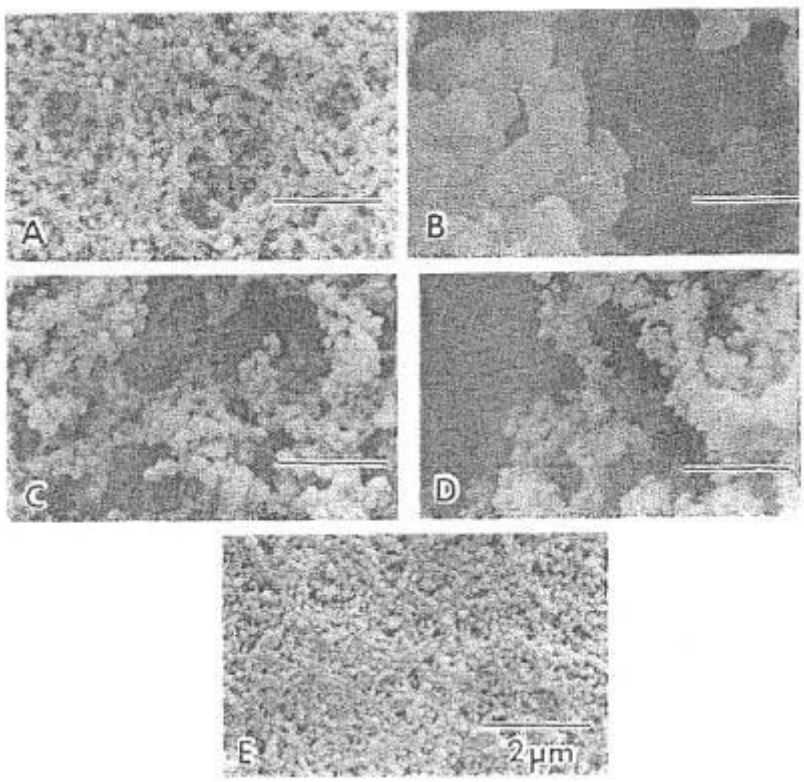
Tobitani & Ross-Murphy (1997b) ont montré par des mesures rhéologiques, que l'addition d'ions Na^+ modifiait de façon importante le temps de gélification de la SAB, cet effet étant dépendant de la concentration en protéines et de la température. Pour les gels de SAB 8 %, l'addition d'ions sodium, à pH 6,6, diminuait le temps de gélification jusqu'à un minimum, suggérant une diminution des interactions électrostatiques entre les ions Na^+ et la protéine. Aux plus fortes concentrations en SAB, soit 15 %, cet effet était moins marqué, l'écrantage des charges par les ions ajoutés serait moindre. Les auteurs ont montré que la température de gélification diminuait également avec l'addition de sel et ceci de façon plus prononcée pour les faibles concentrations en SAB.

Matsudomi *et al*. (1991) ont montré que l'ajout de NaCl (0 jusqu'à 400 mM) à la SAB (4 %, pH 8, traitement thermique 90 °C, 15 min) n'affectait pas la force des gels mesurée pour une compression de 70 % alors qu'une augmentation de la concentration en $CaCl_2$ de 2 à 5 mM se traduisait par la formation de gels clairs et par un renforcement du gel par rapport à celui formé en absence de sel. Pour des concentrations en $CaCl_2$ supérieures à 10 mM, le gel

devenait opaque et moins rigide. Le même comportement a été mis en évidence par Yasuda *et al.* (1986) sur des gels de SAB (4,5 %) à des pH supérieurs au pHi en présence de $CaCl_2$ (force ionique totale ajustée à 100 mM). Les auteurs ont attribué le renforcement du gel à des interactions ioniques spécifiques entre les ions calcium et les groupements négatifs de la protéine de façon analogue au comportement de la *b*-Lg (détaillée plus loin). Au-delà d'une concentration seuil en $CaCl_2$, ces liaisons seraient en excès et la matrice protéique s'effondre donnant un coagulum (Mulvihill & Kinsella, 1988).

L'effet combiné de la présence de NaCl (100 mM) et de différents ions métalliques, apportés par $CuSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ et $MgSO_4$ (5 mM), sur la microstructure des gels de SAB (5 %, pH 7, obtenu après chauffage de 15 min à 90°C) a été étudié récemment par Haque & Aryana (2002). La technique utilisée était la microscopie électronique à balayage (Figure I.10). La présence des ions métalliques s'est traduite par un changement de structure de la matrice protéique observée en milieu NaCl uniquement. En présence de Mg^{2+}, la matrice était plus compacte alors qu'en présence des autres ions, la taille des agrégats était modifiée et des zones larges dépourvues de protéines étaient mises en évidence.

Figure I.10 Observations en microscopie électronique à balayage de gels de SAB (5 %) (**A**) en présence de $CuSO_4$ (**B**), $FeSO_4$ (**C**), $ZnSO_4$ (**D**) ou $MgSO_4$ (**E**) 4mM dans NaCl 100 mM à pH 7. Barre d'échelle 2 μm. D'après Aryana (2002).



D'une manière générale, il s'avère évident que la nature et la concentration des ions seuls ou en mélange affectent les propriétés des gels de SAB. De fait, une étude approfondie et systématique de ces paramètres serait nécessaire.

I.1.2.4 La β-Lactoglobuline

- *Origine et Utilisation:*

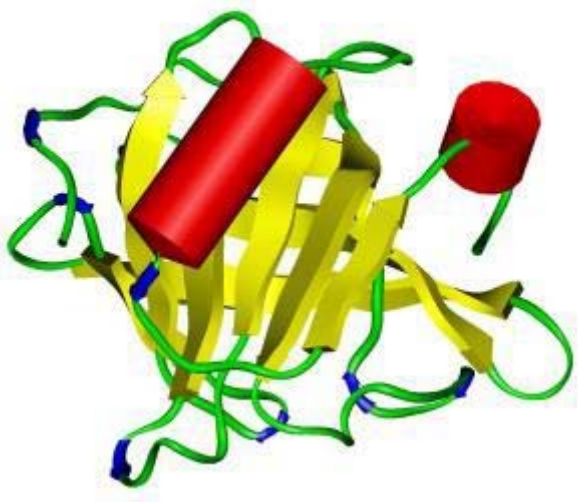
La β-Lactoglobuline (β-Lg) est présente dans le lait des mammifères, à l'exception des primates et des rongeurs. Dans le lait de vache, sa concentration varie entre 2 et 4 $g.L^{-1}$, c'est la protéine sérique majeure. Bien que le rôle physiologique de cette protéine n'ait pas encore été bien précisé, les nombreuses expériences *in vitro* montrent que cette protéine interagit fortement avec de petites molécules hydrophobes, telles que les rétinoïdes, les acides gras et leurs dérivés et les molécules polycycliques. D'un point de vue industriel, cette protéine a été largement utilisée en nutrition animale et, actuellement, elle suscite un intérêt dans le domaine alimentaire, en particulier dans les produits allégés en matière grasse ou encore des crèmes glacées (Cayot & Lorient, 1998).

- *Structure:*

La séquence primaire de la β-Lg bovine comporte 162 acides aminés pour une masse molaire calculée de 18,6 $kg.mol^{-1}$. Elle possède deux ponts disulfures et un groupement sulfhydryle libre. On dénombre sept variants génétiques, parmi lesquels les plus fréquents sont les variants A et B qui diffèrent seulement par la nature de deux résidus et se rencontrent dans des proportions voisines (Cayot & Lorient, 1998).

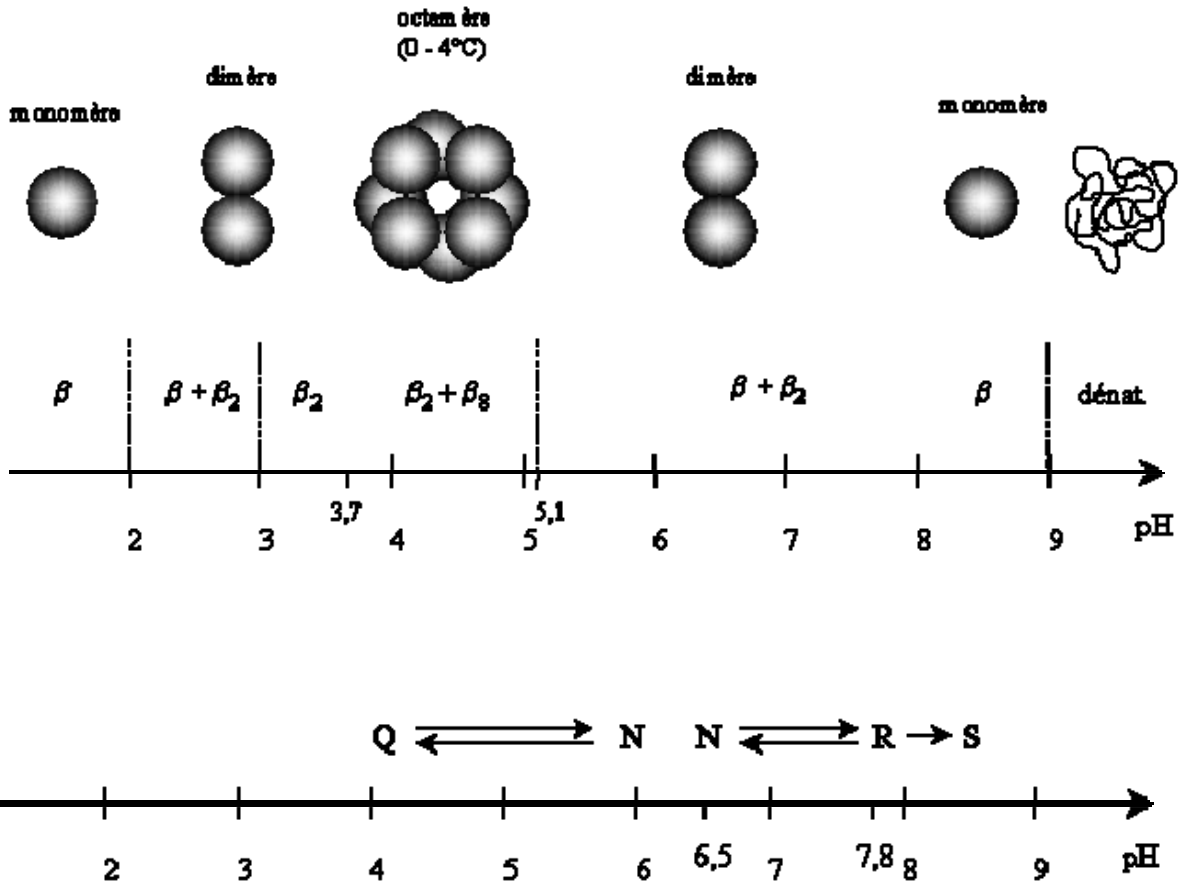
La β-Lg contient 10 % d'hélices a, 50 % de feuillets b ; 8 % de coudes β et 35 % de régions désordonnées (Qi *et al.*, 1997). La structure tertiaire de la β-Lg, native et complexée, a été résolue en RMN et diffraction des rayons X jusqu'à 1,8 Å par Brownlow *et al.* (1997). La protéine présente une structure en calice lui conférant son appartenance à la famille des lipocalines. Le monomère de dimension 43*40 Å est formé par neuf feuillets b anti-parallèles enroulés (Figure I.11) dont huit forment le cœur de la molécule.

Figure I.11 Structure tridimensionnelle du monomère de la *β*-Lg d'après Brownlow *et al.* (1997). Les hélices *α* sont représentées par des cylindres, les feuillets *β* par des flèches rectangulaires et les zones désordonnées par des traits fins (code correspondant dans la Protein Data Bank: 1beb.pdb (http://www.rcsb.org/pdb/)).



La *b*-Lg présente une large gamme de structures quaternaires traduites par différents stades d'oligomérisation en fonction du pH du milieu. La concentration en protéines, la force ionique et la température peuvent modifier les proportions entre les différents oligomères en présence. Un certain nombre de changements conformationnels réversibles de faible ampleur accompagne l'oligomérisation de la protéine lorsque l'on augmente ou que l'on diminue le pH (Ananthanarayananan *et al.*, 1977) et il a été possible d'établir par RMN les différents degrés d'association des monomères de la *b*-Lg (Figure I.12a) (Hambling *et al.*, 1992).

Figure I.12 a. États multimériques de la *β*-Lg en fonction du pH. D'après Hambling *et al.* (1992). Selon le pH, les monomères (*β)* s'associent par deux (β_2) ou par huit (β_8) et pour des pH extrêmes la protéine est dénaturée (dénat.).
Figure I.12 b. Transitions conformationnelles de la *β*-Lg en fonction du pH. La déscription des conformations Q, N, R, S se trouve dans le texte. D'après Hambling *et al.* (1992).



- De pH 3 à pH 7,5, à température ambiante, la *b*-Lg existerait sous la forme d'un ensemble dimérique à l'aspect pseudo-cyclique pour une diamètre de 3,6 nm et une hauteur de 6,93 nm (Timasheff & Townend, 1964). L'implication de liaisons hydrogène entre groupements carboxyles serait à l'origine de cette structure (Creamer *et al.*, 1983). Cependant, à basse température (0-4 °C) entre pH 3,7 et 5,1 et pour une concentration supérieure à 1,5 %, le dimère se tétramérise pour former un octamère (Townend *et al.*, 1960).

- Si le pH augmente en delà de 7,5 ou diminue au deçà de 2, les dimères de la *b*-Lg se dissocient en monomères. Cette monomérisation serait due à l'augmentation de la charge nette de la protéine, du fait des forces électrostatiques répulsives. Il s'effectue sans changement majeur de conformation (Swaisgood, 1982).

- Pour des pH extrêmes (pH >9), la protéine est dénaturée.

En outre, la dissociation dimère/monomère s'accompagne de changements conformationnels réversibles de faible ampleur (Figure I.12b). Un premier changement survient entre pH 4 et 6, appelé transition QN. Il se traduit par une augmentation de coefficient du sédimentation et est lié à la contraction de la protéine (Timasheff *et al.*, 1966b). Entre pH 6,5 et 7,8, un deuxième

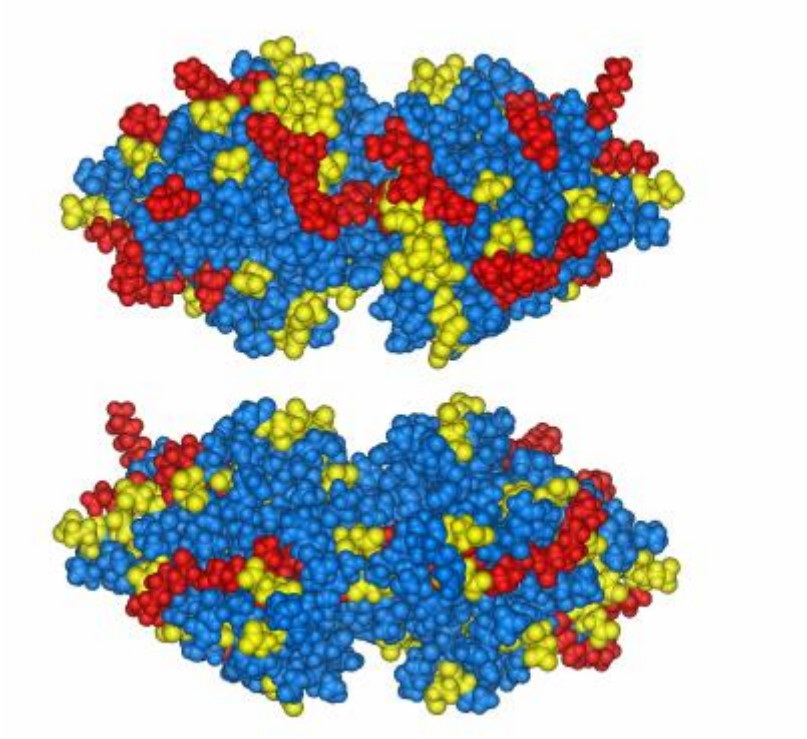
changement, désigné sous le nom de transition NR, a lieu. Il se traduit par une diminution du coefficient de sédimentation, lié probablement à une expansion du volume ou à une variation de forme de la protéine (Timasheff et al., 1966b). A partir de pH 8, un troisième changement conformationnel a lieu (RS) mais de plus faible ampleur, se traduisant par la dissociation du dimère, la valeur du coefficient de sédimentation étant en accord avec une structure monomérique. Ce changement serait suivi d'une dénaturation lente et irréversible du monomère conduisant à une agrégation.

- *Propriétés physico-chimiques*

- Charge:

Le point isoélectrique de la *b*-Lg est de 5,2. A pH 7, la charge nette de la protéine a été évaluée à 7,8 (Renard & Lefebvre, 1992) La répartition des charges au niveau du dimère représentée selon différentes vues sur la Figure I.13, montre que celle-ci est homogène.

Figure I.13 Répartition des charges sur la *β*-Lg à pH 7 (structure tridemensionnelle). En jaune les acides aminés chargés négativement (asparagine, acide glutamique); en rouge les acides aminés chargés positivement (histidine, lysine, arginine); en bleu les zones neutres (issue des données de la Protein Data Bank, source détaillée sur la Figure I.11).

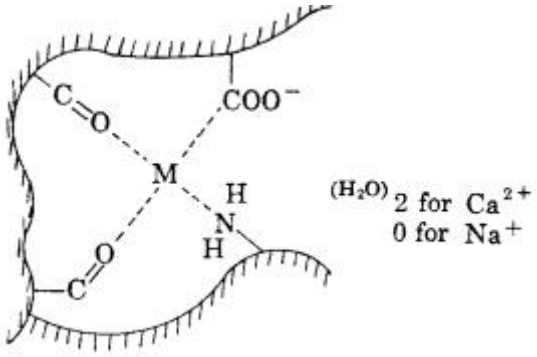


- Fixation des ions:

Le point isoélectrique de la *b*-Lg diminue en présence de KCl, NaCl ou $CaCl_2$, suggérant une affinité spécifique pour les cations, K^+, Na^+ ou Ca^{2+} par l'intermédiaire des groupements carboxylates de la protéine (Tanford *et al.*, 1959). Au-dessus du point isoélectrique le nombre d'ions Na^+ fixés par la protéine, varie de 0 à 2, notamment lorsque le pH augmente de 6 à 9 (Powell Baker & Saroff, 1965).

L'étude des interactions entre la *b*-Lg et plusieurs cations, à différents pH (6,5, 5,5 et 5) et à trois valeurs de forces ioniques, a montré que l'affinité de la protéine est plus élevée pour Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+} que pour Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} (Baumy & Brulé, 1988). La stœchiométrie des complexes est toujours de 1/1 et l'affinité de la protéine pour les minéraux diminue avec le pH ou lorsque la force ionique augmente. En supposant que le même site de fixation existe pour les ions calcium et sodium, Powell Baker & Saroff (1965) ont proposé une coordination tétradendate selon la Figure I.14. Le site de fixation du calcium se situerait au niveau du fragment peptidique Val43-Leu57. La constante de dissociation (Kd) du complexe *b*-Lg/calcium a été estimée à 3 mM (Dufour *et al.*, 1994).

Figure I.14 Modèle de fixation du calcium et du sodium (l'ion étant symbolisé par la lettre M) proposé par Powell-Baker *et al.* (1965).



Par ailleurs des études de la cinétique d'hydrolyse de la protéine par la thermolysine ont mis en évidence que la fixation du calcium induisait des changements de conformation de la protéine (Dufour *et al.*, 1994). Ceci a également été mis en évidence par Jeyarajah & Allen (1994) qui ont montré que la réactivité des groupes sulfhydryles de la *b*-Lg s'accroît quand la teneur en calcium augmente (dans la gamme 1-15 mM, pH 8). Ce résultat serait probablement lié à la formation de ponts intramoléculaires entre les groupes chargés de la protéine et le calcium, induisant de petits changements de conformation. En outre, l'hydrophobie augmentant parallèlement, la présence de calcium favoriserait celle-ci et la formation de ponts

disulfures. Le chlorure de sodium n'aurait en revanche aucun effet sur la réactivité du groupe sulfhydryle.

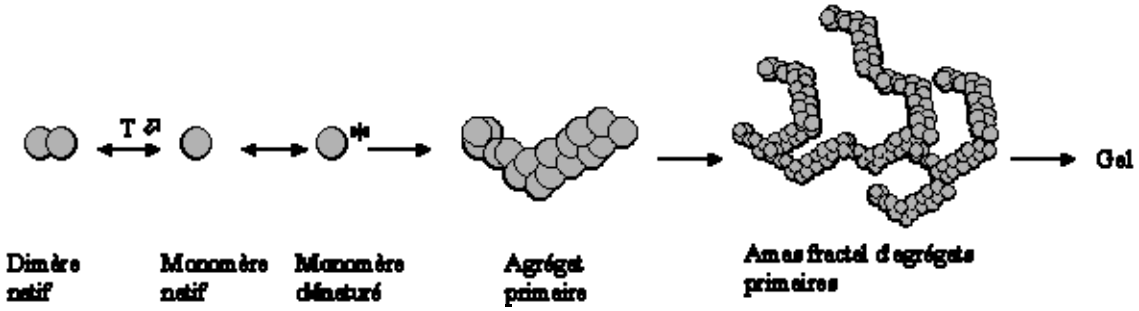
- *Gélification thermique de la b-Lg*

- Structure et propriétés mécaniques des gels de *b*-Lg

La gélification thermique de la *β*-lg est un processus assez complexe qui dépend notamment du pH. Nous limiterons cette partie à la gélification à pH > pHi.

Lorsqu'une solution de *β*-lg à pH > 6 est chauffée de 50 à 80°C, une dissociation des dimères s'opère, provoquant une exposition accrue du groupement sulfhydryle libre. Ce groupe est très réactif dans ce domaine de pH (Kella & Kinsella, 1988). Ainsi, au-delà de 70°C et à pH 7, une dénaturation irréversible apparaît, conduisant à l'agrégation de la protéine. Un schéma détaillé des étapes de la formation d'un gel de *b*-Lg à pH 7 dans NaCl 100 mM a été établi et est présenté sur la Figure I.15 (Gimel *et al.*, 1994; Aymard *et al.*, 1996).

Figure I.15. Représentation schématique de la formation d'un gel de *β*-Lg à pH 7 dans NaCl 100 mM. D'après Aymard *et al* (1996).



A température ambiante et à pH 7, la *β*-Lg est présente principalement sous forme de dimère en équilibre avec un petite fraction de monomères. En augmentant la température, cet équilibre se déplace vers le monomère dont la capacité à avoir une structure dénaturée augmente. Les monomères dénaturés s'associent alors pour former des agrégats contenant environ 100 monomères. Ceux-ci posséderaient un rayon hydrodynamique de 10 à 15 nm quelles que soient les conditions de température, de force ionique ou de concentration en protéine (Aymard et al., 1996). Par ailleurs, la formation de ponts disulfures ne serait pas à l'origine de la formation de ces agrégats, ceux-ci résulteraient plutôt d'un réarrangement interne, intervenant après une liaison non spécifique et dû à des interactions hydrophobes. Dans une phase ultérieure, ces agrégats, dits primaires, s'associeraient de façon à former un

amas polydisperse ayant une structure fractale caractérisée par une dimension fractale égale à 2 qui diminue légèrement pour des forces ioniques plus basses (Baussay *et al.*, 2003).

La structure des gels a été étudiée par diffusion des neutrons (Renard *et al.*, 1995) et diffusion de la lumière (Pouzot *et al.*, 2004a; 2004b). Lorsque le pH est suffisamment éloigné du point isoélectrique de la protéine (Stading & Hermansson, 1990) et dans des conditions de fortes répulsions électrostatiques, les gels obtenus sont de type filamenteux. Ces gels se caractérisent par un aspect translucide à faible concentration en protéines.

Les propriétés rhéologiques des gels de *β*-Lg ont également fait l'objet de nombreuses études (Renard, 1994; Le Bon *et al.*, 1999a, 1999b; Pouzot *et al.*, 2004a, par exemple). Globalement les mêmes conclusions que pour la SAB peuvent être données sur les facteurs contrôlant la gélification de *β*-Lg. Toutefois les limites de concentration, de température, de pH permettant la formation d'un gel varient selon la nature de la protéine (Hegg, 1982; Paulsson *et al.*, 1986; Hines & Foegeding, 1993).

- *Influence de la nature des ions présents dans le milieu sur la gélification de la b-Lg*

Comme pour la SAB, l'environnement minéral est un des paramètres importants qui agit directement sur les étapes de dénaturation et d'agrégation de la protéine au cours du traitement thermique. Le chlorure de sodium semble avoir deux effets opposés sur la dénaturation et l'agrégation de la *b*-Lg: il aurait un effet protecteur vis-à-vis de la dénaturation en augmentant la température de dénaturation ce qui ralentirait alors l'étape de dissociation des dimères en monomères ayant lieu au cours de la première étape d'agrégation (Renard *et al.*, 1998a).

Pouzot *et al.* (2004b) ont montré que, suite à un traitement thermique intensif (80°C, 24 h) et pour des concentrations en NaCl inférieures à 50 mM, des gels filamenteux transparents se formaient pour des concentrations en protéines allant jusqu'à 12 %. Pour de plus fortes concentrations en sels, la turbidité des systèmes augmentait rapidement et les gels ont été caractérisés par une longueur de corrélation caractéristique au-delà de laquelle le système est homogène. Cette longueur diminuait en augmentant la concentration en protéines et en diminuant la concentration en sels. Pour des concentrations en NaCl supérieures à 200 mM, le système devenait hétérogène et opaque mettant en évidence la formation d'une structure de

type coagulum.

Contrairement au chlorure de sodium, les changements de conformation de la protéine induits par l'addition de $CaCl_2$ décrits précédemment, favoriseraient la dénaturation de la protéine mais augmenteraient aussi la cinétique de formation des agrégats (Jeyarajah & Allen, 1994; Foegeding *et al.*, 1994). Il a été en effet montré que, lorsque l'on ajoute du calcium après le chauffage, l'agrégation est plus faible que celle obtenue quand la même quantité de calcium est ajoutée avant le chauffage de la solution protéique (De Wit,1981).

Foegeding *et al.*, (1992) ont montré que des solutions de *b*-Lg (7 %, pH 7) gélifiaient plus vite en présence de 20 mM de $CaCl_2$ qu'en présence de NaCl. Les mesures rhéologiques ont montré que les gels obtenus en présence de $CaCl_2$ étaient plus faibles qu'en présence de NaCl et que ceux obtenus à partir du mélange NaCl/$CaCl_2$ étaient encore plus faibles. Ces résultats supposent que les interactions entre la protéine et les ions Na^+ et Ca^{2+} sont de natures différentes. De même que pour la SAB, il a été montré qu'une concentration optimale en sels existait au-delà de laquelle la fermeté des gels de *b*-Lg diminuait. Cette concentration optimale a été évaluée à 2 mM en $CaCl_2$ contre 20 mM en NaCl pour des gels de *b*-Lg 5 % à pH 8 (Matsudomi *et al*., 1991) et à 10 mM en $CaCl_2$ et 200 mM en NaCl pour des gels de *b*-Lg 10 % % à pH 8 (Mulvihill & Donovan, 1987).

En comparaison de la SAB, les concentrations optimales déterminées provoquant un renforcement des gels diffèrent. En outre un changement de conformation de la *b*-Lg induit par la présence de calcium semble jouer sur les mécanismes de dénaturation et d'agrégation ce qui n'est pas le cas avec la SAB. En clair, il apparaît intéressant d'approfondir les connaissances sur l'effet des ions séparément et en mélange sur ces deux protéines.

I.2 Les mélanges de biopolymères

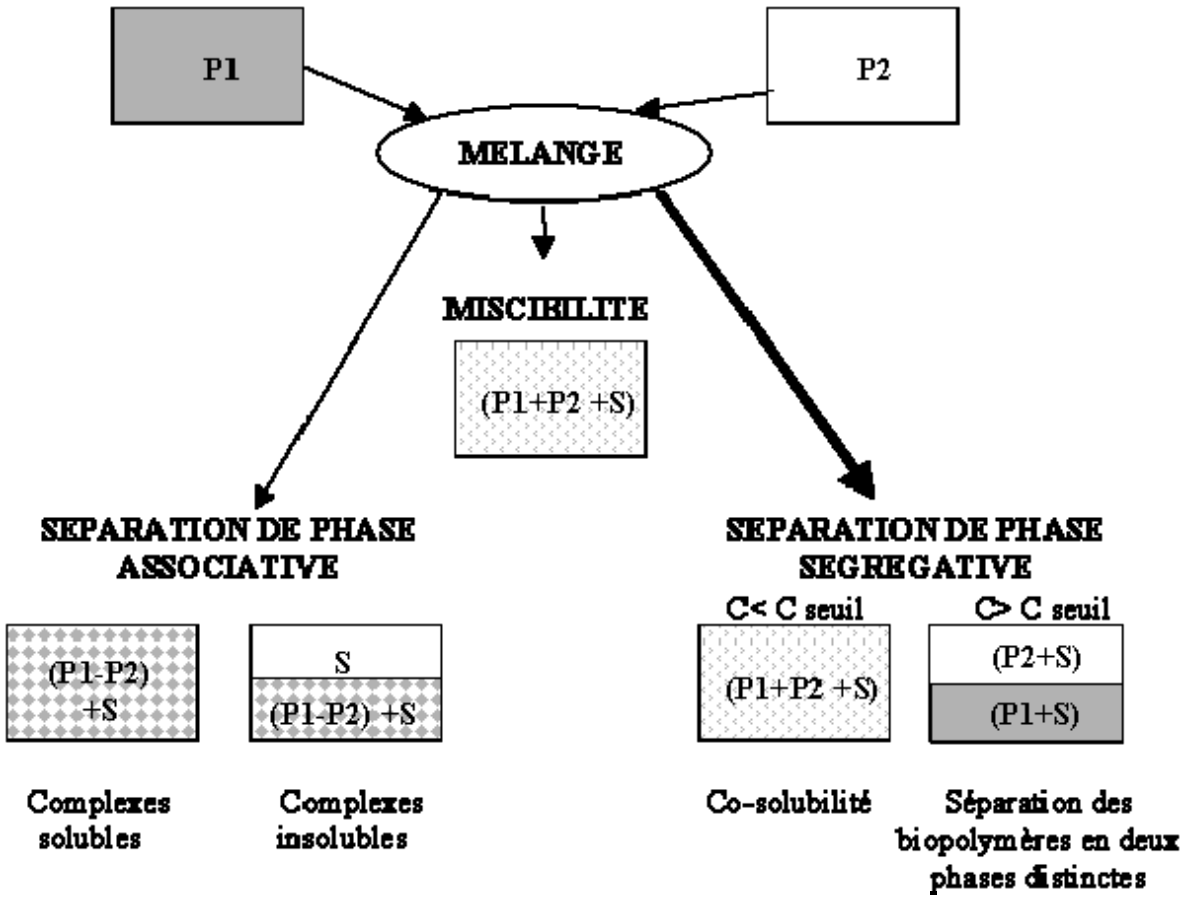
I.2.1 Stabilité des mélanges de biopolymères

1.2.1.1 Description qualitative de la stabilité des mélanges

Les bases thermodynamiques qui déterminent le comportement des mélanges de biopolymères en milieu aqueux sont les mêmes que celles des mélanges de polymères synthétiques en milieu solvant. Il n'y a pas de différence fondamentale entre les deux.

Une représentation schématique du comportement de polymères P1 et P2 en mélange en milieux aqueux est donnée en Figure I.16 (Tolstoguzov, 1991; Piculell & Lindman, 1992). On distingue deux types de comportements :

Figure I.16. Comportement des mélanges de polymères en solution d'après Picullell & Lindman (1992) adapté pour les mélanges de biopolymères de Toltstoguzov (1991).



-La miscibilité totale: Un milieu homogène stable est observé, les deux polymères étant des co-solutés « indifférents » l'un par rapport à l'autre. Cette situation peut avoir lieu lorsque le système est très dilué (Tolstoguzov, 1991; Syrbe *et al.*, 1998) mais reste assez rare (Scott, 1949).

-La séparation de phase: dans ce cas, les polymères se répartissent inégalement dans le mélange et deux phases coexistent au sein du système. La séparation de phase peut être «associative» ou «ségrégative». Les phénomènes de démixtion des mélanges dépendent fortement de la nature des interactions existantes entre les biopolymères. Les interactions attractives peuvent être spécifiques (liaisons ioniques) ou non spécifiques (liaisons de van der Waals, liaisons hydrogène, hydrophobe, ioniques) (Dickinson & Mc Clements, 1995). Les interactions répulsives, non spécifiques, peuvent être de nature électrostatique et/ou lié à un mécanisme d'exclusion de volume.

La séparation de phase associative ou «coacervation complexe» se traduit par une séparation de deux phases liquides, les deux polymères étant concentrés dans la même phase, alors que l'autre phase contient essentiellement le solvant. Elle se traduit par la formation de complexes solubles ou insolubles qui peuvent précipiter. Ce type de séparation de phase se produit généralement au sein d'un mélange de polyélectrolytes portant des charges nettes de signes opposées comme par exemple une protéine (à un pH inférieur à son point isoélectrique) et un polyoside anionique. Les complexes solubles résultent de l'attraction de deux polymères portant des charges opposées en nombre différent. La charge nette résultante du complexe formé induit une certaine stabilité du système sous forme colloïdale. Lorsque le nombre de charges portées par les deux polymères sont égales, un complexe insoluble neutre se forme (Schmitt *et al.*, 1998).

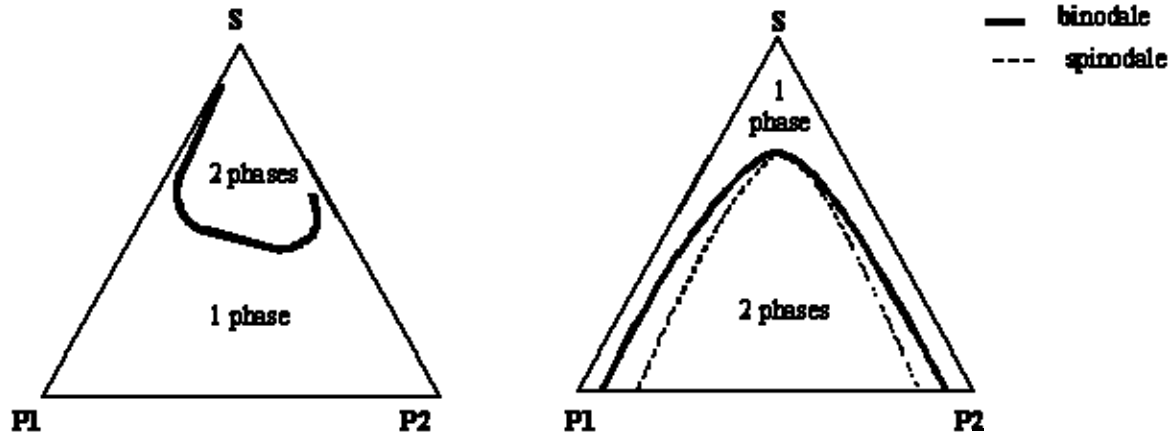
La séparation de phase «ségrégative» est un cas couramment rencontré dans les mélanges de biopolymères. Dans la revue de Grinberg & Tolstoguzov (1997), une centaine de mélanges protéines (gélatine, protéines de soja, caséine, SAB, ovalbumine)/polyosides (anioniques ou pas) sont présentés et la majorité d'entre eux sont décrits comme incompatibles thermodynamiquement. Chacune des deux phases formées est enrichie en l'un des polymères, le solvant étant réparti entre les deux. A l'équilibre thermodynamique, chaque phase contient majoritairement un des deux polymères et une quantité plus faible de l'autre polymère. Si dans de nombreux cas, la séparation des deux phases est observée au niveau macroscopique, dans

certains cas on peut constater une pseudo-stabilité qui conduit à l'obtention de systèmes qui ont été décrits comme étant des émulsions eau-dans-eau (Tolstoguzov, 1995).

1.2.1.2 Diagrammes de phase

A l'équilibre thermodynamique, les mélanges de polymères peuvent être décrits par leur diagramme de phase (Albertsson, 1962; Tolstoguzov, 1991). Deux diagrammes de phase en représentation triangulaire, relatifs à des systèmes respectivement associatifs et ségrégatifs, sont montrés sur la Figure I.17.

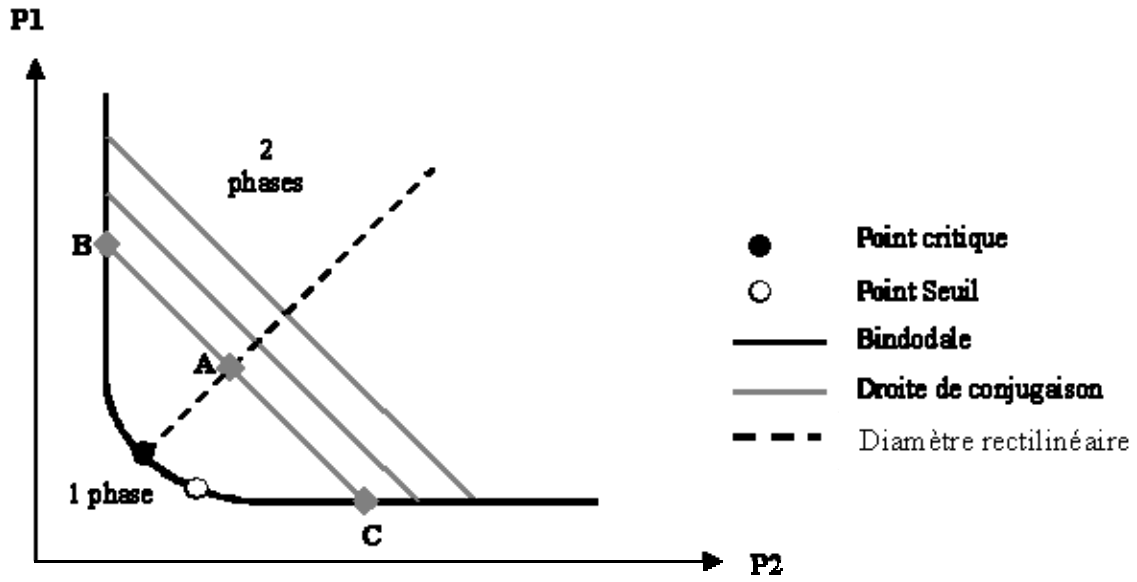
Figure I.17 Représentation schématique d'un diagramme de phase de type associatif (**a**) et ségrégatif (**b**) en coordonnées triangulaire d'un mélange polymère 1 (P1)/polymère 2 (P2)/solvant (S).



a. **b.**

Chaque sommet du triangle représente le composé pur et le solvant, les côtés du triangle correspondent aux systèmes binaires. L'ensemble des points situés à l'intérieur du triangle représente toutes les combinaisons de mélanges possibles. Puisque le solvant est le constituant majoritaire, il est plus courant de représenter le diagramme de phase en coordonnées cartésiennes. La Figure I.18 correspond au diagramme de phase d'un mélange ternaire de type ségrégatif.

Figure I.18. Représentation schématique d'un diagramme de phase de type ségrégatif en coordonnées cartésiennes d'un mélange polymère 1 (P1)/polymère 2 (P2)/solvant (S).



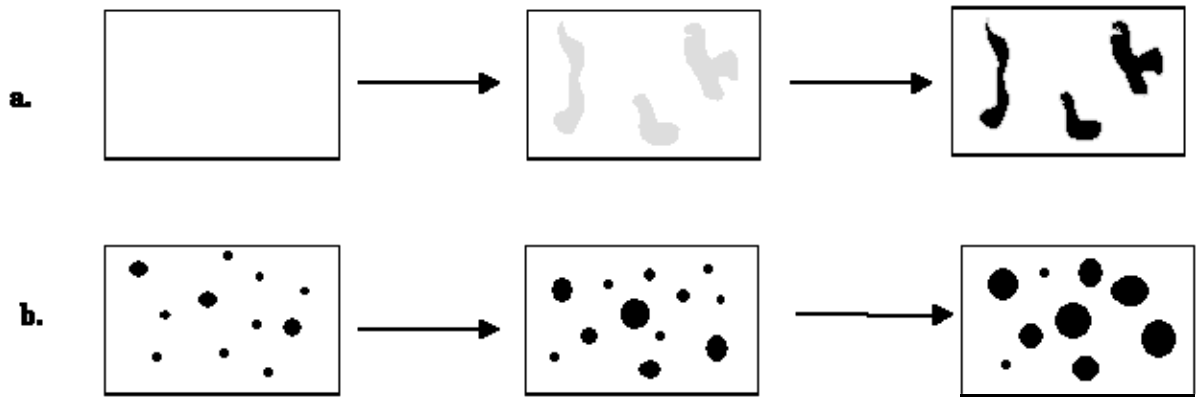
La courbe qui sépare la région monophasique de la zone biphasique est la binodale. Chaque point situé à l'intérieur de la binodale (par exemple le point A sur la Figure I.18) donne lieu à une séparation de phase. Les compositions des phases qui en résultent (points B et C) sont situées à l'intersection de la binodale et d'une droite qui passe par le point A, la droite de conjugaison. Tous les mélanges situés sur une même droite de conjugaison conduisent à des phases de mêmes compositions, mais avec des volumes différents (le rapport AB/AC correspondant au rapport des volumes des phases). Le diamètre rectilinéaire joint les milieux des droites de conjugaison. Il représente les mélanges se séparant en deux phases de même volume. Le point critique correspond à l'intersection entre la binodale et le diamètre rectilinéaire et donne la composition du mélange démixant théoriquement en deux phases de même composition et de même volume. Le point seuil exprime la concentration minimale totale en polymères conduisant à la séparation de phase.

1.2.1.3 Aspects cinétiques de la séparation de phase

A l'intérieur de la zone d'incompatibilité du mélange définie par la binodale sur le diagramme de phase, une autre courbe, appelée la spinodale (Figure I.17) délimite deux zones

où la séparation de phase s'effectue selon deux processus différents selon la composition du mélange (Figure I.19).

Figure I.19 Représentation schématique du mécanisme de décomposition spinodale (**a**) et de nucléation et croissance (**b**). D'après Syrbe (1997).



- A l'intérieur de la spinodale, le système est instable. De petites fluctuations de concentrations entraînent la formation de zones de tailles identiques et périodiquement espacées. Ce processus est rapide. La séparation de phase se fait selon le processus dit de «décomposition spinodale» (Figure I.19a). Les zones formées vont se concentrer sans évolution de taille (Cahn, 1965).

- Dans la zone située entre la binodale et la spinodale, le système est métastable. De petites fluctuations de concentrations entraînent l'augmentation de taille de certaines régions selon une distribution statistique. Afin de compenser l'état thermodynamiquement instable du système une interface se forme sous forme de gouttelettes appelées 'noyau'. Ce noyau grossit de façon aléatoire. Le processus est lent et la séparation de phase se fait selon le mécanisme dit de «nucléation et croissance» (Figure I.19b). Les fluctuations de concentration doivent avoir une certaine taille et une certaine amplitude pour pouvoir subsister. Seules ces zones vont pouvoir croître en taille alors que les autres disparaissent (Cahn, 1965).

Selon le mécanisme, les structure intermédiaires peuvent être différentes mais la structure finale peut être identique. D'un point de vue pratique si la séparation de phase est «bloquée» au niveau de ces étapes intermédiaires par exemple, par un phénomène de gélification, il est alors possible d'obtenir des structures très variées (Syrbe, 1997; Turgeon *et al.*, 2003).

Dans le cadre de notre étude, nous avons porté notre attention plus particulièrement aux systèmes présentant une séparation de phase ségrégative. Dans la majorité des mélanges de biopolymères, la démixtion est liée soit à une incompatibilité thermodynamique entre les composants, soit à des mécanismes de déplétion-floculation pour les particules colloïdales en présence de polymères.

1.2.2 L'incompatibilité thermodynamique

1.2.2.1 Approche théorique

D'une manière générale, lorsque l'on souhaite mélanger plusieurs composants, le second principe de la thermodynamique indique que ces espèces sont miscibles si l'énergie libre de mélange (ΔG) est minimale avec :

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \qquad \textit{Equation I.2}$$

Avec ΔH_m et ΔS_m , respectivement, l'enthalpie et l'entropie du mélange, et T la température.

Dans le cas d'une solution idéale les forces intermoléculaires (responsables du terme ΔH_m) sont négligées devant la contribution entropique (responsables du terme $-T\Delta S_m$).

Pour décrire une solution réelle de polymère, Flory (1942) et Huggins (1942) se sont inspirés du modèle de la solution idéale, après avoir posé un certain nombre d'hypothèses assez restrictives (limitation de la flexibilité des polymères, absence de ramification et de polydispersité, interactions à courtes distances majoritaires-comme les liaisons hydrogène et les forces de van der Waals). Ces hypothèses posées, un terme enthalpique est rajouté à l'expression ΔG_m pour exprimer l'écart à l'idéalité. Il est décrit par le paramètre sans dimension de Flory-Huggins (ψ_{12}) qui rend compte des interactions entre le solvant S1 et le polymère P2. Lorsque $\psi_{12} < 0,5$ (valeur critique correspondant à un mauvais solvant) le système est miscible, lorsque $\psi_{12} > 0,5$ une séparation de phase a lieu.

Dans le cas d'un mélange de deux polymères P2 et P3, en plus des paramètres ψ_{12} et ψ_{13} relatifs aux interactions polymère/solvant, un paramètre d'interaction croisé polymère /polymère noté ψ_{23} intervient et reflète l'affinité entre les polymères. Une discussion selon les valeurs de ces paramètres permet alors de déterminer si le mélange est miscible ou si une

séparation de phase de type associatif ($\psi_{23} < 0$) ou ségrégatif ($\psi_{23} > 0$) a lieu. Dans le cas d'un mélange protéine/polyoside, ce modèle serait applicable si la protéine présentait des caractéristiques proches de celle d'un polyoside (comme la gélatine). Or pour un système contenant une molécule semi-flexible ou repliée comme les protéines globulaires, cette théorie reste une approximation.

Un autre modèle fréquemment envisagé est basé sur le développement du viriel (Edmond & Ogston, 1968). Les seconds coefficients du viriel relatifs au polyoside ($A_{2\ polyos.}$) et à la protéine ($A_{2\ prot.}$) reflètent les interactions entre biopolymère et solvant. A partir du second coefficient du viriel croisé pour le mélange polyoside/protéine ($A_{2\ polyos.-prot.}$), il est possible d'estimer si le système est compatible ou incompatible. La séparation de phase se produit lorsque $|A_{2\ polyos-prot}{}^{2}| > |A_{2\ polyos.} * A_{2\ prot.}|$. Ces variations peuvent être interprétées de la même manière que la paramètre de Flory-Huggins $\psi_{proteine-polyoside}$ caractérisant les interactions entre protéines et polyosides (Grinberg & Tolstoguzov, 1997). Une valeur positive de $A_{2\ polyos.-prot.}$ traduit une séparation de phase ségrégative entre biopolymères alors qu'une valeur négative traduit la formation d'un complexe. Quelques tentatives de description théorique sur des bases thermodynamiques du comportement de phase dans le cas de mélanges de biopolymères ont été réalisées (Semenova & Savilova, 1998; Clark, 2000; Simonet *et al.*, 2002). Il faut cependant noter que très peu d'entre elles concernent les mélanges protéines globulaires et les polyosides.

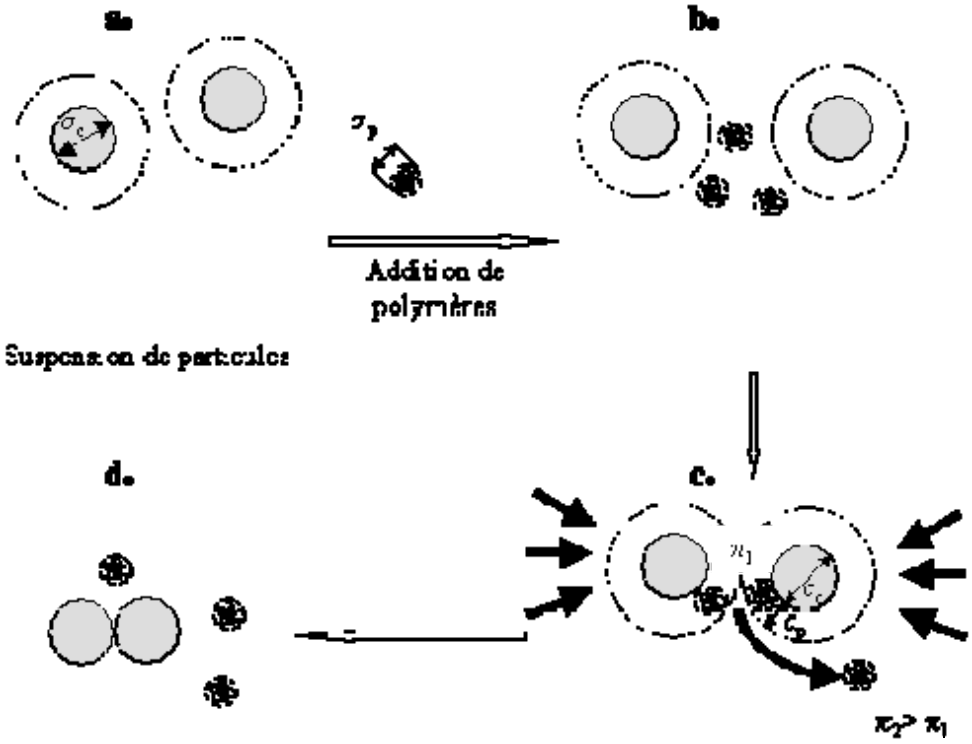
1.2.2.2 Influence des paramètres intrinsèques et extrinsèques au système

La masse molaire des biopolymères, la force ionique, le pH, la température sont autant de facteurs qui jouent un rôle dans le comportement de phase des mélanges de biopolymères. Une augmentation de la masse molaire de l'un des composants se traduit par un domaine d'incompatibilité plus important. L'effet de la force ionique et du pH dépend de la charge des polymères présents (Piculell *et al.*, 1994). La température affecte généralement les propriétés structurales des polymères et de ce fait peut modifier le comportement de phase des mélanges. Dans le cas de mélanges où des protéines globulaires sont impliquées, la dénaturation et l'agrégation protéique conduit à des systèmes de types particules colloïdales -polymères dans lesquels des interactions de types déplétion-floculation peuvent alors avoir lieu.

I.2.3 Les interactions de déplétion-floculation

Ces interactions, d'origine entropique, ont été décrites pour la première fois par Asakura & Oosawa (1954) qui ont considéré sur des bases théoriques des particules sphériques en suspension colloïdales dans une solution de polymères de taille plus petite et non adsorbants (Asakura & Oosawa, 1954, 1958). Ce mécanisme permet d'expliquer comment une suspension de particules (de diamètre σ_c) peut être floculée lorsqu'un polymère (assimilable à une sphère de rayon égal à son rayon de giration, soit un diamètre σ_p) est ajouté au milieu (Figure I.20a). Si le volume disponible entre deux particules est inférieur à celui occupé par le polymère (Figure I.20b) c'est à dire lorsque deux particules sont séparées d'une distance centre à centre inférieure à ($\sigma_p + \sigma_c$), l'espace entre les deux sphères n'est plus accessible au polymère (Figure I.20c). Cet espace, défini par σ_p, correspond à la couche dite de déplétion. L'apparition de ce volume exclu dans lequel la pression osmotique π_1 est inférieure à celle du reste de la solution π_2 entraîne une force d'attraction des deux particules (Figure I.20d). La description théorique de ce mécanisme a été réalisée en estimant le potentiel d'interaction entre particules, somme des potentiels individuels liés aux forces de van der Waals, aux forces électrostatiques, aux forces stériques et aux forces osmotiques induites par la déplétion.

Figure I.20 Représentation schématique du processus de déplétion-floculation: la différence de pression osmotique induit l'exclusion du polymère et entraîne la floculation des particules. D'après Asakura et Oosawa (1954, 1958). La description des étapes (a, b, c, d) est faite dans le texte.



Les modèles proposés pour calculer ce potentiel d'interaction ne s'appliquent que dans le cas où le polymère ne s'adsorbe pas à la surface du colloïde et lorsque $\sigma_c \rangle \sigma_p$ (Vrij, 1976). Tuinier & de Kruif (1999) et Tuinier *et al.* (1999) ont appliqué ce modèle au cas des mélanges de caséine micellaire (σ_c ~200 nm) et d'un polyoside exocellulaire (EPS) (σ_p~172 nm) excrété par la bactérie *Lactococcus lactis.* Une assez bonne concordance entre le modèle et les résultats expérimentaux a été constatée bien que les polydispersités des caséines et du polyoside n'aient pas été prises en compte. La même approche a été appliquée par Wang *et al.* (2001) aux mélanges β-Lactoglobuline (σ_c~ 4 nm) /pullulane (σ_p ~ 13 nm) en faisant varier la teneur en sels et le pH du milieu.

Des divergences par rapport à la théorie apparaissent lorsque le rayon de giration du polymère s'approche du rayon des particules. Dans le cas où $\sigma_c \langle \sigma_p$, de Kruif & Tuinier (1999) ont validé la théorie de la déplétion-floculation dans le cas où des agrégats de protéines du lactosérum (σ_c ~ 27 nm) étaient mélangées avec un polyoside exocellulaire (σ_p~172 nm). Une séparation de phase de type ségrégative a été mise en évidence, l'attraction entre les protéines étant proportionnelle à la taille et la concentration en EPS. Lorsque les attractions entre protéines sont suffisamment fortes le système se sépare en deux phases selon un mécanisme

de décomposition spinodale. Dans un second temps, Tuinier *et al.* (2000) ont montré que l'épaisseur de la couche de déplétion était alors égale à ~ $\sigma_p/20$.

Verma *et al.* (2000) ont montré sur les mélanges composés de sphères dures de silice (σ_c ~ 1,25 μm) immergées dans une solution d'ADN de bactériophage λ non-adsorbant (σ_p ~ 16,5 μm), que le modèle proposé par Asakura-Oosawa pour le régime dilué reste valable en régime semi-dilué. Alors qu'en régime dilué, l'échelle de mesure des potentiels d'interaction dépend du rayon de giration du polymère ($\sigma_p/2$), en milieu semi-dilué c'est la longueur de corrélation du polymère (χ) qu'il faut prendre en compte. L'effet de déplétion serait accentué lorsque χ devient plus petit que $\sigma_p/2$. La solution de polymères enchevêtrés peut alors être considérée comme une solution athermique de polymères formant des sphères n'interagissant pas entre elles, de diamètre égal à $\pi\chi$, où π représente la valeur de la pression osmotique moyenne du système.

La mise en évidence des mécanismes de déplétion-floculation peut impliquer plusieurs types de méthodes dont la microscopie par la mise en évidence des changements structuraux lors de la séparation de phase mais aussi des mesures rhéologiques (Wolthers *et al.*, 1997; Bourriot *et al.*, 1999; Tanaka, 2000). Le concept de séparation de phase viscoélastique introduit par Tanaka (2000) s'appuie sur l'asymétrie dynamique entre les composants du mélange induite par la différence de tailles des polymères ou par la présence d'une transition sol-gel. La séparation de phase liée au mécanisme de déplétion-floculation induit une structuration du système par l'agrégation des particules entre elles qui se traduit par un changement des propriétés rhéologiques du système même s'il reste d'apparence homogène.

I.3 Les mélanges ségrégatifs Protéines globulaires/Polyosides

I.3.1 Etude des mélanges ségrégatifs protéine globulaire native/polyoside

Dans ce cas, le mélange est réalisé à température ambiante. L'incompatibilité thermodynamique des mélanges protéines/polyosides dépend de la nature des polyosides (chargés ou pas) et des facteurs du milieu.

D'une façon générale, Grinberg & Tolstoguzov (1997) ont montré que l'incompatibilité était le phénomène général. Elle est expliquée par une répulsion entre polyoside et protéine qui peut être interprétée en terme d'exclusion de volume (Laurent, 1963a; Laurent, 1963b).

Hoskins *et al.* (1996) ont décrit les systèmes protéine globulaire (SAB, γ-globuline ou lyzozyme)/dextrane ou HEC sur la base du mécanisme de déplétion-floculation. Le maximum d'immiscibilité est trouvé pour un pH proche du point isoélectrique. Syrbe *et al.* (1995) ont également montré que ce type de séparation de phase avait lieu dans une gamme étroite de pH (5-7) pour les mélanges protéines natives de lactosérum/dextrane (ou maltodextrine ou méthylcellulose). La concentration totale en biopolymère nécessaire à l'obtention de deux phases séparées était assez élevée, supérieure à 4 %, sans doute en raison du faible volume exclu des protéines globulaires.

Cette incompatibilité a également été mise en évidence à des échelles différentes. Une étude menée sur les mélanges SAB/polymère neutre (HEC) comparé avec un polymère chargé (CMC) en régime semi-dilué à pH 7 dans les conditions de concentrations correspondant à la zone monophasique du diagramme de phase, a montré par diffusion de neutrons aux petits angles et par des mesures rhéologiques, que le mélange présentait des hétérogénéités témoignant de la présence d'une amorce de séparation de phase par floculation, bien que l'on soit dans la zone de miscibilité à l'échelle macroscopique (Renard *et al.*, 1997). En présence du polyoside chargé, les interactions électrostatiques répulsives entre les polymères domineraient alors que dans le cas du polymère neutre ce seraient les interactions de déplétion des particules de SAB qui interviendraient. De même, Doublier *et al.* (1995) ont décrit le diagramme de phase de mélanges SAB/hydroxycellulose (HEC) et caractérisé les comportements rhéologiques dans la zone monophasique en supposant la formation d'une émulsion «eau-dans-eau» avec des gouttelettes riches en protéines dispersées dans la phase continue riche en polyosides.

Pour les mélanges globuline11S/dextrane (ou pectinate) (Semenova & Savilova, 1998) et β-Lg (ou Zéine ou SAB)/dextrane (Laurent, 1963a; 1963b), l'incompatibilité des systèmes a été interprétée après mesure des coefficients du viriel par la contribution des phénomènes d'exclusion de volume et des interactions électrostatiques, la présence du polyoside diminuant la solubilité des protéines du fait d'une exclusion stérique. Dans ces cas d'incompatibilité, la concentration totale en biopolymères nécessaire à l'obtention de deux phases séparées était supérieure à 5 %.

Le cas particulier de la compatibilité des mélanges protéines de lactosérum (12 %) et de polyosides de natures différentes (pectines HM, κ-carraghénanes, carboxyméthylcellulose (CMC), xanthane-2 %) à pH 8 (>pHi) a été montré par Syrbe *et al.* (1995). D'autres exemples de miscibilité assez proches du cadre de notre étude ont été montrés dans le cas des mélanges β-Lg /alginate (Dumay *et al.*, 1999), β-lg /pectine (Dumay *et al.*, 1999; Wang & Qvist, 2000), SAB/pectine (Imeson *et al.*, 1977; Takada & Nelson, 1983 ; Semenova *et al.*, 1991), SAB/alginate (Imeson *et al.*, 1977; Kelly *et al.*, 1994; Cai & Arntfield, 1997; Neiser *et al.*, 1998) à température ambiante et pour un pH> pHi. Plusieurs hypothèses ont été soumises pour expliquer cette compatibilité. Les deux polymères coexisteraient dans une seule phase bien que certains domaines d'un biopolymère excluent certains domaines de l'autre, entraînant ainsi des inhomogénéités locales dans la solution. La présence d'attractions locales électrostatiques entre des domaines spécifiques de la protéine chargée positivement (même à ce pH) et du polyoside a également été supposée (Imeson *et al.*, 1977). La coexistence des deux mécanismes précédents peut également être envisagée.

Semenova *et al.* (1991) ont suggéré toutefois que la compatibilité des systèmes pectine/SAB n'est pas de nature électrostatique. En effet sur la base des coefficients du viriel obtenus par diffusion de la lumière, les auteurs ont établi que la compatibilité du mélange SAB/pectine existait sur une large gamme de pH (5-8) et de force ionique (NaCl 100 mM à 1 M). Celle-ci disparaissant lorsqu'un agent dénaturant (urée 6 M) était ajouté au système, elle serait liée à l'augmentation de l'entropie du mélange qui est principalement régie par les nouvelles interactions moléculaires et la déshydratation des macromolécules pouvant avoir lieu lorsqu'elles sont en contact.

Par ailleurs, Wang & Qvist (2000) ont montré qu'à pH 6,5, les mélanges contenant de la β-Lg (15-17 %) et des pectines LM (2,5 %) restaient homogènes lorsque la force ionique était inférieure à NaCl 300 mM alors qu'avec des pectines HM (3-4 %) le système n'est miscible que pour des forces ioniques inférieures à 70 mM. Pour les autres valeurs de force ionique (I = 0,5 par exemple), et pour des concentrations en polymères égale à 6,7 % pour les pectines LM et 5,6 % pour les pectines HM, un précipité contenant majoritairement la β-lg se forme, lié à la diminution de la solubilité de la β-lg. La densité de charge des pectines dans le mélange jouerait donc un rôle dans la stabilité selon la force ionique du milieu. Les auteurs suggèrent que la masse molaire des deux échantillons étant du même ordre de grandeur, pour un mélange de même concentration en biopolymères, la charge nette des mélanges pectines

LM/β-Lg est supérieure à celle des mélanges pectines HM/β-Lg, ces derniers attirant moins de cations, laissant ainsi plus d'ions disponibles pour écranter la β-Lg**.**

Pour résumer, ce sont des phénomènes de séparation de phase dus à l'incompatibilité thermodynamique qui apparaissent au sein des systèmes protéines globulaires natives/ polyoside. Ces phénomènes seraient plus marqués pour les polyosides neutres que pour les polyosides anioniques et ils pourraient apparaître à l'échelle microscopique, y compris dans la zone monophasique du diagramme de phase.

En outre, il a été montré qu'une augmentation de la force ionique dans le milieu (à pH éloigné du pHi) augmentait cette incompatibilité (Grinberg & Tolstoguzov, 1997). Ce comportement pourrait être lié soit à une augmentation des interactions entre protéines (du fait de l'écrantage des répulsions électrostatiques) (Syrbe, 1997) soit à un effet de «salting out» (Hoskins *et al.*, 1996), ou encore par la suppression de la contribution osmotique des contre-ions. De plus, selon la nature des fonctions acides et selon la nature de la protéine, la zone d'incompatibilité (gamme de concentrations) diminuait selon l'ordre albumine > globuline pour les protéines et selon l'ordre des résidus carboxyles (comme la gomme arabique, les pectines, les alginates, carboxylméthylcellulose) > polyosides neutres (comme le dextrane) > résidus sulfates (comme le dextrane sulfate, les carraghénanes) pour les polyosides (Grinberg & Tolstoguzov, 1997). Outre la charge, la flexibilité des polymères joue un rôle sur leur comportement en mélange. Le nombre de contacts entre polymères étant directement relié à la flexibilité des polymères, les polymères plus rigides (comme les pectines ou les alginates) seraient moins enclins à favoriser une séparation de phase par rapport aux polymères flexibles (comme le dextrane ou le dextrane sulfate) (Grinberg & Tolstoguzov, 1997).

I.3.2 Etude des mélanges ségrégatifs protéine globulaire dénaturée/polyoside

Dans un mélange protéine globulaire/polyoside, la dénaturation thermique des protéines crée une nouvelle espèce protéique, moins soluble que la protéine native et sujette à l'agrégation. Deux types d'études ont été réalisés: soit la protéine est dénaturée préalablement puis les

agrégats protéiques sont mélangés au polyoside soit le mélange protéine native/polyoside est préparé au préalable puis traité thermiquement.

Dans une étude des mélanges protéines du lactosérum dénaturées/polyoside de différentes natures (neutres ou chargés), Syrbe (1997) a observé qu'une séparation de phase de type liquide-liquide avait lieu dans le mélange de protéine faiblement dénaturée et du polyoside si le pH est éloigné du pHi.

Toutefois divers facteurs influençant la dénaturation protéique et l'agrégation peuvent modifier le comportement de phase des mélanges (Syrbe, 1997). Une augmentation de la température de chauffage conduit à une augmentation de la viscosité de la phase protéique qui peut précipiter lors du mélange avec le polyoside. Ces effets dépendent du type de polyoside, de la concentration en protéines, du rapport de concentrations entre biopolymères, des facteurs du milieu. Ainsi par exemple, lorsque les agrégats de protéines sont fortement dilués avant d'être mélangés au polyoside, les systèmes sont miscibles.

Bryant & Mc Clements (2000) ont montré des effets comparables sur les mélanges d'isolats de protéines de lactosérum (8,5 %) natives ou dénaturées en présence de xanthane (<0,2 %) à pH 7. En absence de sel, une séparation de phase avait lieu dans le mélange du xanthane avec la protéine dénaturée alors qu'en présence de la protéine native le mélange restait miscible. En présence de sels, l'ajout de xanthane à la protéine dénaturée se traduisait par une augmentation de la viscosité et de la turbidité des systèmes. Dans ce cas, les auteurs suggèrent qu'une émulsion de type eau-dans-eau se serait formée avec des régions riches en xanthane entourée d'une phase enrichie en protéines. Ce résultat a également été montré par des observations microscopiques sur le même type de mélange par Syrbe *et al.* (1997).

L'étude de systèmes β-Lg dénaturée/κ-carraghénane a montré une séparation de phase qui s'est traduite par la formation de micro-domaines sphériques enrichis en protéines inclus dans la phase polyosidique (Croguennoc *et al.*, 2001a). Par la mesure des rayons de giration des agrégats protéiques et de la longueur de corrélation (χ) du polyoside, les auteurs ont attribué cette séparation de phase à un mécanisme de déplétion-floculation. L'effet de déplétion pour le polyoside en régime semi-dilué serait dépendant de χ, et cet effet serait d'autant plus marqué lorsque χ diminue en deçà du rayon de giration des particules en accord avec les observations de Verma *et al.* (2000). La dépendance entre la concentration en polyoside et χ a permis d'évaluer une concentration critique au-delà de laquelle le système démixte et forme

des microdomaines enrichis en protéines. La taille de ces microdomaines dépendrait peu de la concentration en protéines. Ces micro-domaines finissaient par sédimenter avec le temps donnant lieu à une séparation de phase macroscopique.

Ainsi lorsque les protéines dénaturées sont en mélange avec un polyoside, le comportement de phases des mélanges peut être contrôlé par la maîtrise du nombre et de la taille des agrégats protéiques formés via les paramètres intrinsèques (nature du polyoside, nombre et taille des agrégats protéiques) et extrinsèques (traitement thermique, pH, force ionique) au mélange. En revanche, lorsque le mélange protéine native/polyoside est chauffé, les données thermodynamiques sont plus difficiles à définir au cours des différentes étapes qui peuvent mener à la formation du gel.

I.3.3 Les gels de biopolymères mixtes

I.3.3.1 Définition

Les gels mixtes sont formés à partir de deux biopolymères dont l'un au moins est gélifiant, dans des conditions favorisant leur gélification. Selon le comportement de phase des mélanges on peut distinguer trois groupes. Les gels «mixtes ou interpénétrés» et les gels «remplis» qui sont formés suite à une séparation de phase ségrégative, et les gels «complexes» formés par l'association de complexes dans le cas d'une séparation de phase associative (Tolstoguzov, 1991; Morris & Wilde, 1997).

Un gel mixte, le plus souvent composite, est formé lorsque les concentrations des deux polymères sont supérieures à la concentration critique de gélification et de démixtion. Il est structuré par la coexistence de deux réseaux indépendants occupant chacun le système. Lorsque les polymères sont compatibles, cas rare, les deux réseaux s'interpénètrent.

Un *gel rempli* est formé au-delà du seuil de démixtion d'un mélange et si la concentration de l'un des polymères est inférieure à sa concentration critique de gélification ou s'il n'est pas gélifiant. Il est constitué du réseau du polymère gélifiant formant la phase continue avec des particules dispersées enrichies par l'autre polymère. Si les fractions volumiques des deux phases sont très différentes, la phase de fraction volumique la plus faible est généralement

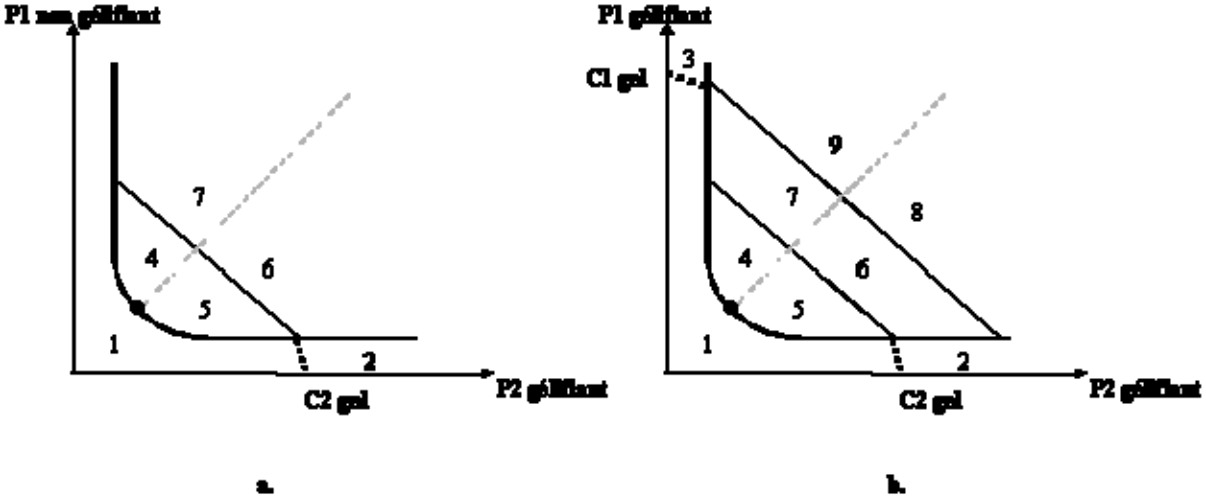
sous forme de gouttelettes dispersées dans une matrice continue de fraction volumique dominante (Dickinson & Mc Clements, 1995).

I.3.3.2 Stabilité thermodynamique

Les limites de cosolubilité (c'est à dire la position de la binodale sur le diagramme de phase) et les concentrations critiques de gélification sont deux caractéristiques déterminant les conditions critiques pour la formation des gels remplis et mixtes. La concentration minimale de gélification suite à un traitement thermique de biopolymères varie entre 0,1 et 15 % (Zasypkin *et al.*, 1997). La gamme de concentrations pour laquelle la gélification a lieu est généralement inférieure à celle nécessaire pour qu'une séparation de phase ait lieu (Tolstoguzov, 1995). Ainsi les mélanges de biopolymères gélifiant peuvent former des gels de part et d'autre de la binodale.

La Figure I.21 illustre schématiquement les différentes systèmes obtenus dans un mélange de biopolymères (P1 et P2) lorsque l'un des biopolymères ou les deux gélifient (Zasypkin *et al.*, 1997). Dans le cas où un seul biopolymère est gélifiant (Figure I.21a), la binodale sépare des gels uniphasiques des gels biphasiques, le diamètre rectilinéaire correspondant à une inversion de phase dans les gels mixtes. Il en résulte dans les zones 4 et 5 la formation d'émulsions de type «eau-dans-eau». Dans la zone 6, un gel contenant une phase continue riche en P2 remplie d'une phase dispersée liquide riche en P1 se forme. Dans la zone 7, les phases sont inversées et il y a formation d'une suspension contenant des particules gélifiées riches en P2. Lorsque les deux biopolymères gélifient (Figure I.21b), des gels mixtes se forment dans les zones 8 et 9.

Figure I.21. Diagrammes de phase d'un mélange polymère 1 (P1) non gélifiant/polymère 2 (P2) gélifiant/solvant (**a**) et polymère 1 (P1) gélifiant/polymère 2 (P2) gélifiant/solvant (**b**). Les concentrations minimales pour qu'une gélification ait lieu sont indiquées pour P1 et P2 par C1gel et C2gel, respectivement. D'après Zasypkin *et al.* (1997)



1. Une phase: solution (a et b)
2. Une phase gélifiée de P2 remplie avec P1 (a et b)
3. Une phase gélifiée de P1 remplie avec P2 (b)
4 et 5. Deux phases: Emulsions eau dans eau de P2 dans P1 (4) et de P1 dans P2 (5) (a et b)
6. Deux phases: Gel riche en P2 rempli avec des particules non gélifiées de P1 (a et b)
7. Deux phases: Suspension de particules gélifiées en P2 dans une phase continue non gélifiée riche en P1 (a et b)
8 et 9. Deux phases: Gels remplis avec des particules gélifiées de P2 dans P1 (9) et de P1 dans P2 (8) (b)

Cette description est basée uniquement sur les concentrations en biopolymères et leurs concentrations critiques de gélification. En réalité, il faut tenir compte de la cinétique des différents mécanismes de gélification et de démixtion. La structure finale de tels mélanges résulte de la compétition entre les cinétiques de ces deux mécanismes. Or celles-ci sont fortement influencées par un ensemble de paramètres intrinsèques aux biopolymères (masse moléculaire, composition chimique, flexibilité…) ou extrinsèques du milieu (température, force ionique, pH, traitement thermique, cisaillement …).

I.3.3.3 Compétition entre les cinétiques de gélification et de démixtion

La gélification a pour effet de diminuer la mobilité de l'un ou des deux composants du mélange. Ainsi, la séparation de phase est susceptible d'être bloquée par la gélification de la

phase protéique (à chaud) et/ou de la phase polyosidique (à froid) si celui-ci est gélifiant. Le temps au bout duquel l'élasticité du système devient mesurable dépendra donc des cinétiques respectives de la gélification et de la séparation de phase. La compétition entre ces deux mécanismes peut ainsi aboutir à des systèmes très complexes dont la microstructure et les comportements rhéologiques diffèrent par rapport au système contenant un seul polymère (Tromp *et al.*, 1995).

- *Microstructure des gels mixtes*

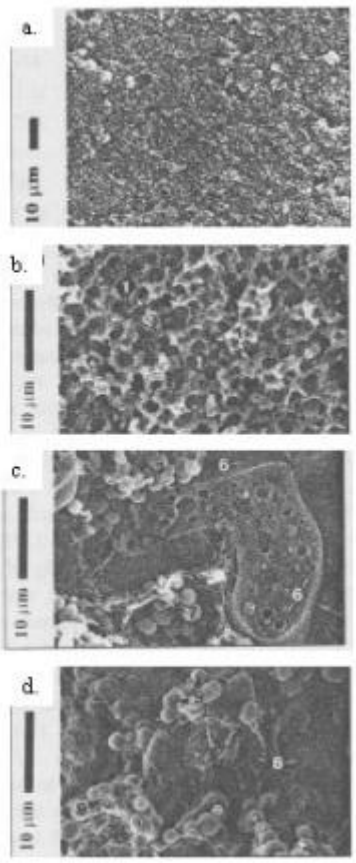
Les conditions d'application du traitement thermique constituent un facteur déterminant dans la structure des gels obtenus. Lorsque la gélification des protéines est favorisée par les conditions expérimentales choisies, un réseau continu protéique se forme avec des inclusions de polyosides. Lorsqu'une séparation de phase de type liquide-liquide a lieu, la gélification bloque la démixtion du mélange et les protéines s'associent entre elles sous forme d'agrégats protéiques formant des microparticules, avec un faible niveau d'organisation tridimensionnelle (Syrbe, 1997; Turgeon & Beaulieu, 2001). La connectivité de ces particules protéiques peut alors être favorisée par des interactions de type déplétion-floculation (Tuinier *et al.*, 2000).

- Influence de la nature et de la concentration en polyoside

Dans une étude basée sur des observations en microscopie électronique à balayage (MEB), Dumay *et al.* (1999) ont décrit les structures des gel de *β*-Lg (12 %, pH 7, formés à 87 °C pendant 40 min) en présence ou pas d'alginate ou de pectines (LM et HM) à différentes concentrations. Le gel de protéines seules se présente comme un réseau tridimensionnel d'agrégats protéiques avec une distribution homogène de pores (Figure I.22a). La présence de pectines ou d'alginate (de 0,1 % à 1 %) modifie la structure de ces gels en diminuant leur porosité tout en limitant le phénomène de synérèse. La microstructure de ces gels varie selon la concentration en polyosides. Les Figures I.22 bcd présentent les microstructures observées pour les mélanges contenant 0,1, 0,5 et 1 % de pectines LM. En présence de 0,1 % de pectines LM (Figure I.22 b), les agrégats protéiques forment un réseau contenant des alvéoles de tailles régulières contenant les régions riches en polyosides. En augmentant la concentration en polyosides (Figure I.22 c, d), la majorité des protéines est sous forme de microparticules (de taille inférieure à 3 µm). Les auteurs attribuent cette microparticulation à une agrégation rapide des protéines dans des zones fortement concentrées en polyosides. Des structures

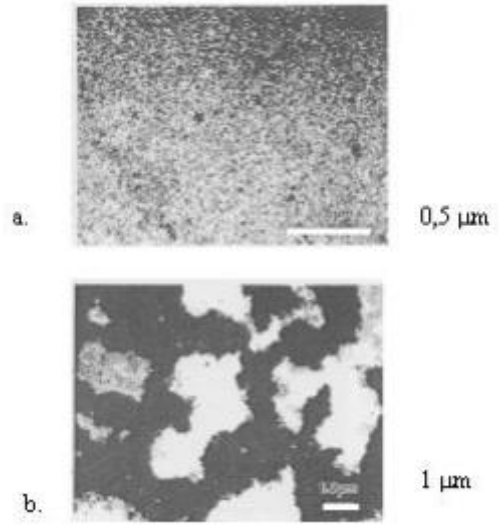
similaires sont observées avec les pectines HM et les alginates mais les changements structuraux en présence de pectines HM semblent plus progressifs entre la structure alvéolaire et la microparticulation protéique.

Figure I.22 Microstructure des gels thermiques observées par MEB de gels de *β*-Lg pure (12%) (**a**) et de gels obtenus à partir des mélanges *β*-Lg (12 %)/Pectines LM (0,1%) (**b**); *β*-Lg (12 %)/Pectines LM (0,5 %) (**c**); *β*-Lg (12 %)/Pectines LM (1 %) (**d**). D'après Dumay *et al.* (1999).



Ndi *et al.* (1996) ont également observé par microscopie électronique à transmission sur des mélanges *β*-Lg (10%)/polypectate de sodium (1 %) que le chauffage à 95 °C pendant 5 min induisait la formation de gros amas protéiques (1-5 µm) (Figure I.23b) dont la structure différait totalement des gels de protéines seules en présence de NaCl 25 mM, où la distribution des agrégats dans la matrice gélifiée est uniforme (Figure I.23a).

Figure I.23 Microstructure des gels thermiques observés par MET obtenus à partir de *β*-Lg pure en présence de 25 mM NaCl (10 %) (**a**) et du mélange *β*-Lg (10 %)/sodium polypectate (1 %) (**b**) à pH 6,5. D'après Ndi *et al.* (1996).



En outre, il a été mis en évidence par Syrbe (1997) sur les mélanges protéines du lactosérum/pectines HM que l'augmentation de la concentration en polyoside affectait de façon plus significative la structure obtenue par rapport aux variations de concentrations en protéines probablement en raison de l'augmentation de viscosité induite par la présence du polyoside.

Renard *et al.* (1998b) ont décrit ce phénomène de compétition sur les mélanges SAB (10 %)/HEC ou CMC (1 %) par diffusion de neutrons aux petits angles. En présence du polyoside neutre, les gels de SAB formés à pH 7, à 80 °C sont constitués d'agrégats protéiques de tailles plus petites et plus connectés que pour le gel de protéines seules. Le polyoside agirait comme une barrière stérique au développement des agrégats et ralentirait la séparation de phase en augmentant la viscosité du milieu. La présence du polyoside chargé conduit en revanche à un phénomène rapide de floculation en raison des répulsions électrostatiques entre la SAB et le CMC qui portent une charge de même signe. La séparation de phase qui en découle serait stoppée par la gélification de la SAB.

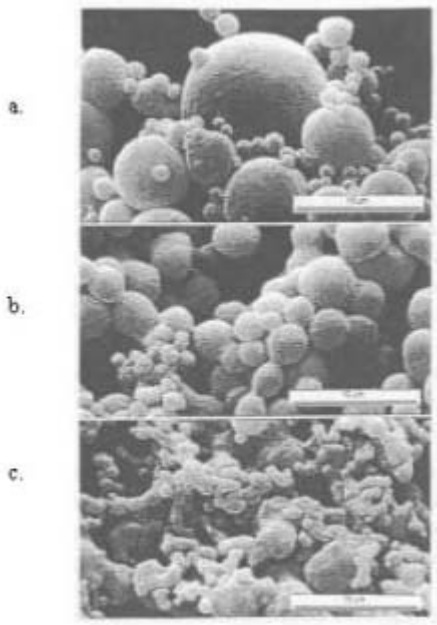
De même, le chauffage du mélange *β*-Lg/*κ*-carraghénane aboutit à une séparation de phase (Capron *et al.*, 1999a, 1999b; Croguennoc *et al.*, 2001b). L'observation de la phase inférieure des mélanges montre la présence des micro-domaines de même structure que ceux formés dans le cas où la protéine est dénaturée au préalable. L'agrégation protéique n'est pas influencée par la présence du polyoside jusqu'à ce que les agrégats atteignent une taille

critique. Au-delà d'une certaine taille, les agrégats s'associent suite à des attractions induites par un phénomène de déplétion et peuvent former un gel. Ce phénomène est d'autant plus marqué que la concentration en polyoside est grande. Parallèlement à la séparation de phase, la cinétique d'agrégation des protéines est favorisée par le traitement thermique.

- Influence de la cinétique du traitement thermique

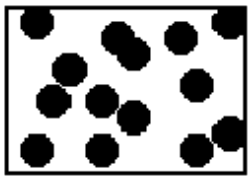
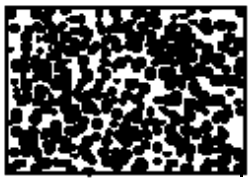
Syrbe (1997) a clarifié cette compétition entre cinétique de séparation de phase et de gélification dans une étude basée principalement sur des observations microscopiques (microscopie électronique à balayage, contraste de phase, fluorescence) dans des systèmes protéines du lactosérum/polyosides anioniques non gélifiants à un pH supérieur au point isoélectrique. Pour des systèmes protéine du lactosérum/pectine, la distribution de taille des microparticules protéiques était largement dépendante de la cinétique du traitement thermique mais peu sensible à la température finale de traitement. Plus le chauffage était lent, plus les microparticules protéiques étaient volumineuses et isolées. La Figure I.24 illustre trois types de morphologies observées selon cette compétition entre la gélification et la séparation de phase dans ces mélanges.

Figure I.24 : Clichés de microscopie électronique à balayage obtenus avec le système protéines du lactosérum (8%)/ pectine (3,5%) à pH 7 à 20°C après traitement thermique. Barre d'échelle 10 μm. a. Protéines légèrement dénaturées pendant 2 min 45 s à 75 °C puis mélangés à la pectine. Le mélange est alors chauffé 2 min à 120°C. b. Mélange chauffé jusqu'à 105 °C à 2,5 °C.min^{-1}. c. Mélange chauffé 2 min à 120 °C.



La Figure I.25 schématise les différents types de microstructures obtenues selon la balance des cinétiques entre séparation de phase et gélification. Une vitesse de chauffage lente va généralement équilibrer les cinétiques de séparation de phase et de gélification pour produire des gouttelettes sphériques isolées de tailles assez bien définies (type II) (Figure I.24b), alors qu'une vitesse plus rapide va figer le système dans les premiers stades de la séparation de phase, produisant un réseau de petites inclusions non sphériques et fortement connectées (type III) (Figure I.24c). En revanche, dans le cas de protéines légèrement dénaturées par un préchauffage (type I), on est en présence de microparticules protéiques de taille supérieure, le processus de séparation de phase étant accéléré, probablement par des interactions de déplétion. Il s'ensuit que les gouttelettes formées ont le temps de coalescer et de relaxer vers une forme sphérique en produisant une suspension polydisperse avant que le système ne soit figé et ce même pour des vitesses de chauffage élevées (Figure I.24a) (Syrbe, 1997).

Figure I.25 Classification de la microstructure des gels obtenus avec les mélanges protéines de lactosérum/polyosides anioniques à un pH supérieur au point isoélectrique. La taille des particules constitutives diminue et la connectivité augmente dans le sens Type IÒTypeÒ II Type III. D'après Syrbe (1997).

	Etat de la protéine	Vitesse de chauffe	Balance des cinétiques séparation de phase / gélification	
Type I	dénaturée	rapide	sép. >> gél.	
Type II	native	lente	sép. ~ gél.	
Type III	native	rapide	sép. < gél.	

La température finale atteinte et la durée du traitement thermique n'affectent pas la taille des inclusions sphériques protéiques mais augmente la connectivité entre les agrégats.

- *Propriétés mécaniques des gels mixtes*

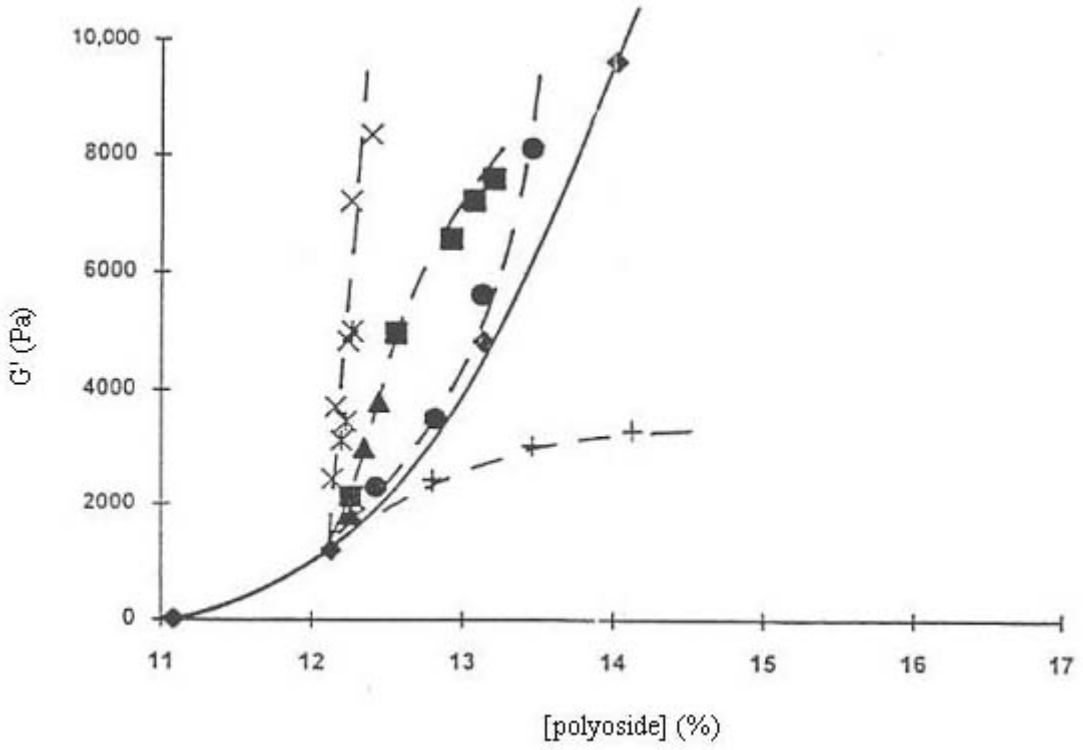
Selon les conditions choisies, un effet antagoniste ou synergique peut être mis en évidence par rapport aux propriétés des biopolymères seuls.

L'effet antagoniste se traduit par un affaiblissement du gel obtenu à partir du mélange par rapport aux biopolymères pris individuellement. Dans le cas de gels de type rempli, l' augmentation de la fraction volumique des particules insérées dans la matrice peut entraîner une diminution de l'élasticité des gels (Tolstoguzov, 1995).

L'effet synergique peut se définir par un renforcement du gel obtenu en mélange par rapport à chacun des biopolymères pris séparément. Ces effets synergiques peuvent provenir des interactions de type d'exclusion de volume. De plus, l'existence d'interactions spécifiques ioniques entre biopolymères n'est pas totalement à écarter.

Les effets d'exclusion de volume s'appliquent généralement lorsque le polyoside n'interagit pas de façon spécifique avec la protéine. Du fait de la séparation de phase une redistribution de l'eau a lieu selon l'affinité de chacun des polymères présents pour le solvant. Ceci se traduira par la concentration d'une phase et aboutira à sa gélification accompagnée d'une dilution de l'autre phase. Ainsi Fernandes (1998) a montré l'influence de la nature du polyoside (guar, caroube, amidon, maltodextrines, κ-carraghénane ou xanthane) sur le comportement rhéologique des gels d'isolats de protéines de lactosérum (12 %). A l'exception des maltodextrines, tous les gels (formés à 80 °C) obtenus à partir des mélanges présentaient un module conservatif G' plus élevé que le gel de protéines seules (Figure I.26).

Figure I.26 Modules conservatifs G' obtenus à 25 °C (1 Hz) après un traitement thermique (20 min à 80°C) pour les mélanges protéines du lactosérum (12 %) (¿) et pour les mélanges protéines du lactosérum (12 %) /polyosides de différentes natures. Exemples de synergie pour les mélanges contenant : amidon (˜), guar (¢), caroube(p), κ-carraghénanes(Í), xanthane (Ú). Exemple d'effet antagoniste en présence de matodextrine(È).D'après Fernandes (1998).

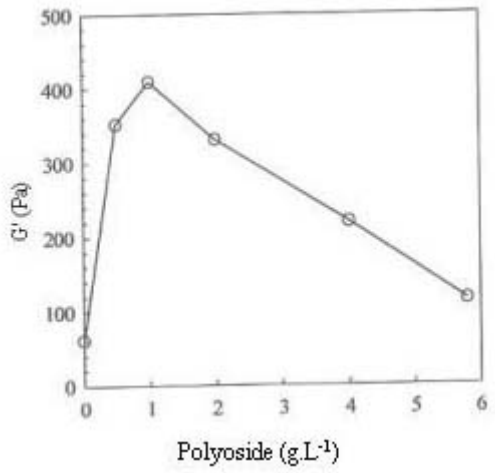


Ceci était d'autant plus marqué lorsque la concentration en polyosides augmentait et avec des polyosides chargés. Après avoir observé les mélanges par microscopie à contraste de phase, des globules de 1 à 5 μm contenant majoritairement les polyosides dispersés dans la phase protéique ont pu être mis en évidence. Le phénomène de concentration qui en résulte serait à l'origine des augmentations de modules mesurées. Ce comportement a également été mis en évidence par Beaulieu *et al.* (2001) sur les mélanges protéines du lactosérum (8%)/pectines (1%) à pH 6. En présence du polyoside, la solution de protéines gélifie sous l'influence d'un traitement thermique (80 °C, 30 min) alors que les protéines de lactosérum seules ne peuvent pas former de gel dans ces conditions. Le renforcement du gel est attribué à une augmentation de la concentration locale dans la phase protéique due à la séparation de phase.

Dans les systèmes β-Lg/κ-carraghénane, Capron *et al.* (1999a) ont montré par des mesures de diffusion de la lumière que la présence du polyoside ne modifiait pas la structure des agrégats

protéiques formés suite à un traitement thermique. L'étude de la gélification des systèmes a mis en évidence un effet synergique pour des faibles concentrations en polyosides (entre 0,05 et 0,1 %) (Figure I.27) avec une accélération de l'agrégation de la β-Lg (5 %) (Capron *et al.*,1999b). Pour des concentrations en polyosides supérieures (jusqu'à 0,6 %), les cinétiques de gélification ralentissaient (mais restaient plus rapides que pour la protéine seule). Les auteurs ont attribué cet effet à une séparation de phase à l'échelle de quelques μm, mise en évidence par microscopie électronique à transmission, diminuant la connectivité du réseau protéique. Ainsi selon la concentration en polyosides, la force du gel et sa cinétique de formation peuvent varier.

Figure I.27 Module G' obtenu après 2 h à 75 °C (1 Hz) pour les mélanges β-Lg (5%)/κ-carraghénanes en fonction de la concentration en polyoside. D'après Capron *et al.* (1999b).

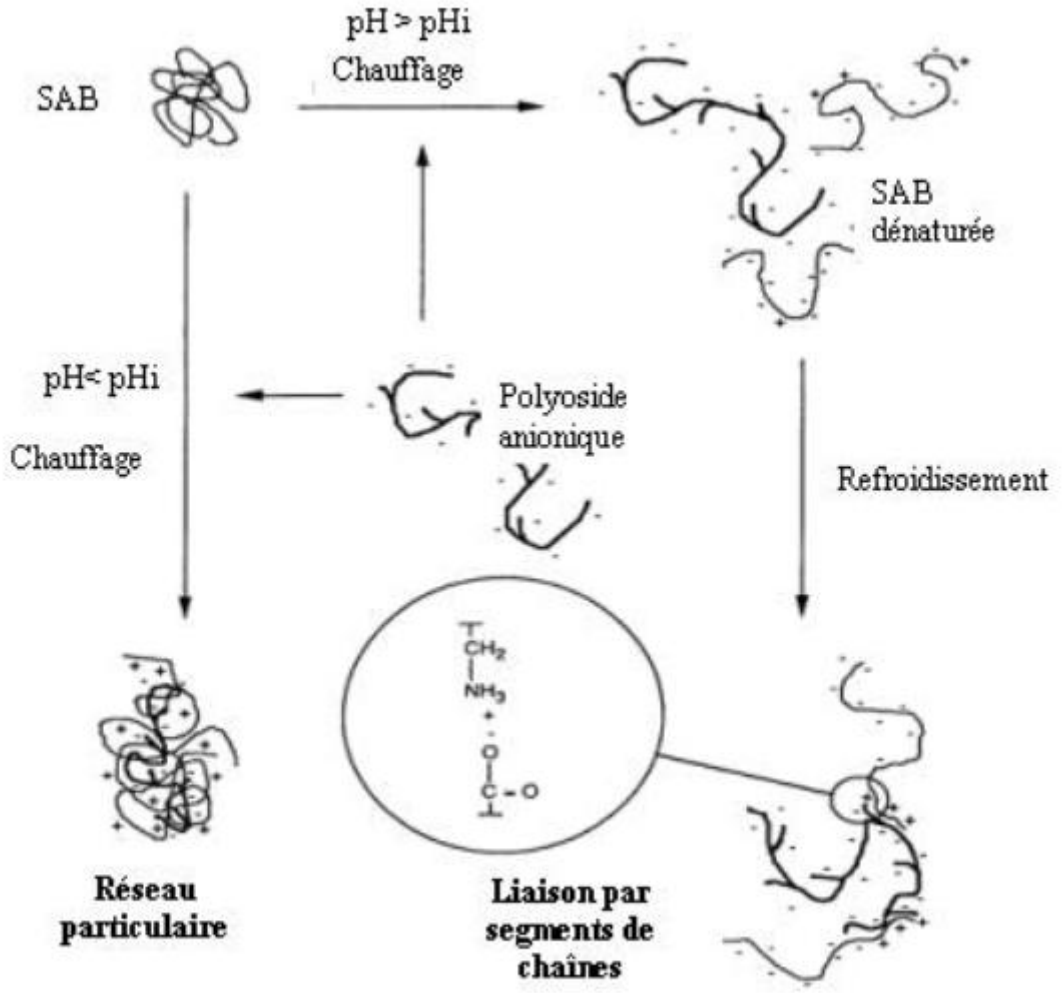


Toute variation de concentration de la phase continue a un fort impact sur les propriétés du gel. La concentration critique de gélification peut ainsi être abaissée par l'ajout d'un biopolymère incompatible (Zasypkin *et al.*, 1997). Ainsi Ould Eleya & Turgeon (2000a) ont montré que la présence de 1 % de κ-carraghénane induisait la gélification de la β-Lg à une concentration inférieure (0,5 %) à sa concentration critique de gélification évaluée à 1 % dans les conditions de l'étude (pH 7, $CaCl_2$ 10 mM).

Certains auteurs ont attribué les effets synergiques observés dans ce type de mélange à l'existence d'interactions entre protéine globulaire et polyoside. Celles-ci empêcheraient l'agrégation thermique des protéines en limitant le nombre de sites réactifs de la protéine et en diminuant le coefficient de diffusion des biopolymères. Cai & Arntfield (1997) ont ainsi suggéré sur la base de mesures de turbidité, de rhéologie et par filtration sur gel sur une

colonne Sephacryl des mélanges SAB (10 %) /pectine ou alginate (1,5 %) à pH 6 que les biopolymères en mélange sont capables de se lier pour former un complexe lorsque le mélange est chauffé. La présence de pectines ou d'alginate augmentait la température de gélification de la SAB de 70 à 80 °C. Par ailleurs, le gel formé à pH 5,7 (70 °C/15min) à partir du mélange était plus ferme que le gel de protéine seule. Les résultats obtenus ont été attribués à la liaison de segments de chaînes entre protéines dénaturées formant le réseau gélifié et le polyoside (Figure I.28).

Figure I.28 Interaction entre SAB et polyoside anionique (alginate ou pectine) selon le modèle de liaisons par segments de chaînes. D'après Cai & Arntfield (1997).



Pour un pH<pHi, la formation de complexes entre les biopolymères est possible puisqu'ils portent des charges nettes de signes opposés. En revanche au pH>pHi, les deux biopolymères portent une charge nette de même signe. Il a été suggéré que, dans ce cas, les polyosides interagissent de façon électrostatique avec les domaines de la protéine chargés positivement révélés lors de la dénaturation.

Kelly *et al.* (1994) ont montré par des mesures de diffusion de la lumière que les alginates formaient avec la SAB des complexes de plus grande taille qu'avec les pectines HM à pH 6,5. En effet, les alginates possèdent une densité de charge plus grande que les pectines

et celles-ci sont réparties de façon plus homogène. En présence de pectines, la probabilité de liaison entre protéine et polyoside, et donc la taille du complexe avec la protéine, sont limitées par la faible densité de charges des régions « lisses » pour les pectines hautement méthylées et par une grande taille moléculaire. D'autre part, la région « chevelue » des pectines riches en oses neutres serait impliquée dans la stabilisation stérique des interactions entre polymères.

- *Influence des facteurs extrinsèques et intrinsèques du système*

- Masse moléculaire, densité de charges des polymères :

L'influence de la masse moléculaire du polyoside sur le contrôle de l'agrégation protéique a également été vérifiée sur des mélanges protéines/polyoside de différentes natures (Tolstoguzov, 1991). Une diminution de la masse molaire du polyoside entraînait une augmentation de la concentration nécessaire pour obtenir une séparation de phase.

Zhang & Foegeding (2003) ont par ailleurs montré que la présence de dextrane sulfate (DS) à faible concentration et à pH 6,8, stabilisait la β-Lg contre la dénaturation thermique, ce qui n'était pas le cas en présence de dextrane. La présence de groupements sulfates empêcherait l'exposition des groupements thiols de la protéine et renforcerait ainsi la stabilité des dimères de β-Lg. En revanche, au-delà d'un certain rapport polyoside/protéine, l'agrégation de la protéine était accélérée et une séparation de phase avait lieu. Ce rapport était plus faible pour le DS que pour le dextrane (à masse moléculaire égale) et pour de plus fortes concentrations en protéines. Dans le cas du mélange protéines du lactosérum/pectines, il a été démontré que le degré de méthylation des pectines n'affectait pas la cinétique de gélification des mélanges (Beaulieu *et al.*, 2001).

- Rapport des concentrations en polymères :

La morphologie d'un gel biphasique dépend de la proportion de chaque biopolymère dans le mélange. Lorsqu'un gel est formé par deux polymères incompatibles il existe un rapport de concentration critique pour lequel l'inversion de phase se produit. Celui-ci se situe au niveau du diamètre rectilinéaire (Figure I.21). D'un point de vue rhéologique, ceci se traduit par un affaiblissement du gel puis selon la rigidité des différentes phases une augmentation ou une diminution de la force du gel (Tolstoguzov, 1995; Zasypkin *et al.*, 1997).

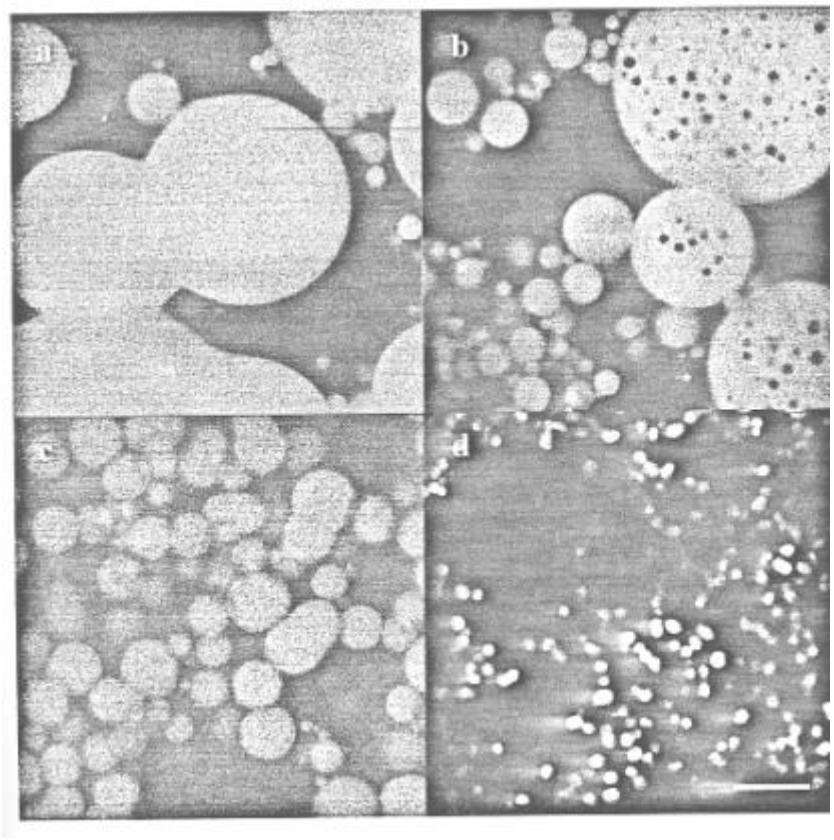
- pH et force ionique:

Le pH détermine le degré d'ionisation des groupes fonctionnels portés par les biopolymères (carboxyles, amines, sulfate…). Par ailleurs, la force ionique module l'écrantage des charges des biopolymères.

Beaulieu (2002) a montré que l'ajout de NaCl (50-200 mM) augmentait la fermeté des gels de protéines seules et en présence de pectines, ceci de façon plus marquée à pH 8 qu'à pH 6. Les observations en MCBL des systèmes à pH 8 présentées en Figure I.29 montrent qu'une séparation de phase a eu lieu au sein des mélanges et que les structures formées diffèrent selon la teneur en sel du milieu. En absence de sel des particules sphériques contenant les protéines, relativement grandes (de taille supérieure à 50 μm) et des petites (de tailles 5 μm) sont observées (Figure 29a). Celles-ci ont tendance à coalescer. L'ajout de NaCl se traduit par une réduction du diamètre moyen de ces particules protéiques (Figure I.29bcd) et un réseau plus homogène tend à s'établir. En absence de sel la séparation de phase aurait lieu avant la gélification protéique (Syrbe *et al.*, 1998). La présence de sel réduit les répulsions électrostatiques et le processus de séparation de phase n'est pas aussi prononcé avant que le gel protéique ne soit formé conduisant à des agrégats protéiques sphériques plus petits (Beaulieu, 2002).

Dans une étude de gels mixtes de β-Lg (10 %)/κ-carraghénane (1 %), Ould Eleya & Turgeon (2000b) ont montré qu'un gel mixte interpénétré se formait pour une gamme de pH comprise entre 5 et 7 alors qu'à pH 4 (pH où les forces attractives entre biopolymères sont plus grandes), un gel couplé se forme suite à l'association des biopolymères entre eux.

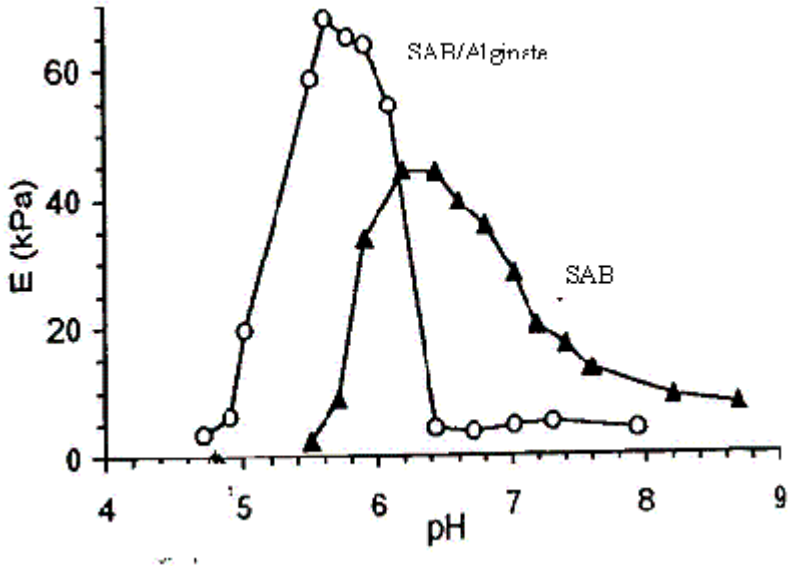
Figure I.29 Observations à 20 °C par MCBL des gels de mélanges protéines de lactosérum marquée avec du Fast Green FCF (8 %)/Pectines LM (DM 35%) (1%) obtenus après un traitement thermique (80 °C, 30 min) dans l'eau (**a**) et en présence de 50 mM (**b**); 100 mM (**c**) et 200 mM (**d**) de NaCl à pH 8. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 10 μm. D'après Beaulieu (2002).



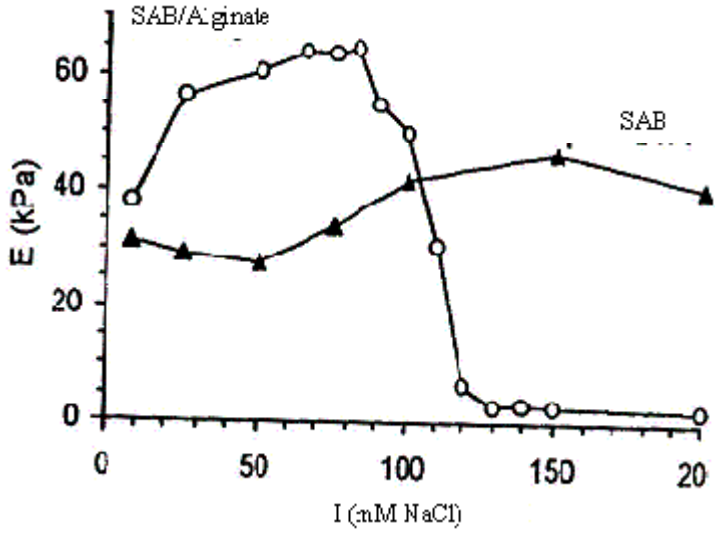
L'effet de la force ionique (ajout de NaCl) et du pH sur les propriétés rhéologiques aux fortes déformations de mélanges gélifiés SAB (8 %)/alginate (1 %) a été étudié par Neiser *et al.* (1998). Les gels les plus rigides étaient obtenus à des pH compris entre 5 et 6 et à faible force ionique. A pH = 5,9 (Figure I.30a), le module d'Young augmentait avec la force ionique jusqu'à un maximum (pour I = 75 mM) puis diminuait vers des valeurs inférieures aux gels de SAB pure. Pour I = 75 mM (Figure I.30b), le module d'Young des gels de SAB pure était maximal pour des pH compris entre 6 et 7 alors que pour les mélanges SAB/alginate les valeurs maximales étaient atteintes pour des pH compris entre 5,3 et 6,2. Pour un pH £ 4,7, l'augmentation du module d'Young a été attribuée à la formation d'un complexe entre la SAB chargée positivement et les alginates chargés négativement. Les auteurs ont supposé que ces comportements reposaient sur l'importance des liaisons électrostatiques locales entre les biopolymères décrites précédemment (Cai & Arntfield, 1997) et les interactions électrostatiques répulsives entre les biopolymères chargés négativement. Le renforcement des

gels à faible force ionique pourrait être lié à un écrantage des répulsions électrostatiques entre SAB et alginates, favorisant ainsi les attractions électrostatiques locales. En augmentant la force ionique, ces forces attractives seraient écrantées donnant lieu à une séparation de phase. Celle-ci se traduirait par une diminution de la connectivité du réseau protéique et un affaiblissement du gel. En augmentant le pH, le nombre de sites attractifs de la protéine diminuerait et le nombre de sites chargés négativement (responsables des interactions à grande distance) augmenterait. A une force ionique faible, la diminution de la force des gels quand le pH augmente, pourrait être liée à la diminution globale de l'attraction entre les biopolymères ou aux répulsions électrostatiques entre protéines (Neiser *et al.*, 1998). Le même type d'interprétation a été proposé dans une étude similaire sur les mélanges SAB/κ-carraghénane (Neiser *et al.*, 2000).

Figure I.30 Modules d'Young (E) des gels de SAB (8%) et du mélange SAB (8 %)/alginate (1 %) obtenus après un traitement thermique (90 °C, 23 min) et mesurés à 20 °C **a.** en fonction de la force ionique (mM NaCl) à pH 5,9. **b.** en fonction du pH pour I = 75 mM NaCl. D'après Neiser *et al.* (1998).



a.



b.

- Facteurs physiques et mécaniques :

Tout traitement thermique ou mécanique affectant la structure des protéines globulaires influence logiquement le comportement de phase du mélange. L'augmentation de température favorise les interactions hydrophobes et diminue les liaisons hydrogène modifiant l'équilibre entre forces attractives et répulsives entre biopolymères.

L'application d'un cisaillement à un mélange de type ségrégatif peut provoquer une déformation de la taille des particules de la phase incluse et peut aussi stabiliser la microstructure lors du «piégeage cinétique» (Norton & Frith, 2001). Sous certaines conditions de cisaillement, il est possible d'utiliser la gélification pour piéger la phase dispersée dans une morphologie anisotrope (Antonov *et al.*, 1980). Une fois formées, ces particules asymétriques induisent des propriétés rhéologiques différentes des structures sphériques. Des techniques récentes basées sur l'étude de la déformation des gouttelettes ont permis d'évaluer la tension interfaciale existant entre deux biopolymères incompatibles (par exemple dans le mélange gélatine/κ- carraghénane). Celles-ci sont de l'ordre de 10^{-5} $N.m^{-1}$, ce qui est environ trois mille fois plus faible que les valeurs obtenues pour des émulsions de type huile-dans-eau ou eau-dans-huile (Wolf *et al.*, 2000; Norton & Frith, 2001).

I.3.3.4 Influence de la gélification des polyosides

Peu d'études ont été réalisées sur les systèmes mixtes protéines globulaires/polyosides lorsque le polyoside gélifie. Nous nous intéressons ici plus particulièrement aux cas où le polyoside gélifie en présence de calcium comme les pectines LM ou les alginates.

Les mélanges β-Lactoglobuline/ polypectate de sodium ont été étudiés par Ndi *et al.* (1996), les mélanges protéines de lactosérum/pectines par Bernal *et al.* (1987), les mélanges SAB/alginate par Neiser *et al.* (1999) et plus récemment par Beaulieu *et al.* (2001) les mélanges protéines du lactosérum/pectines. En revanche aucune étude n'a été décrite sur les gels mixtes de SAB/pectines LM ou β-Lg/pectines LM.

- *Microstructure et propriétés mécaniques des systèmes*

Une compétition pour les ions calcium entre les biopolymères a été montrée par Beaulieu *et al.* (2001) sur les protéines du lactosérum (8 %) en mélange avec des pectines dont le DM variait entre 28 et 47 % (0,1-1,5 %) en présence de calcium 10 mM (pH 6, dans l'eau). En absence de calcium, les protéines du lactosérum ne gélifiaient pas à cette concentration. L'ajout de calcium permettait leur gélification en lien avec les interactions électrostatiques spécifiques comme celà a été évoqué précédemment pour la SAB et la β-Lg (Mulvihill & Donovan, 1987). En présence de calcium, les gels étaient moins rigides dans le mélange que pour la protéine seule mais les cinétiques de gélification étaient comparables suggérant que la gélification du mélange est essentiellement guidée par la phase protéique. Plus le DM des

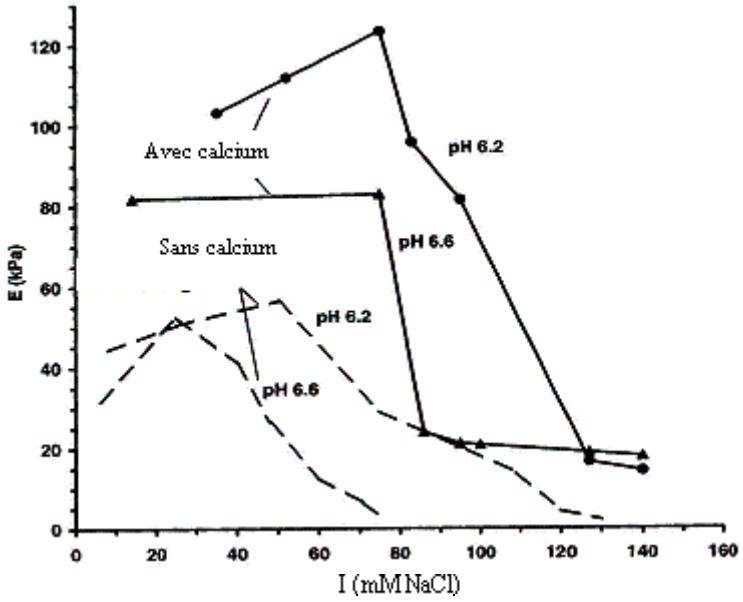
pectines était élevé ou plus la concentration en pectine était faible, plus les interactions entre pectine et calcium diminuaient. Rappelons que l'ajout de calcium génère des interactions entre groupes carboxyles négatifs des protéines, augmentant ainsi la tendance des protéines à s'agréger et coaguler plutôt que de former un réseau protéique régulier. Dans le cas des mélanges en présence de pectines à faibles DM, une partie du calcium serait impliquée dans la gélification des pectines et de ce fait n'est plus disponible pour les protéines, ce qui pourrait expliquer la diminution de la force des gels formés à partir du mélange.

Des résultats comparables ont été décrits par Ndi *et al.* (1996) pour des mélanges polypectate de sodium (SPP)/β-Lg (10 %/1 %) à pH = 6,5 en présence ou non de calcium en suivant l'évolution de G' en fonction de la température. Le renforcement du gel par les ions calcium était plus notable lorsque la température était inférieure à 85 °C, conditions où les interactions calcium/SPP ont lieu préférentiellement. Au-delà de cette température, la différence de force des gels formés avec et sans calcium n'était plus significative. Les auteurs ont attribué ce résultat à la prédominance des interactions entre biopolymères ou entre la protéine seule et les ions calcium au détriment des interactions SPP/calcium. D'un point de vue structural, des observations en microscopie électronique à transmission ont montré qu'en présence de calcium les larges agrégats mis en évidence dans le mélange décrit précédemment (Figure I.23) seraient redispersés, le SPP gélifié serait inséré dans une matrice uniforme formée par de larges agrégats protéiques. Le calcium se lierait ainsi à la fois sur la protéine et sur le SPP réduisant les répulsions électrostatiques entre les biopolymères conduisant ainsi à une microstructure plus homogène.

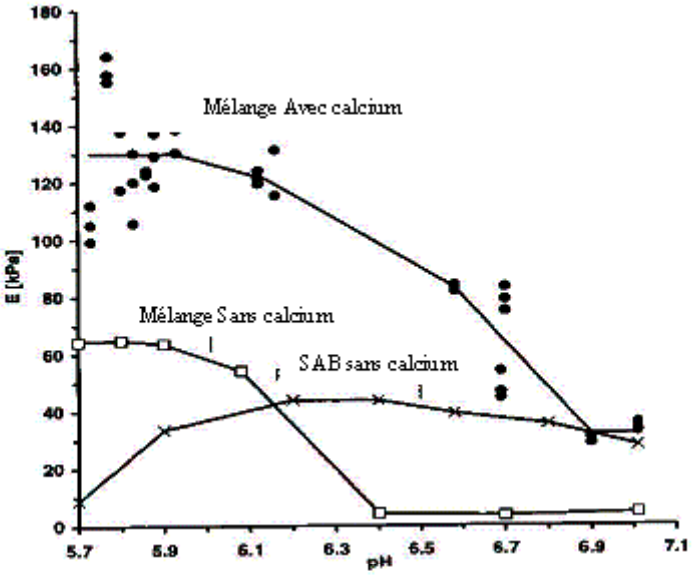
- *Influence des facteurs extrinsèques aux systèmes*

L'effet de la force ionique et du pH sur les propriétés mécaniques des mélanges SAB (8 %)/alginate (1 %) en présence de calcium (14 mM) a été décrit par Neiser *et al.* (1999) (Figure I.31). L'ajout de calcium quels que soient le pH et la force ionique induisait un renforcement du gel par rapport aux mélanges sans calcium. Au-delà d'une certaine valeur de force ionique (80 mM à pH 6,2 et 6,6) (Figure I.31a) ou de pH (6,2 pour I = 75 mM) (Figure I.31b), la force du gel diminuait. La contribution du réseau d'alginate à la force du gel expliquerait ce phénomène en considérant aussi l'influence d'une légère augmentation de la concentration de chaque polymère due à la séparation de phase. Les auteurs ont supposé l'existence de liaisons électrostatiques entre la SAB et les alginates qui diminueraient en augmentant la force ionique ou le pH.

Figure I.31 Modules d'Young (E) et du obtenus après un traitement thermique (90 °C, 23 min) et mesurés à 20 °C **a.** mélange SAB (8 %)/alginate (1 %) en présence ou non de $CaCl_2$ (14 mM) en fonction de la force ionique (mM NaCl) à pH 6,6 et 6,2 **b.** pour la SAB (8 %) et le mélange SAB (8 %)/alginate (1 %) en présence ou non de calcium en fonction du pH pour I = 75 mM NaCl. D'après Neiser *et al.* (1999).



a.



b.

I.3.4 Conclusions

Le comportement des mélanges protéines globulaires/polyuronates (pectines ou alginate) dépend du pH, de la force ionique, de la nature des ions du milieu et du traitement thermique. A température ambiante, le mélange protéine globulaire native/polyoside est compatible. La nature exacte des interactions entre les biopolymères expliquant cette compatibilité est encore sujette à discussion.

Lors du chauffage du mélange, une compétition entre les cinétiques de gélification et de démixtion a lieu qui se traduit par des propriétés mécaniques et structurales très variées en fonction des facteurs intrinsèques (nature et concentrations en biopolymères) et extrinsèques au système (traitement thermique, pH, ajout de NaCl). En présence de calcium, les deux biopolymères sont capables de gélifier et des gels mixtes peuvent se former.

Les propriétés rhéologiques dépendent de la morphologie du gel et de la concentration de chaque phase: si la phase continue formant le gel est enrichie par le polymère gélifiant, la rigidité du gel augmente. Cependant, si la phase dispersée perturbe la structure du réseau, le gel peut être alors affaibli par rapport au gel de protéine seule (Tolstoguzov, 1995). Le renforcement des gels en mélange a également été attribué à des interactions électrostatiques entre biopolymères (Cai & Arntfield, 1997).

Objectifs de l'étude

La revue des travaux antérieurs nous a permis de mettre en évidence la grande diversité des systèmes gélifiés qui peuvent être obtenus à partir de mélange de biopolymères et plus particulièrement des mélanges protéines globulaires/polyosides. Dans les mélanges ségrégatifs, lorsque un ou les deux biopolymères gélifient, une compétition entre les cinétiques de séparation de phase et de gélification a lieu. Ces cinétiques peuvent être contrôlées par de nombreux facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques au système mixte.

L'objectif de cette étude est de comprendre comment ces facteurs modifient la structuration des systèmes protéines globulaires/pectines LM au cours d'un processus thermique. La majorité de cette étude porte sur les mélanges SAB/pectines LM et une partie sur les mélanges β-Lg/pectines LM. Ce travail vise à décrire les propriétés rhéologiques et structurales des systèmes mixtes en les comparant aux propriétés des biopolymères séparément afin de comprendre le type d'interactions existant au sein du mélange et de ce fait de déterminer quels facteurs peuvent les contrôler. En particulier, après avoir évoqué dans la revue bibliographique que la nature et la teneur en sels affectent la gélification des protéines globulaires et des pectines LM, nous nous sommes interrogés sur l'influence de ce facteur dans les mélanges.

Pour aborder ces questions nous avons choisi comme approche d'étudier les propriétés de gélification de la SAB seule puis des mélanges SAB/pectines LM et β-Lg/pectines LM. Cette étude est ainsi structurée en quatre parties :

Dans un premier temps (**Chapitre III**) l'influence des cations (Na^+ ou Ca^{2+}) sur la structure des gels de SAB à pH 7 sera présentée sur la base de mesures de diffusion de la lumière complétées par des observations en microscopie confocale à balayage laser (MCBL).

Dans les chapitres suivants, par une approche globale en combinant des observations macroscopiques, microscopiques et des mesures rhéologiques aux faibles déformations, nous allons décrire les propriétés rhéologiques et structurales des mélanges SAB/pectines LM après un traitement thermique à pH 6,8 dans NaCl 100 mM.

L'influence de la concentration en biopolymères et la présence de calcium sera examinée de manière détaillée dans le**Chapitre IV**. L'influence de la force ionique du milieu apportée par NaCl, $CaCl_2$ ou un mélange NaCl/$CaCl_2$ sera ensuite présentée (**Chapitre V**).

Enfin, dans une dernière étape, l'influence de la nature de la protéine globulaire a été considérée en comparant les propriétés des mélanges SAB/pectines LM aux mélanges β-Lactoglobuline/pectines LM dans l'eau et dans NaCl 100 mM en présence ou non de calcium (**Chapitre VI**).

II. Matériels et Méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Echantillons utilisés et préparation des solutions mères

II.1.1.1 Pectines faiblement méthylées (pectines LM)

L'échantillon utilisé dans cette étude a été fourni par la société Degussa Food Ingredients (Baupte, France) (lot 90619). Le degré de méthylation mesuré par titrimétrie est de 28,1 % et le pourcentage d'acide galacturonique est de 70,6. La poudre brute fournie a été purifiée par mise sous forme acide par lavage avec un mélange éthanol acide à 95 % suivi d'un lavage abondant à l'éthanol à 70 % pour éliminer les sels et le chlore en excès.

La poudre purifiée de Pectines LM est mise en solution par dispersion à environ 3 % dans l'eau millipore à température ambiante pendant 3 heures. Afin d'éviter toute contamination bactérienne, de l'azoture de sodium est rajouté aux solutions (0,02 %). La neutralisation est réalisée avec NaOH 100 mM et NaOH 10 mM. Les dispersions sont ensuite homogénéisées pendant une nuit à 4 °C pour poursuivre l'hydratation. Les solutions sont alors filtrées successivement sur des porosités de 8, 3, 0,8 et 0,45 µm (Millipore, Irlande) afin d'éliminer les particules et les agrégats non dissous.

Les solutions sont dialysées 72 h contre du dextrane T 40 (M = 40 kDa, Sigma, Danemark) en solution aqueuse à pH 6,8 à 37,5 %. Les solutions obtenues ont une concentration variant de 2,5 à 3,5 % à pH 6,8 et sont conservées à 4 °C.

II.1.1.2 Albumine de sérum bovin (SAB)

Nous avons utilisé un échantillon fourni par ICN (référence 103700, lots n° 85640 et R16077), obtenu par le procédé de fractionnement à froid selon la méthode de Cohn. La protéine n'est jamais chauffée durant le procédé, ce qui garantit qu'elle se trouve bien sous forme native. D'après le fournisseur, la pureté de l'échantillon est estimée à 98–99 % et le pourcentage de protéines dénaturées mesuré par électrophorèse et mesures de solubilité est inférieur à 0,2 %. La poudre est délipidée avec du n-pentane, afin d'éliminer les acides gras adsorbés à la surface de la protéine. Pour cette opération, la poudre brute fournie est dispersée à froid (4 °C) dans environ 20 volumes de n-pentane, puis mis sous agitation magnétique pendant 2 h. Elle est ensuite récupérée par filtration sur verre fritté n°4 (porosité: 5 à 15 μm), cette opération est répétée trois fois de suite. Enfin, la poudre est séchée sous vide pendant 48 h à température ambiante. La poudre délipidée est conservée à 4 °C.

Les solutions aqueuses de SAB délipidée sont préparées en versant très lentement la poudre dans la solution saline désirée, additionnée d'azoture de sodium (0,02 %). Cette opération se déroule à froid (4 °C) et sous agitation magnétique modérée. La solution est maintenue sous agitation modérée pendant une nuit à 4 °C. Après dissolution complète, une centrifugation pendant 30 min à 16 000 *g* permet d'éliminer les insolubles (à l'état de traces) et d'obtenir une solution de couleur jaune pâle parfaitement limpide. Les solutions ainsi préparées ont un pH de 5,2, ce qui correspond au point isoélectrique de la SAB. Les solutions à pH 6,8 sont obtenues par ajout de NaOH 1 M. Le stockage se fait à 4 °C.

II.1.1.3 La β-Lactoglobuline

L'échantillon utilisé dans cette étude a été fourni par la société Lactalis (Laval, France) (lot 958). La poudre fournie a été obtenue après purification par mise sous forme acide (pH 3,5). Selon le fournisseur, la poudre contient 90 % de β-Lg, 1,6 % d'α-Lactalbumine.

La préparation des solutions de β-lg se fait suivant la méthode décrite précédemment pour la SAB, hormis le fait que l'ajustement à pH 6,8 se fait avant l'étape de centrifugation. Les solutions ainsi préparées sont incolores et limpides. La conservation se fait à 4°C.

II.1.2 Préparation des mélanges

Les mélanges sont préparés à 20 °C puis chauffés à 50 °C. Deux protocoles ont été choisis en fonction de la force ionique du milieu. Les propriétés des mélanges ont été comparées à celles des polymères individuels. Les protocoles de préparation des mélanges présentés ci-dessous ont également été appliqués de façon rigoureusement identique pour les biopolymères considérés individuellement en remplaçant le polymère manquant par son solvant.

II.1.2.1 Mélanges SAB/pectines LM à température ambiante, pH 6,8

Le mélange SAB/pectines LM est effectué par agitation au vortex pendant 2 min à température ambiante. Le pH du mélange est alors vérifié et ajusté à 6,8 si nécessaire. Les concentrations finales en Pectines LM et SAB varient respectivement de 0,21 à 2 % et de 1 à 10 %. La concentration en NaCl est égale à 0 ou 100 mM.

II.1.2.2 Mélanges SAB/pectines LM à 50 °C, dans NaCl 100 mM, pH 6,8

Le mélange SAB (lot 85640)/pectines LM (3 mL) est d'abord réalisé selon le protocole décrit ci-dessus à partir d'une solution de SAB préparée dans NaCl 200 mM et d'une solution de pectines LM préparée dans l'eau.

Les Pectines LM gélifiant en présence de calcium à des températures généralement inférieures à 50 °C et les protéines globulaires se dénaturant à des températures supérieures à 50 °C, nous avons choisi d'effectuer le mélange à cette température.

Le mélange est ainsi placé dans un bain à 50 °C pendant 2 min sous agitation magnétique. Simultanément, une solution de $CaCl_2$ 6 mM dans NaCl 100 mM est mise à la même température. 3 mL de cette solution de $CaCl_2$/ NaCl sont alors prélevés à l'aide d'une pipette et versés goutte à goutte dans le mélange SAB/Pectines LM. L'agitation du mélange est ensuite poursuivie 3 min à 50 °C. Les concentrations finales en Pectines LM et SAB varient respectivement de 0,21 à 0,85 et de 2 à 8 %.

II.1.2.3 Mélanges SAB ou β-Lg/pectines LM à 50 °C, pH 6,8, pour différentes forces ioniques

Pour cette étude le lot de SAB R16077 a été utilisé, le lot 85640 étant épuisé chez le fournisseur. Les concentrations finales en pectines LM et protéines sont égales à 0,21, 0,43 ou 0,85 et de 8 % respectivement. Le mélange est préparé dans l'eau à 20 °C puis placé au bain-marie à 50 °C. Une solution de NaCl ou $CaCl_2$ ou NaCl/$CaCl_2$ est alors ajoutée selon le même protocole que précédemment, de façon à avoir une force ionique extrinsèque au système (*ie* apportée par les ions présents dans le milieu), variant de 0 à 100 mM.

Le calcul de la force ionique extrinsèque au système, est réalisé d'après la théorie de Debye-Huckel.

$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum_i C_i \cdot Z_i^2 \qquad \textit{Equation II.1}$$

où I correspond la force ionique totale (en mol.L^{-1}) apportée par les ions i de concentration C_i (en mol.L^{-1}) et de charge Z_i.

II.2 Méthodes

II.2.1 Caractérisation des échantillons et des solutions

II.2.1.1 Détermination de la concentration

- *Matière sèche*

Cette méthode consiste à peser une certaine quantité de solution (~3 mL), la déposer dans une capsule en verre parfaitement sèche puis à évaporer l'eau de l'échantillon pendant 48 h dans une étuve à 104 °C afin de mesurer la masse de matière sèche restante. Une moyenne est effectuée sur deux capsules.

- *Spectrophotométrie UV*

L'appareil que nous avons utilisé est un spectrophotomètre UV / visible Perkin Elmer Lambda 2. L'échantillon est placé dans une cuve d'épaisseur 1 cm, traversée par un faisceau monochromatique de longueur d'onde décroissante (λ = 360$\acute{\eta}$260nm), ce qui permet

d'enregistrer un spectre de densité optique. La concentration en protéines est calculée avec la loi de Beer-Lambert. Dans le cas de la SAB et de la β-lg, le maximum de densité optique se situe à 278 nm et les coefficients d'extinction molaire à cette longueur d'onde, sont pour ces deux protéines, respectivement de 0,667 et 0,96 $L.g^{-1}.cm^{-1}$ à 25°C (Townend *et al.*, 1960; Peters, 1975). Cependant, il est nécessaire d'apporter une correction à la valeur de densité optique relevée sur le spectre. En effet, en raison du phénomène de diffusion dû à des insolubles résiduels présents dans la solution, il faut soustraire à la densité optique mesurée à λ = 278 nm la valeur moyenne de la densité optique apportée par la turbidité de la solution (DO_τ) à cette longueur d'onde. Celle-ci se calcule aisément puisqu'elle suit une loi du type :

$$\log DO_\tau = a - b \log \lambda \qquad \textit{Equation II.2}$$

où *a* et *b* sont calculés par ajustement du spectre entre 320 et 360 nm, c'est-à-dire sur une plage où la densité optique de la protéine est négligeable face à celle liée à la turbidité.

II.2.1.2 Teneurs en ions des échantillons

Les teneurs en sels (Na^+, Cl^-) contenus dans les échantillons ont été données par le fournisseur directement. Pour compléter ces analyses (teneurs en Ca^{2+} pour le SAB et les pectines et Ca^{2+}, Na^+, Cl^- pour la β-Lg), des mesures ont été effectuées par la société Toxilabo (Nantes) par dosage par absorption atomique de flamme. Pour cela, les solutions de protéines et pectines LM sont préparées à une concentration d'environ 0,1 % dans l'eau, mises à pH 7 selon les protocoles indiqués précédemment (voir II.1.1). Les teneurs en ions en $\mu mol.g^{-1}$ des échantillons sont données dans le tableau ci-dessous.

*Tableau II.1: Teneurs en ions sodium, chlorure et calcium en $\mu mol.g^{-1}$ de poudre des différents échantillons utilisés. Les valeurs indiquées par * ont été obtenues par dosage par absorption atomique de flamme; les autres valeurs ont été données par le fournisseur.*

	SAB		β-Lg	Pectine LM
n° lot	85640	R 16077	958	90619
Na^+	21,7	1,74	17,6*	
Cl^-	33,8	3,94	873*	
Ca^{2+}	2,4*	2,33*	14,8*	34,13*

L'équilibre ionique au sein de la solution protéique à pH 6,8 peut être calculé selon l'équation II.3 (Cannan *et al.*,, 1942):

$$\frac{Z \cdot C}{M} = [Cl^-] + [OH^-] - [Na^+] - [H^+] \qquad \textit{Equation II.3}$$

avec C: la concentration en protéine en $g.L^{-1}$, M la masse moléculaire de la protéine et Z la charge nette de la protéine (égale à –18 pour la SAB (Peters, 1975) et –7,8 (Renard & Lefebvre, 1992) pour la β-Lg à pH 7). Dans le cas où le pH est ajusté à partir d'une solution de protéine isoélectrique (cas pour la SAB), on soustrait la concentration en [NaOH] à l'équation II.3. Ceci permet de calculer l'apport des ions Na^+ lors de l'ajustement du pH.

Pour les solutions de pectines LM, au pH choisi pour cette étude (6,8), la concentration en groupements carboxyles en $eq.L^{-1}$ est calculée par l'équation II.4.

$$[COO^-] = \frac{C_{pectineLM} \cdot (\%AG) \cdot \left(\frac{100 - DM}{DM}\right)}{M_{AG}} \qquad \textit{Equation II.4}$$

où $C_{pectine\ LM}$ est la concentration en pectines LM en $g.L^{-1}$; $\%AG$ est le pourcentage d'acide galacturonique; DM est le degré de méthylation et M_{AG} est la masse molaire de l'acide galacturonique égale à 176 $g.mol^{-1}$.

On peut en déduire ainsi la force ionique intrinsèque (I') apportée par la solution de pectines LM est donnée par l'équation suivante (Rinaudo & Domard, 1973):

$$I' = \alpha\, \gamma\, [COO^-] \qquad \textit{Equation II.5}$$

où α correspond à la fraction de groupements ionisée (α = 1 à pH 6,8), γ est le coefficient d'activité du contre-ion sodium monovalent (γ_{Na} = 0,507).

II.2.1.3 Viscosité intrinsèque des pectines LM

- *Principe*

La viscosité intrinsèque reflète le volume hydrodynamique occupé par une unité de masse de l'espèce étudiée. Elle est définie par une extrapolation à dilution infinie:

$$[\eta] = \lim_{C \to 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 \cdot C} = \lim_{C \to 0} \frac{\eta_{sp}}{C} \qquad \textit{Equation II.6}$$

avec C, la concentration en polymère ($g.L^{-1}$); η, la viscosité de la solution (Pa.s); η_0, la viscosité du solvant (Pa.s) et η_{sp} la viscosité spécifique.

Expérimentalement, la viscosité intrinsèque est déterminée par la double extrapolation de Huggins et de Kraemer selon les relations :

Equation de Huggins : $\frac{[\eta_{sp}]}{C} = [\eta] + \lambda_1 \cdot C \cdot [\eta]^2$ *Equation II.7*

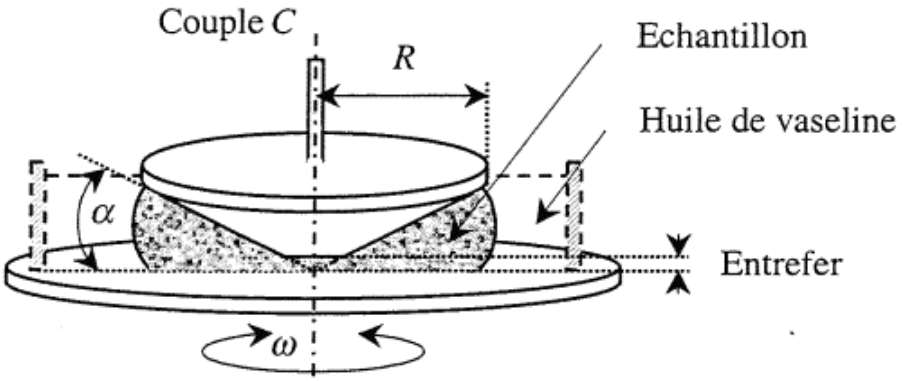
Equation de Kraemer : $\frac{ln(\eta/\eta_0)}{C} = [\eta] - \lambda_2 \cdot C \cdot [\eta]^2$ *Equation II.8*

Avec λ_1 et λ_2 les constantes de Huggins et de Kraemer.

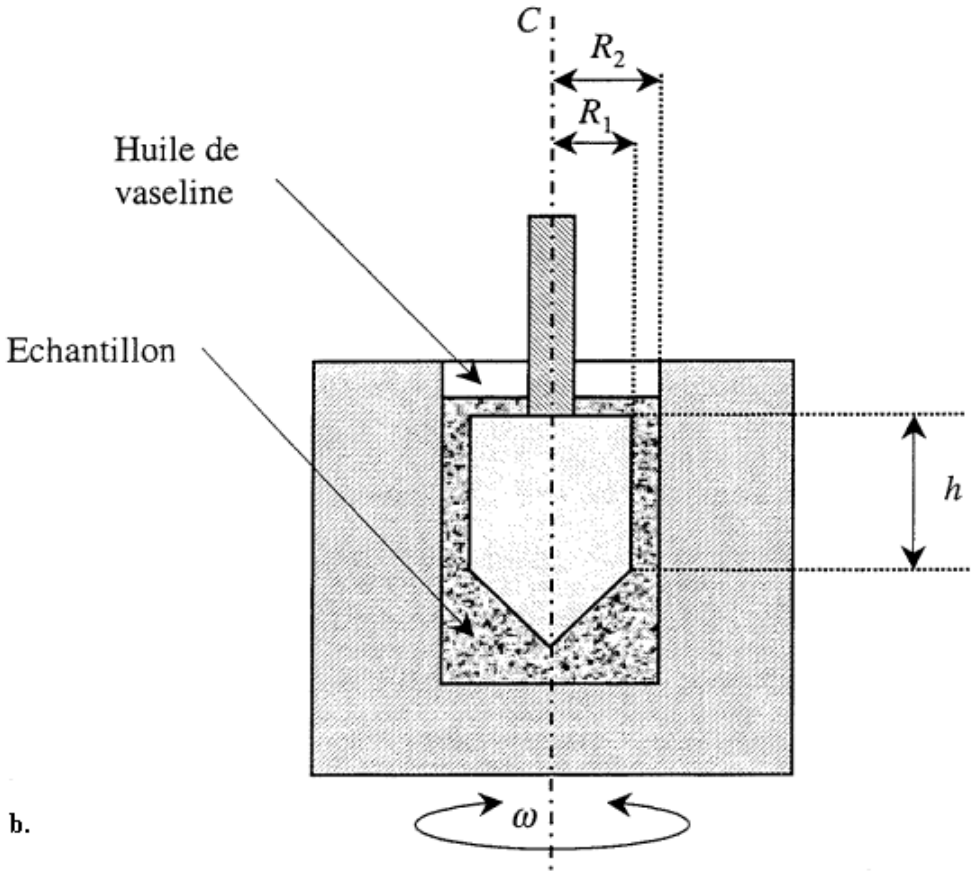
- *Protocole opératoire*

Le rhéomètre Low Shear LS 40 (Contraves, Zürich) à contrainte imposée a été utilisé pour cette mesure. Il a été utilisé avec un système de mesure à cylindres coaxiaux schématisé sur la Figure II.1 (R_1 = 6 mm ; R_2 = 6,5 mm ; h = 18 mm ; acier). La sensibilité de ce rhéomètre est très élevée puisque le couple minimal mesurable est de 1,6 η 10^{-8} N.m. La vitesse minimale de cisaillement est de 2,7 η 10^{-4} s^{-1}. La régulation en température se fait au niveau de la partie extérieure par l'intermédiaire d'un bain thermostaté.

Figure II.1 Représentation schématique des géométries utilisées avec l' AR2000 (a) et le LS 40 (b).



a.



b.

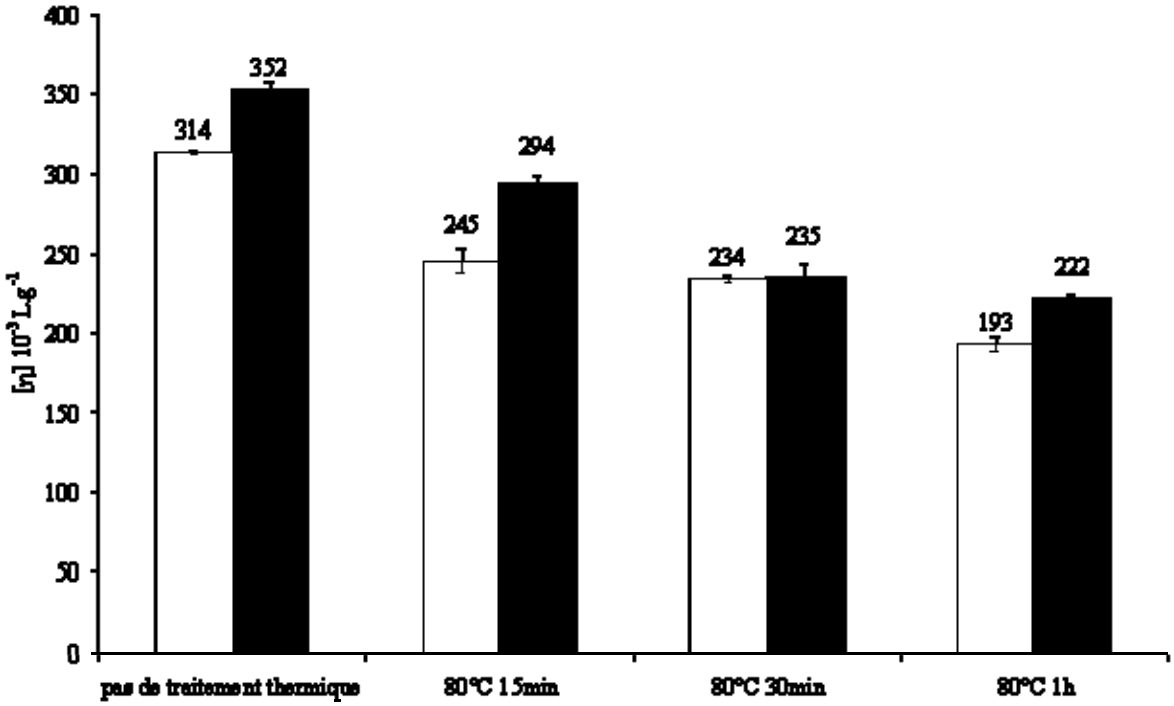
Des solutions de concentrations différentes sont préparées en s'assurant qu'elles se situent dans le régime dilué et que leur comportement est newtonien. La viscosité est ensuite déterminée en effectuant un balayage en vitesse de cisaillement de 0 à 10^2 s^{-1}. Enfin, la

viscosité intrinsèque est déterminée en extrapolant à concentration nulle les deux régressions linéaires correspondant aux équations de Huggins et de Kraemer. La viscosité intrinsèque des pectines LM faiblement méthylées a été mesurée à 20°C dans NaCl 100 mM à pH 6,8. Elle a également été mesurée pour les pectines LM marquées avec la sonde fluorescente, la fluorescéine amine (pectines LM-FA) (voir II.2.6.1). Les mesures ont été réalisées à 20 °C avant ou après avoir chauffé les solutions pendant 15, 30, 60 min à 80°C et refroidies.

- *Viscosités intrinsèques caractérisant les systèmes étudiés*

Les valeurs de viscosité intrinsèque des pectines LM et de FA-pectines LM sont reportées dans la Figure II.2. L'influence d'un traitement thermique (15, 30, 60 min à 80 °C) sur les valeurs est également montrée.

Figure II.2 : Viscosité intrinsèque ($[\eta].10^{-3}$ L.g^{-1}) d'une solution de pectine LM (barres vides) et de pectine LM-FA (barres pleines) dans NaCl 100 mM à pH 7 mesurée à 20°C avant ou après un traitement thermique à 80°C de 15, 30, 60 min (2 mesures pour chaque condition).



La viscosité intrinsèque des pectines LM à 20 °C est de 314*10^{-3} L.g^{-1}. Lorsque les solutions ont subi un traitement thermique à 80 °C, cette valeur diminue de 245*10^{-3} L.g^{-1} à 234*10^{-3}

$L.g^{-1}$ pour une durée de traitement thermique de 15 et 30 min respectivement et est égale à $193*10^{-3}$ $L.g^{-1}$ lorsque le traitement thermique est de 60 min. Cette diminution peut être attribuée à une légère dégradation des chaînes pectiques. La réaction de β-élimination pourrait être à l'origine de cette dépolymérisation. Cependant ce type de réaction est plus probable pour les pectines HM (Axelos & Branger, 1997). Ces auteurs suggèrent que la réduction de viscosité intrinsèque pour les pectines LM serait liée à un changement conformationnel irréversible des chaînes pectiques du fait du changement de leurs interactions avec le solvant au cours du chauffage.

Les valeurs de viscosité intrinsèque des pectines LM-FA suivent le même comportement en regard du traitement thermique. Toutefois, elles sont légèrement supérieures. Nous avons vérifié que les propriétés gélifiantes n'étaient pas affectées par la présence du marqueur. On peut donc considérer que le marquage des pectines LM n'affecte que légèrement le degré de polymérisation des chaînes pectiques.

II.2.1.4 Concentration critique de gélification de la SAB

L'évaluation des concentrations critiques de gélification après 12 et 48 h de chauffage à 80°C a été réalisée sur les solutions de SAB préparées comme décrit dans le chapitre II.1.2. Les solutions de SAB (3 mL) sont placées dans des tubes en verre scellés avec un film de parafilm et placées 12 ou 48 h dans un bain marie à 80°C, puis refroidies en les plaçant dans une pièce thermostatée à 20°C pendant 12 h.

Les tubes sont alors observés visuellement. La concentration critique de gélification correspond à la concentration où on observe un réseau macroscopique. Celui-ci est mis en évidence lors de l'apparition d'un précipité ou, pour de plus faibles teneurs en sel dans le milieu, lorsqu'une structure ne s'écoulant pas sous son propre poids se forme. Pour chaque système on note la dernière concentration testée où le système est dans l'état «sol» et la première concentration où on observe un gel.

II.2.3 Diffusion de la lumière

II.2.3.1 Principe et Appareils utilisés

Les bases théoriques des mesures de diffusion de la lumière dans un système agrégé sont données dans l'Annexe I. Nous détaillerons ici l'appareillage, le mode opératoire et les traitements des résultats effectués. Cette technique a été utilisée avec des solutions de SAB (lot R16077) préparées dans l'eau et pour différentes teneurs en sels (NaCl (25-200 mM) ou $CaCl_2$ (0,1-1,5 mM)). Les solutions de SAB sont ajustées à pH 7 puis dialysées 48 h contre leur solvant de solubilisation ajusté à pH 7. Les solutions sont ensuite filtrées sur filtre de porosité 0,45 μm avant utilisation.

L'ensemble de ces mesures ont été réalisées en collaboration avec M. T. Nicolai, au laboratoire Polymère, Colloïdes, Interfaces (PCI), UMR 6120 (CNRS-Université du Maine), Le Mans.

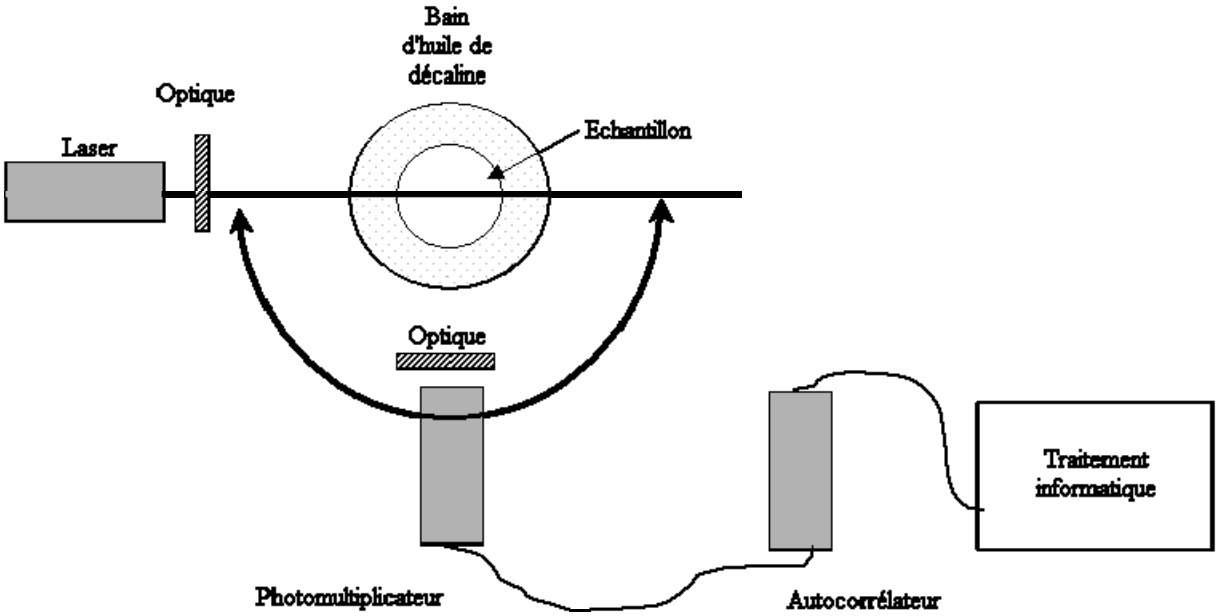
- *Diffusion de la lumière pour les systèmes transparents*

- Matériel utilisé

Les expériences sont réalisées sur un système ALV couplé à un laser solide Millenia de chez Spectra Physics ayant une longueur d'onde fixe de 532 nm.

Un schéma du montage utilisé pour l'appareil de mesure est présenté en Figure II.3.

Figure II.3 Schéma de l'appareil de mesure en diffusion de lumière pour les systèmes transparents (λ_{laser} = 532 nm).



Le faisceau est focalisé sur le centre de la cellule de diffusion grâce à un système optique (lentille + diaphragme). La cellule de diffusion cylindrique est placée au centre d'une cuve thermostatée par un bain externe au système et remplie de décaline qui est une huile isoréfractive du verre, permettant ainsi d'éviter les problèmes de reflets du faisceau incident. Le faisceau utilisé éclaire directement une partie de la surface active de la photocathode du photomultiplicateur (PM). Cette surface peut être modifiée grâce à un système de diaphragmes de façon à mesurer une intensité comprise entre les limites de précision de l'appareil (~10-1000 kHz). Le signal photoélectrique est alors transformé en un signal électrique et amplifié de façon à être utilisable par l'analyseur. La corrélation de photons est assurée par un corrélateur digital ALV-5000/E multitau.

On rapporte toujours l'intensité diffusée à celle diffusée par une référence (dans notre cas il s'agit d'un solvant, le toluène) de façon à s'affranchir des problèmes liés à la fluctuation de puissance du faisceau. En milieu transparent et à faible concentration, les photons ne sont diffusés qu'une seule fois et l'intensité mesurée à un angle q provient donc uniquement des photons diffusés une fois à cet angle.

Les systèmes sont préparés dans des tubes de 10 mm fermés hermétiquement par du parafilm et chauffés 48 h dans un bain marie à 80 °C puis refroidis à 20 °C.

L'intensité diffusée par les systèmes est alors mesurée en fonction du temps pour différents angles à 20 °C. Pour les systèmes gélifiés, le système ne peut pas relaxer dans l'échelle de temps de mesure car l'hétérogénéité est figée par la connectivité du système. Dans ce cas, on réalise une moyenne spatiale pour accéder au temps de relaxation. Cette opération est réalisée en tournant l'échantillon à faible vitesse.

- Protocole expérimental

Les mesures ont été effectuées sur une gamme d'angle s'étendant de 10 à 140°. Une moyenne temporelle de l'intensité mesurée est effectuée sur 2 min.

Le corrélateur permet de sonder une échelle temporelle comprise entre 0,2 μs et quelques dizaines de secondes. Avant d'effectuer les mesures, l'alignement de l'appareillage est vérifié en passant un étalon de toluène à différents angles. Si la dépendance angulaire diffusée par le toluène est inférieure ou égale à 1 %, l'appareil est considéré comme convenablement aligné.

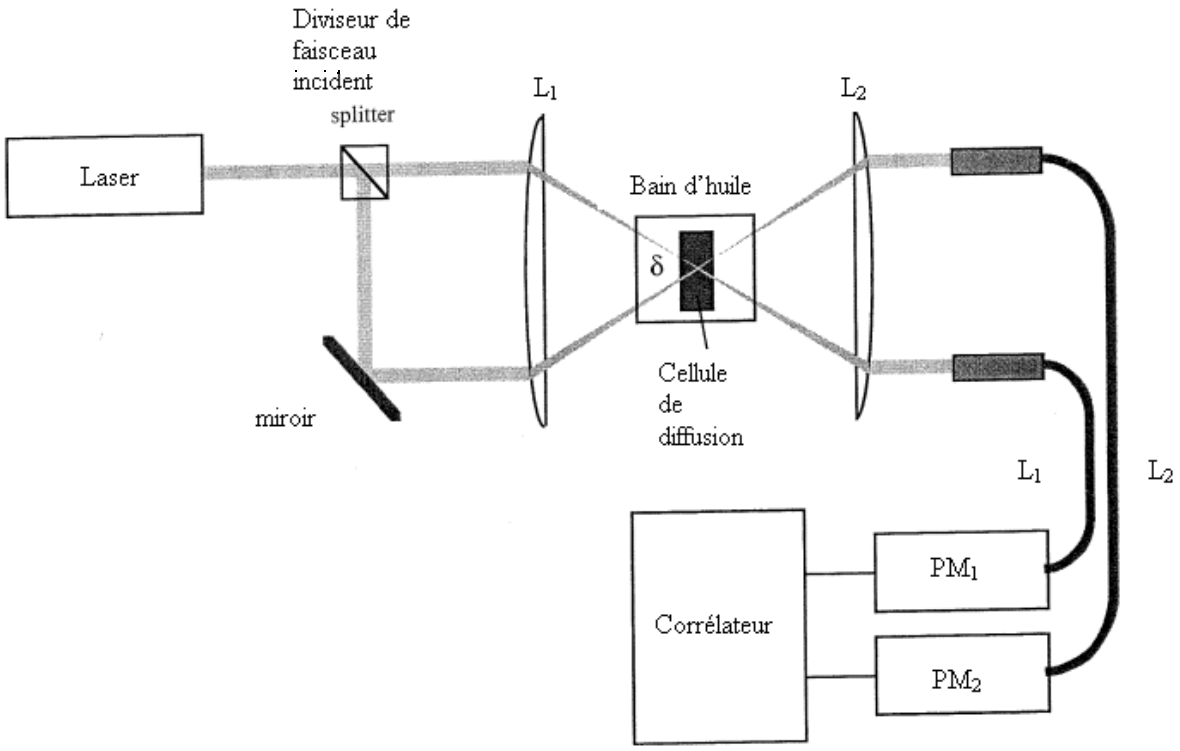
L'analyse de la fonction d'auto-corrélation $g_1(q,t)$ est effectuée via un logiciel GENDIST. Pour certains systèmes deux populations (particules et gros agrégats) sont mises en évidence par une distribution large de temps de relaxation. La quantification de chacune des populations en diffusion dynamique de la lumière permet de recalculer à chaque angle l'intensité diffusée par les particules, d'une part, et celle diffusée par les amas, de l'autre.

- *Diffusion de la lumière pour les systèmes turbides*

- Matériel utilisé

Les mesures ont été réalisé à 20 °C sur un instrument de diffusion de la lumière en corrélation croisée schématisé sur la Figure II.4 (LS Instruments, Fribourg, Suisse). Le principe de ce type d'appareillage est proche de celui décrit pour la diffusion simple mais la source lumineuse est émise par une diode ayant pour longueur d'onde 685 nm et se divise en deux lasers synchrones de même longueur d'onde. Ce principe permet de s'affranchir de la diffusion multiple existant au sein des échantillons turbides (voir Annexe I) (Urban & Schurtenberger, 1988). La corrélation des photons est assurée par un corrélateur digital (ALV-5000E, ALV).

Figure II.4 Schéma de l'appareil de mesure en diffusion de lumière en milieu turbide. (λ_{laser} = 685 nm) D'après Urban & Schurtenberger (1998).



Afin de diminuer l'effet de la turbidité, des tubes de diamètre interne de 2 ou 4 mm de diamètre sont employés. Les tubes contenant les solutions de protéines sont fermés de façon hermétique avec du parafilm et chauffés 48 h dans un bain à 80 °C puis refroidis à 20 °C.

La cellule de diffusion cylindrique est également placée au centre d'une cuve thermostatée à 20 °C par un bain externe au système et remplie d'huile de décaline. Les tubes contenant des systèmes gélifiés sont tournés à faible vitesse.

- Protocole expérimental

La correction de l'intensité mesurée se fait selon différentes étapes de façon à obtenir l'intensité diffusée simple et à s'affranchir de l'intensité diffusée multiple (voir aussi Annexe I).

i) Détermination de l'intensité de référence ($I_{toluène}$)

De la même façon que décrite précédemment, il faut rapporter l'intensité diffusée par les échantillons à l'intensité diffusée par une référence connue (le toluène). Dans le cas de la

diffusion de lumière en corrélation croisée, l'intensité issue de la diffusion par les particules de toluène est très faible. Il est donc nécessaire de prendre un autre étalon dont l'intensité diffusée est plus forte et dont la dépendance angulaire reste nulle: le ludox. Il s'agit d'une solution de petites particules de silice faiblement concentrée (solution transparente à cette dilution) mais qui diffuse beaucoup du fait de la taille de ces particules (système monodisperse de 17 nm). L'intensité diffusée en corrélation croisée est ensuite rapportée en unité toluène grâce au rapport d'intensité mesuré entre ludox et le toluène sur l'appareil de diffusion de la lumière pour les milieux transparents.

ii) Détermination de $G_2(t)_{idéal}$

Dans une solution de ludox, les photons ne sont diffusés qu'une seule fois. La mesure de la fonction d'auto corrélation du ludox donne une valeur de $G_2(t)_{idéal}$.

iii) Détermination du facteur de correction (F) pour la diffusion multiple

Grâce à la fonction d'auto-corrélation, nous déterminons $G_2(t \to 0)$ de notre échantillon pour un angle donné variant de 10 à 140°. Cette mesure est d'autant plus délicate que la turbidité de l'échantillon augmente. En effet, à forte turbidité, la lumière reçue aux PM est faible et nécessite un temps d'acquisition très long pour obtenir des valeurs d'intercepte fiables. En pratique l'intensité de l'échantillon est fixée à 1000 Hz et la mesure dure entre 15-30 min (ou plus) de façon à avoir une valeur stable de $G_2(t \to 0)$. La racine carrée du rapport entre $G_2(t \to 0) / G_2(t)_{idéal}$ définit la facteur F.

iv) Détermination de la turbidité (τ) des systèmes

Les mesures de turbidité ont été réalisées avec le spectromètre UV décrit précédemment, équipé en plus d'un système Peltier (PTP-6 Peltier System) permettant de contrôler la température en fonction du temps.

La turbidité (τ) est définie comme suit.

$$\tau = (DO/\Delta l)*\ln(10) \qquad \text{Equation II.9}$$

où Δl correspond à la largeur de la cuve utilisée (en cm) et DO à la densité optique à 685 nm.

Les solutions de SAB sont placées dans des cuves en quartz d'épaisseurs variables (0,1; 0,2; 0,5; 1 cm) à 20 °C. Une rampe de température de 20 à 80 °C (6 °C.min^{-1}) est alors appliquée. Le temps de chauffage à 80°C est fixée entre 12 et 48 h (pour des raisons pratiques, le chauffage est parfois effectué en partie dans le spectromètre, puis les cuves sont placées dans un bain à 80°C). Enfin les cuves sont refroidies à 20°C à la vitesse de 10 °C.min^{-1}.

Un passeur de 5 cuves est utilisé. La référence est une cuve de 1 cm contenant le même solvant que la série d'échantillons. Afin d'éviter l'évaporation, quelques gouttes d'huile de paraffine sont déposées à la surface de la solution. La valeur de la turbidité mesurée après 48 h de chauffage à 80°C est prise en compte pour corriger l'intensité de la lumière diffusée.

v) Mesure de l'intensité totale (I_m)

L'intensité de l'échantillon est mesurée en faisant varier l'angle de mesure (θ) entre 10 et 140°. Une moyenne temporelle de l'intensité mesurée est effectuée sur 5 min.

A partir de ces différentes corrections, on en déduit l'intensité résultant de la diffusion simple ($I_{corrigée}$) qui est fonction de I_m, $I_{toluène}$, F et τ (voir équation A.43-annexe II).

II.2.3.2 Analyse des résultats

Dans les systèmes dilués, l'intensité *I(q)* est reliée au degré d'agrégation moyen en masse des agrégats m_w des agrégats constituants le système et au facteur de structure *S(q)* des solutés par la relation :

$$I(q) = K \cdot C \cdot m_w \cdot S_z(q) \qquad \textit{Equation II.10}$$

Avec *C* la concentration en protéines et *K* une constante optique; $S_z(q)$ peut être écrit en fonction du rayon de giration moyen en z (R_{gz}) des agrégats pour $q.Rgz << 1$:

$$S_z(q) = \left(1 + \frac{q^2 \cdot R_{gz}^2}{3}\right)^{-1} \qquad \textit{Equation II.11}$$

Lorsque q tend vers zéro $S_z(q)$ tend vers 1. En pratique, l'extrapolation de *I(q)/KC* en fonction de q pour q= 0 permet d'évaluer m_w. La courbe de $S_z(q)$ en fonction de q obtenue alors est

ajustée sur celle réprésentant l'équation théorique II.11, montrant S(q) en fonction de qR_{gz} ce qui permet de déterminer alors R_{gz}.

Pour les systèmes auto-similaires, $S(q) \sim q^{-df}$ (avec *df* la dimension fractale) où le préfacteur dépend de la structure fractale élémentaire des agrégats constituant le système, m_w augmente avec R_{gz}^{df}.

Pour les systèmes concentrés *S(q)* est le facteur de structure de la solution; m_w et R_{gz} sont remplacés dans les équations par la masse apparente moyenne des agrégats m_a et le rayon apparent de giration R_a.

II.2.4 Diagrammes d'état des mélanges SAB/pectines LM après traitement thermique

Les mélanges SAB/pectines LM d'une masse totale de 6 g sont réalisés dans des tubes en polystyrène de contenance 12 ml. Ils sont ensuite placés pendant 10 min dans un bain-marie à 80°C, puis laissés 15, 30 ou 60 min à 80°C avant d'être refroidis à 20°C dans une pièce climatisée. Une observation des tubes est ensuite réalisée. Cette première observation permet de définir le diagramme d'état en distinguant les systèmes qui présentent une séparation de phase macroscopique de ceux qui restent homogènes.

Dans un second temps, après avoir laissé les mélanges au repos à 20°C pendant 48 h, les tubes sont centrifugés pendant 3 h à 2600 *g* de manière à mieux définir l'interface des mélanges ayant démixé, et à accélérer la séparation de phase macroscopique des systèmes métastables qui n'auraient pas démixé pendant la période de repos. Une seconde observation des tubes est alors réalisée: on obtient ainsi le diagramme d'état après centrifugation. Les mêmes observations sont réalisées à température ambiante sans traitement thermique.

II.2.5 Mesures rhéologiques

Le principe des mesures rhéologiques en essai harmonique est détaillé dans l'Annexe II.

II.2.5.1 Appareil utilisé

Le rhéomètre AR 2000 (TA Instrument, Surrey, Grande-Bretagne) à contrainte imposée a été utilisé avec une géométrie de type cône-plan (R = 20 mm ; α = 4 ° ; entrefer = 102 μm; acier) (voir Figure II.1). Le couple imposé minimal selon le constructeur est de 0,1 μN.m et la

résolution angulaire de 0,04 μrad. La régulation en température se fait par l'intermédiaire du plateau inférieur, équipé d'un thermostat à effet Peltier et le dispositif anti-évaporation est constitué d'une enceinte amovible, que l'on remplit d'huile de paraffine jusqu'à ce que l'échantillon soit complètement recouvert. La dilatation de l'entrefer qui se produit au cours du traitement thermique est automatiquement compensée avec un gradient calibré en fonction du traitement thermique appliqué, égal dans notre cas, à 0,5 μm.°C^{-1}.

II.2.5.2 Protocole opératoire

L'échantillon préchauffé dans un bain à 50 °C est déposé sur le plateau du rhéomètre placé à la même température. Les modules G' et G'' sont mesurés à ς = 1 rad.s^{-1} à une déformation de 1 %, en fonction du temps et de la température. Le traitement thermique a été effectué *in situ*, grâce une rampe de température programmée. Les différentes rampes de température choisies sont identiques à celles imposées aux échantillons lors de l'établissement des diagrammes d'état, c'est à dire lorsque les échantillons sont placés dans un bain-marie à 80°C puis refroidis à 20 °C dans une pièce thermostatée. Il a été vérifié que le préchauffage à 50 °C n'influençait pas les propriétés des systèmes.

Une rampe de chauffage de 50 à 80 °C est appliquée avec une vitesse constante de 6 °C.min^{-1} puis la température de 80 °C est maintenue pendant 30 min. Le refroidissement se fait ensuite avec différentes rampes de températures de 80 à 40 ° à 4 °C.min^{-1}, de 40 °C à 25 °C à 1,5 °C.min^{-1} puis de 25 °C à 20 °C à 0,2 °C.min^{-1}. Le système est alors maintenu pendant 1 h à 20 °C. Un spectre viscoélastique à 20°C à une déformation de 1 % pour des fréquences variant de 10^2 à 10^{-2} rad.s^{-1} est alors effectué suivi d'un balayage en déformation de 1 à 5 % à 20 °C (ς = 1 rad.s^{-1}) pour vérifier le domaine linéaire.

Pour une partie de l'étude les différentes rampes de température de 80 à 20 °C.min^{-1} ont été remplacées par une seule rampe de vitesse égale à 10 °C.min^{-1}. Pour chaque mesure, au moins deux essais ont été réalisés.

II.2.6 Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)

II.2.6.1 Observations des systèmes

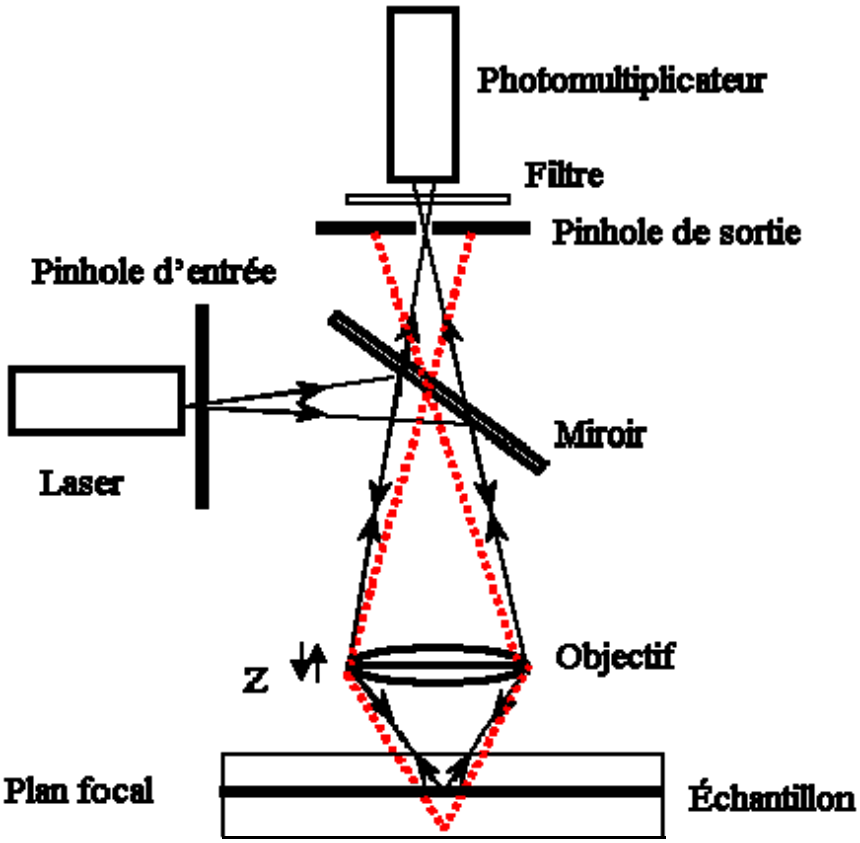
- *Principe et appareil utilisé*

Nous avons utilisé la microscopie confocale à balayage laser (MCBL) en mode fluorescence. Le schéma du principe de l'appareil est représenté sur la Figure II.5. La lumière d'excitation émise par des lasers monochromatiques passe par un diaphragme ("pinhole") d'excitation qui réduit la source à un point lumineux. Le laser est sélectionné en fonction des longueurs d'ondes d'excitation choisies. Le faisceau lumineux passe ensuite sur un miroir dichroïque qui réfléchit la lumière d'excitation en direction de l'échantillon. Celle-ci est alors focalisée en un plan de l'échantillon, appelée plan focal. Ce dernier capte alors la lumière émise par les fluorochromes excités (flèches noires sur la Figure II.5) qui est ensuite retransmise via l'objectif, en passant par un filtre d'émission, vers le capteur (photomultiplicateur), qui transforme le signal lumineux en signal électrique. La lumière émise par les fluorochromes situés au-dessus et au-dessous du plan focal est filtrée à l'entrée du détecteur par la présence d'un "pinhole de sortie"(flèches rouges sur la Figure II.5).

L'image est construite point à point par balayage (X, Y) du champ analysé à l'aide de miroirs de déflection de la source lumineuse. Une platine motorisée déplace la préparation suivant l'axe Z permettant la saisie de différents plans optiques dans l'épaisseur de l'objet et peut permettre de renseigner sur la structure tridimensionnelle de l'échantillon en superposant les images obtenues.

Les clichés de MCBL ont été réalisés avec un microscope inversé Zeiss LSM 410 Axiovert (Le Pecq, France) équipé de trois lasers produisant les longueurs d'onde 364, 488, 543 et 633 nm. L'objectif η40 à immersion dans l'eau a été utilisé en utilisant un zoom permettant d'observer les systèmes à l'échelle de 25 μm. Les pectines LM et les protéines étudiées ne possédant pas de propriétés de fluorescence naturelle après excitation à ces longueurs d'onde, il a été nécessaire de les marquer avec des sondes fluorescentes. Le choix des fluorochromes s'est fait parmi des composés fluorescents dont les maxima d'excitation sont distincts et proches des longueurs d'onde des lasers, et dont les maxima d'émission sont suffisamment éloignés pour qu'il n'y ait pas d'interférences entre les différentes émissions de fluorescence.

Figure II.5 Schéma de fonctionnement du MCBL:



- *Marquage des biopolymères*

Les protéines ont été marquées de manière non covalente à pH 6,8 par la rhodamine B isothiocyanate (RITC), dont les maxima d'excitation et d'émission se situent respectivement à λ = 543 nm et 580 nm dans le méthanol (http://www.probes.com). La RITC se fixe par le biais d'interactions hydrophobes sur les groupements apolaires de la protéine, ne perturbant pas ses caractéristiques structurales. Le marquage s'effectue par ajout de la poudre de RITC directement dans la solution de protéine de manière à obtenir une concentration en RITC de 2,5 mg/g de protéines. L'échantillon est homogénéisé ensuite pendant 2 h à 4 °C.

Les pectines LM ont été marquées de façon covalente avec la fluoresceine amine (FA) dont les maxima d'excitation et d'émission se situent respectivement à λ = 490 nm et 515 nm dans 100 mM NaOH (http://www.probes.com). Le protocole suivi a été mis au point au laboratoire par S. Durand (communication personnelle). 1 g de poudre de pectines LM est dissout dans

150 mL d'eau millipore, ajusté à pH 6,8 avec NaOH 0,01 M et homogénéisé une nuit à 4 °C. Parallèlement, 0,03 g de FA sont dissous dans 5 mL de DMSO et ajoutés à la solution de pectines LM. 30 μL d'acétaldéhyde et 30 μL de cyclohexane sont également ajoutés en tant que catalyseurs directement dans la solution de pectines LM. Le mélange réactionnel est ensuite laissé 5 heures à température ambiante. Le dérivé fluorescent obtenu est précipité en ajoutant 10 volumes d'éthanol à 95 %, puis lavé successivement avec de l'éthanol absolu et de l'acétone. Après une nuit dans une étuve à 35°C, le produit obtenu est redispersé dans de l'eau déionisée, de manière à obtenir une solution à environ 1 %. Après 48 h de dialyse contre de l'eau déionisée, permettant d'éliminer les marqueurs non fixés au polyoside, la solution de pectines LM-FA est lyophilisée. Le produit récupéré est conservé à 4 °C.

- *Observations des systèmes*

Les protéines-RITC et les pectines LM-FA ont été respectivement observées aux longueurs d'onde 543 nm (émission enregistrée entre 575-640 nm) et 488 nm (émission enregistrée entre 510-525 nm). L'excitation et l'émission de ces sondes fluorescentes se situent à des longueurs d'onde suffisamment éloignées pour que l'utilisation de bandes passantes appropriées permette d'éviter toute interférence.

Les solutions de protéines seules ou les mélanges sont placés entre lame concave et lamelle à température ambiante ou à 50 °C (voir II.1.4). L'ensemble est scellé avec du vernis à ongle, de manière à éviter toute évaporation. Une platine thermostatée par un système Peltier (Linkam PE 60, Surrey, Angleterre) permet d'appliquer au mélange le même traitement thermique que celui appliqué pour les mesures rhéologiques (voir II.5.2.2).

Pour chaque système, des clichés sont recueillis toutes les 15 min lors du traitement thermique à 80°C et à 60, 40 et 20°C lors de la descente en température. Une série de 10 images est prise alors après une heure à 20 °C. Chaque image numérisée se compose de 512*512 pixels ayant chacun un niveau de gris variant de 0 (noir) à 255 (blanc).

II.2.6.2 Analyse d'images par la méthode de co-occurrences

L'acquisition numérisée des images sur station de traitement d'images permet d'accroître les possibilités d'analyse et de quantification. La méthode d'interdépendances des variations des niveaux de gris (aussi appelée la méthode de co-occurrences) a été retenue. Il convient de

souligner que la notion de «texture» employée dans cette partie se réfère à l'organisation spatiale de l'image *i.e.* à son «aspect» et n'a absolument aucun rapport avec la notion de texture utilisée en rhéologie pour qualifier les propriétés mécaniques des systèmes.

L'analyse de texture d'image est communément utilisée pour segmenter et classifier les images entre elles (Lohmann, 1995). Une zone dite 'texturée' dans une image est caractérisée par une distribution spatiale de l'intensité des niveaux de gris variable et non uniforme. Cette variation peut être régulière ou aléatoire. Il est alors évident que pour des textures grossières, les variations de la distribution des niveaux de gris changent peu avec la distance entre pixels alors que pour des textures plus 'fines', ces variations sont plus grandes (Novales *et al.*, 1998).

Le principe de la méthode de co-occurrences est basé sur l'observation des valeurs de niveaux de gris de pixels séparés par une distance donnée dans une direction donnée à partir desquelles on définit une matrice dite de co-occurence. A partir cette matrice, 10 paramètres mathématiques sont extraits et nommés selon la classification d'Haralick (Haralick *et al.* 1973; Haralick 1979) : énergie, entropie, contraste, corrélation, moment différentiel inverse, probabilité maximale, moyenne des lignes en x, moyenne des lignes en y, écart des lignes en x, écart des lignes en y. La manière dont la matrice de co-occurrence est construite à partir des images de MCBL et la définition précise des paramètres sont détaillées dans l'Annexe III.

Une analyse en composante principale (ACP) est effectuée à partir des valeurs obtenues pour ces différents paramètres. Grâce à cette analyse, des composantes principales sont extraites, qui sont des combinaisons linéaires des variables d'origine (les paramètres de co-occurrences). Ces composantes principales ne sont pas corrélées entre elles et permettent de décrire quantitativement les principales variations observées dans les variables d'origine.

Des cartes factorielles peuvent être établies en traçant pour chaque image les valeurs obtenues pour deux des composantes principales (choisies par rapport au pourcentage d'information cumulées qu'elles fournissent). Sur ces cartes, deux points proches l'un de l'autre correspondent à des images ayant des aspects similaires et inversement pour des points éloignés (Jolliffe,1986). Il est possible d'expliquer alors les différences entre les images grâce à la carte factorielle associant les paramètres caractéristiques de chacun des axes.

La répétabilité des images prises pour les même systèmes mais préparés des jours différents avec différentes solutions mères a été vérifiée. Les paramètres extraits des images et traités en

ACP ont été comparés. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. Il a également été vérifié que les paramètres optiques de mesures pour chaque observation en MCBL (contraste, brillance) n'affectaient pas les résultats de cette analyse d'images.

II.2.6.3 Analyse d'images en utilisant la fonction de corrélation de paires

Cette méthode d'analyse d'images a été appliquée dans le but de quantifier une longueur de corrélation caractéristique χ sur les systèmes gélifiés de RITC-SAB à partir des images obtenues en MCBL.

Cette analyse a été réalisée par M. J.-C. Gimel (Laboratoire PCI, Le Mans).

Plusieurs hypothèses ont été prises en compte dans ce calcul. On considère tout d'abord que l'image à analyser est une coupe bidimensionnelle du système, l'épaisseur de celle-ci étant du même ordre de grandeur que celle de chaque pixel constituant l'image. En outre on suppose que l'intensité mesuré I(r) pour chaque pixel est proportionnelle à la concentration en protéines c(r) à la distance r du pixel choisi au hasard comme point de départ. Le calcul de la longueur caractéristique χ se base alors sur la définition de la fonction de paires définie dans l'Annexe I en prenant comme postulat de départ:

$$g(r) = C \cdot \frac{\langle i(0) \cdot i(r) \rangle}{\langle i \rangle^2} \qquad \textit{Equation II.12}$$

avec C la concentration en protéines dans l'image.

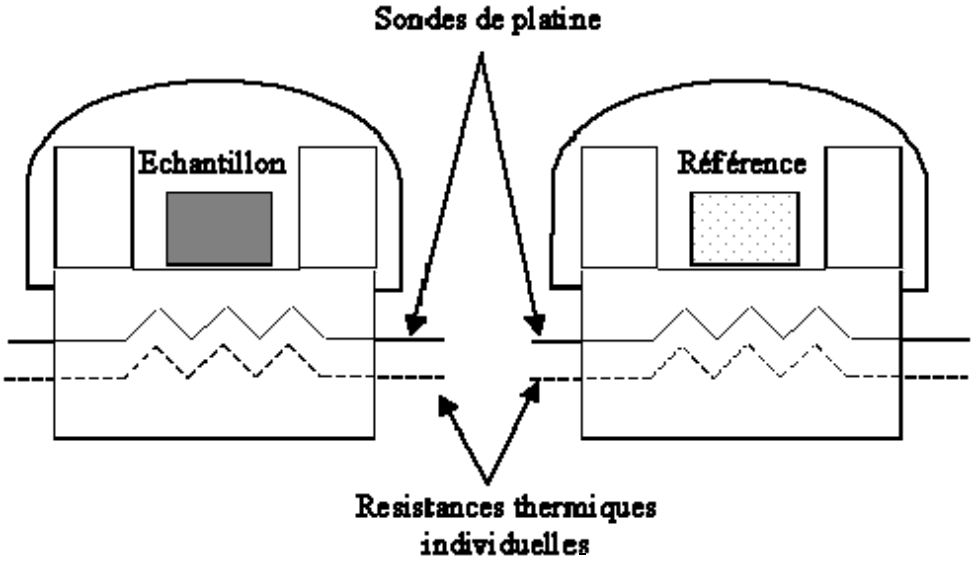
II.2.7 Analyse Enthalpique Différentielle (AED)

II.2.7.1 Principe et appareil utilisé

L'analyse enthalpique différentielle (AED) permet de mesurer les paramètres thermodynamiques et cinétiques de transition de phase. Cette méthode consiste à chauffer progressivement à vitesse constante l'échantillon à analyser et une référence inerte (solvant de la solution contenant l'échantillon) de même masse, dans le domaine de température étudié. A chaque instant, la différence de puissance électrique nécessaire pour maintenir l'échantillon et la référence à la même température est mesurée. Un étalonnage permet de convertir cette

mesure en flux de chaleur différentiel. La tête de mesure d'un système AED est représentée sur la Figure II.6.

Figure II.6 Représentation schématique du système d'analyse enthalpique différentielle (AED).



La différence de flux énergétique *dQ* est enregistrée tout au long de la programmation en température. Si une transition se produit dans l'intervalle de températures T_1 et T_2 ($T_1<T<T_2$), on aura :

$$dQ = dH + Cp\,dT \qquad \textit{Equation II.13}$$

avec *dQ* = énergie thermique ; *dH* = enthalpie de transition ; Cp = différence de capacité calorifique entre la référence et l'échantillon ; *dT* = intervalle de température.

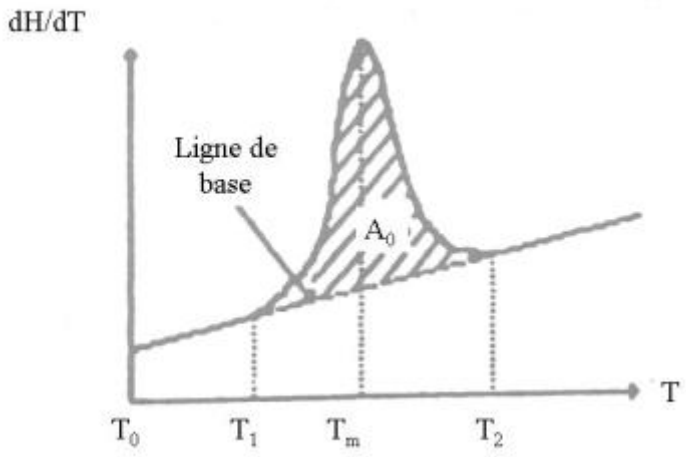
Ainsi, sur l'ensemble de cette plage de température, ΔH, l'enthalpie de transition est donnée par :

$$\Delta H = \int_{T1}^{T2} dQ - \int_{T1}^{T2} Cp\,dT \qquad \textit{Equation II.14}$$

Lorsqu'une transition thermique se produit au sein de l'échantillon, l'échange thermique se traduit par un thermogramme comportant un pic dont la surface est proportionnelle à la variation d'enthalpie ΔH de la réaction (Figure II.7). Si elle est positive elle traduit un apport supplémentaire d'énergie (réaction endothermique), à l'inverse si elle est négative, elle traduit

une diminution de l'énergie apportée (réaction exothermique). La température correspondant au maximum du pic de transition est considérée comme la température de vitesse de réaction maximum et elle détermine la température de transition.

Figure II.7 Représentation simplifiée d'un thermogramme d'AED dans le cas d'une transition endothermique. A_0: aire du pic; T_0: Température initiale; T_M température à l'instant t, T_1 et T_2: Températures de début et de fin de transition; dH/dT : flux différentiel d'énergie entre l'échantillon et la référence.



II.2.7.2 Protocole expérimental

Les mesures ont été réalisées à l'aide de deux microcalorimètres: SETARAM Micro DSC III (France) et Microcal (USA). La différence entre ces deux appareillages vient de leur sensibilité de détection. Ainsi avec le microcalorimètre SETARAM DSC III, des systèmes contenant des concentrations en protéines supérieures ou égales à 0,5 % sont étudiés, alors qu'avec le microcalorimètre Microcal, ces concentrations sont de l'ordre de 0,1 %.

Dans le cas du microcalorimètre SETARAM DSC III, ~800 µL de solution de SAB ou de mélange SAB/pectines LM préparé selon le protocole décrit en II.1 sont déposés à froid ou à 50°C dans une capsule en inox. La capsule contenant l'échantillon et la capsule de référence, de même masse, sont fermées par un joint thermorésistant. Elles sont mises en place dans le four de l'appareil. Les échantillons sont maintenus 15 min à 20°C puis une rampe de température est appliquée jusqu'à 100 °C à une vitesse linéaire de 1 °C.min^{-1} ou de 0,2 °C.min^{-1}. Les mesures de flux de chaleur sont enregistrées avec une sensibilité de l'ordre de 10^{-4} J.g^{-1}.

Dans le cas du microcalorimètre Microcal, ~1,5 mL de solution de SAB sont déposés à froid dans une cuve située dans l'appareil. La capsule contenant l'échantillon et la capsule de référence, de même masse, sont fermées par un joint thermorésistant. Les échantillons sont maintenus 15 min à 20°C puis une rampe de température est appliquée jusqu'à 100 °C à une vitesse linéaire de 1 °C.min^{-1}. Les mesures de flux de chaleur sont enregistrées avec une sensibilité inférieure à 4*10^{-4} J.g^{-1}.

III. Caractérisation de la structure des gels de SAB :

- Influence de NaCl ou $CaCl_2$

- Influence du temps de chauffage

Dans ce premier chapitre des résultats, nous avons voulu approfondir certains points relatifs à la gélification de la SAB selon les conditions ioniques (10-100 mM NaCl ou 0,1-3 mM $CaCl_2$). Les résultats sont présentés de la façon suivante.

Une étude de modélisation moléculaire a d'abord été réalisée afin d'établir d'un point de vue structural les possibilités de liaisons entre les ions calcium et la SAB, les ions sodium n'ayant pas d'affinité spécifique avec la protéine.

Notre travail s'est poursuivi sur l'étude des solutions de SAB soumises à un traitement thermique. La structure de la SAB passe ainsi de l'état natif à dénaturé et agrégé. Nous avons essayé de mettre en évidence l'influence de la nature des ions sur ces changements structuraux et sur les propriétés des gels résultants. Une observation générale des gels de SAB et la description des diagrammes d'état ont été effectuées. La description de la structure des gels a été ensuite menée par diffusion de la lumière et microscopie confocale à balayage laser (MCBL).

III.1 Etude de la complexation SAB native/Calcium par modélisation moléculaire

La visualisation graphique, quand elle était requise, ainsi que les calculs de minimisation énergétique ont été effectués sur les stations Silicon Graphics avec les logiciels InsightII et Discover, de la société Accelrys (Accelrys Inc. San diego CA, USA).

III.1.1 Hypothèse de départ

Nous nous sommes basés sur la structure cristallographique de la SAH, la structure de la SAB n'étant pas disponible à ce jour. Nous avons déjà indiqué la similarité entre la SAH et la SAB, celles-ci partageant 76% d'identité sur toute la longueur de leurs séquences primaires. A ce stade d'identité, nous pouvons raisonnablement faire l'hypothèse d'une structure 3D quasiment identique pour la BSA.

Les coordonnées de la structure native de la SAH, cristallisée sous forme dimérique et résolue à 2,50 Å, ont été sélectionnées. Son code correspondant dans la Protein Data Bank est 1bm0.pdb (http://www.rcsb.org/pdb/) (Berman *et al.*, 2000).

La localisation des sites potentiels de fixation de calcium s'est faite, d'une part, en considérant l'encombrement stérique du calcium et d'autre part, en localisant les acides aminés impliqués dans ces sites de fixation sur la base des données bibliographiques.

III.1.2 Positionnement des ions Ca^{2+} et optimisation

Les cavités et poches accessibles, présentes dans le monomère de la SAH ont été évaluées grâce au site Castp : http://cast.engr.uic.edu/cast/. Ce site mesure de manière analytique les surfaces et volumes accessibles d'une protéine (Liang *et al.*, 1998).

Ainsi, il a été montré que la protéine native offre plus de 82 poches ou cavités allant de 13 à 5880 $Å^3$. Or le volume (assimilé sphérique) occupé par un ion calcium peut se calculer aisément en prenant une valeur du rayon R = 2 Å. Pour qu'un ion calcium aille se loger dans une de ces cavités, celle-ci doit donc avoir un volume minimum de 34 $Å^3$.

Sachant que les ions Ca^{2+} sont fixés par les acides aminés montrant au moins un groupement carboxylate (Jin & Wang, 1991), seules les poches de volume supérieur ou égal à 34 $Å^3$,

possédant au moins un acide aspartique ou glutamique ont été retenues. En plus de cette base topologique et électrostatique, nous avons recherché la coordinance optimale du calcium avec une liaison de type heptadentate (7 ligands) (Strynadka & James, 1989).

La visualisation graphique de ces poches nous a permis de ne retenir que la large cavité centrale de la protéine satisfaisant ces critères. Celle-ci se décline plus précisément en trois poches localisées entre les lobes des domaines I-II, d'une part, et III d'autre part. Un ion Ca^{2+} a donc été soigneusement positionné dans chaque poche identifiée. Les liaisons avec les groupes carboxyliques ont été optimisées par un repositionnement des chaînes latérales des acides aminés quand il était nécessaire. Les acides aminés impliqués dans les trois poches sont listés ci-dessous :

Poche 1: D187(I), E400 (III) et K432 (III)

Poche 2: H146 (I), K190 (I), E425 (III)

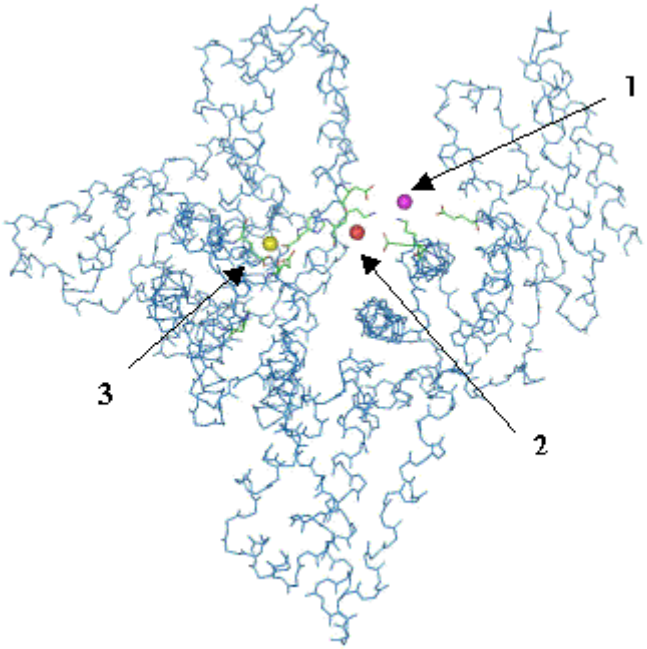
Poche 3: E153 (I), H242(II) et E292 (II).

Avec D: Acide Aspartique; E : acide Glutamique; K : Lysine et H : Histidine.

Après minimisation de l'énergie potentielle de la SAH native et complexée, les deux structures montrent des énergies potentielles équivalentes, respectivement, de -8936 $kcal.mol^{-1}$ *vs* -8932 $kcal.mol^{-1}$. Le delta énergétique de 4 $kcal.mol^{-1}$ est insuffisant pour affirmer que la protéine gagne en stabilité quand elle a fixé des ions calcium. Il a été noté toutefois que l'énergie potentielle du site 3 est la plus basse suggérant que celui-ci est le plus affin.

Au cours de la minimisation d'énergie, les ions calcium n'ont pas bougé, ce qui met en évidence que la cavité intérieure abrite bien des poches capables de fixer des ions Ca^{2+} (Figure III.1). Cependant, les énergies d'interaction entre la protéine et les ions sont trop faibles pour être significatives en tant que sites de fixation forts et spécifiques.

Figure III.1 Localisation des trois poches potentielles de fixation des ions calcium sur la structure de la HSA native. Les ions calcium sont représentés par des billes.



De manière tout à fait intéressante, le retour à la comparaison 1D de ces acides aminés avec la séquence protéique de la BSA montre une conservation évidente des acides aminés impliqués dans les trois poches identifiées comme site de fixation potentiel du calcium et le site 3, plus affin, est également conservé.

III.1.3 Conclusion

Cette étude nous a permis d'identifier, sur une base topologique (poche, cavité) et électrostatique (acides aminés Asparagique/Glutamique), au moins trois sites de fixation potentiels pour les ions calcium sur la structure native de la SAH. Ces derniers se fixent au cœur de la protéine, *ie* entre les domaines I et II, I et III.

Toutefois, l'affinité entre la protéine et les ions calcium n'est pas marquée au point de créer des sites de fixation forts. Il semblerait que la protéine puisse en effet arrimer des ions Ca^{2+} dans sa cavité interne mais de manière ni très spécifique, ni très affine.

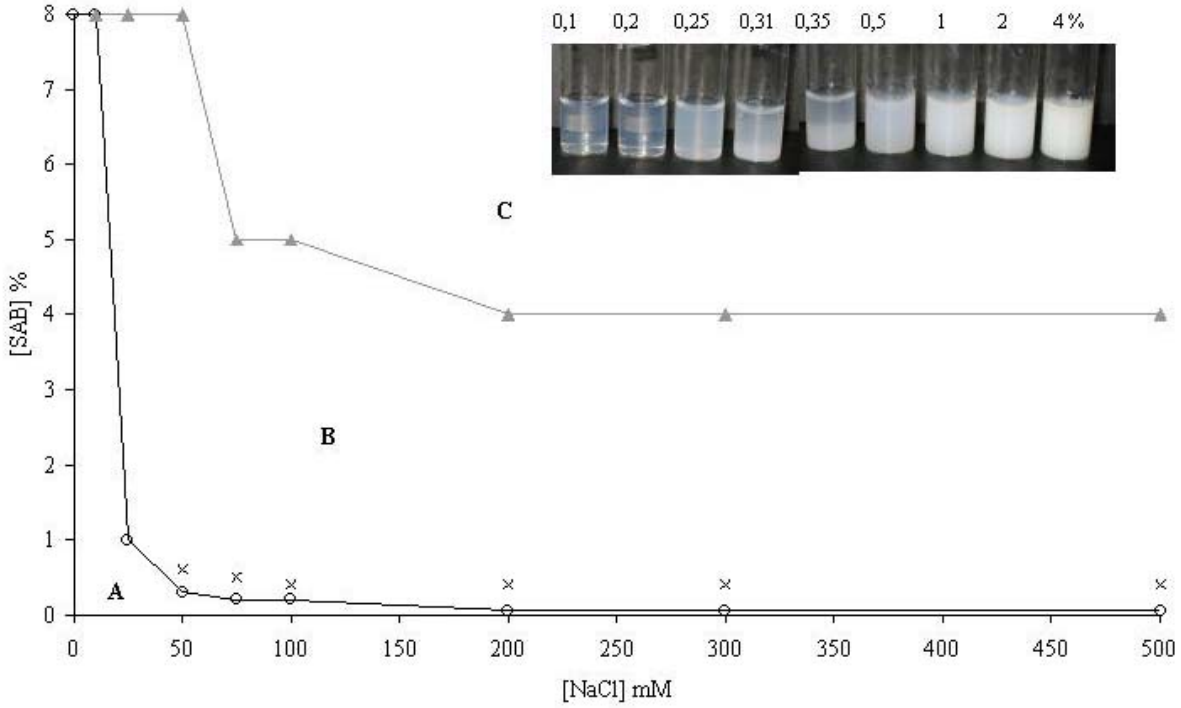
Au vu de l'alignement des deux séquences SAH/SAB, il est raisonnable d'envisager une fixation comparable chez la SAB puisque les acides aminés impliqués dans la fixation des Ca^{2+} sont conservés avec sept acides aminés strictement conservés sur les neuf impliqués.

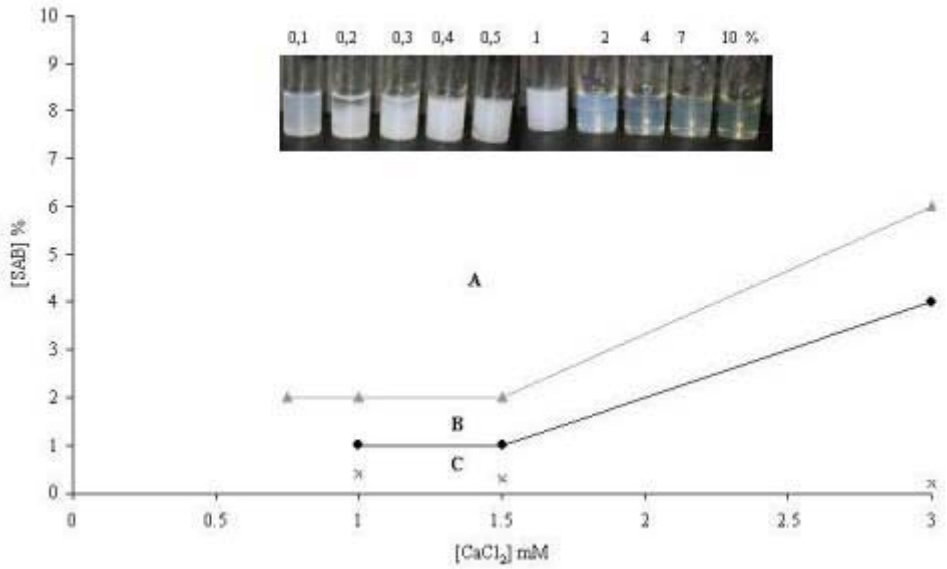
III.2 Diagramme d'état des gels de SAB

III.2.1 Observations visuelle de la turbidité des systèmes

La Figure III.2 présente les diagrammes d'état sur la base d'observations macroscopiques des gels de SAB à différentes concentrations (après un chauffage de 12 h à 80 °C) selon la concentration en NaCl et $CaCl_2$ (mM).

Figure III.2 Observations macroscopiques des gels de SAB en fonction de la concentration en NaCl (mM) (**a**); en $CaCl_2$ (**b**); obtenus après 12 h à 80 °C. A : systèmes transparents (limité par); B : systèmes turbides (p); C : systèmes opaques (˜). La dernière concentration où un précipité est visible est symbolisée par Í. A titre d'exemple, une série de photographies des systèmes obtenus dans NaCl 200 mM (Figure III.2a) et dans $CaCl_2$ 1 mM (Figure III2.b) sont présentées.





Ceci permet de distinguer trois types de systèmes: les systèmes transparents, les systèmes turbides et les systèmes opaques. Les systèmes transparents n'ont été observés que pour des concentrations inférieures ou égales à NaCl 10 mM et à $CaCl_2$ 0,5 mM. A partir de NaCl 25 mM, les systèmes apparaissent de plus en plus turbides voire opaques lorsque la concentration en sels augmente (Voir photo Figure III.2a pour NaCl 200 mM). En revanche à partir de 0,75 mM de $CaCl_2$ et en augmentant la concentration en protéines, les systèmes sont turbides voire opaques puis deviennent transparents (Voir photo Figure III.2b pour $CaCl_2$ 1 mM).

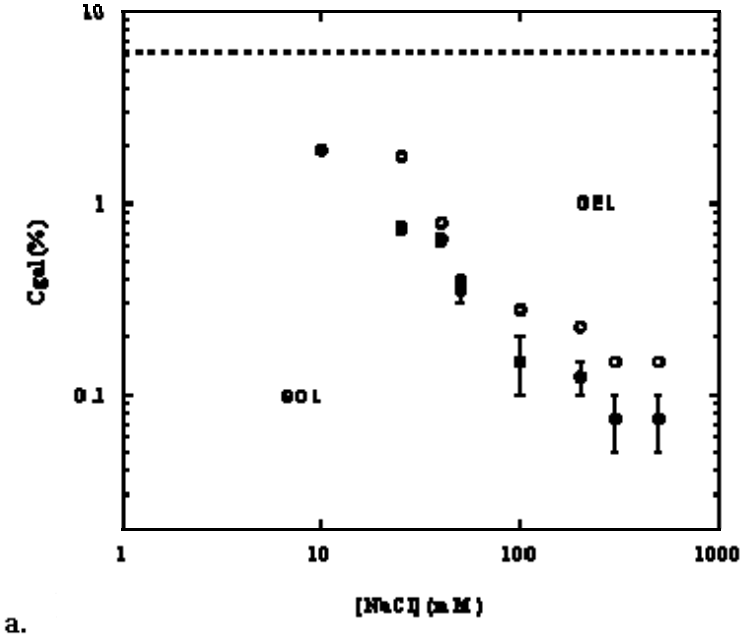
Lorsque la durée du chauffage à 80 °C passe à 48 h, l'ensemble des observations est globalement similaire. Toutefois, la turbidité des systèmes et l'apparition de précipités dans certaines conditions a lieu pour des concentrations en protéines plus faibles.

III.2.2 Concentrations critiques de gélification

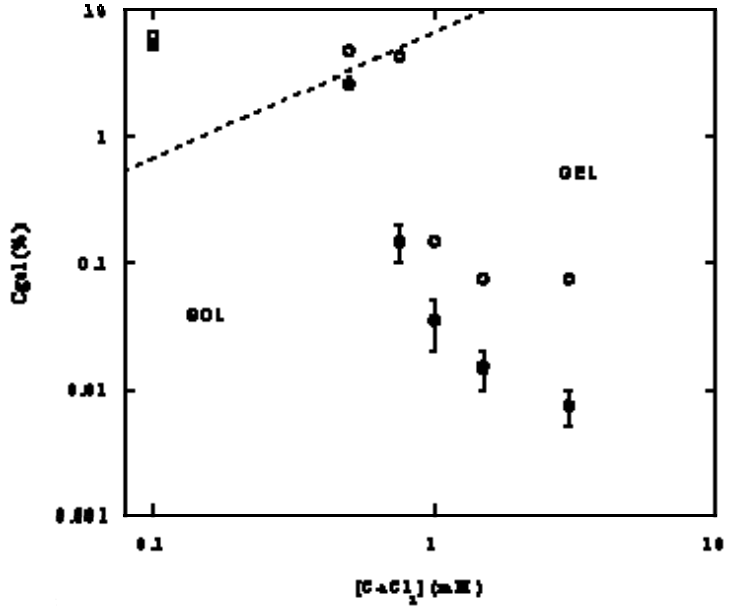
A partir de systèmes chauffés 12h et 48 h à 80 °C, nous avons précisé l'état des systèmes à savoir l'état «sol» ou «gel» (voir II.2.1). Les Figures III.3a et b montrent les diagrammes d'état obtenus en fonction des concentrations en NaCl et $CaCl_2$, respectivement. Dans les deux cas, l'augmentation de la concentration en sel se traduit par une diminution de la concentration critique de gélification. Les concentrations critiques de gélification dans NaCl sont beaucoup plus élevées que dans $CaCl_2$. Les gels se formant à faible concentration en SAB et à forte concentration en sels apparaissent assez faibles et s'écroulent sous leur

propre poids entraînant l'apparition d'un précipité. Pour de plus fortes concentrations en protéines, le gel se maintient sous son propre poids lorsque l'on retourne le tube.

Figure III.3 Concentrations critiques de gélification de la SAB à pH 7 après 12 h (symboles vides) et 48 h (symboles pleins) de chauffage à 80 °C en fonction de la concentration en NaCl **(a)** ou en $CaCl_2$ **(b)**.
Les valeurs inférieures et supérieures de la barre d'erreur indiquent, respectivement, la plus grande concentration en protéines testée où aucun gel n'est observé et la plus faible concentration où un gel est observé après 48 h de chauffage.



a.



b.

La droite en pointillé sur la Figure III.3a correspond à la concentration critique de gélification en absence de NaCl ou de $CaCl_2$ après 48 h chauffage. La droite en pointillé sur la Figure III.3b sépare le domaine où $[Ca^{2+}]/[SAB]< 1$ en (haut à gauche), c'est à dire que moins d'un ion calcium est disponible pour la protéine, au domaine où $[Ca^{2+}]/[SAB]> 1$ (en bas à droite) où plus d'un ion calcium est disponible pour la protéine. On remarque que la concentration critique de gélification est fortement diminuée pour R>1.

III.2.2 Conclusions

Ces observations sont en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature. A pH 7, sous l'influence d'un traitement thermique, les agrégats de SAB forment des structures filamentaires (Clark & Lee-Tuffnell, 1986). En absence de sel dans le milieu, les fortes répulsions électrostatiques existant entre les agrégats empêchent l'association des structures fibrillaires et le gel ne se forme que pour des concentrations relativement élevées. En augmentant la concentration en sel dans le milieu, les associations entre agrégats sont favorisées et un gel est formé à plus faible concentration. L'effet plus marqué de $CaCl_2$ par rapport à NaCl est à relier à la différence d'affinité de la protéine envers les ions présents dans la solution. Ce point sera discuté ultérieurement.

Outre la concentration et la nature des sels, le temps de chauffage influence la concentration critique de gélification. En augmentant le temps de chauffage de 12 h (symboles vides sur la Figure III.3) à 48 h (symboles pleins), les concentrations critiques de gélification sont plus basses. Les systèmes semblent ainsi évoluer avec le temps. Pour des raisons pratiques nous n'avons pas établi de diagramme d'état pour des temps de chauffage plus longs.

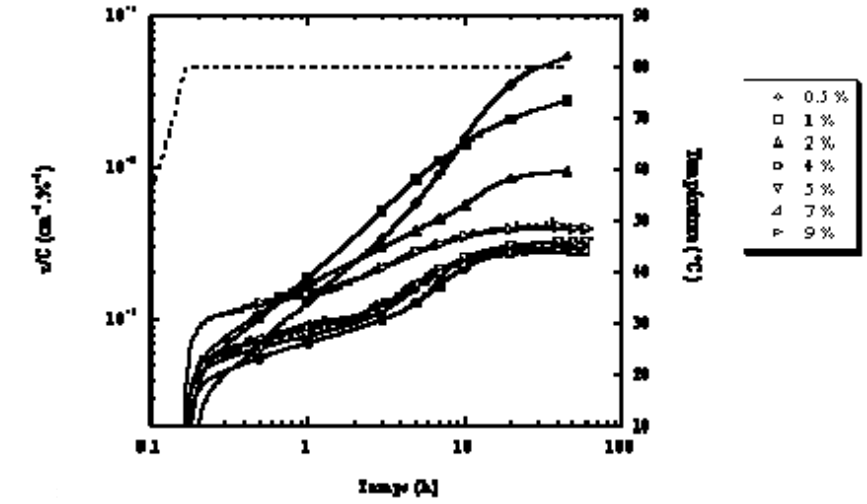
III.3 Mesure de la turbidité des systèmes

Les mesures de turbidité ont été réalisées au cours du chauffage à 80 °C in situ à différentes concentrations en NaCl et $CaCl_2$. D'après les observations visuelles, nous avons pu déterminer la gamme de concentrations où une mesure de turbidité est possible. En effet ces mesures excluent les systèmes qui précipitent ou qui sont opaques.

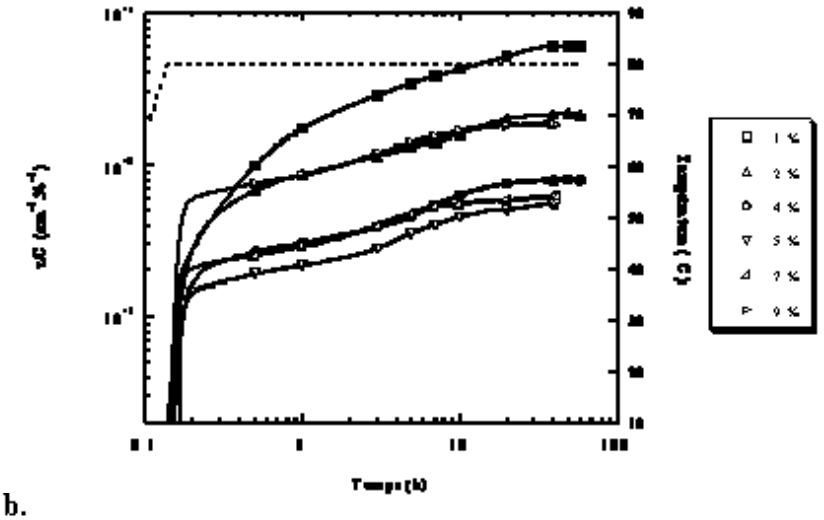
Les Figures III.4 et III.6 montrent l'évolution de la turbidité normalisée (τ/C) par la concentration en SAB en fonction du temps de chauffage à 80 °C pour deux concentrations en NaCl (50 et 100 mM) et pour deux concentrations en $CaCl_2$ (0,75 et 1,5 mM), respectivement.

La turbidité normalisée des systèmes augmente avec le temps et de façon différente selon la concentration en protéines.

Figure III.4 Evolution de la turbidité réduite pour différentes concentrations en SAB dans NaCl 100 mM (**a**) et 50 mM (**b**) au cours du chauffage à 80 °C (profil de température : trait pointillé).



a.



b.

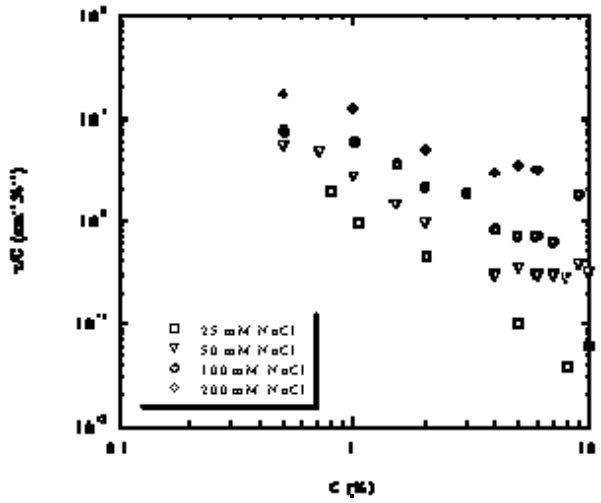
Dans NaCl 50 et 100 mM (Figure III.4), pour des concentrations supérieures à 2 %, la turbidité normalisée augmente en deux temps. Un premier plateau apparaît au bout de ~10 min. Celui-ci dure environ 10 h puis on note une nouvelle augmentation vers un second plateau. Entre 4 et 7 %, les turbidités normalisées au premier plateau et au deuxième plateau sont du même ordre alors qu'à 9 % elles sont beaucoup plus élevées. Le temps au bout duquel le second plateau apparaît varie en fonction de la concentration en SAB : plus la concentration

est élevée, plus ce temps est court. Pour ces concentrations, la stabilité apparaît atteinte après 48 h de chauffage.

Pour 0,5, 1 et 2 % de SAB les deux étapes sont moins marquées. Le temps au bout duquel le second plateau est atteint nécessite un chauffage plus long et, dans nos conditions de mesure, il apparaît que pour 0,5 % et 1 %, le système continue d'évoluer.

La Figure III.5 présente l'ensemble des turbidités normalisées mesurées au bout de 48 h de chauffage pour différentes concentrations en NaCl en fonction de la concentration en SAB. Quelle que soit la concentration en NaCl, la turbidité normalisée diminue en augmentant la concentration en protéines. Pour NaCl 50 mM, elle devient stable à partir d'une concentration de 4 % alors que pour NaCl 100 mM la turbidité normalisée diminue jusqu'à SAB 8 % et augmente à nouveau pour SAB 9 %. Dans NaCl 200 mM, la turbidité est trop forte pour être mesurée pour des concentrations supérieures à 7 %.

Figure III.5 Dépendance en concentration de SAB de la turbidité réduite mesurée au bout de 48 h à 80°C pour différentes concentrations en NaCl.

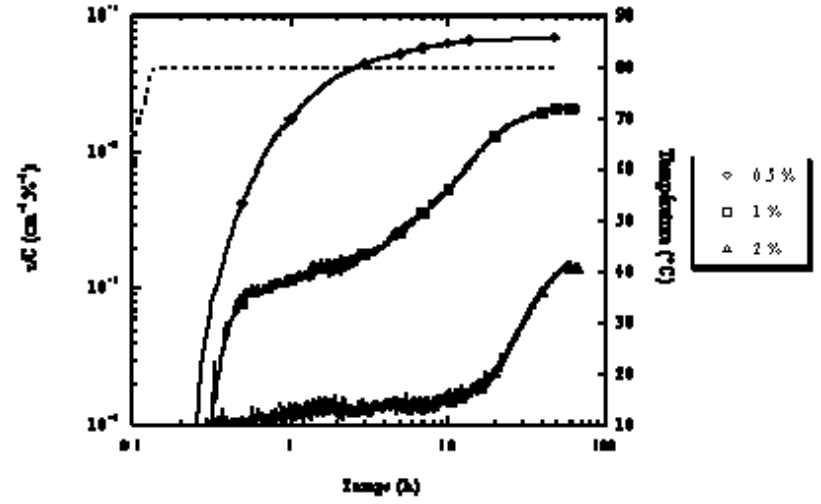


L'augmentation de la concentration en NaCl se traduit par de plus fortes valeurs de turbidités normalisées. Il faut noter cependant qu'en deçà de 1 %, les valeurs retenues au bout de 48 h de chauffage sont sous-estimées car les systèmes ne sont pas encore stabilisés.

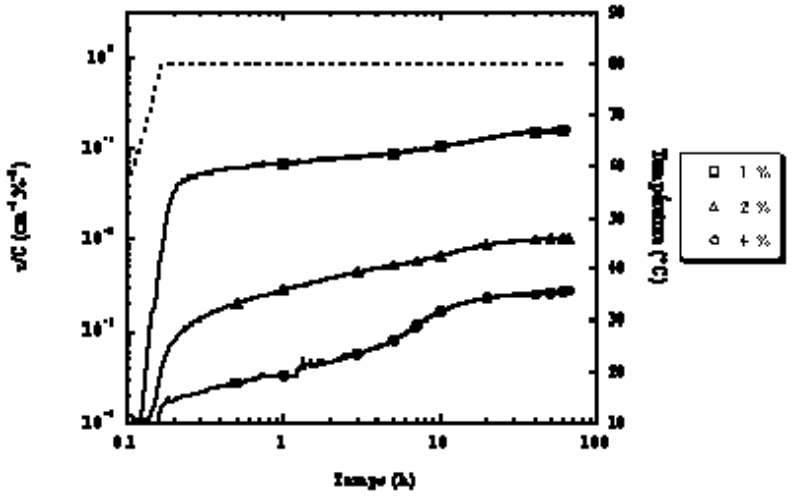
Lorsque la SAB gélifie en présence de $CaCl_2$, la turbidité augmente également en fonction du temps en deux étapes (Figure III.6) excepté pour une concentration de 0,5 % dans $CaCl_2$ 0,75 mM où l'augmentation de la turbidité normalisée est monotone. Comme dans NaCl, le second plateau apparaît plus tôt lorsque la concentration augmente pour $CaCl_2$ = 1,5

mM mais l'effet inverse est constaté pour $CaCl_2$ = 0,75 mM. L'ensemble des valeurs de turbidités obtenues après 48 h de chauffage est résumé sur la Figure III.7. On constate que la diminution de turbidité normalisée en fonction de la concentration en SAB est nettement plus marquée que dans NaCl. Comme dans NaCl, plus la concentration en sel augmente plus la turbidité normalisée augmente.

Figure III.6 Evolution de la turbidité réduite pour différentes concentrations en SAB dans 1,5 mM (**a**) et 0,75 mM (**b**) $CaCl_2$ au cours du chauffage à 80 °C (profil de température : trait pointillé).

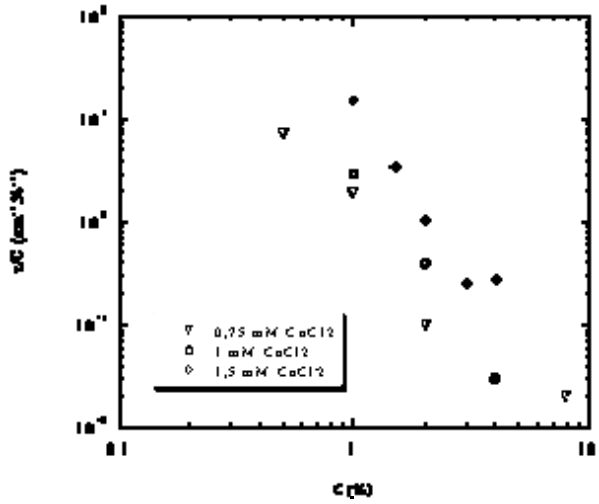


a.



b.

Figure III.7 Dépendance en concentration de SAB de la turbidité réduite mesurée au bout de 48 h à 80°C pour différentes concentrations en $CaCl_2$.



III.4 Etude de la structure des gels par diffusion de la lumière

Cette étude a été réalisée au laboratoire PCI, Le Mans. La démarche choisie s'est inspirée des récents travaux menés sur l'influence de la concentration en NaCl à pH 7 sur la structure des gels de β-lactoglobuline (β-Lg) et d'ovalbumine (OA) (Pouzot *et al.*, 2004b, Pouzot *et al.*, 2004c; Weijers *et al.*, 2004).

III.4.1 Influence de la nature du solvant : NaCl ou $CaCl_2$

L'intensité de la lumière *I(q)* a été mesurée à différents angles (donc pour différentes valeurs du vecteur d'onde, q) permettant de couvrir une échelle de ~50 à 500 nm. Des systèmes de concentrations variables en protéines obtenus dans différentes conditions ioniques après un chauffage à 80 °C pendant 48 h ont été étudiés. Selon la turbidité des systèmes, les mesures ont été réalisées par diffusion de la lumière simple ou multiple (Voir Chapitre II. 2.3).

Rappelons qu'à partir des mesures de *I(q)* en fonction de q, on détermine la valeur de la masse apparente des agrégats m_a lorsque q tend vers zéro. Puis à partir de l'équation III.1, on en déduit S(q) (voir II.2.3).

$$I(q) = K \cdot C \cdot ma \cdot S(q) \qquad \textit{Equation III.1}$$

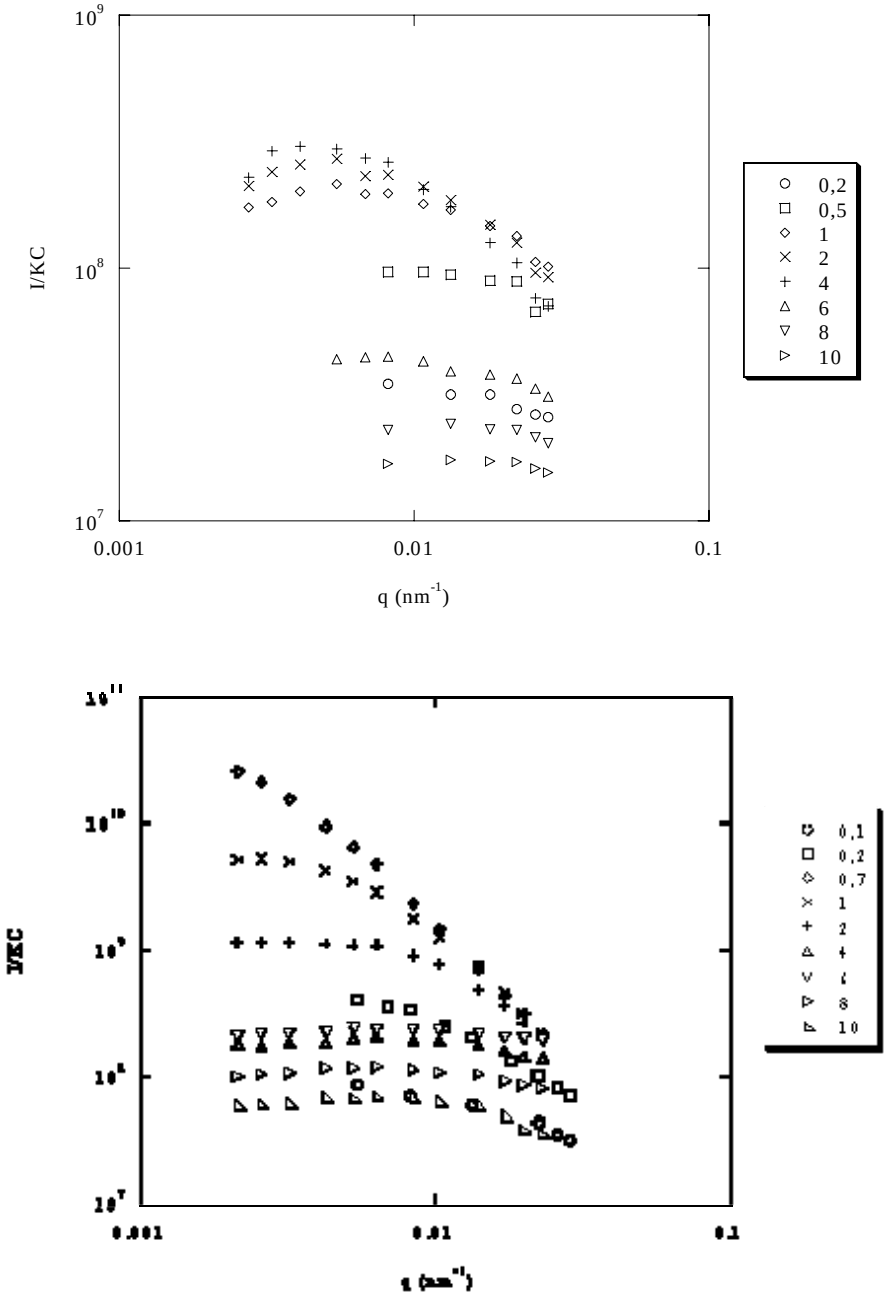
La courbe de *S(q)* en fonction de q est ensuite ajustée à l'aide de l'équation théorique III.2, montrant S(q) en fonction de qR_a avec R_a, le rayon apparent. On peut ainsi estimer la valeur de *Ra*.

$$S(q)=(1+\frac{q^2 \cdot R_a^2}{3})^{-1} \qquad \textit{Equation III.2}$$

En absence de sel et en présence de NaCl 10 mM ou $CaCl_2$ 0,1 mM, *I(q)* présente une faible dépendance angulaire dans la gamme de concentrations étudiée. De ce fait m_a peut être évaluée mais en revanche *Ra* ne peut être déterminée à cette échelle d'observation.

L'évolution de *I(q)/KC* en fonction de q pour différentes concentrations en SAB en NaCl 50 mM est présentée sur les Figures III.8.

Figure III.8 *I(q)/KC* en fonction du vecteur d'onde *q* pour des systèmes de concentrations variables en SAB (en %, indiquées sur la figure) en NaCl 50 mM (après un chauffage de 48 h à 80 °C)**.**

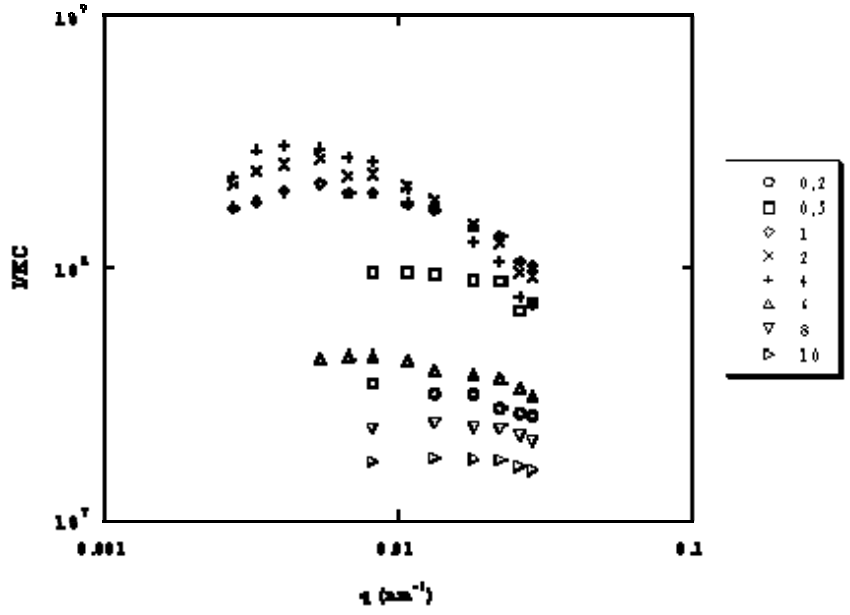


La dépendance angulaire est de plus en plus marquée lorsque la concentration en SAB augmente jusqu'à 2 %. Au-delà, pour des concentrations comprises entre 4 et 10 %, la dépendance angulaire est plus faible. Par ailleurs, pour une concentration en SAB égale à 0,7 %, la dépendance angulaire est trop forte ce qui indique que $Ra > 1$ μm et $m_a > 5*10^9$ g.mol $^{-1}$. Dans ces deux cas, la longueur de corrélation *Ra* ne peut être déterminée dans la gamme de vecteur d'onde considérée.

Pour NaCl = 100 mM (non présenté), la dépendance en q de *I(q)/KC* n'est mesurable que sur une gamme de concentrations réduite (2-5 %) du fait des valeurs élevées des turbidités des systèmes.

En présence de $CaCl_2$ 0,5 mM (Figure III.9), les variations de *I(q)/KC* en fonction de *q* montrent une dépendance angulaire seulement pour des concentrations comprises entre 1 et 4 %.

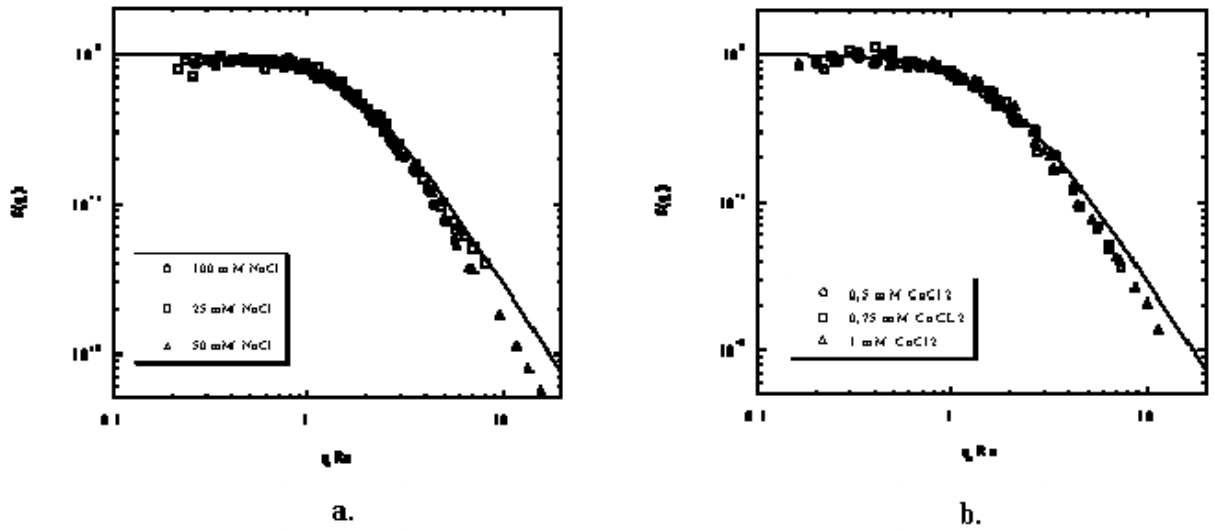
Figure III.9 *I(q)/KC* en fonction du vecteur d'onde *q* pour des systèmes de concentrations variables en SAB (en %, indiquées sur la figure) en $CaCl_2$ 0,5 mM (après un chauffage de 48 h à 80 °C)**.**.



Dans les conditions de faibles dépendances angulaires, il serait cependant possible d'avoir recours à la diffusion des rayons X aux petits angles pour déterminer *Ra* (Pouzot *et al.*, 2004c).

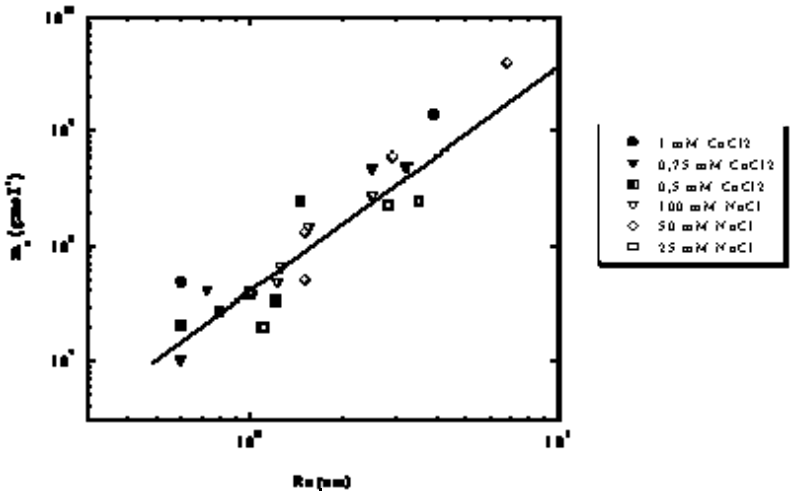
Les facteurs de structure *S(q)* ne peuvent donc être déterminés que sur une gamme réduite de concentrations où *Ra* est mesurable. Les Figures III.10a et b montrent les facteurs de structures obtenus dans NaCl 25, 50 et 100 mM et $CaCl_2$ 0,5, 0,75 et 1 mM en fonction de *qRa*. La courbe en traits continus sur les deux figures correspond à l'équation théorique III.2. Celle-ci ne décrit pas totalement *S(q)* pour de tels systèmes puisqu'aux fortes valeurs de *qRa*, les résultats expérimentaux dévient de cette courbe. Malgré ces légères déviations, les valeurs de m_a et *Ra* peuvent être déterminés sur la base de la dépendance angulaire initiale.

Figure III.10 Facteur de structure *S(q)* pour des systèmes de concentrations variables en SAB obtenus après un chauffage de 48 h à 80 °C et pour les différentes concentrations en NaCl **(a)** et $CaCl_2$ **(b)** indiquées sur les figures. La courbe indiquée par le trait continue correspond à l'équation III.2



La Figure III.11 montre les variations de m_a en fonction de *Ra* pour l'ensemble des systèmes (obtenus dans NaCl ou $CaCl_2$). Tous les points sont répartis de part et d'autre d'une droite de pente égale à 2. Il y a donc peu de différences sur le type de structures obtenues que ce soit en présence de NaCl ou de $CaCl_2$. Cette droite tracée de façon quelque peu arbitraire correspond à une relation déjà montrée pour d'autres protéines globulaires (Weijers *et al.*, 2002; Pouzot *et al.*, 2004a).

Figure III.11 Masse molaire apparente m_a en fonction de la longueur de corrélation *Ra* pour des systèmes de concentrations variables en SAB obtenus après chauffage de 48 h à 80 mesurée pour différentes concentrations en NaCl et $CaCl_2$. La droite tracée indique une pente égale à 2.

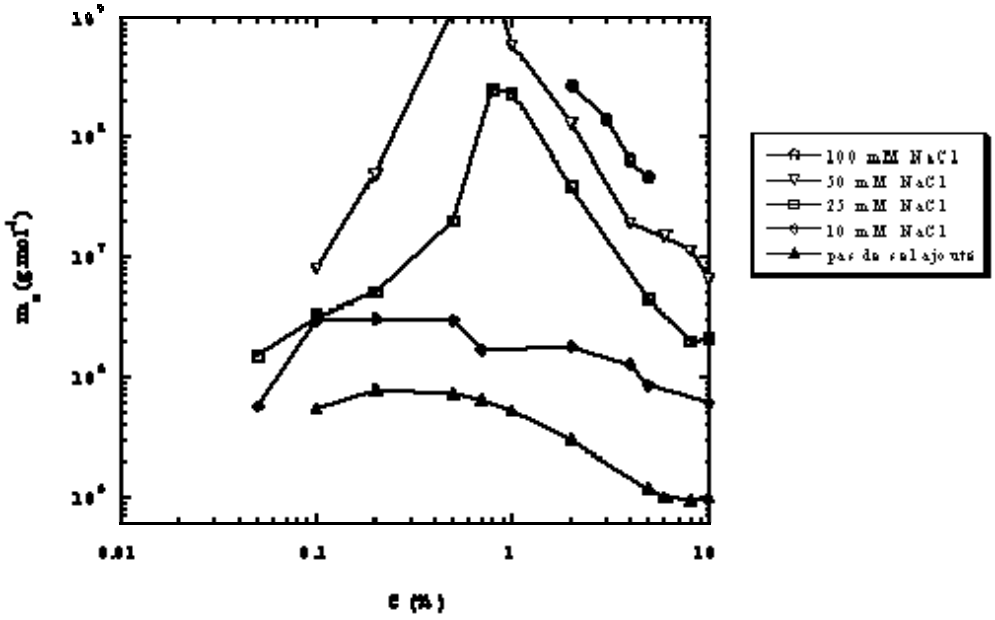


Pour des structures auto-similaires, on sait que $m_a \sim Ra^{df}$ où *df* est la dimension fractale. Dans notre cas, nous ne disposons pas de suffisamment de valeurs expérimentales pour établir une relation précise entre m_a et *Ra* pour chaque condition ionique. On remarque que lorsque la concentration en sel augmente les points sont situés plus à gauche de la droite, le préfacteur de la relation entre m_a et *Ra* est ainsi plus grand pour des plus fortes concentrations en sels indiquant la formation de structures locales plus denses. Cependant, les valeurs assez dispersées et bruitées obtenues ne peuvent pas nous permettre de conclure avec certitude.

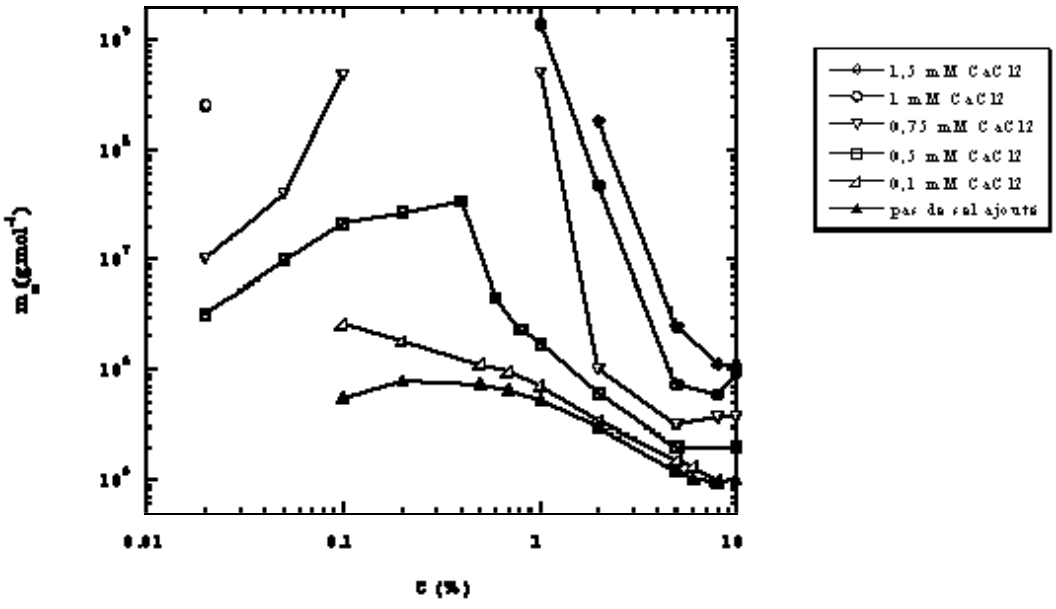
Toutefois les dépendances générales sont compatibles avec une loi en puissance dont la valeur de *df* serait proche ou légèrement supérieure à 2. Cette valeur de *df* confirme l'évolution de *S(q)* en fonction de *q* (Figure III.10). En effet pour des structures autosimilaires, $S(q) \sim q^{-df}$ pour $q >> R_a^{-1}$, la pente théorique de la droite correspond à une valeur de *df* égale à -2. Ce résultat est en accord avec l'étude de Hagiwara *et al.* (1997), qui ont mesuré une dimension fractale à 2,1 pour des agrégats de SAB en milieu dilué à pH 7 dans un milieu de force ionique 100 mM.

Les dépendances en concentration protéiques de m_a pour différentes teneurs en NaCl et $CaCl_2$ sont présentées sur les Figures III.12a et b, respectivement. Lorsque la concentration en SAB augmente, m_a augmente fortement pour des concentrations < ~1% puis diminue ensuite pour des concentrations plus fortes.

Figure III.12 Masse molaire apparente m_a pour des systèmes de concentrations variables en SAB obtenus après chauffage de 48 h à 80°C pour différentes concentrations en NaCl **(a)** et $CaCl_2$ **(b)**.



a.



b.

En absence de sel ou à des faibles concentrations en NaCl (10 mM) ou $CaCl_2$ (0,1 mM), les valeurs de m_a sont les plus faibles. Pour $CaCl_2$ 0,1 mM, les valeurs de m_a sont très proches de celles mesurées en absence de sels.

L'augmentation de la teneur en sels à faibles concentrations en protéines, se traduit par une augmentation de m_a plus faible. Par exemple pour SAB 0,1 % (Figure III.12a), en augmentant la teneur en NaCl de 0 à 50 mM, m_a est multipliée par ~20 et pour SAB 1 % le facteur multiplicatif de m_a est ~ 1000. Par ailleurs, il est difficile de mesurer m_a à de plus faibles concentrations en protéines que 0,02-0,05 % par cette méthode, l'intensité diffusée par le système étant trop faible. Il semblerait toutefois que pour des concentrations en protéines inférieures, les valeurs de m_a tendent vers celle la valeur de la masse molaire de la SAB ($6{,}6*10^4$ $g.mol^{-1}$). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour d'autres protéines globulaires telles que l'ovalbumine (OA) (Weijers *et al.*, 2002) et la β-Lg (Pouzot *et al.* 2004b) où les agrégats protéiques obtenus après chauffage ont été caractérisés après les avoir dilués pour éviter toutes interactions et des effets de diffusion multiple. Les valeurs des masses apparentes déterminées indiquaient une faible agrégation protéique.

Ces variations croissantes et décroissantes des valeurs de m_a sont plus visibles pour les plus fortes teneurs en sels et en particulier en présence de NaCl 25 mM et $CaCl_2$ 0,5 mM. En présence de NaCl, m_a atteint son maximum pour des valeurs proches de la concentration critique de gélification. Cette augmentation est liée à l'augmentation de l'agrégation protéique.

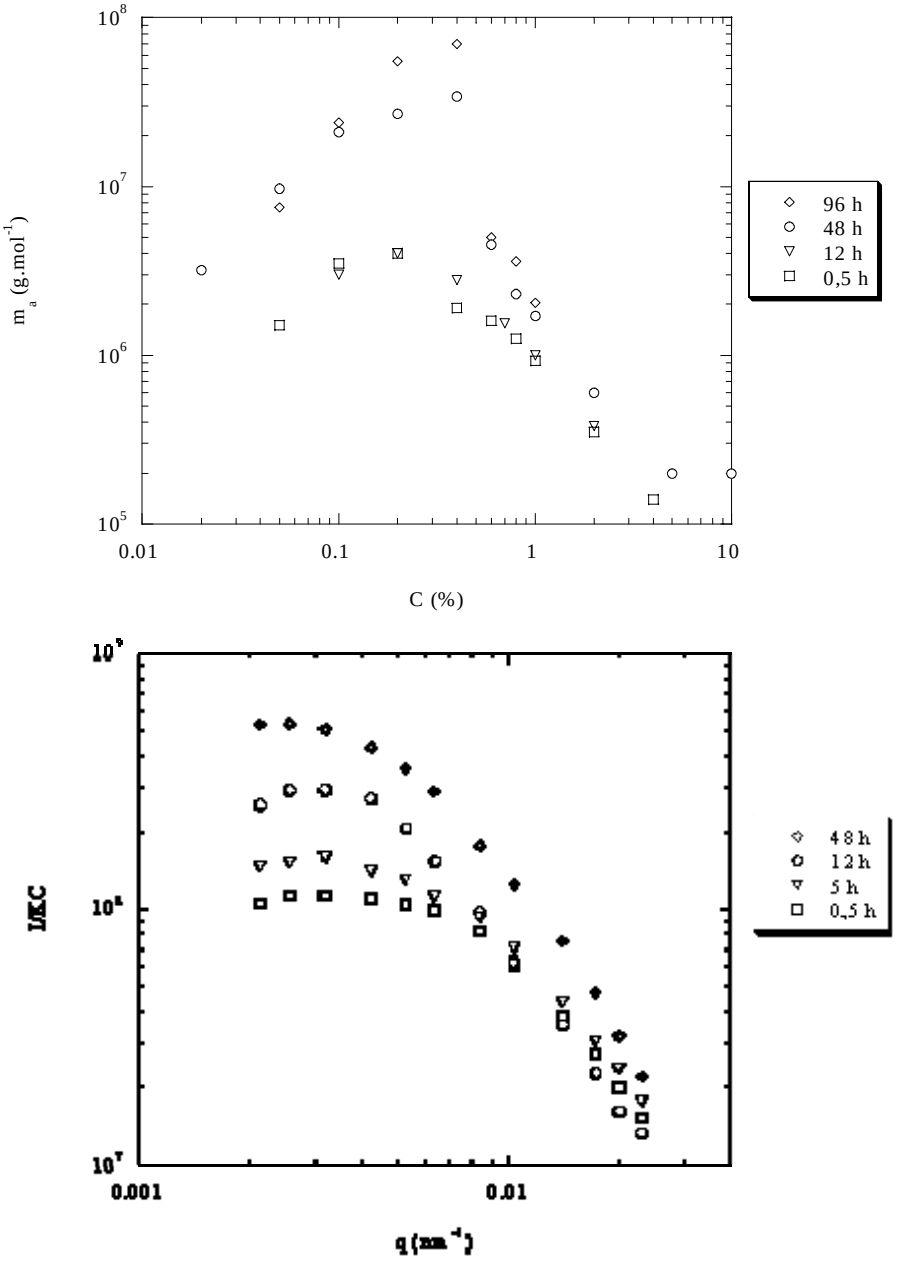
Pour de plus fortes concentrations en sels, m_a n'est plus mesurable du fait de la présence de précipité ou d'une trop forte turbidité. Pour des concentrations en protéines plus fortes, les systèmes sont gélifiés et quelle que soit la concentration en sels, m_a diminue quand la concentration en protéine augmente. Cette dépendance est plus marquée en présence de $CaCl_2$. Cette diminution pourrait s'expliquer par l'augmentation des interactions électrostatiques répulsives et des interactions d'exclusion de volume entre les protéines dénaturées.

III.4.2 Influence de la durée du traitement thermique

L'influence du temps de chauffage à 80°C a été étudiée pour SAB 1% dans NaCl 50 mM et pour toute la gamme de concentrations dans $CaCl_2$ 0,5 mM. La figure III.13 montre la dépendance de $I(q)/KC$ en fonction de q pour le système SAB 1 % dans NaCl 50 mM. L'allure des courbes obtenues est similaire mais l'intensité diffusée, augmente quand le temps

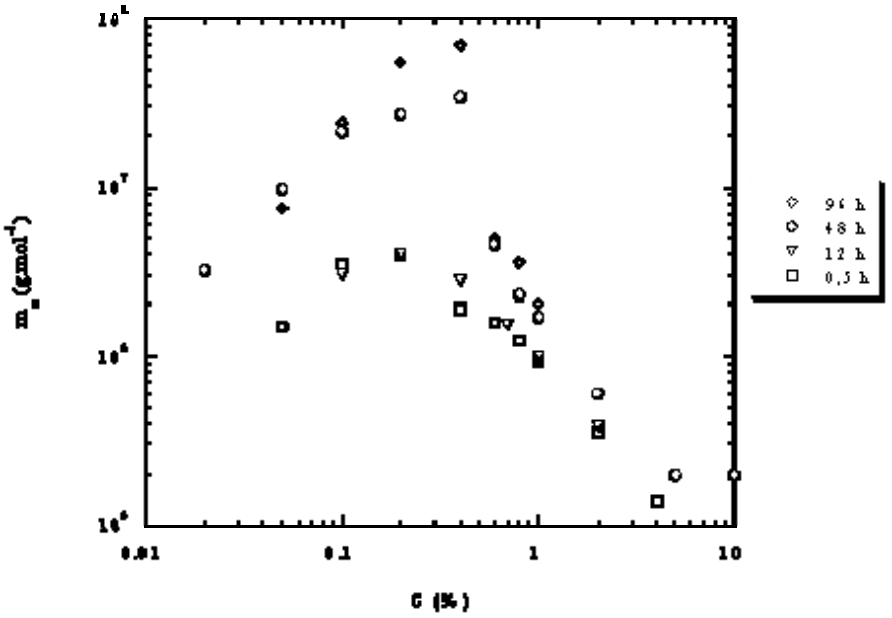
de chauffage augmente. On note ainsi que m_a augmente de ~ 1 à $4*10^8$ g.mol^{-1}. Ce résultat est à rapprocher des mesures de turbidité décrites précédemment (Figure III.2a).

Figure III.13 *I(q)/KC* en fonction du vecteur d'onde *q* dans NaCl 50 mM pour SAB 1% obtenus après un chauffage de 30 min, 5h, 12h et 48 h à 80 °C.



L'évolution de m_a en fonction de la concentration en SAB dans $CaCl_2$ 0.5 mM pour différents temps de chauffage est présentée sur la figure III.14.

Figure III.14 Masse molaire apparente m_a pour des systèmes de concentrations variables en SAB dans $CaCl_2$ 0,5mM obtenus après un chauffage de 30 min, 12 h, 48 h et 96 h à 80 °C.



On distingue deux types d'évolutions: d'une part, pour les systèmes obtenus après 30 min et 12 h de chauffage, les valeurs de m_a mesurées sont très proches et un maximum est observé pour une concentration proche de 0,2 %; d'autre part, les systèmes chauffés pendant 48 h et 96 h ont des valeurs de m_a plus fortes avec un maximum autour de SAB 0,4 %. Les valeurs de m_a mesurées après 96 h étant légèrement supérieures à celles obtenues après 48 h de chauffage suggèrent que le système continue d'évoluer. Aucune relation ne peut être établie avec la turbidité des systèmes puisqu'ils sont transparents mais on remarque que deux étapes semblent également être définies.

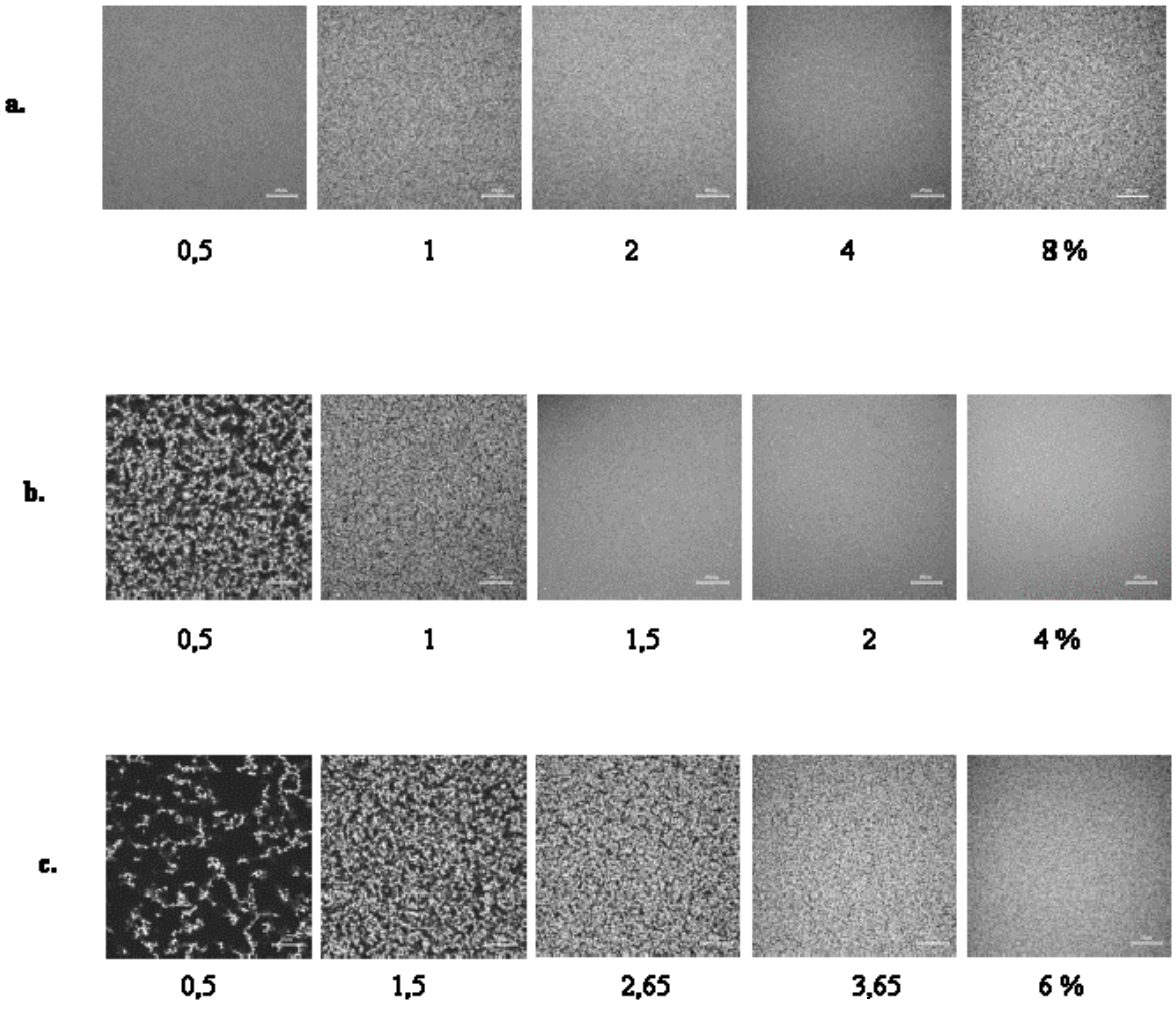
III.5 Description de la structure des gels par analyse des clichés MCBL

Pour les systèmes où les mesures ne sont pas possibles en diffusion de la lumière nous avons essayé de compléter cette étude à partir d'observations en microscopie confocale à balayage laser couplées à une analyse d'images permettant de définir une longueur de corrélation caractérisant chaque système.

III.5.1 Observation des systèmes

Les structures des systèmes obtenus pour différentes concentrations en SAB dans NaCl 200 mM et dans $CaCl_2$ 1,5 et 3 mM sont présentées sur la figure III.15. Ces structures ont été observées après un chauffage de 30 min à 80 °C.

Figure III.15 Images obtenues en MCBL pour différentes concentrations en SA*B*-RITC (en %, indiquées sur la figure) après une heure à 20°C suite au traitement thermique (30 min à 80°C) dans NaCl 200 mM **(a)**, $CaCl_2$ 1,5 mM **(b)** et $CaCl_2$ 3 mM **(c)**. Barre d'échelle : 25 µm.



Dans NaCl 200 mM, la fluorescence est répartie de façon homogène pour SAB 0,5; 2 et 4 %, ce qui indique qu'aucune structure n'est visible à cette échelle d'observation. Pour SAB = 1 et 8 %, une distribution non homogène de la fluorescence est notée avec des zones claires concentrées en protéines (la RITC révélant la présence des protéines) et des zones sombres de petites tailles dépourvues de protéines. Pour SAB 1 %, ces changements de structures peuvent

être mis en relation avec la forte augmentation de m_a mesurée pour NaCl 100 mM (III.12a) aux faibles concentrations en SAB. Pour SAB 8%, on peut relier cette hétérogénéité à la forte augmentation de turbidité des systèmes qui ne permet pas la mesure (Figure III.5).

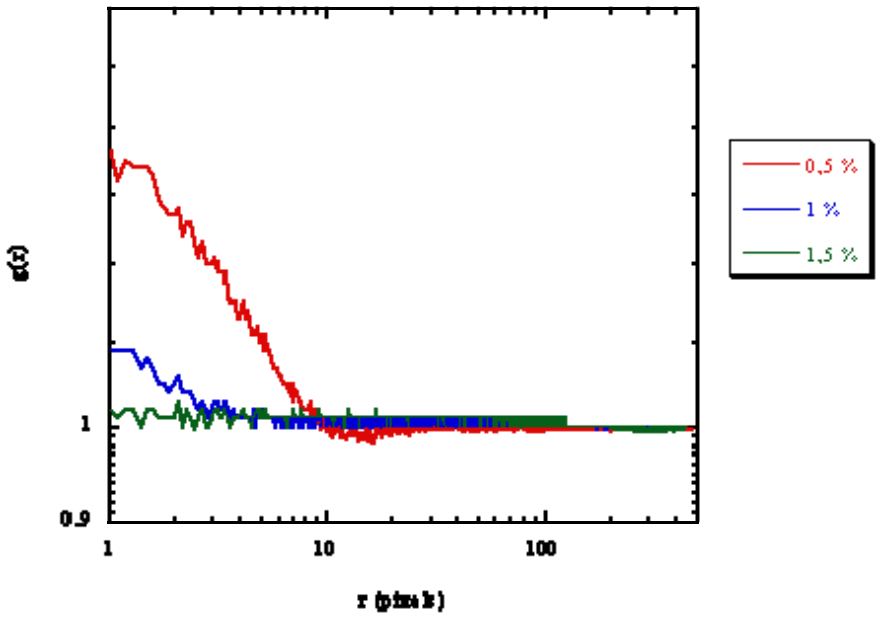
Dans $CaCl_2$, la distribution de la fluorescence est très hétérogène par rapport à NaCl. Pour SAB 0,5 % dans $CaCl_2$ 1,5 mM et pour SAB 0,5 et 1,5 % dans $CaCl_2$ 3 mM, de larges zones claires concentrées en protéines insérées dans une phase sombre dépourvue de protéines sont mises en évidence. Dans ce cas l'hétérogénéité des systèmes est visible à l'échelle de ~ 10 μm. En augmentant la concentration en protéines, la distribution de fluorescence devient plus homogène et pour SAB =1,5 % dans $CaCl_2$ 1,5mM et SAB = 6 % dans $CaCl_2$ 3 mM aucune structure n'est visible à cette échelle d'observation. D'un point de vue macroscopique ces systèmes deviennent transparents.

A ces concentrations en sels, les systèmes sont trop turbides et les mesures de diffusion de la lumière ne sont pas possibles. En revanche, pour des concentrations en sels inférieures, les observations microscopiques montrent que la fluorescence est répartie de façon homogène dans l'image et aucune structure n'est visible à cette échelle d'observation. Ces deux techniques paraissent ainsi complémentaires sur les gammes d'échelle d'observations des systèmes. Dans notre cas toutefois, la comparaison directe entre les résultats obtenus en diffusion de la lumière (chauffage 48 h à 80 °C) et les observations de MCBL (chauffage 30 min) ne peut être établie totalement puisque nous avons montré que le système continuait à évoluer en fonction du temps de chauffage.

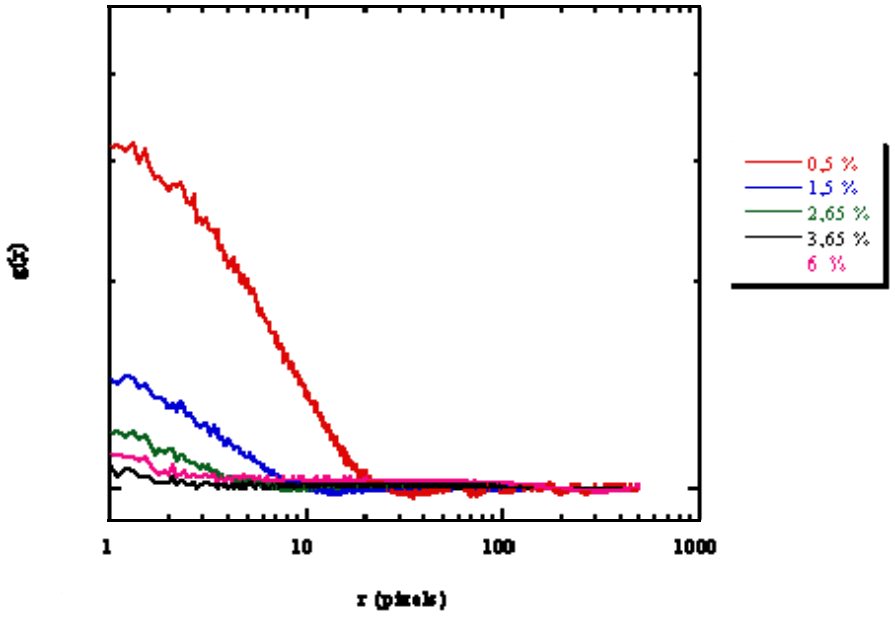
III.5.2 Analyse d'image par la fonction de corrélation de paires

La figure III.16 présente la fonction de corrélation de paires en fonction de la distance exprimée en pixel (*r*) pour les systèmes observés dans $CaCl_2$ 1,5 mM et 3 mM. Pour les faibles concentrations en protéines, *g(r)* diminue avec r. Lorsque *g(r)* est égal à 1 on définit une longueur de corrélation caractéristique χ (proportionnelle à Ra) au-delà de laquelle l'échantillon est considéré comme homogène.

Figure III.16 Evolution de la fonction de corrélation de paires g(r) en fonction de r pour différentes concentrations en SAB dans $CaCl_2$ 1,5 mM **(a)** et $CaCl_2$ 3 mM **(b)**.



a.



b.

Dans $CaCl_2$ 1,5 mM, elle est de l'ordre de ~ 10 pixels pour SAB 0,5 % et diminue vers ~ 7 pixels pour SAB 1 %. Dans $CaCl_2$ 3 mM, elle est égale à ~ 11 pixels pour SAB 0,5 % et diminue vers ~ 6 pixels pour SAB 1,5 %. Au-delà de cette longueur on remarque que *g(r)* diminue faiblement avant de rester constant à 1. Ce déficit en matière est liée à la zone de

déplétion entourant les amas formés. Elle caractérise la taille des zones non occupées par les agrégats protéiques. Pour les concentrations en SAB supérieures, *g(r)* varie peu en fonction de r et la longueur de corrélation ne peut pas être déterminée.

Dans les conditions opératoires choisies (objectif 40, λ_{ex} = 543 nm, λ_{em} = 575-640 nm, zoom 2), l'épaisseur du plan focal est de ~ 5,2 μm et la taille d'un pixel vaut ~0,31 μm. Il faut noter que les images recueillies par MCBL en deux dimensions reflètent un système qui est en réalité tridimensionnel. Il convient donc d'interpréter les résultats avec prudence. Pour s'assurer que la relation entre l'intensité de chaque pixel et la concentration en protéines est valable, il faudrait vérifier la distribution de l'intensité de fluorescence d'un pixel selon l'axe z. Les résultats obtenus avec cette méthode ne permettent donc pas de quantifier de façon rigoureuse la longueur χ. Pour cela, une étude plus approfondie sur un système modèle serait nécessaire.

III.6 Discussion et conclusions

L'influence de l'ajout de NaCl sur la structure des gels de SAB a été décrite par diffusion des rayons X aux petits angles (Clark & Tuffnell, 1980) et par microscopie électronique (Clark *et al.*, 1981). Les agrégats de SAB s'agrègent sous forme de filaments. En fonction de la force ionique du milieu, des gels filamenteux ou des coagula sont formés. Aucune étude n'a été réalisée sur la structure des gels à une autre échelle d'observation du fait de la turbidité des systèmes. L'utilisation de la diffusion de la lumière en milieu turbide a permis l'étude de tels systèmes.

III.6.1 Influence de la nature du solvant (NaCl ou $CaCl_2$) sur la structure des gels

A travers les différentes méthodes utilisées nous avons pu mettre en évidence que l'ajout de concentrations croissantes en NaCl et $CaCl_2$ se traduisait par des changements de structure des gels de SAB.

Ces changements apparaissent cependant pour des gammes de concentrations en $CaCl_2$ beaucoup plus faibles qu'en NaCl. Les différences observées par l'effet des ions Na^+ et Ca^{2+} sur la structure des gels ne peuvent pas être expliquées uniquement par la valence des ions. La nature des interactions existantes entre la SAB et ces deux cations semble différer. Bien que tous les deux diminuent les répulsions électrostatiques entre les agrégats protéiques par

écrantage des charges négatives à la surface de la protéine, il semblerait que des liaisons spécifiques avec la SAB auraient lieu en présence d'ions Ca^{2+}. On peut ainsi considérer le rapport molaire R =$[Ca^{2+}]$/[SAB]. Ce rapport affecterait de façon significative l'agrégation de la SAB lorsqu'il serait supérieur à 1 (c'est à dire lorsque plus d'un ion calcium serait disponible pour une molécule de protéine). La concentration en protéines où R égal 1 est indiquée en pointillé sur la Figure III.3b.

Pour des concentrations en calcium inférieures à 0,5 mM, les gels se forment pour R<1. Dans ces conditions, les valeurs de m_a mesurées étaient proches de celles des gels formés en absence de sels (Figure III.12b). On peut en déduire que dans ce cas, la présence de calcium n'affecte pas de façon de façon significative la structure du gel. Pour de plus fortes concentrations en calcium, la diminution de la concentration critique de gélification se fait de façon plus prononcée qu'en présence de sodium. Dans ce cas le rapport R semble jouer un rôle plus important que la concentration absolue en calcium sur la structure des gels.

En augmentant la concentration en calcium, R augmente ce qui se traduit par la formation d'un gel à de plus faibles concentrations en protéines. Ce rapport peut également expliquer que la diminution de m_a mesurée en fonction de la concentration en protéines dans la zone des fortes concentrations en protéines est plus importante en milieu $CaCl_2$ qu'en NaCl.

En augmentant la concentration en protéine, R diminue et de ce fait moins de charges portées par la protéine sont écrantées. L'augmentation des répulsions entre les protéines chargées due à l'augmentation du nombre d'agrégats protéiques mais aussi à l'augmentation de la charge de la protéine pourrait expliquer alors la forte diminution des valeurs de m_a. D'un point de vue macroscopique, l'augmentation de R se traduit pour de faibles concentrations en protéines par la formation de structure très hétérogènes opaques qui peuvent précipiter du fait d'une forte diminution des répulsions électrostatiques. La diminution de R se traduit en revanche par une homogénéisation du système qui devient transparent.

III.6.2 Influence du temps de chauffage sur la structure des gels

En augmentant la durée du chauffage de 12 à 48h, la concentration critique de gélification diminue et la turbidité des systèmes évolue. Ce facteur joue donc un rôle important sur la structure des gels.

L'évolution de la turbidité des gels de SAB en présence de NaCl au cours du temps de chauffage se fait en deux étapes plus marquées lorsque la concentration en protéine est supérieure à 2 %. La première augmentation de turbidité est certainement liée à l'agrégation

des protéines dénaturées qui conduit à la gélification du système. Pour des concentrations en SAB inférieures ou égales à 1 %, le taux d'agrégation est plus faible qu'aux plus fortes concentrations en protéines. En outre, il est plus faible dans 50 mM que dans 100 mM en raison d'un plus faible écrantage des répulsions électrostatiques entre les agrégats. La seconde augmentation de turbidité a lieu lorsque le système est déjà gélifié. Elle a lieu d'autant plus tôt que la concentration en protéines est élevée. Le changement de structure qui en résulte se traduit par une augmentation de m_a comme nous l'avons montré pour le système SAB 1 % dans NaCl 50 mM.

On peut donc supposer qu'une restructuration du gel a lieu au cours du chauffage et de ce fait que les protéines ne sont pas agrégées entièrement de façon irréversible. Toutefois le gel ne se dissout pas lorsqu'il est redispersé dans le solvant. Cette restructuration serait ainsi liée à la flexibilité des systèmes et non pas à une désolidarisation et une nouvelle agrégation des protéines entre elles. L'évolution des systèmes au cours du temps serait ainsi à l'origine des différentes concentrations critiques de gélification mesurées.

En présence de $CaCl_2$, le même type d'évolution en deux étapes a été observé et les mesures de m_a pour des systèmes transparents ont vérifié que cette évolution semblait avoir lieu pour tous les systèmes. Toutefois la deuxième étape peut être beaucoup plus marquée qu'en présence de NaCl pour les fortes concentrations en protéines. En augmentant la concentration en protéines, le rapport R diminue et devient égal à 1 pour des concentrations en SAB de 4,95 % et 9,9 % dans 0,75 mM et 1,5 mM, respectivement. Ainsi pour le même ratio R (= 2,5), en présence de $CaCl_2$ 0,75 mM (SAB 2 %) la deuxième étape a lieu plus tard que dans 1,5 mM de $CaCl_2$ (SAB 4%). De ce fait, on peut supposer que les répulsions électrostatiques augmentent plus fortement dans 0,75 mM que dans 1,5 mM lorsque la concentration en protéine augmente. Ce comportement serait plus marqué lorsque le temps de chauffage augmente. En effet la diminution de la concentration critique de gélification en fonction de la concentration en protéines est plus marquée pour un chauffage de 48 h que de 12 h (Figure III.3b).

III.6.3 Comparaison avec la structure des gels de β-Lactoglobuline

Les résultats obtenus dans cette étude peuvent être comparés avec la structure des gels de β-Lg récemment étudiées dans différentes concentrations de NaCl à pH 7 (Pouzot *et al.*, 2004b). La SAB et la β-Lg ont un point isoélectrique de 5,2, la SAB ayant une charge négative nette deux fois plus forte (-18) que la β-Lg (-7,8).

Comme pour la SAB, la β-Lg gélifie au-delà d'une certaine concentration critique qui diminue lorsque la concentration en sel augmente. Les valeurs mesurées par Baussay *et al.* (2003) au bout de 24 h de chauffage à 80°C suggèrent que la gélification de la SAB a lieu pour des concentrations plus basses que la β-Lg.

Des gels transparents sont obtenus pour des concentrations en NaCl inférieures ou égales à 50 mM avec la β-Lg alors que pour la SAB ils ne sont observés que jusqu'à NaCl 10 mM seulement. La turbidité des systèmes augmente en augmentant la concentration en sel. Contrairement à la SAB dans 100 et 200 mM, aucune augmentation de la turbidité aux fortes concentrations en protéines n'est observée pour la β-Lg. Aucune explication n'a pu être fournie pour expliquer ce phénomène. L'augmentation de la turbidité au cours du chauffage à 80 °C est monotone pour la β-Lg contrairement à la SAB où deux étapes ont été mises en évidence.

La gélification des systèmes se fait de façon analogue par agrégation des protéines dénaturées qui interagissent pour former un réseau tridimensionnel. En absence de restructuration en deçà de l'échelle d'observation de la structure locale (*Ra*), la structure des agrégats des gels est la même que celle des agrégats dilués formés en dessous du point de gel. Ce résultat a été clairement mis en évidence pour la β-Lg (Pouzot *et al.*, 2004b). Pour la SAB la correspondance n'a pas été établie dans notre étude de façon précise mais la dimension fractale des gels est comparable à celle mesurée pour des agrégats dilués dans les mêmes conditions (Hagiwara *et al.*, 1997).

Pour les deux protéines, l'hétérogénéité des systèmes évaluée par m_a augmente avec la concentration jusqu'à un maximum au-delà de laquelle elle décroît. En deçà du point de gel, l'augmentation de la concentration en protéines se traduit par une augmentation de la taille des agrégats. Aux concentrations proches du point de gel, les mesures ne sont pas réalisables pour des forces ioniques élevées car le système devient hétérogène. Pour des concentrations plus élevées que le point de gel, la force des interactions répulsives entre les agrégats augmente et tend de ce fait à rendre le système plus homogène.

L'effet des ions Na^+ et Ca^{2+} a été mis en évidence dans cette étude mais aucune étude de ce type n'a encore été réalisée sur les gels de β-Lg permettant d'établir des comparaisons. Le nombre de sites de fixation du calcium varie également en fonction de la nature des protéines. Nous avons montré qu'il existerait, pour la SAB native, trois sites de fixation possibles. Cependant, lorsque la protéine est dénaturée, on peut supposer que les changements structuraux induits par le traitement thermique modifient le nombre de sites localisés de façon spécifique où une interaction entre la protéine et les ions calcium a lieu.

IV. Gélification thermique des mélanges SAB/pectines LM en présence ou non de calcium

IV.1 Systèmes en absence de calcium

IV.1.1 Etablissement des diagrammes d'état des mélanges

Cette partie est préliminaire à l'étude des propriétés rhéologiques et microscopiques des systèmes SAB/pectines LM, l'objectif étant de définir le domaine d'étude le plus pertinent en termes de concentrations en biopolymères et de durée du traitement thermique.

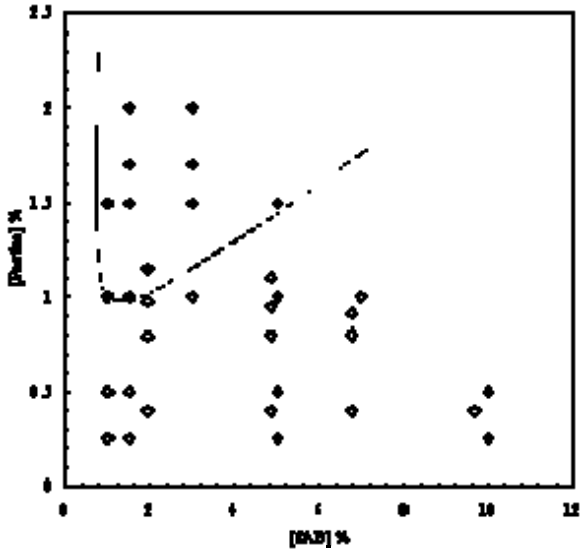
IV.1.1 Etude des systèmes SAB native/pectines LM

Les mélanges réalisés à 20 °C dans les gammes de concentrations comprises entre 1 et 10 % pour la SAB et 0,21 et 2 % pour les pectines LM, restent homogènes : aucun trouble dans les solutions n'est mis en évidence. Les systèmes sont donc miscibles, confirmant les résultats de la littérature (Takada & Nelson, 1983; Semenova *et al.*, 1991). Rappelons que ce comportement est assez inhabituel pour les mélanges polyosides/protéines, puisque dans la majorité des cas, les mélanges protéine/polyoside présentent une séparation de phase (Tolstoguzov, 1998).

IV.1.2 Influence du traitement thermique

La Figure IV.1 présente le diagramme d'état obtenu à partir des observations des mélanges SAB/pectines LM ayant subi un traitement thermique à 80°C pendant 1 h, dans NaCl 100 mM. Les observations ont été effectuées après refroidissement à 20 °C. On distingue des tubes homogènes opaques, d'une part, et des tubes présentant une séparation de phase macroscopique, d'autre part. Dans ce cas, la phase supérieure est liquide et translucide; on peut supposer qu'elle contient majoritairement les pectines LM; la phase inférieure est solide, opaque; on suppose qu'elle contient majoritairement la SAB agrégée. Pour la protéine seule, tous les tubes sont opaques. Plus la concentration en pectines LM est élevée, plus la séparation de phase est visible macroscopiquement. Toutefois, une apparence homogène ne signifie pas forcément que la séparation de phase n'ait pas lieu. En effet, l'agrégation et la gélification de la protéine induite par le traitement thermique peut bloquer la séparation de phase. Ce diagramme d'état indique essentiellement que la compétition entre les cinétiques de gélification et de démixtion sont dépendantes de la concentration en biopolymères.

Figure IV.1 Diagramme d'état des mélanges SAB/pectines LM dans NaCl 100 mM (observés à 20 °C après un traitement thermique de 1 h à 80 °C). Mélanges opaques présentant une apparence homogène (¯) ou une séparation de phase macroscopique (®). Trait pointillé: séparation des deux zones.

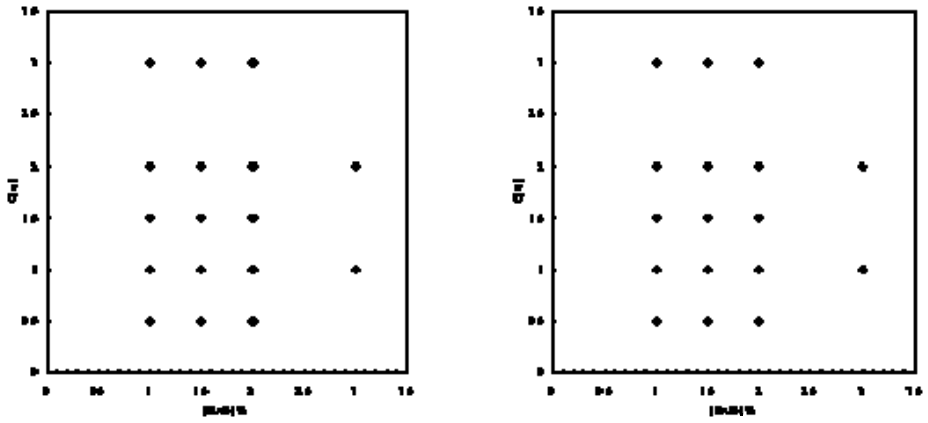


Nous avons choisi d'examiner plus spécifiquement les systèmes dont la concentration en pectines LM variait de 0,2 à 1,55 % et la concentration en SAB entre 1 et 3 %. Ces mélanges ont été visualisés après refroidissement suite à un traitement thermique à 80 °C de 30 ou 60 min et après un temps de repos de 48 h à 20° C suivi d'une centrifugation à 2600 g.

Les diagrammes sont tracés en représentant en ordonnées la concentration réduite C[η] (où C est la concentration en pectines LM et [η] la viscosité intrinsèque égale à $234*10^{-3}$ $L.g^{-1}$ (voir II.2.1.3)), correspondant en régime dilué (C[η] < 1) au volume occupé par le polymère dans la solution. Dans les conditions choisies, la concentration réduite était comprise entre 0,5 et 3, couvrant ainsi les régimes dilués et semi-dilués.

Dans le cas des protéines seules, les tubes restaient opaques et d'apparence homogène, avant et après centrifugation. Pour les mélanges, le diagramme d'état obtenu avant et après centrifugation pour des traitements thermiques d'une durée de 30 min à 80 °C est présenté sur la Figure IV.2. Sans centrifugation les tubes paraissaient homogènes jusqu'à C[η]~2. Après centrifugation, une grande partie des tubes montraient une séparation de phase. Toutefois certains mélanges avaient encore une apparence homogène (C[η] = 0,5; SAB > 1,5 %). Même après centrifugation, il n'était pas possible de visualiser la séparation de phase dans ces conditions. Il est à noter cependant que le fait que les tubes à 1 % de SAB présentaient cette séparation de phase indique que celle-ci doit se produire aux concentrations supérieures. Par ailleurs, nous avons observé des diagrammes similaires lorsque la durée du chauffage était de 30 ou de 60 min.

Figure IV.2 Diagrammes d'état des mélanges SAB/pectines LM (concentrations en pectines entre 0,21 et 1,3 %) observés à 20 °C (**a**) et après une centrifugation (2600 g, 3h) (**b**). Mélanges présentant une phase homogène (⁀) ou une séparation de phase macroscopique (®) (traitement thermique de 30 min à 80 °C).



a. b.

IV.1.3 Conclusions

Cette partie préliminaire a permis de préciser le comportement macroscopique des mélanges SAB/pectines LM à température ambiante après un traitement thermique. Une compétition entre les cinétiques de ces deux mécanismes s'opère ce qui se traduit par l'observation de systèmes d'apparence homogène ou présentant une séparation de phase macroscopique.

A partir de ces observations, nous avons choisi de travailler avec un traitement thermique d'une durée de 30 min à 80 °C et de limiter notre étude à trois concentrations en pectines LM: 0,21 % (C[η] = 0,5); 0,43 % (C[η] = 1) et 0,85 % (C[η] = 2) et trois concentrations en SAB: 2, 4 et 8 %.

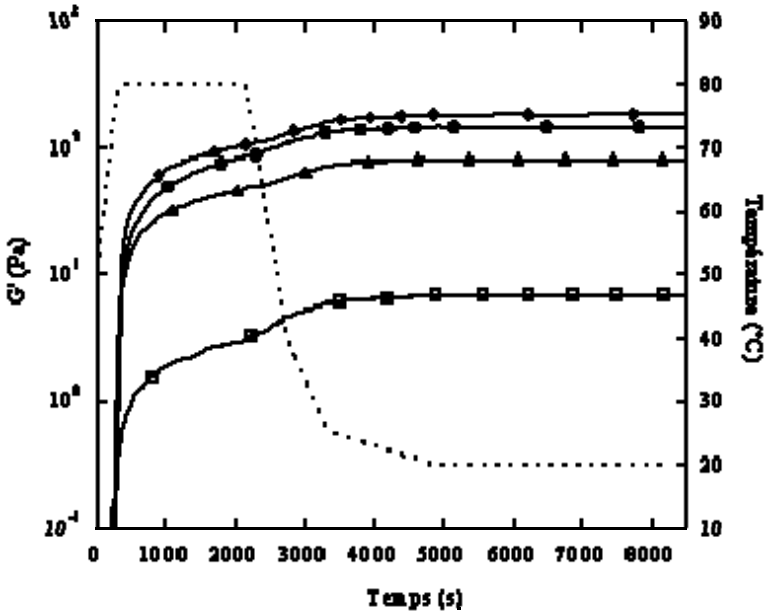
IV.1.2. Rhéologie et Ultrastructure des mélanges

IV.1.2.1. Influence de la présence de pectines LM sur la gélification de la SAB

- *Propriétés rhéologiques*

Les variations du module G' au cours du processus thermique pour la SAB seule (2 %) et pour les mélanges SAB (2 %)/pectines LM sont présentées en Figure IV.3. Le traitement thermique appliqué imite celui subi par les systèmes observés macroscopiquement que nous venons de décrire.

Figure IV.3 Gélification de la SAB 2 % (˜) et des mélanges SAB 2 %/pectines LM 0,21 (¯), 0,43 (r) et 0,85 (c) % dans NaCl 100 mM à pH 6,8 (trait en pointillé: profil de température).

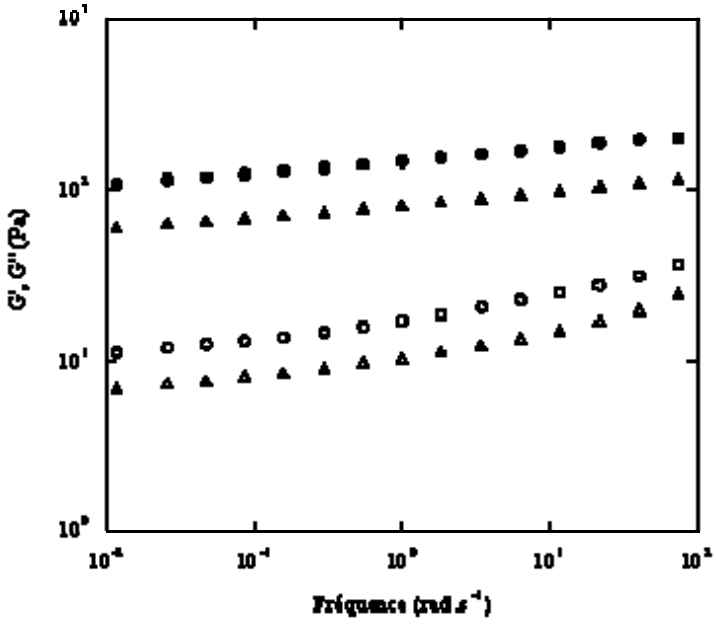


Pour tous les systèmes, on observe une augmentation rapide de G' à 80 °C et une seconde augmentation plus faible au cours du refroidissement. Après 1 h à 20 °C, G' n'augmente plus de façon significative et les systèmes sont considérés comme stables. L'addition de pectines LM à la SAB ne modifie pas l'allure générale des courbes mais la rigidité des gels diffère. L'addition de 0,21 % de pectines LM conduit à une légère accélération de la cinétique de gélification et un renforcement du gel de protéine seule. Ce comportement a également été vérifié pour des concentrations en pectines LM allant jusqu'à 0,3 %. En augmentant la concentration en pectines LM dans le mélange (0,43 et 0,85 %), des gels plus faibles que pour la protéine seule sont obtenus. Cette tendance a également été confirmée pour des concentrations en pectines LM allant jusqu'à 1,3 %. Ces mesures ont été réalisées avec au moins deux répétitions pour chaque système. Les écarts de modules sont toujours inférieurs à 5 % en valeur relative. Par ailleurs, pour chaque nouvelle préparation de solution mère protéique, un suivi des propriétés viscoélastiques lors du traitement thermique appliqué a été réalisé pour vérifier la répétabilité de la gélification. Cette démarche a été suivie pour toutes les expériences présentées dans ce travail.

Les spectres mécaniques (courbes de variations de G' et G'' en fonction de la fréquence) obtenus à la fin du traitement thermique sont présentés en Figure IV.4 pour la SAB seule et pour le mélange en présence de 0,43 % de pectines LM (les spectres des autres mélanges ont la même allure). Quel que soit le système, G' est toujours supérieur à G'' (G'>10 G'') et les

deux modules présentent une faible dépendance en fréquence. Les modules s'infléchissent légèrement aux faibles fréquences. En s'appuyant sur la définition de Clark & Ross-Murphy (1987), on peut qualifier le gel obtenu de gel «fort» ou «vrai» (que nous désignerons par la suite simplement par gel) en opposition aux gels «faibles» qui montrent une plus forte dépendance en fréquence des modules. On peut souligner le fait que la légère dépendance des modules G' et G'' en fonction de la fréquence est typique des gels de protéines globulaires, les gels de polyosides, en particulier les pectines LM, présentant souvent une bien moindre dépendance de la fréquence.

Figure IV.4 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): SAB 2 % (˜); mélange SAB 2 %/pectines 0,43 % (p) dans NaCl 100 mM à pH 6,8 (symboles pleins : G'; symboles vides: G'').

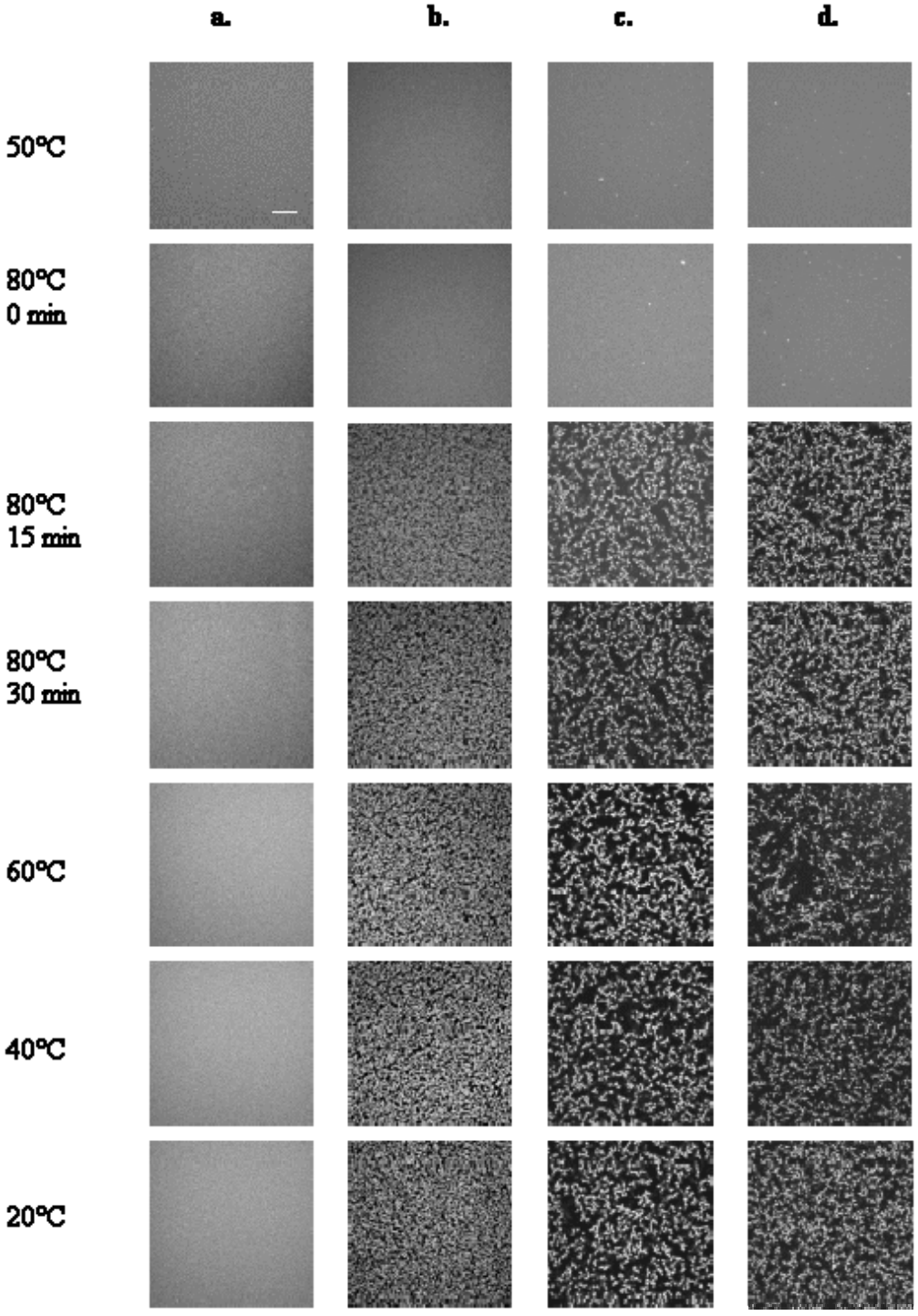


Les gels obtenus à partir de la protéine seule et du mélange présentent donc la même structure mais la fermeté des gels varie selon la concentration en pectines.

- *Ultrastructure des systèmes*

Les ultrastructures correspondantes observées au cours du traitement thermique sont présentées en Figure IV.5 (la protéine étant marquée avec la RITC).

Figure IV.5 Observations par MCBL des systèmes au cours du processus thermique dans NaCl 100 mM à pH 6,8: SA*B*-RITC 2 % (**a**); mélanges SA*B*-RITC 2 %/pectines LM 0,21 (**b**); 0,43 (**c**) et 0,85 (**d**) %. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.

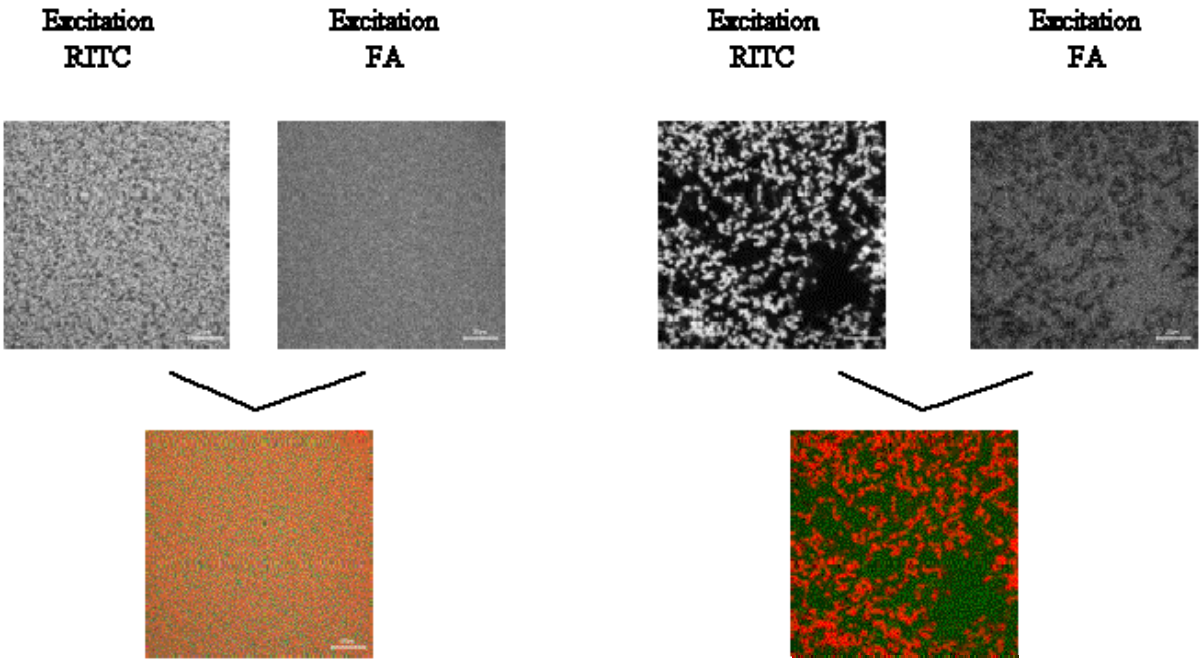


Pour la protéine seule (colonne a) aucun changement significatif n'est noté au cours du traitement thermique. La fluorescence est répartie de façon uniforme dans le milieu. On peut donc conclure que le réseau protéique n'est pas visible à cette échelle d'observation.

Pour les mélanges SAB/pectines LM (colonnes b, c, d), les systèmes ont une apparence homogène jusqu'au début du traitement thermique à 80 °C. Sur les images prises au bout de 15 min à 80 °C, une distribution inhomogène de la fluorescence est observée par la présence de particules fluorescentes, apparemment sphériques, plus ou moins connectées sous forme de chapelets. La taille des particules est difficile à évaluer (à la limite de résolution de l'appareil) en revanche la taille des ensembles plus ou moins connectées de particules est de l'ordre de quelques dizaines de microns pour des concentrations en pectines égales à 0,43 et 0,85 %. Cette structure est conservée durant le refroidissement à 20 °C. Lorsque la concentration en pectines LM augmente, les zones sombres sont plus larges et la connectivité entre les particules sphériques semble diminuer.

Des observations par double localisation en utilisant la protéine marquée avec le RITC et les pectines LM marquées avec la FA ont permis de préciser ces clichés. Les images sont obtenues en excitant les deux sondes fluorescentes respectivement l'une après l'autre (Figure IV.6 a et *b*-1ère rangée). La fluorescence des biopolymères est codée en couleur de façon arbitraire: vert pour les pectines LM et rouge pour la SAB. Les deux clichés sont alors superposées (Figure IV.6a et *b*-2ème rangée). Les microstructures finales montrent ainsi qu'aucune zone de l'image n'est dépourvue de biopolymères et il est évident que les protéines et les pectines LM sont situées dans deux phases distinctes.

Figure IV.6. Observations par MCBL par double localisation des structures finales des mélanges SA*B*-RITC 2 %/pectines LM-FA 0,21 (**a**) et 0,43 % (**b**) dans NaCl 100 mM à pH 6,8.
Première rangée: clichés résultant de l'excitation de la RITC et de la FA
Deuxième rangée: Superposition des deux clichés en codant arbitrairement les couleurs, les protéines apparaissent en rouge et les pectines en vert. Barre d'échelle 25 µm.



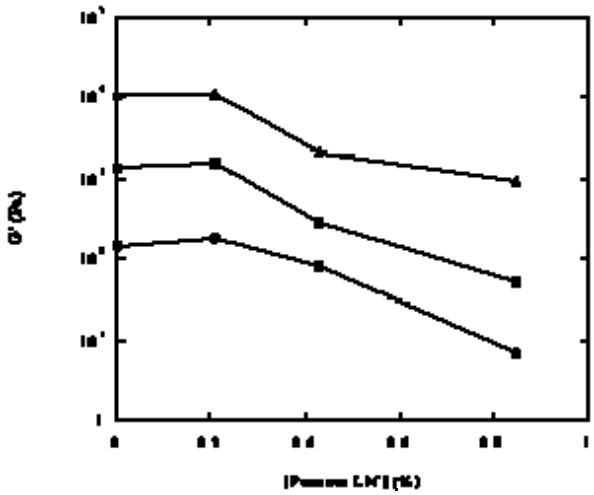
Ces observations permettent de montrer que les protéines sont localisées au niveau des particules fluorescentes et les pectines LM dans la phase continue qui apparaît sombre lorsque la protéine seule est marquée avec la RITC (Figure IV.5). L'augmentation de la taille des zones sombres lorsque la concentration en pectines LM augmente suggère ainsi que le processus de séparation de phase est de plus en plus accentué.

IV.1.2.2 Influence de la concentration en SAB

- *Propriétés rhéologiques*

Les expériences réalisées pour des concentrations plus élevées en SAB (4 et 8 %) ont conduit à des profils rhéologiques assez identiques à ceux obtenus pour 2 % de SAB, quelle que soit la concentration en pectines. La Figure IV.7 montre les variations du module G' à la fin du processus thermique pour les mélanges SAB/pectines LM en fonction de la concentration en pectines LM. Lorsque la concentration en protéine est doublée, un décalage proche d'une décade est noté pour G'. Par ailleurs, l'influence de la concentration en pectines LM est similaire, quelle que soit la concentration en protéines. Les écarts de modules entre répétitions pour chaque système sont inférieurs à 5 % en valeur relative.

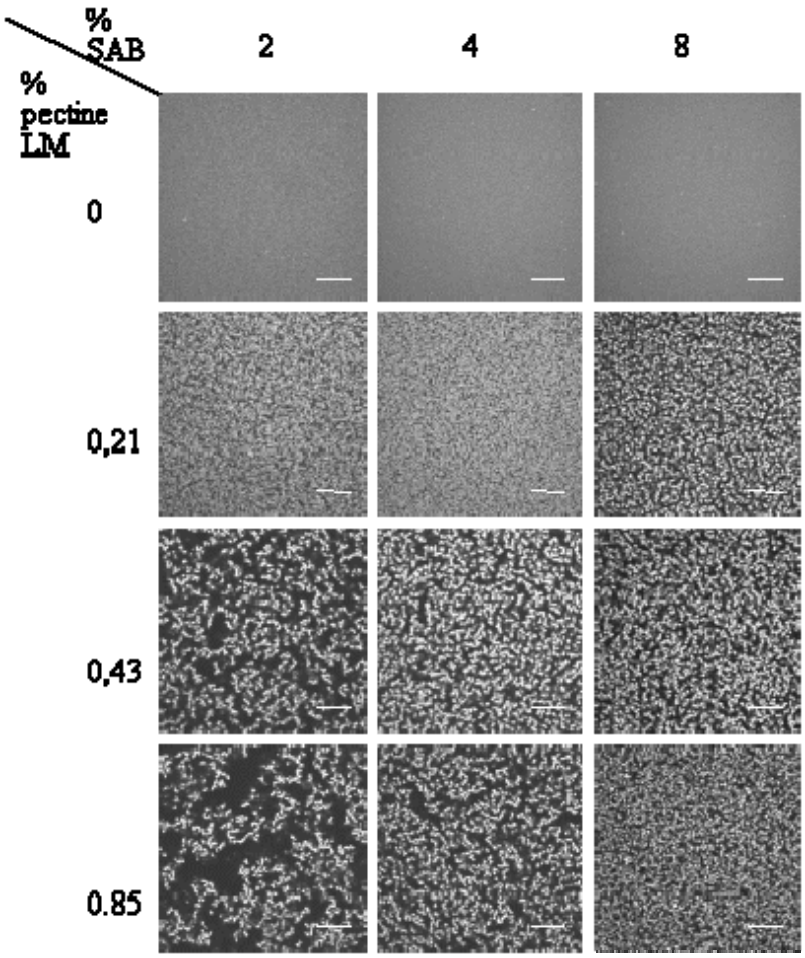
Figure IV.7 Modules G' des mélanges SAB/pectines LM (en fin de cinétique, après 1 h à 20 °C) en fonction de la concentration en Pectines LM pour 2 ( ), 4 (c), 8 (r) % de SAB, dans NaCl 100 mM à pH 6,8).



- *Ultrastructure des systèmes*

Les microstructures finales de ces systèmes sont présentées dans la Figure IV.8. Comme précédemment, les gels de protéines seules apparaissent homogènes à cette échelle d'observation.

Figure IV.8 Observations par MCBL des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8: SA*B*-RITC et mélanges SA*B*-RITC /pectines LM. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.



La présence de pectines LM se traduit par des clichés assez semblables quelle que soit la concentration en pectines et en SAB reflétant le même type de séparation de phase. L'augmentation de la concentration en protéines semble diminuer l'espace occupé par les zones sombres. Il est toutefois difficile de distinguer de façon objective toutes ces images visuellement. C'est pourquoi une analyse d'images a été réalisée. Celle-ci sera décrite ultérieurement.

IV.1.3 Discussion et conclusions

La SAB est le seul biopolymère du mélange capable de gélifier dans ces conditions. La gélification du système est donc gouvernée par celle de la protéine. Cependant, la concentration en biopolymères semble affecter de façon significative la structure macroscopique, microscopique et les propriétés rhéologiques des mélanges.

Le fait que la présence de pectines LM affecte la rigidité du gel doit pouvoir s'expliquer sur la base des séparations de phase qui peuvent conduire à des effets très différents selon les conditions.

Pour les mélanges en présence de SAB 2 % contenant une faible quantité de pectines LM (0,21 %) (C[η]= 0,5), même si aucune séparation de phase macroscopique n'a pu être observée après centrifugation (Figure IV.2), celle-ci est nettement visible par MCBL (Figure IV.5). Dans ces conditions, un effet synergique est observé: la séparation de phase conduit à un renforcement du gel qui peut être attribué à une augmentation de la concentration locale en protéine. Ce comportement est similaire de celui observé avec les mélanges β-Lg (5 %)/κ-carraghénanes (0,1 %) (pH 7, NaCl 100 mM) (Capron *et al.*, 1999b).

Pour des concentrations plus élevées en pectines LM (0,43 et 0,85 %), la séparation de phase macroscopique a été mise en évidence après centrifugation. Les observations MCBL ont confirmé que dans ce cas la séparation de phase était plus marquée. Le réseau protéique formé par des agrégats apparaît moins connecté ce qui pourrait expliquer l'affaiblissement du gel par rapport au gel de protéines seules (effet de type antagoniste).

L'augmentation de concentration en protéines se traduit logiquement par un renforcement de la rigidité des gels et une augmentation de l'agrégation protéique.

En s'appuyant sur les résultats obtenus par Syrbe (1997) sur des mélanges protéines du lactosérum/pectines HM, les observations de particules protéiques d'apparence sphériques laissent supposer qu'une séparation de phase de type liquide-liquide est amorcée lors du chauffage à 80 °C. En prolongeant le traitement thermique, la gélification des protéines dans ces particules sphériques aurait alors lieu. En assimilant ces particules protéiques à des particules colloïdales, on peut supposer qu'un phénomène de déplétion-floculation des agrégats de SAB en présence des chaînes de pectines LM pourrait alors avoir lieu. Ce mécanisme a été proposé par Tuinier *et al.* (2000) pour expliquer le comportement des systèmes composés d'agrégats de protéines du lactosérum mélangés à un polyoside exocellulaire.

L'agrégation et la gélification protéique qui se poursuivent bloquent à un certain moment la séparation de phase et la structure est alors figée. En se basant sur les observations microscopiques au cours du traitement thermique (Figure IV.5), la structure apparaît définie dans les 15 premières minutes du plateau à 80 °C, ce que semblent confirmer les profils

rhéologiques qui montrent que les pectines interviennent sur la cinétique dès les premiers instants de ce plateau.

Toujours sur la base d'un mécanisme de déplétion-flocculation, le concept de séparation de phase viscoélastique, développé par Tanaka (2000) peut être envisagé. Dans ce cas, les mélanges de protéines et de polyosides sont considérés comme des mélanges dynamiquement asymétriques du fait de la différence de tailles des molécules composant les biopolymères et de la transition sol-gel qui réduit la dynamique du système. La séparation de phase conduit ainsi à un réseau de particules lentes interagissant (les agrégats protéiques), si les attractions entre celles-ci sont suffisamment fortes. Ce dernier point a été confirmé dans une étude menée par Wolthers *et al.* (1997) par des mesures viscoélastiques réalisées sur une dispersion de particules colloïdales sphériques. Il a été montré que le mécanisme de déplétion-floculation pouvait induire la formation d'un réseau colloïdal, la dépendance en fréquence mesurée traduisant les interactions entre les particules colloïdales. Des comportements de même type ont également été montrés par des mesures rhéologiques et par des observations microscopiques par Bourriot *et al.* (1999) sur les mélanges caséines micellaires/galactomannanes. Les auteurs ont montré qu'une plus faible dépendance des modules G' et G'' avec la pulsation serait la conséquence de la formation d'un réseau faible, stabilisé par les interactions entre les protéines colloïdales suite à un mécanisme de déplétion-flocculation induit par la présence des chaînes polyosidiques.

Dans les conditions opératoires employées ici, la transition sol-gel de la SAB induite par le traitement thermique et l'augmentation de la concentration en biopolymères modifie la viscoélasticité des phases du mélange. Une augmentation de la concentration en pectines LM induit une accentuation de la séparation de phase et une augmentation de la concentration en protéines se traduit par une agrégation plus importante.

IV.2. Systèmes en présence de calcium

IV.2.1. Gélification des pectines LM en présence de calcium

Il a été vérifié par viscosimétrie que le comportement rhéologique de la solution de pectines LM (1 %) à 20 °C présente un caractère légèrement rhéofluidifiant et non thixotrope. Les propriétés viscoélastiques obtenues montrent un comportement rhéologique typique d'une solution macromoléculaire.

Sur la base d'observations macroscopiques des systèmes pectines LM/calcium, nous avons choisi de limiter notre étude à une concentration en calcium égale à 3 mM. Les évolutions du module G' des solutions de pectines LM lorsqu'elles sont chauffées en présence d'ions calcium, sont présentées dans la Figure IV.9a.

Figure IV.9 a. Gélification des pectines LM 0,21 (®), 0,43 (¢) et 0,85 (p) % dans NaCl 100 mM à pH 6,8 en présence de 3 mM $CaCl_2$.

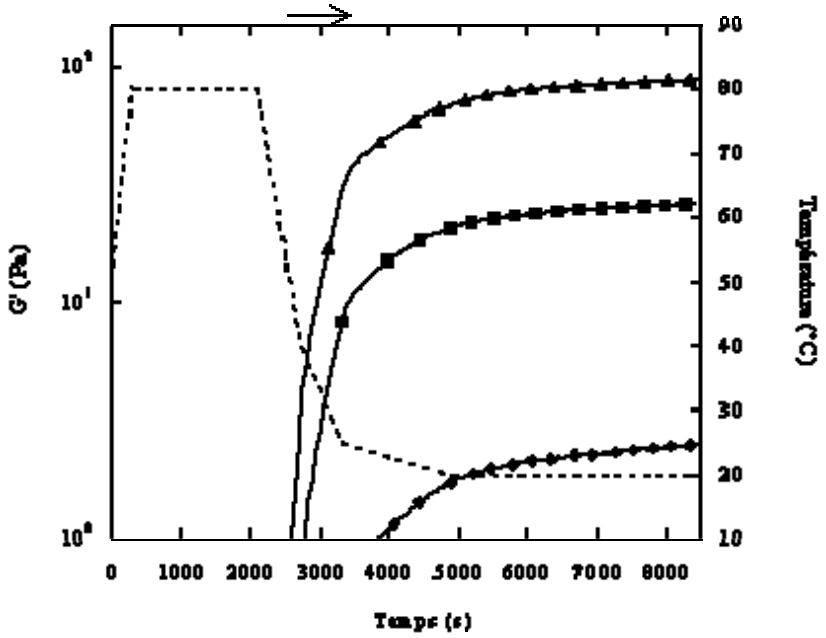
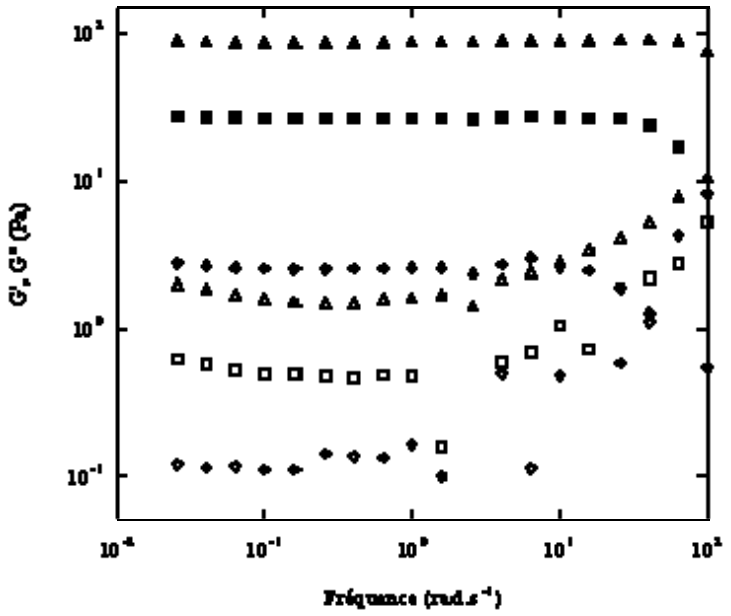


Figure IV.9 b. Spectres mécaniques correspondants en fin de cinétique (mesures à 20 °C) (symboles pleins G', symboles vides G'').



Quelle que soit la concentration en pectines LM, aucun module n'est mesurable au plateau à 80 °C. G' commence à augmenter au refroidissement pour une température inférieure à 60 °C et continue d'augmenter au cours du temps à 20 °C. L'allure des spectres mécaniques réalisés en fin de traitement thermique (Figure IV.9b) est caractéristique d'un gel de polyoside pour les trois concentrations en pectines LM étudiées. Le module G' est toujours supérieur à G''. G' ne présente aucune dépendance en fréquence (absence de pente).

Pour 0,21 % de pectines LM, les valeurs de modules sont peu élevées (G'< 5 Pa) et un gel très faible est formé. En présence de 0,43 % de pectines LM, le gel devient plus rigide (G'~ 30 Pa) et pour 0,85 % de pectines LM, un gel ferme est formé (G' proche de 100 Pa). Ici aussi, les mesures sont réalisées au moins en double et les écarts de modules sont toujours inférieurs à 5 % en valeur relative. A chaque nouvelle préparation de solution mère les propriétés d'écoulement et de gélification de la solution pectique ont été vérifiées afin de s'assurer de la répétabilité des préparations.

Cet effet de la concentration en pectines, pour une concentration donnée en calcium s'explique par une augmentation des liaisons entre les chaînes pectiques *via* les ions calcium (Axelos & Thibault, 1991b). On peut souligner que les modules viscoélastiques des gels de

pectines LM mesurés à 20 °C au bout d'une heure n'atteignent pas un plateau, montrant une lente réorganisation du système.

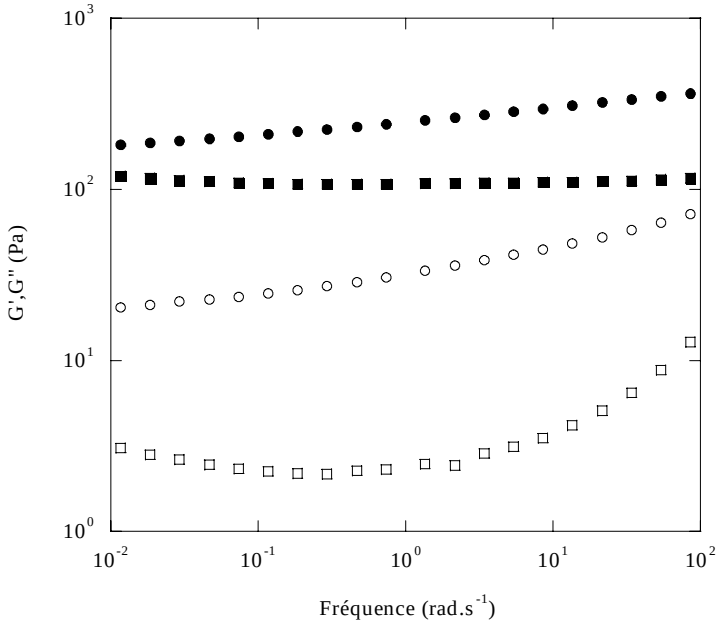
IV.2.2. Gélification de la SAB et des mélanges en présence de calcium

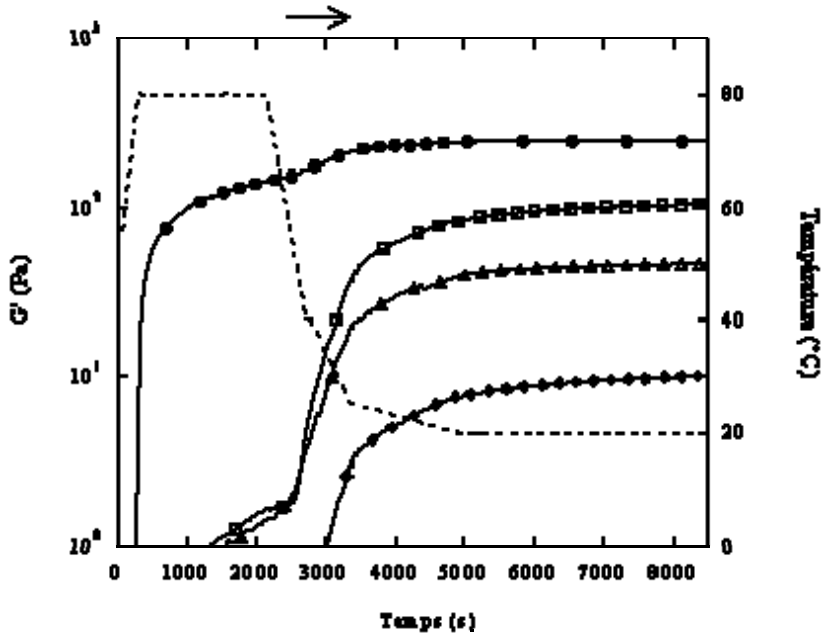
IV.2.2.1 Influence de la concentration en pectines LM en présence de calcium

- *Propriétés rhéologiques*

La Figure IV.10 présente l'évolution des modules G' au cours du traitement thermique des mélanges SAB (2 %)/pectines LM en présence de $CaCl_2$. Ceux-ci sont comparés à la cinétique de gélification de la protéine seule.

Figure IV.10 Gélification de la SAB 2 % (˜) et des mélanges SAB 2 %/pectines LM contenant 0,21 (¯), 0,43 (r) et 0,85 (c) % de Pectines LM dans NaCl 100 mM à pH 6,8 en présence de $CaCl_2$ 3 mM.



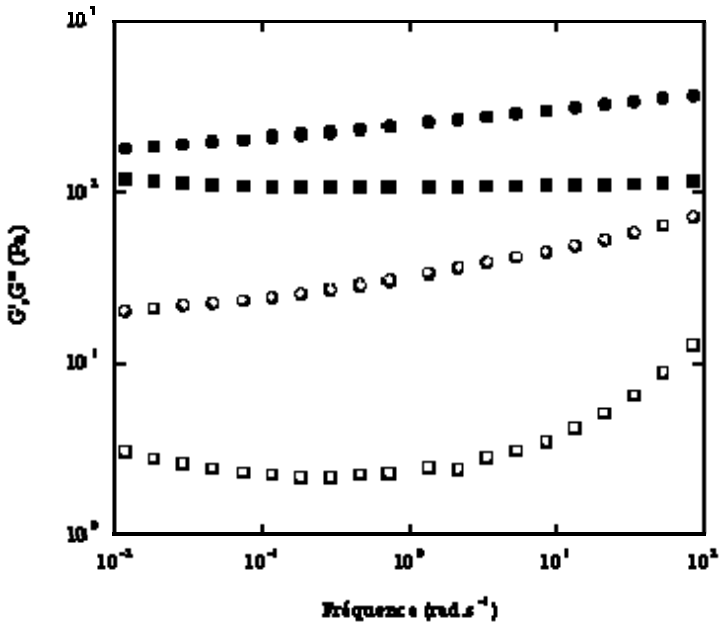


L'addition de calcium à la SAB ne modifie pas le profil de gélification décrit en absence de calcium (Figure IV.3) mais la rigidité du gel est plus grande (G' ~ 250 Pa et G' ~ 150 Pa en absence de calcium).

L'allure des courbes pour les mélanges est très différente de celle de la protéine seule et tend à se rapprocher de celles des pectines seules: quelle que soit la concentration en pectines LM, une très faible augmentation du module G' est observée à 80 °C. Une augmentation marquée est notée lors du refroidissement à partir de ~ 60 °C et se stabilise à 20 °C après une légère nouvelle augmentation. Les modules G' finaux obtenus pour les mélanges ont des valeurs nettement plus faibles (G'£ 10^2 Pa) que pour la protéine seule en présence de calcium (G' > $2*10^2$ Pa) mais des valeurs supérieures (G' ³ 40 Pa) à celles des gels de pectines LM seules pour 0,21 et 0,43 % tandis qu'en présence de 0,85 % de pectines, les rigidités des mélanges et des gels de pectines sont proches (G'~ 10^2 Pa).

Les spectres mécaniques obtenus en fin de cinétique pour la SAB seule et le mélange contenant 0,85 % de pectines LM sont présentés en Figure IV.11.

Figure IV.11 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): SAB 2 % (˜); mélange SAB 2 %/pectines 0,85 % (¢) dans NaCl 100 mM à pH 6,8 (symboles pleins : G' ; symboles vides : G'').



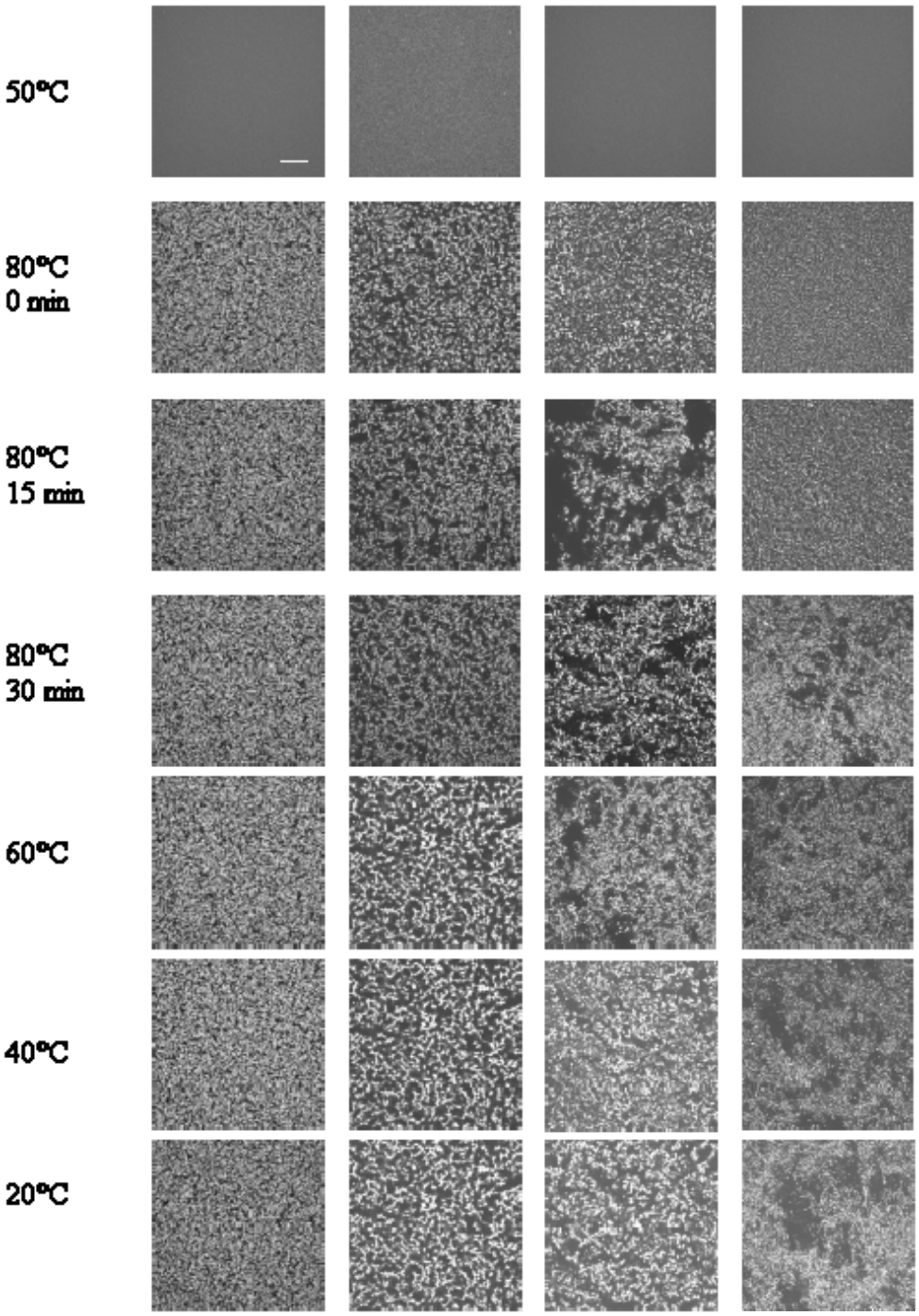
Pour les autres concentrations en pectines l'allure des spectres est similaire à celui présenté. Contrairement aux mélanges sans calcium décrits précédemment, le spectre mécanique du mélange diffère nettement de celui de la protéine seule. Il est en fait assez comparable à celui des gels de pectines LM seules (Figure IV.9b) avec G'(ς) pratiquement constant et G'>10 G''. Ce résultat suggère que la gélification du mélange est gouvernée par la gélification des pectines LM ce qui apparaît en accord avec le fait que le module G' n'augmente que pour des températures inférieures à 60°C comme pour la gélification des pectines LM seules.

En s'appuyant sur l'hypothèse de la thermoréversibilité des gels de pectines LM, le système a été réchauffé à 80 °C. Nous avons observé une diminution du module G' atteignant une valeur légèrement supérieure à celle mesurée au bout de 30 min à 80 °C. L'affaiblissement du gel serait ainsi lié au passage de l'état gélifié à l'état fluide des pectines LM au cours du réchauffage, confirmant ainsi le rôle déterminant du réseau pectique dans la rhéologie du système mixte.

- *Ultrastructure des systèmes*

Les ultrastructures correspondantes observées au cours du traitement thermique sont présentées en Figure IV.12.

Figure IV.12 Observations par MCBL des systèmes au cours du processus thermique dans NaCl 100 mM à pH 6,8 en présence de 3 mM $CaCl_2$: SA*B*-RITC 2 % (**a**); mélanges SA*B* RITC 2 %/pectines LM 0,21 (**b**); 0,43 (**c**) et 0,85 (**d**) %. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.



Dès que les différents systèmes se trouvent à 80 °C, on note une irrégularité de structures. Pour les gels de SAB (colonne a), contrairement aux systèmes sans calcium (Figure IV.8), la présence de calcium se traduit par l'apparition d'inhomogénéités dans la distribution de fluorescence avec des particules protéiques connectées entre elles, séparées par des zones

sombres définissant des pores assez larges. Cette structure observée dès les premiers instants à 80 °C est conservée tout au long du processus thermique.

En présence de pectines LM (colonnes b, c, d), une séparation de phase est observée comme cela a été décrit en absence de calcium, avec la présence de particules protéiques insérées dans une phase sombre contenant les pectines. Toutefois, il est important de souligner que cette séparation de phase traduite par une diminution de connectivité du réseau protéique est visible dès que la température de 80 °C est atteinte, donc plus tôt que pour les systèmes sans calcium. De plus, des changements de structures sont visibles au cours du processus thermique. Pour des concentrations en pectines LM de 0,21 et 0,43 %, l'étendue des zones sombres semble augmenter entre 0 et 15 min à 80 °C, puis la structure est conservée jusqu'au refroidissement. En présence de 0,85 % de pectines, ce changement intervient au-delà de 15 min à 80 °C. La structure observée au bout de 30 min à 80 °C est conservée au cours du refroidissement également.

Il a été vérifié également que lorsque le système est réchauffé à 80 °C la structure finale observée n'était pas modifiée.

IV.2.2.1 Influence de la concentration en SAB en présence de calcium

- *Propriétés rhéologiques*

La Figure IV.13 présente les variations de G' au cours du traitement thermique pour les gels de SAB (2, 4, 8 %) en présence (symboles pleins) de 3 mM $CaCl_2$. Les courbes de variations en absence de calcium sont également montrées (symboles vides). Les mêmes évolutions de G' sont mises en évidence; l'addition de calcium conduit à un léger renforcement du gel quelle que soit la concentration en protéines.

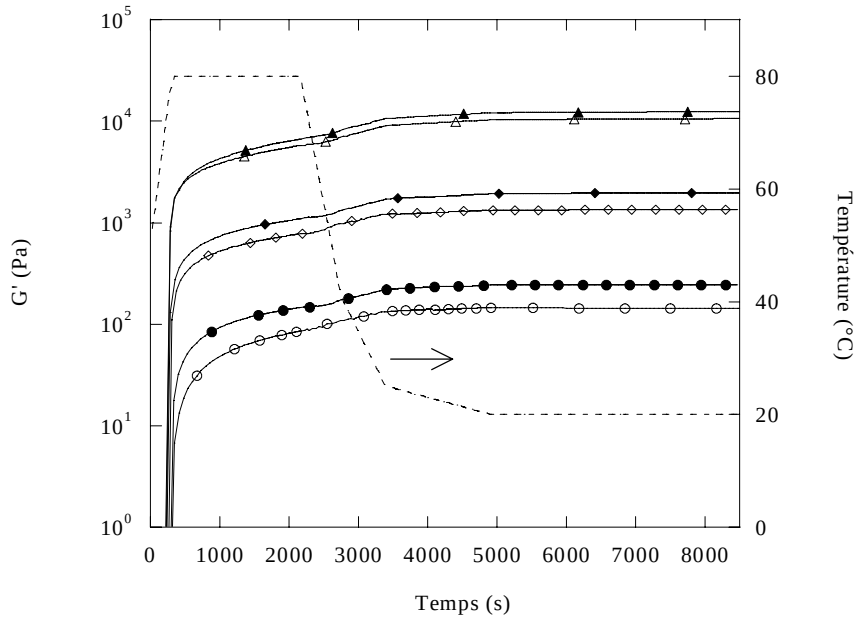
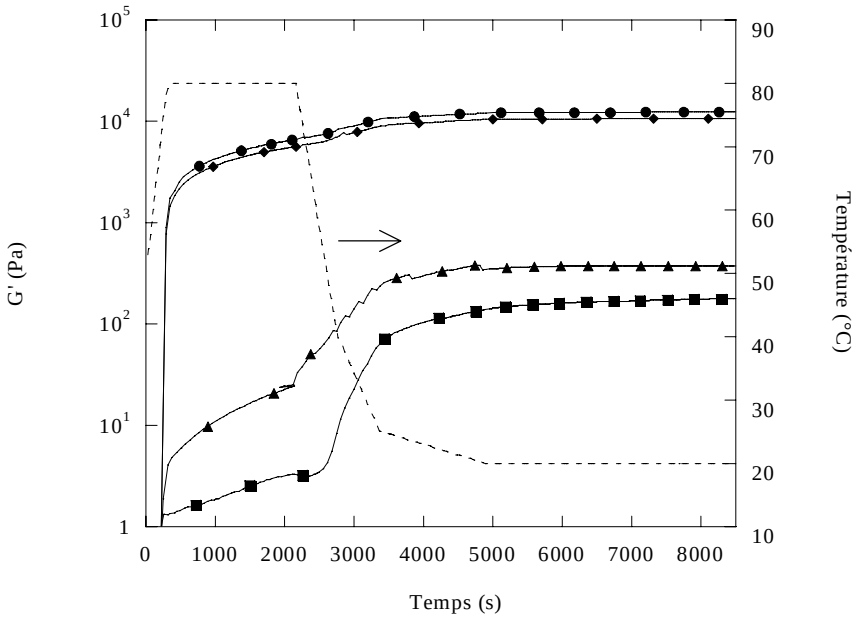
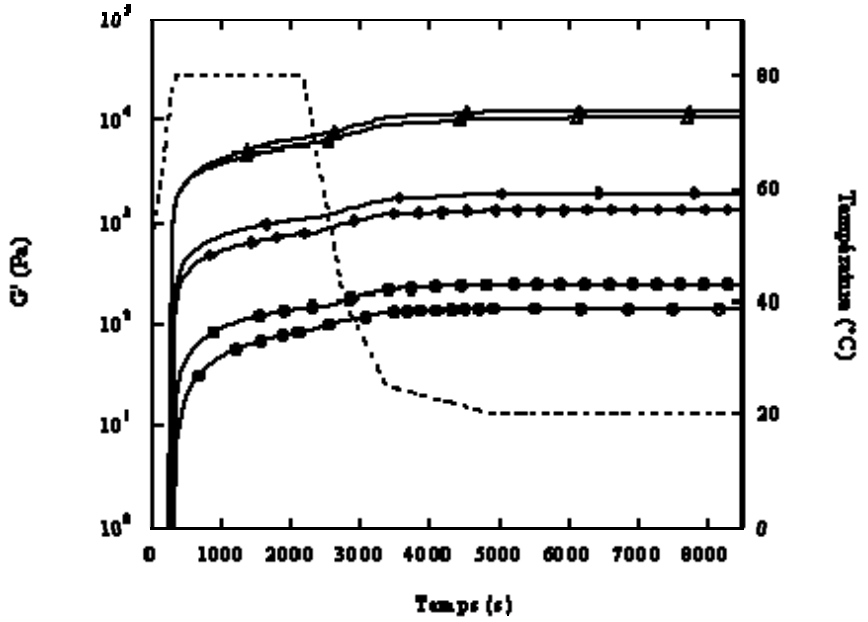


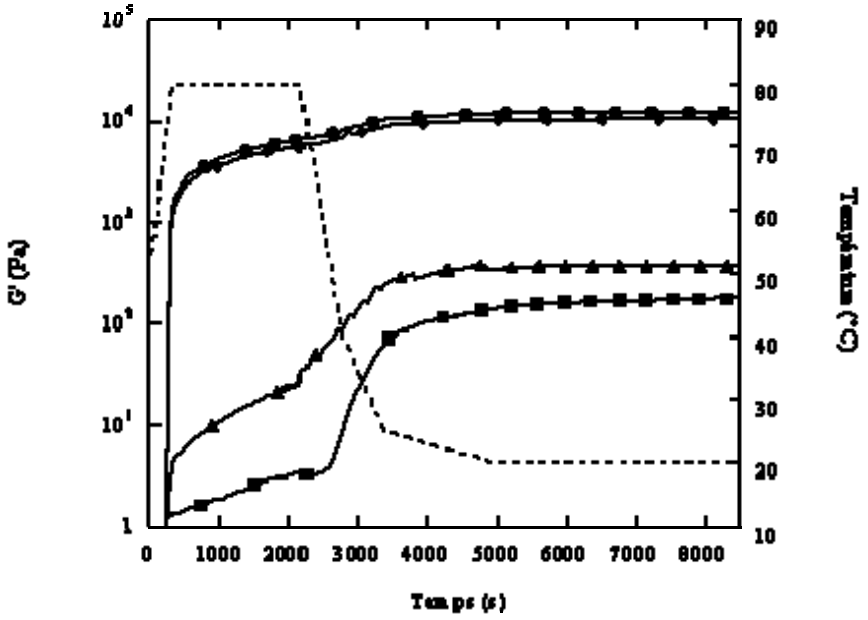
Figure IV.13. Gélification de la SAB 2 ( ), 4 (¯) et 8 (r) % en absence (symboles vides) et en présence de 3 mM $CaCl_2$ (symboles pleins) dans NaCl 100 mM à pH 6,8.





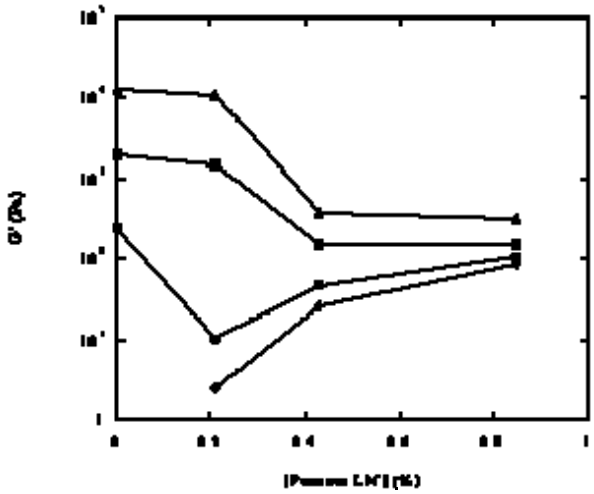
Dans leur ensemble, les cinétiques de gélification des mélanges contenant 4 et 8 % de SAB sont identiques aux cinétiques à celles des systèmes contenant 2 % (Figure IV.10). Nous ne présentons ici que les cinétiques obtenues pour 8 % de SAB (Figure IV.14). On note une exception pour les mélanges contenant 0,21 % de pectines LM. En effet, dans ce cas, l'évolution du module G' au cours du traitement thermique est identique à celle de la protéine seule et les rigidités des gels obtenus pour le mélange et la protéine seule sont très proches.

Figure IV.14 Gélification de la SAB 8 % (˜) et des mélanges SAB 8 %/pectines LM 0,21 (¿), 0,43 ( ) et 0,85 (¢) % dans NaCl 100 mM en présence de 3 mM $CaCl_2$ à pH 6,8.



La Figure IV.15 résume les variations de G' en fonction de la concentration en pectines pour les différentes teneurs en SAB. Les forces de gels obtenus pour les mélanges sont comprises entre celles des gels de pectines LM seules et ceux de la SAB seule. De façon analogue aux systèmes sans calcium (Figure IV.7), l'augmentation de la teneur en protéines se traduit par un renforcement des gels mais ne modifie pas les comportements rhéologiques observés à l'exception des mélanges contenant 0,21 % de pectines LM.

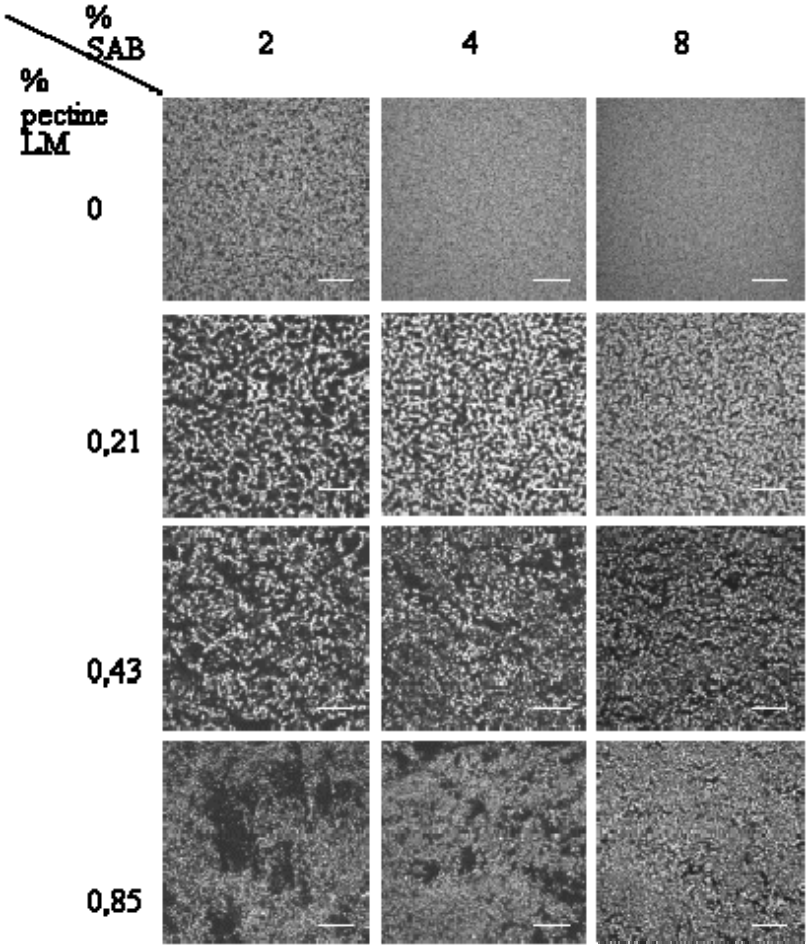
Figure IV.15 Modules G' des gels de Pectines (¿) et des mélanges SAB/pectines LM (en fin de cinétique, après 1 h à 20 °C) en fonction de la concentration en Pectines LM pour 2 (˜), 4 (¢), 8 ( ) % de SAB dans NaCl 100 mM à pH 6,8 en présence de 3 mM $CaCl_2$.



- *Ultrastructure des systèmes*

Les microstructures finales sont illustrées dans la Figure IV.16. Les mêmes types de structures que celles décrites pour les systèmes contenant 2 % de SAB sont observées pour 4 et 8 % de protéines. L'augmentation de la concentration en protéines se traduit par une augmentation de l'espace occupé par les zones fluorescentes et les zones sombres sont de taille plus petite. La connectivité des zones riches en protéines semble plus importante lorsque la concentration en protéines augmente mettant en évidence de façon plus nette le réseau formé.

Figure IV.16 Observations par MCBL des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8 en présence de 3 mM de $CaCl_2$: SA*B*-RITC; mélanges SA*B*-RITC/pectines LM. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.



IV.2.3 Conclusions

Dans ces conditions opératoires, la protéine et les pectines LM sont à même de gélifier. L'ajout de calcium à la SAB dans NaCl 100 mM se traduit par un renforcement des gels et une modification de leur microstructure. Nous avons montré dans le chapitre précédent qu'une interaction spécifique entre les ions calcium et la SAB native au niveau de sites localisés pouvait exister. Concernant les gels, des modifications structurales en présence de calcium ou de sodium ont été constatées. Les résultats suggèrent que les ions sodium diminuent les répulsions électrostatiques entre les protéines dénaturées et l'importance du rapport R = $[Ca^{2+}]/[SAB]$ suggère que les ions calcium auraient également une affinité spécifique localisée avec celles-ci. Les modifications structurales induites par la présence de teneurs en sels croissantes ont été observées pour des gammes de concentrations beaucoup plus basses en calcium qu'en sodium. Le renforcement des gels serait à la fois lié à la

diminution des répulsions électrostatiques par les ions sodium et aux interactions spécifiques entre la protéines et les ions calcium. Le changement de microstructure visible dès la mise en température à 80 °C, par MCLB pourrait ainsi être lié à l'effet combiné de ces deux cations.

Les profils de gélification, de même que les propriétés rhéologiques en fin de cinétique des mélanges contenant 0,43 et 0,85 % de pectines LM, traduisent le fait que la gélification est principalement gouvernée par les pectines LM. La rigidité des gels des mélanges est cependant proche ou plus grande que celles des gels de pectines LM lorsque la concentration en SAB augmente. Ceci suggère une contribution des protéines aux propriétés du gel qui pourrait être de type gel composite (Tolstoguzov, 1995) avec un réseau gélifié continu enchâssant des particules protéiques elles-mêmes gélifiées.

Les observations microscopiques montrent que la structure des gels dépend de la teneur en pectine LM. Plus la concentration en pectines LM augmente, plus la séparation de phase est marquée. De plus on peut noter que cette séparation de phase a lieu dès que la température de 80 °C est atteinte. Les résultats de rhéologie ont montré une grande différence de comportement par rapport aux systèmes sans calcium avec une gélification limitée au cours du plateau à 80 °C pour les mélanges (excepté SAB 4 et 8%/ pectines LM 0,21 %).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'en présence de calcium, la séparation de phase a lieu plus tôt qu'en absence de calcium. Les particules protéiques n'ont pas le temps de se connecter entre elles et le mécanisme de déplétion floculation serait alors accentué au cours du chauffage à 80 °C. La faible augmentation du module G' traduit ainsi la compétition entre la gélification protéique et la séparation de phase. D'après les résultats sur les gels de SAB seule, on peut supposer que le calcium intervient à ce stade du processus thermique dans la gélification des particules protéiques. En revanche au cours du refroidissement, la formation du gel pectique suppose que le calcium interagit préférentiellement avec les pectines LM et ceci de façon plus marquée lorsque la concentration en pectines LM augmente. On peut noter que la gélification des pectines LM ne modifie pas les structures observées par MCBL au cours du refroidissement.

En augmentant la concentration en protéines, on peut supposer que les mélanges tendent à former une structure interpénétrée entre le réseau protéique (observé en MCBL) et le réseau pectique (déduit de la rhéologie). Selon les concentrations en biopolymères dans le mélange il existe une balance entre la contribution des deux biopolymères à la rigidité finale des gels. La gélification des mélanges contenant 0,21 % de pectines semble principalement gouvernée par

la gélification des protéines alors que pour des concentrations en pectines supérieures la gélification est gouvernée par celle des pectines LM, les protéines contribuant également à la rigidité finale du gel.

IV.3 Ultrastructure des systèmes par analyse d'images

L'ensemble des clichés de MCBL (Figures IV.8 et 16) ont été traitées avec la méthode de co-occurrences d'analyse d'images, décrite dans la partie II.2.6.2. Dans un premier temps les structures des gels de SAB seules ont été analysées. Ensuite les structures des mélanges ont été distinguées selon deux approches, en fonction de la concentration en SAB, d'une part, ou en fonction de la concentration en pectines LM, d'autre part.

IV.3.1 SAB seule

La carte factorielle des deux premières composantes principales obtenues après une analyse en composantes principales des paramètres de co-occurrences est montrée en Figure IV.17a. Sur cette carte, pour des raisons de clarté, nous avons choisi de placer une image représentative du groupe des 10 images prises pour chaque système à sa position moyenne dans ce groupe (Figure IV.17b). Chaque image est caractérisée par les paramètres de co-occurrences associés (Figure IV.17c). Chaque paramètre renseigne sur la structure du système (voir Annexe III). Lorsque deux images sont situées à côté l'une de l'autre sur la carte factorielle, elles ont des 'textures' similaires car elles sont définies par les mêmes paramètres.

Figure IV.17 a. Carte factorielle obtenue avec les images des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8 : SA*B*-RITC 2 (S2, S2T, S2C); 4 (S4T, S4C); 8 (S8T,S8C) % en absence (S2, S2T, S4T, S8T) ou en présence de $CaCl_2$ 3 mM (S2C, S4C, S8C).

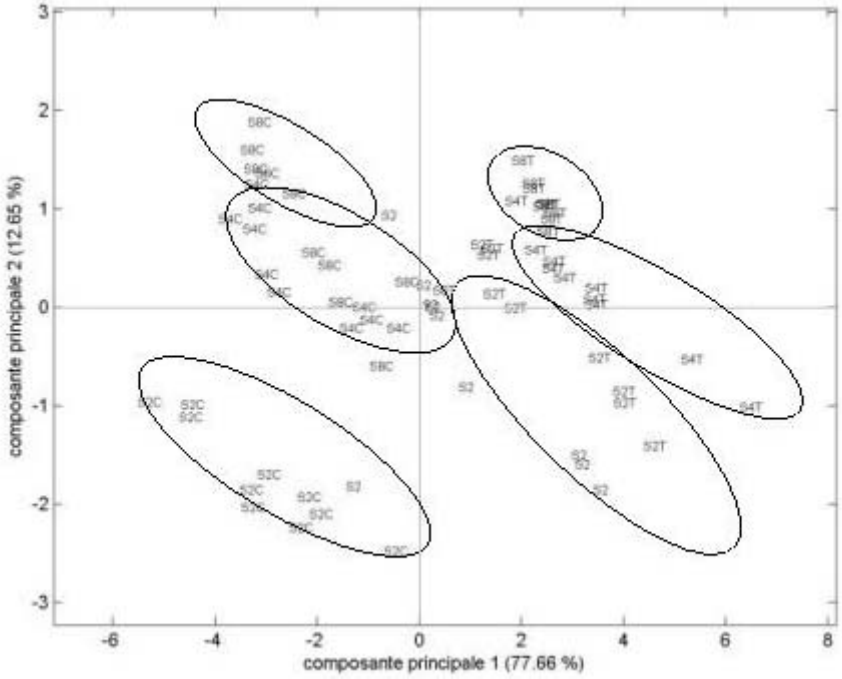
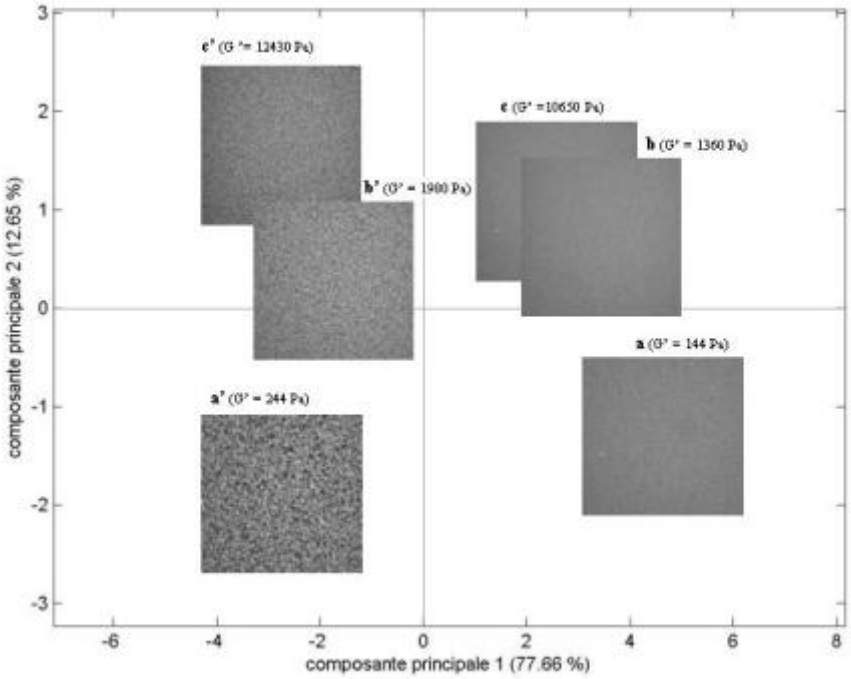


Figure IV.17 b. Représentation simplifiée de la carte a. avec pour chaque système une image représentative placée au milieu du groupe de 10 images. Les nombres entre parenthèse correspondent à la valeur de G' obtenue après une heure à 20 °C.



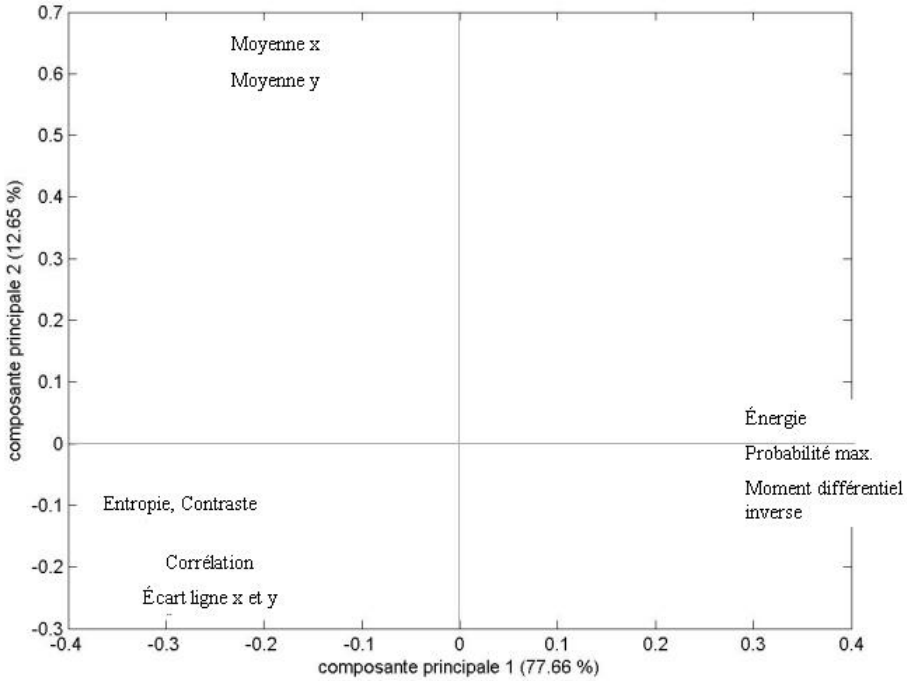
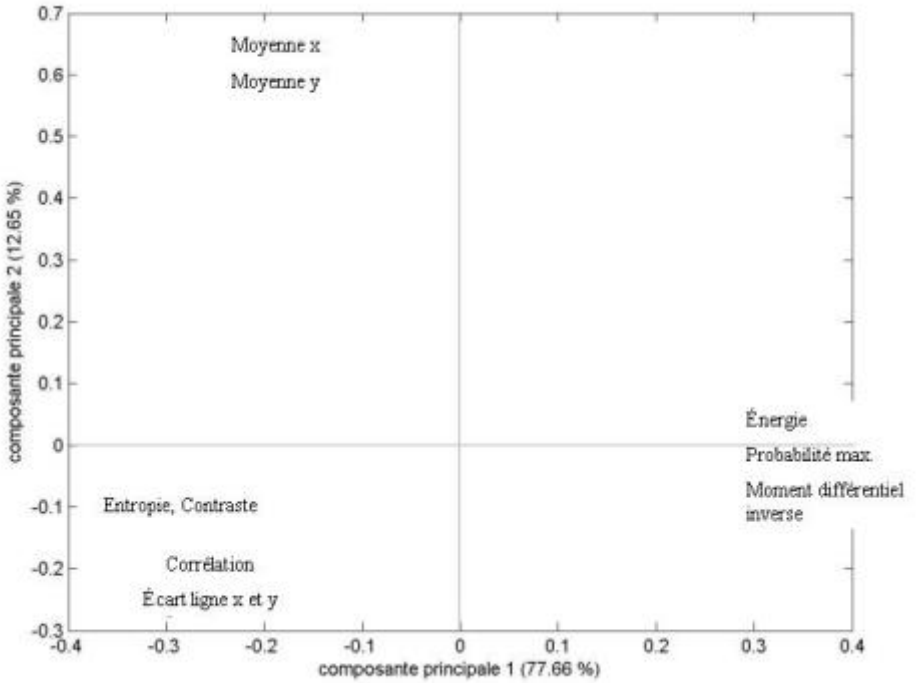


Figure IV.17 c. Carte factorielle des paramètres de co-occurrences associés à la carte de la Figure IV.17a



Ainsi la Figure IV.17b montre clairement que les systèmes avec et sans calcium sont séparés selon l'axe 1: les images correspondant aux systèmes en présence de calcium se trouvent dans la partie gauche de la carte factorielle alors que les images correspondant aux systèmes en absence de calcium se trouvent dans la partie droite. En rapprochant cette carte factorielle aux

paramètres qui y sont associés (Figure IV.17c), l'axe 1 sépare deux groupes de paramètres. Les paramètres associés aux systèmes sans calcium sont l'énergie, la probabilité maximale et le moment différentiel inverse. Ces paramètres indiquent qu'il y a peu de variations de niveaux de gris dans l'image traduisant ainsi que ces images sont assez homogènes. Au contraire, les paramètres décrivant les systèmes en présence de calcium sont l'entropie, le contraste, la corrélation et l'écart des x, y. Ces paramètres définissent une grande variation des niveaux de gris et la présence de zones de même intensité de niveaux de gris, ce qui peut être interprété par des images plus complexes où sont mis en évidence des petits «objets» pouvant être assimilés aux pores du système agrégé.

L'axe 2 permet de différencier les systèmes en fonction de la concentration en SAB. Plus la concentration en SAB augmente plus les images sont situées vers le haut sur la carte. Les paramètres relatifs aux images correspondants à des fortes concentrations en SAB sont les moyennes en x, y. Ces variables traduisent la différence d'intensité de fluorescence dans les images. La classification selon l'axe 2 est pertinente si l'on s'appuie sur l'hypothèse que l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la concentration en protéines.

Les valeurs moyennes des modules G' finaux correspondant aux systèmes observés sont indiquées entre parenthèse sur la carte factorielle présentée en Figure IV.17b. La classification des différents systèmes opérée par la méthode d'analyse d'images peut être ainsi reliée avec la force des gels obtenus. Pour chacune des concentrations en SAB (2, 4, 8 %), les valeurs de G' augmentent de la droite vers la gauche de l'axe 1 c'est à dire lorsque le calcium est présent dans le système. Selon l'axe 2, le module G' augmente du bas vers le haut c'est à dire lorsque la concentration en SAB augmente.

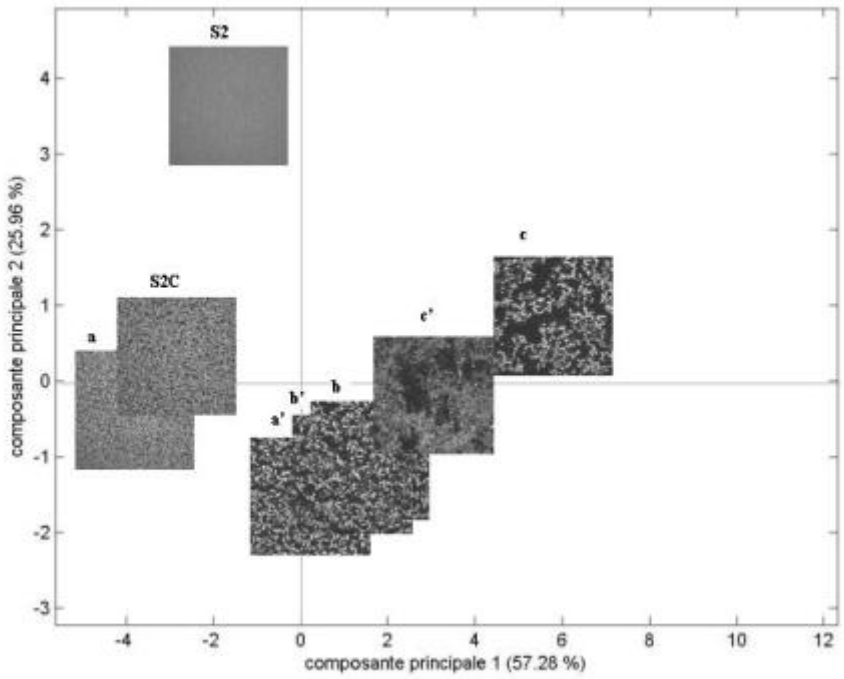
La méthode d'analyse d'images employée nous a ainsi permis de discriminer de façon objective les images obtenues pour les gels de SAB qui visuellement ont la même apparence (images a et c sur Figure IV.17b, par exemple).

IV.3.2 Mélanges à concentration en SAB fixe

IV.3.2.1 Mélanges SAB 2%/pectines LM

La carte factorielle des deux premières composantes principales obtenue par ACP est présentée en Figure IV.18.

Figure IV.18 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8: SA*B*-RITC à 2 (S2, S2C) %; mélanges SA*B*-RITC 2%/pectines LM 0,21 (a, a'); 0,43 (b, b'); 0,85 (c, c') % en absence (S2, a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ (S2C, a', b', c') .



L'axe 1 permet de distinguer deux groupes. Le premier rassemble les images des gels de protéine seule (S2) et du mélange SAB/pectines LM (0,21 %) (a) en absence de calcium (situées vers la gauche de l'axe). Le second groupe contient les images obtenues avec les autres mélanges, en présence (a', b', c') ou non de calcium (b, c) (situées vers la droite de l'axe). Ces dernières associées aux variables énergie, corrélation, moment différentiel inverse et probabilité maximale montrent de larges zones de même intensité de niveaux de gris. Ceci est à relier à la séparation de phase se produisant au sein du système. En revanche, pour le système contenant la protéine seule (S2) et le mélange SAB/pectines LM (0,21 %) (a) en absence de calcium, les paramètres expliquant ce groupe sont l'entropie, le contraste et la moyenne traduisant des images moins homogènes avec de fortes variations de niveaux de gris.

L'axe 2 sépare les images des mélanges en fonction de la concentration en pectines LM. Les paramètres entropie, contraste sont associés aux images à faibles concentrations en pectines LM en bas de l'axe 2, traduisant des structures complexes avec une grande variation de

niveaux de gris. L'image correspondant à la protéine seule en absence de calcium est située en haut de l'axe 2.

On peut noter qu'avec cette classification, les structures du gel de SAB seule en présence de calcium et du mélange SAB/Pectine LM 0,21 % en absence de calcium sont similaires (car situées au même endroit sur la carte) et ces modifications structurales se traduisent dans les deux cas par des gels plus rigides que le gel de protéine seule.

IV.3.2.2 Mélanges SAB 4 ou 8 %/pectines LM

Pour les systèmes contenant 4 % de SAB, sur la base de la carte factorielle des deux premières composantes principales (Figure IV.19), les mêmes conclusions que pour le système contenant 2 % de SAB peuvent être établies. Les images obtenues sont séparées en deux groupes selon l'axe 1. Le premier comprend les images relatives à la protéine seule (S4) et au mélange SAB 4%/pectines LM 0,21 % (a) en absence de calcium (vers la gauche de l'axe). Le second comprend tous les autres mélanges. En revanche pour les systèmes contenant 8 % de SAB, sur la carte factorielle des deux premières composantes principales (Figure IV.20), l'axe 1 sépare toutes les microstructures finales des mélanges (a, b, c, a', b', c'), de celles gels de protéines seules (S8). Les mélanges (situés vers la gauche de l'axe) sont caractérisés par des variables (entropie, corrélation, contraste, écart des lignes et colonnes et probabilité maximale) traduisant des images non homogènes avec de nombreuses variations de niveaux de gris en opposition aux systèmes contenant uniquement les protéines dont les images sont plus homogènes.

Figure IV.19 Carte factorielle avec obtenue avec les structures finales de systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8: SA*B*-RITC à 4 (S4, S4C) %; mélanges SA*B*-RITC 4%/Pectines LM 0,21 (a, a'); 0,43 (b, b'); 0,85 (c, c') % en absence (S4, a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ S4C, a', b', c').

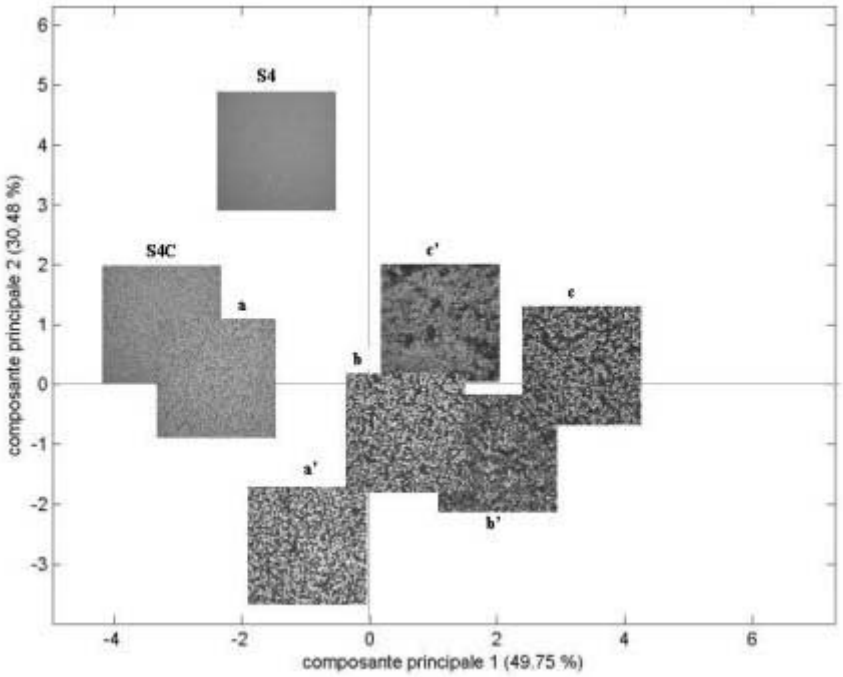
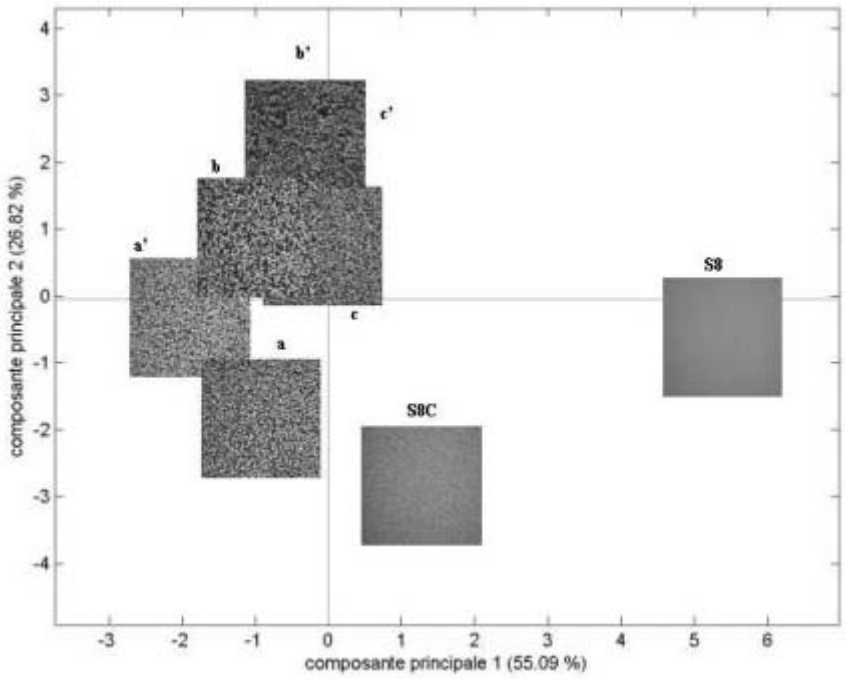
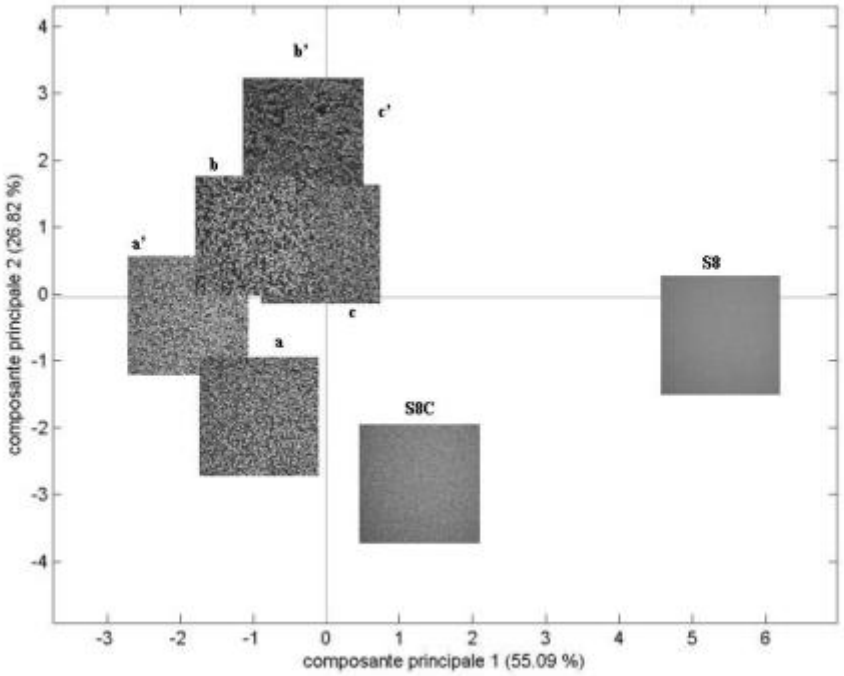


Figure IV.20 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM à pH 6,8: SA*B*-RITC à 8 (S8, S8C) %; mélanges SA*B*-RITC 8%/Pectines LM 0,21 (a, a'); 0,43 (b, b'); 0,85 (c, c') % en absence (S8, a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ (S8C, a', b', c').





IV.3.2.3 Conclusions

Cette analyse d'images nous permet de montrer que pour 2 et 4% de SAB, la concentration en protéines affecte peu les différences observées entre les systèmes avec et sans calcium puisque le même type de carte factorielle est obtenu. Dans les deux cas, des structures proches pour le mélange sans calcium contenant 0,21 % de pectines LM et pour la SAB seule en présence de calcium sont observées.

Lorsque la concentration en SAB est de 8 %, les microstructures des mélanges avec et sans calcium et de la SAB sont discernables. Comme cela a été évoqué dans le chapitre III, on peut supposer qu'au-delà d'une certaine concentration en SAB, le rapport R entre les concentrations en calcium et SAB est trop faible pour que les interactions entre la protéine et le cation affectent de façon significative la structure du réseau protéique par rapport aux concentrations en protéines plus faibles (2 et 4 %).

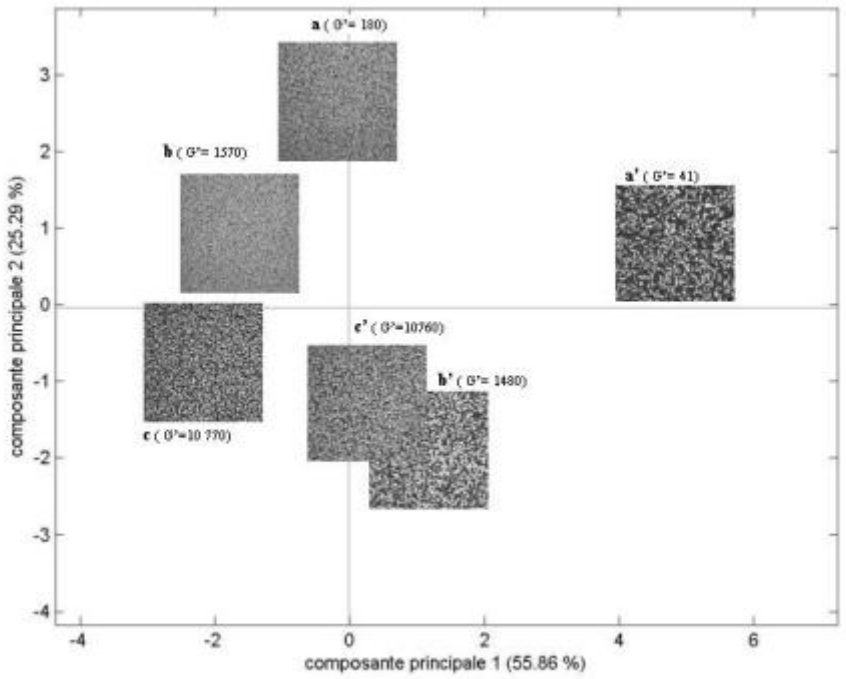
IV.3.3 Mélanges à concentration en pectines LM fixe

IV.3.3.1 Mélanges SAB/pectines LM 0,21 %

L'axe 1 de la carte factorielle de la Figure IV.21 permet de séparer les systèmes sur la base de la présence du calcium. Les systèmes contenant du calcium (a', b', c') sont déplacés

vers la droite de l'axe par rapport aux systèmes sans calcium (a, b, c). Les variables entropie et contraste associées au premier groupe traduisent des images avec de fortes variations de niveaux de gris révélant une organisation du réseau protéique plus fine que pour le second groupe (en absence de calcium) où les variables associées sont l'énergie, la corrélation et le moment différentiel inverse et correspondent à des systèmes avec de larges zones de mêmes intensités de niveaux de gris.

Figure IV.21 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des mélanges Pectines LM 0,21%/SA*B*-RITC 2 (a, a'); 4 (b, b'); 8(c, c') % en absence (a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ (a', b', c') dans NaCl 100 mM à pH 6,8.



L'axe 2 permet de distinguer l'effet de la concentration en SAB. Plus la concentration en SAB est faible plus les images sont placées en haut sur l'axe. Elles sont caractérisées par des grandes zones de même intensité de niveaux de gris (forte énergie, moment différentiel inverse). En augmentant la concentration en SAB, les zones riches en protéines sont plus étendues et plus nombreuses et le nombre de variations de niveaux de gris augmente (fort contraste, entropie).

Les systèmes contenant 8 % de SAB en présence de calcium (c') se trouvent au même niveau que les systèmes contenant 2 % de SAB en absence de calcium (a). On peut traduire ces résultats sur les bases suivantes: l'ajout de calcium dans le mélange SAB/pectines LM 0,21 % induit la formation d'une microstructure proche de celle obtenue si l'on avait un système plus

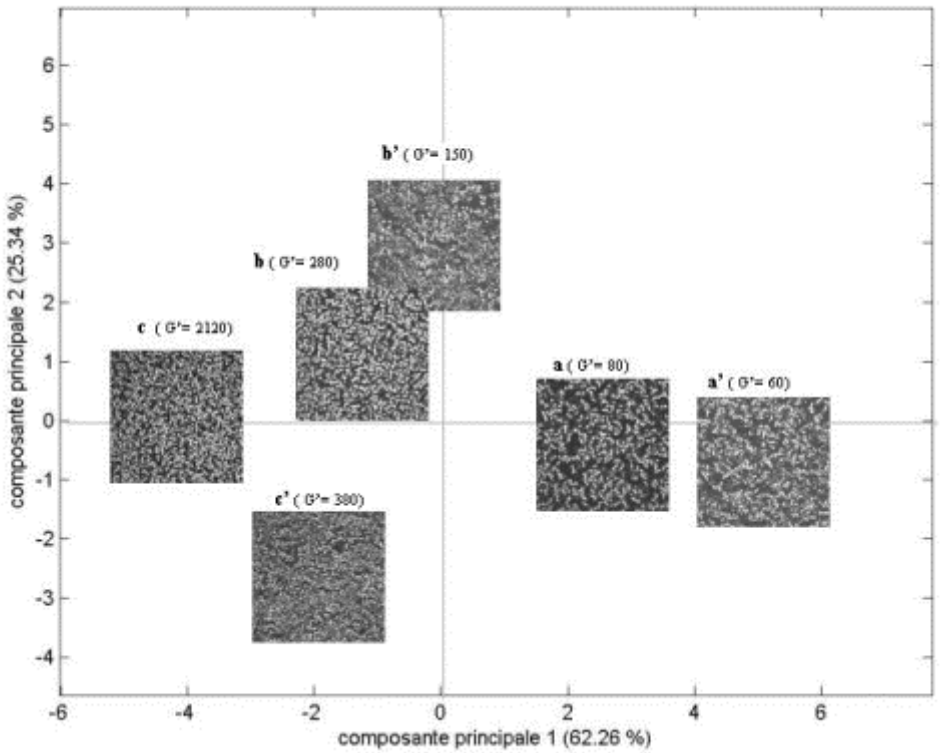
faiblement concentré en protéines en absence de calcium. Autrement dit, l'ajout de calcium se traduit d'un point de vue structural de façon similaire à une diminution de la concentration en SAB, l'axe 2 les discriminant toutefois.

Alors que les valeurs des modules G' finaux indiquées entre parenthèses sont proches pour les systèmes contenant 4 et 8 % avec et sans calcium (a et a' ; b et b'), les structures finales peuvent toutefois être distinguées.

IV.3.3.2 Mélanges SAB/pectines LM 0,43 %

L'axe 1 de la carte factorielle de la Figure IV.22 permet de séparer les systèmes en fonction de la concentration en SAB. Les systèmes contenant une faible concentration en protéines (a, a') sont situés vers la droite de l'axe et les système contenant de plus fortes concentrations en SAB (b, b'; c, c') sont situés vers la gauche. L'axe 2 ne donne pas d'informations supplémentaires.

Figure IV.22 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des mélanges Pectines LM 0,43 %/SA*B*-RITC 2 (a, a'); 4 (b, b'); 8 (c, c') % en absence (a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ (a', b', c') dans NaCl 100 mM à pH 6,8.

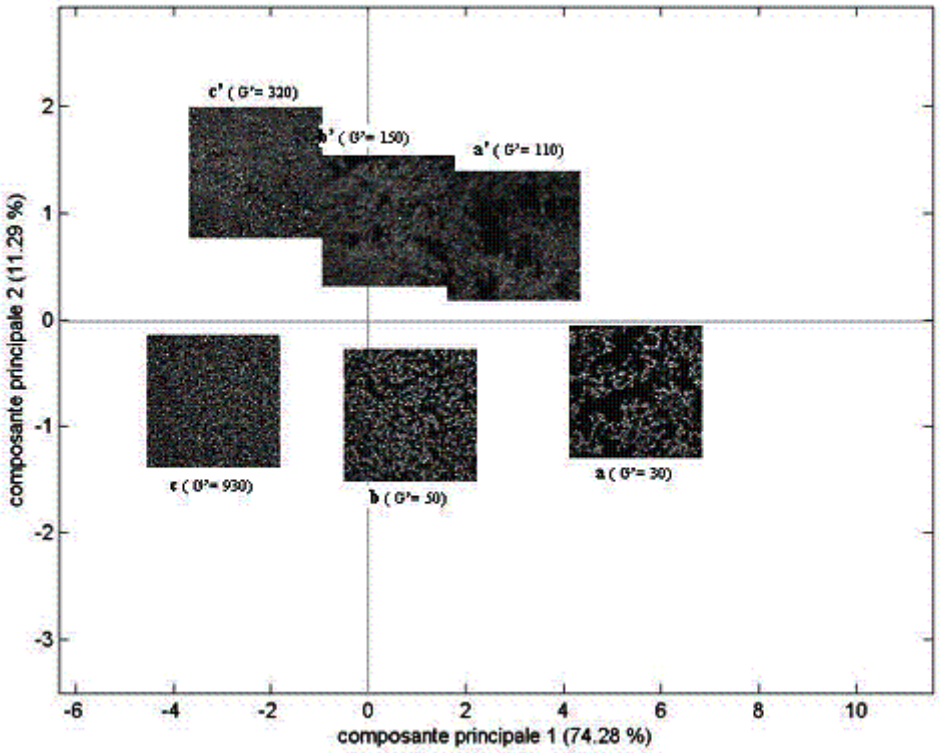


Les paramètres associés au premier groupe (énergie, probabilité maximale, moment différentiel inverse, corrélation) indiquent que les systèmes sont plus complexes et moins homogènes que ceux des gels plus concentrés en SAB. Comme les images correspondantes aux systèmes sans calcium sont placées à droite des systèmes de même concentration en SAB en présence de calcium, les images a', b', c' peuvent être décrites comme des systèmes sans calcium avec une plus faible concentration en protéines montrant des zones riches en protéines de plus petites tailles avec une connectivité réduite. Les valeurs des modules G' finaux indiquées entre parenthèse montrent que la classification établie par cette analyse suit également celle de la rigidité des gels.

IV.3.3.3 pectines LM 0,85 %

L'axe 1 de la carte factorielle des deux premières composantes principales (Figure IV.23) sépare les mélanges en fonction de la concentration en SAB. Les paramètres expliquant les systèmes moins concentrés (vers la droite de l'axe) sont l'énergie, la corrélation, le moment différentiel inverse, la probabilité maximale et les écarts. Ils traduisent ainsi la dispersion de gros agrégats protéiques au sein de la phase pectique.

Figure IV.23 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des gels des mélanges Pectines LM 0,85 %/SA*B*-RITC 2 (a, a'); 4 (b, b'); 8(c, c') en absence (a, b, c) ou en présence de 3 mM $CaCl_2$ (a', b', c') dans NaCl 100 mM à pH 6,8.



L'axe 2 sépare les systèmes en fonction de la présence de calcium. Les systèmes en présence de calcium (a', b', c') se caractérisent par une forte énergie traduisant un réseau protéique plus uniforme et une structuration des zones riches en protéines plus grande.

Les valeurs des modules G' finaux indiquées entre parenthèses montrent que la classification établie par cette analyse selon l'axe 1 peut être reliée au renforcement des gels du à l'augmentation de la concentration en SAB. Cependant, la présence de calcium se traduit par un renforcement ou un affaiblissement des gels de SAB comme nous l'avons décrit précédemment. Dans ce cas il est difficile de relier la classification obtenue par l'analyse d'images à la rigidité finale de gels.

IV.3.3.4 Conclusions

Cette analyse nous a permis de compléter les comparaisons possibles entre les structures des systèmes avec et sans calcium. Pour les mélanges en présence de 0,21 et 0,43% de pectines, les classifications établies supposent que l'ajout de calcium se traduit d'un point de vue

structural de façon analogue à une diminution de la concentration en protéines. En revanche en présence de 0,85 % de pectines LM, les effets de l'ajout de calcium et de l'augmentation de la concentration en SAB sont plus discernables.

IV.4. Discussion et conclusions

Du fait de l'application du traitement thermique, une séparation de phase prend place au sein des mélanges SAB/pectines LM dès que la dénaturation est amorcée. Cette séparation de phase est bloquée à un stade plus ou moins avancé par la gélification de la protéine. La gélification de la pectine lorsqu'elle a lieu (par la présence de calcium dans le milieu) ne modifie pas les structures observées en MCBL dès la mise en température à 80 °C, comme le témoigne le suivi des structures au cours du traitement thermique. Cependant des différences au niveau de la structure et des propriétés rhéologiques ont été mises en évidence pour les systèmes avec et sans calcium.

Selon les concentrations en biopolymères, les contributions respectives du gel protéique et du gel pectique diffèrent en raison de la séparation de phase entre les deux biopolymères et de leurs interactions spécifiques avec les ions (sodium et calcium) présents dans le système.

La gélification des mélanges contenant des concentrations en pectines supérieures à 0,21 % (sauf pour SAB 2 %) en présence de calcium semble être gouvernée par celle des pectines LM. L'augmentation de la concentration en pectines se traduit par un renforcement du gel pectique mais également par une séparation de phase plus marquée qui conduit à des gels dont la rigidité peut être plus grande ou plus faible que les systèmes correspondants sans calcium selon les concentrations en biopolymères.

L'augmentation de la concentration en protéines de 2 à 4 % n'affecte pas de façon significative la structure des mélanges les uns par rapport aux autres. En revanche pour 8 % de SAB, les structures obtenues se distinguent des autres systèmes. Des structures de gels composites pouvant être assimilées à des gels interpénétrés sont observées. Pour 0,21 % de pectines dans le mélange, la gélification est gouvernée par celle de la protéine sauf si la concentration en protéine est égale à 2 %.

Sachant que les deux biopolymères du mélange ont une affinité pour les ions calcium, on peut supposer que la partition du calcium au sein des systèmes diffère selon la concentration en pectines ou en SAB. Une compétition pour les ions calcium pourrait ainsi exister entre la SAB

et les pectines LM comme cela a été suggéré par Beaulieu *et al.* (2001) sur une étude voisine des gels de protéines de lactosérum en présence de pectines LM.

Dans la littérature, seules quelques études traitent de systèmes semblables. Ndi *et al.* (1996) ont montré sur des gels obtenus à partir des mélanges *β*-Lg (10 %)/polypectate de sodium (SPP) (1 %) ($CaCl_2$ 15 mM dans l'eau, pH 6,5) que l'addition de calcium renforçait les gels obtenus à partir du mélange par rapport aux systèmes sans calcium, le SPP gélifié serait inséré dans une matrice uniforme formée par de larges agrégats protéiques. Dans ce cas, il est important de souligner que la structure du SPP n'était pas clairement définie et peut différer des pectines LM de notre étude.

L'étude de Beaulieu *et al.* (2001) sur les mélanges protéines de lactosérum (8 %)/pectines LM (1 %) (dans l'eau, pH 7) a montré que l'addition de calcium (10 mM) augmentait la force des gels en mélanges par rapport à la protéine seule. Les observations par MCBL ont également montré une séparation de phase. Les différences observées peuvent s'expliquer par la nature différente des protéines globulaires. En effet les protéines du lactosérum sont un mélange de plusieurs protéines comprenant majoritairement la *β*-Lactoglobuline (~50 %), l'*α*-Lactalbumine (~20 %) et la SAB (~10 %) qui se comportent différemment des protéines prises individuellement (Hines & Foegeding, 1993).

De plus, la différence de force ionique doit également être considérée. Dans notre cas la force ionique totale du système est apportée essentiellement par le chlorure de sodium (100 mM). Les interactions électrostatiques de natures différentes peuvent ainsi avoir lieu au sein des systèmes, le mode d'interaction des ions calcium divalents différant de celui des ions sodium monovalent. L'influence de la force ionique a d'ailleurs fait l'objet d'une étude similaire sur les mélanges SAB/alginate mettant en évidence les propriétés des gels obtenus à partir du mélange en présence ou non de calcium (Neiser *et al.*, 1999). Selon la force ionique, des systèmes, des gels plus forts ou plus faibles que celui de la protéine seule sont ainsi obtenus.

Ainsi les paramètres intervenant dans la thermodynamique des mécanismes de séparation de phase et de gélification (concentrations en ions et biopolymères, nature des ions, conditions du milieu) doivent être pris en compte pour expliquer les différents comportements observés.

V. Influence de la force ionique et de la nature des sels ajoutés sur la gélification thermique des mélanges SAB/Pectines LM

Des deux chapitres précédents, il ressort que la nature des ions présents dans le système (Na^+ et/ou Ca^{2+}) est un facteur déterminant dans le contrôle des propriétés et de la structure des systèmes SAB/pectines LM. Nous avons donc choisi d'étudier plus spécifiquement cette question en considérant différentes teneurs des deux types de sels, NaCl ou $CaCl_2$, ou l'effet combiné de NaCl/$CaCl_2$ dans le milieu.

Le profil thermique diffère sensiblement de celui du chapitre IV, une seule rampe de refroidissement étant appliquée. Du point de vue de l'échantillon de SAB, nous n'avons pas pu obtenir le même lot de SAB que celui du chapitre IV. Ce changement de lot n'a cependant pas affecté le sens des résultats obtenus, des comportements rhéologiques assez semblables et des microstructures comparables pour la SAB seule et dans le mélange ayant été obtenus (voir Annexe IV).

Une partie préliminaire de ce chapitre est consacrée à l'étude des températures de transitions thermiques de la SAB pour la protéine seule ou en mélange SAB/ pectines LM.

Puis, de façon analogue au chapitre IV, les propriétés rhéologiques et l'ultrastructure des systèmes ont été étudiées en nous limitant cependant à une seule concentration en SAB (8 %) et en pectines LM (0,85 %).

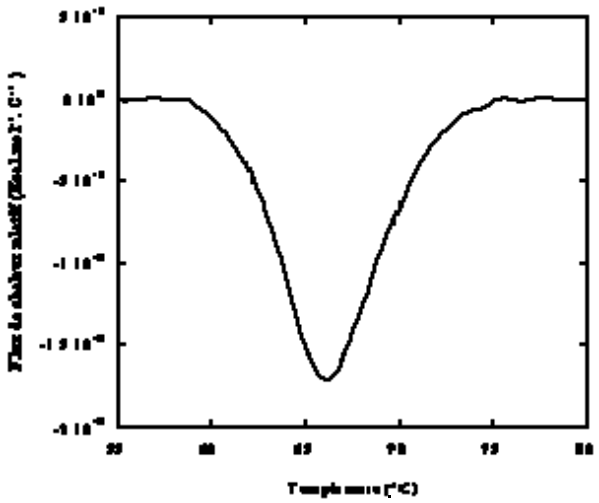
V.1 Etude calorimétrique de la SAB et des mélanges SAB/pectines LM

V.1.1 Etude de la SAB seule

V.1.1.1 Influence de la concentration en SAB

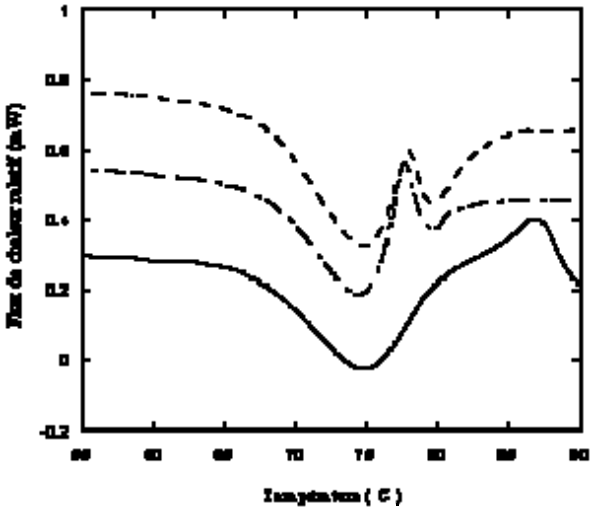
La Figure V.1 présente le thermogramme obtenu à l'aide du microcalorimètre Microcal pour 0,1 % de SAB dans NaCl 100 mM à pH 6,8. Le pic endothermique obtenu correspond, dans ces conditions de concentration, à la dénaturation de la protéine. La température correspondant au maximum du pic, assimilée à la température de dénaturation, est égale à 66,7 °C et l'enthalpie de transition (ΔH) est de 9,4 J.g^{-1} de SAB.

Figure V.1 : Thermogramme de la SAB 0,1 %, NaCl 100 mM à pH 6,8 (microcalorimètre Microcal, vitesse de chauffage (v) = 1 °C.min^{-1}).



Pour des concentrations plus élevées, nous avons utilisé le microcalorimètre Setaram DSC III. La Figure V.2 présente les thermogrammes obtenus pour 1, 1,5 et 2 % de SAB dans les mêmes conditions. Lorsque la concentration est égale à 1 % on observe un pic endothermique dont le maximum se situe vers 75 °C et un pic exothermique autour de 87 °C. Pour 1,5 et 2 % de SAB, on observe deux pics endothermiques qui se chevauchent avec des maxima respectifs de 74 et 78 °C.

Figure V.2 : Thermogrammes de la SAB 1 % (trait plein), 1,5 % (trait discontinu), 2 % (trait en pointillé), NaCl 100 mM à pH 6,8 (microcalorimètre Setaram DSC III, v = 1 °C.min^{-1}).



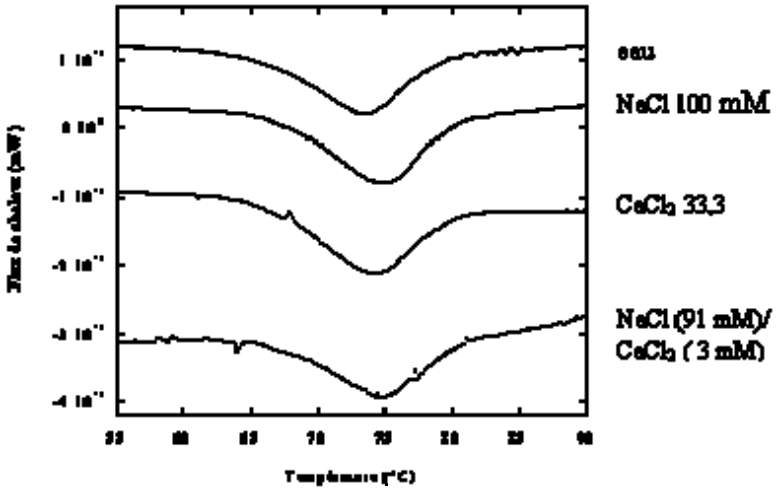
Ces résultats peuvent être discutés sur la base des données de la littérature. Selon les auteurs et les conditions d'étude, jusqu'à 3 transitions thermiques ont pu être mises en évidence pour la SAB. La température de transition (maximum du pic) et le nombre de transitions thermiques varient en fonction de la vitesse de chauffage, de la purification subie par la protéine, du pH et de la force ionique. Privalov & Monaselidze (1963) ont montré que la dénaturation thermique de la SAB (2 %, pH 7, v = 0,06 °C.min^{-1}) donnait un signal en DSC avec trois pics endothermiques dont les maxima se situaient à 57, 69 et 77,5 °C. Ross & Shrake (1988) ont montré que le thermogramme de la SAH (2 %, pH 7, non délipidée) présentait deux pics dont les maxima se situaient à 66 et 78 °C. Barone *et al.* (1992) ont également mis en évidence deux transitions thermiques à 67,7 et 71,5 °C mais les conditions opératoires étaient différentes (SAB 0,6 %, NaCl 0,15 M, v = 0,5 °C.min^{-1}). En revanche, Itoh *et al.* (1976) n'ont constaté qu'une transition thermique à 64 °C (2 %, pH 6,7, v = 5 °C.min^{-1}).

Nos propres données se distinguent assez nettement de ce que nous venons de développer. Cette grande diversité de résultats illustre la difficulté de faire des comparaisons, d'autant que souvent les conditions expérimentales diffèrent. Dans les conditions de concentrations de 1 à 2 %, la dénaturation de la SAB est immédiatement suivie d'une agrégation. Les thermogrammes obtenus traduisent ainsi la superposition de ces deux mécanismes. On peut supposer que la formation du gel au sein du système perturbe le transfert de chaleur dans la

cellule du microcalorimètre, expliquant le fait que l'allure de nos signaux n'ait pas d'équivalent dans la littérature.

Les thermogrammes présentés sur la Figure V.3 ont été obtenus à 0,2 °C.min $^{-1}$ donc dans des conditions plus proches d'un état d'équilibre. La température peut s'équilibrer plus facilement quel que soit l'état du milieu et aboutir ainsi à une meilleure résolution des transitions thermiques. Dans ces conditions, l'analyse calorimétrique de la transition est possible et un seul pic est mis en évidence. C'est donc avec cette vitesse de chauffage que l'ensemble de l'étude a été réalisée.

Figure V.3 : Thermogrammes de la SAB 2 % dans l'eau et dans un milieu de force ionique égale à 100 mM apportée par NaCl, $CaCl_2$ ou NaCl/$CaCl_2$ à pH 6,8 (microcalorimètre Setaram DSC III, v = 0,2 °C.min^{-1}).



V.1.1.2 Influence des conditions du milieu

La Figure V.3 montre les thermogrammes obtenus dans différentes conditions de milieu: eau sans ajout de sels, et en présence de sels de telle sorte que la force ionique soit égale à 100 mM (NaCl 100 mM, $CaCl_2$ (33 mM) et $CaCl_2$ (3 mM)/NaCl (91 mM)) (voir l'équation II.1 pour le calcul de la force ionique).

L'allure des thermogrammes est identique quelles que soient les conditions du milieu et la nature des ions, une seule transition thermique étant mise en évidence. Le Tableau V.1 présente l'ensemble des résultats obtenus avec différentes concentrations en sels. La température de transition thermique dans l'eau est égale à 73,2 °C. L'ajout de NaCl, $CaCl_2$ ou NaCl/$CaCl_2$, quelles que soient les concentrations, donne une température de transition

thermique égale à ~74,5 °C. Les enthalpies de transitions sont du même ordre de grandeur que ce soit en présence de sels u dans l'eau ($\Delta H \sim$ 15-18 $J.g^{-1}$).

L'addition de sels de différentes natures et en différentes proportions ne semble donc pas affecter de façon significative la transition thermique de la protéine.

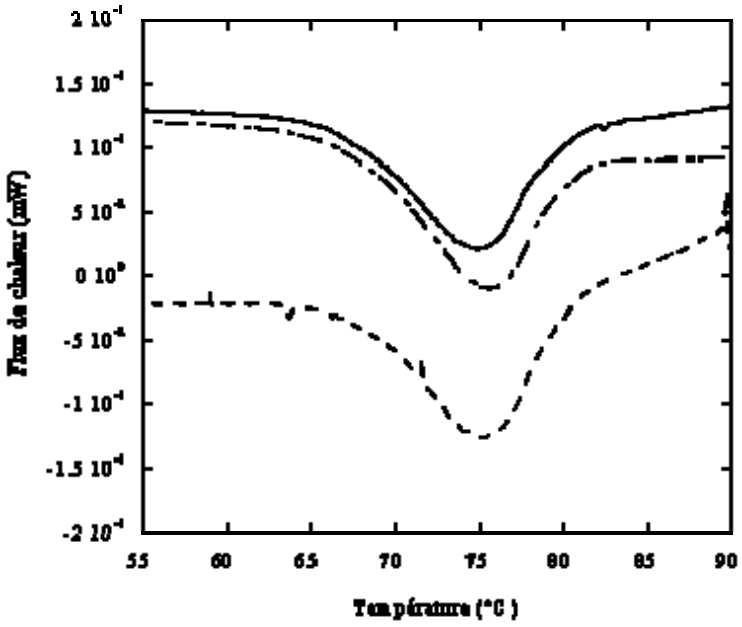
Tableau V.1. *Températures (Tm) et enthalpies de transition (ΔH) obtenues dans différents milieux pour la SAB seule (2 %) ou pour le mélange SAB (2%)/pectines LM (0,85 %) (Microcalorimètre Setaram DSC III ; v = 0,2 °C.min^{-1}).*

		SAB 2 %		**SAB 2 %/Pectines LM 0,85%**	
		Tm (°C)	**ΔH (J.g^{-1} de SAB)**	**Tm (°C)**	**ΔH (J.g^{-1} de SAB)**
milieu	mM				
eau		73,5	15,5		
NaCl	100	74,9	17,6	75,6	16,6
	25	74,3	15,7		
$CaCl_2$	4	74,5	18,7		
	8,33	74,2	18,5		
	33	74,5	15,9		
NaCl/$CaCl_2$	91/3	74,4	15,1	75,2	18,7
	73/9	74,8	15,7		

V.1.2 Etude des mélanges SAB/pectines LM

Les thermogrammes obtenus après l'ajout de 0,85 % de pectines LM à la SAB (2 %) en présence ou non de calcium (3 mM) dans NaCl 100 mM, sont présentés en Figure V.4. Par rapport à la SAB seule, on note une légère augmentation des températures de transition (75,6 °C pour le mélange comparé à 74,9 °C pour la SAB seule en absence de calcium et 75,2 °C au lieu de 74,4 °C en présence de calcium) et les enthalpies de transition sont du même ordre de grandeur que celle de la SAB seule ($\Delta H \sim$ 15-18 $J.g^{-1}$).

Figure V.4 : Thermogrammes de la SAB 2 % dans NaCl 100 mM (trait plein) et du mélange SAB 2 %/ Pectines LM 0,85 %, NaCl 100 mM à pH 6,8: en absence (trait discontinu) et en présence de $CaCl_2$ 3 mM (trait en pointillé) (microcalorimètre Setaram DSC III, v = 0,2 °C.min^{-1}).



Les faibles écarts constatés montrent que les pectines, que ce soit en présence ou non de calcium, ont une faible influence sur le comportement thermique de la SAB.

V.2 Rhéologie et Ultrastructure des mélanges SAB/pectines LM dans l'eau

Les variations du module G' au cours du traitement thermique pour la SAB 8 % et pour le mélange SAB (8 %) /pectines LM (0, 85 %) sont présentées sur la Figure V.5. Pour la protéine seule, G' augmente faiblement au niveau du plateau à 80 °C pour atteindre un module final très faible après 1 h à 20 °C (~ 1 Pa). Le spectre mécanique correspondant (Figure V.6) montre un comportement viscoélastique de gel faible puisque le plateau n'est observé qu'aux faibles fréquences et correspond à des valeurs de G' très basses (G'~ 0,4 Pa).

Figure V.5 Gélification de la SAB 8 % (●) et du mélange SAB 8 %/pectines LM 0,85 (■) % dans l'eau à pH 6,8 (trait en pointillé: profil de température).

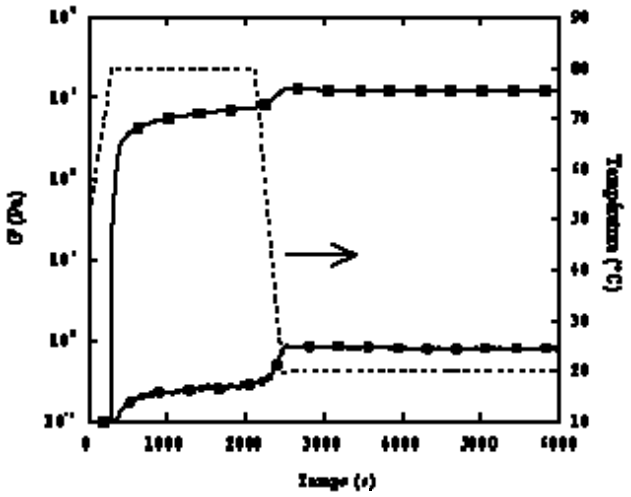
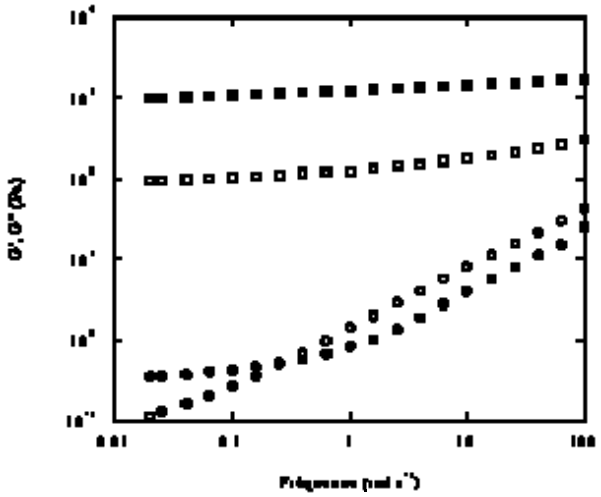


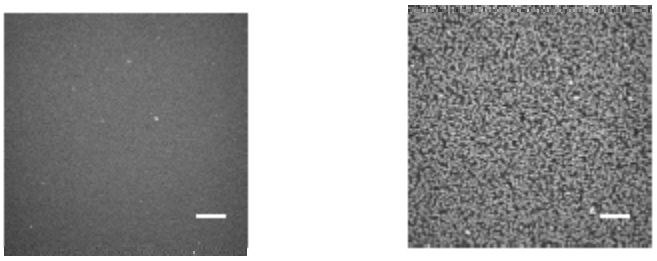
Figure V.6 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): SAB 8 % (●); mélange SAB 8 %/pectine 0,85% (■) (symboles pleins: G' ; symboles vides : G'').



On peut en déduire que nous nous situons à proximité du point de gel dans ces conditions de milieu et de traitement thermique. Comme nous l'avons vu dans le chapitre III, le point de gel varie en fonction de la durée du traitement thermique et a été évalué en absence de sel dans le milieu à ~ 6 % après 48 h de chauffage à 80 °C (Voir Figure III.3a).

La microstructure du gel correspondant (Figure V.7a) ne donne pas plus d'information: la fluorescence est répartie de façon homogène. Aucun réseau protéique n'est mis en évidence à cette échelle d'observation comme cela a été constaté dans le chapitre précédent en NaCl 100mM.

Figure V.7 Observations par MCBL des structures finales des systèmes dans l'eau à pH 6,8: SA*B*-RITC 8 % (**a**), mélanges SA*B*-RITC 8 %/pectines LM 0,85 % (**b**). Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.



a. **b.**

L'addition de pectines LM se traduit par une augmentation rapide de G' au niveau du plateau à 80 °C et présente une seconde augmentation lors de la phase de refroidissement. Après une heure à 20°C, le module G' (~10^3 Pa) ne varie plus de façon significative et le système est considéré comme stable. Le spectre mécanique obtenu montre qu'un gel est formé avec une légère variation des modules en fonction de la fréquence suggérant la prédominance du gel protéique comme discuté précédemment (Figure V.6).

L'ajout de pectine se traduit donc par une accélération de la cinétique de gélification et surtout par un spectaculaire renforcement du gel de SAB seule. Ce résultat peut être mis en relation avec la microstructure obtenue (Figure V.7) montrant une distribution non homogène de la fluorescence résultat d'une séparation de phase entre des zones claires concentrées en SAB et des zones sombres contenant la phase pectique, ce type de structure ayant été déjà décrit dans le chapitre IV.

La rigidité du gel en mélange par rapport à la protéine seule est très certainement liée à une augmentation de la concentration locale en protéine induite par la séparation de phase. Le même résultat avait été constaté pour le mélange SAB 2%/Pectine 0,21% dans NaCl 100 mM. Ceci a également été montré sur des mélanges similaires de protéines de lactosérum (8 %) en présence de pectines LM (1 %) (pH 6, dans l'eau) (Beaulieu *et al.*, 2001).

V.3 Influence de la force ionique (en NaCl)

Les concentrations en NaCl varient entre 9 à 100 mM. Dans le cas des mélanges, la force ionique intrinsèque des pectines LM (0,85 %) égale à 12,5 mM (Voir II.2.1.2-Equation II.5)

est prise en compte. On ajoute ainsi cette valeur à la force ionique calculée par la teneur en ions. Par exemple, lorsque la force ionique apportée par la teneur en sels est égale à 50 mM, la force ionique totale dans le mélange est égale à 62,5 mM. Le tableau ci-dessous rappelle les correspondances entre la teneur en ions et la force ionique des systèmes.

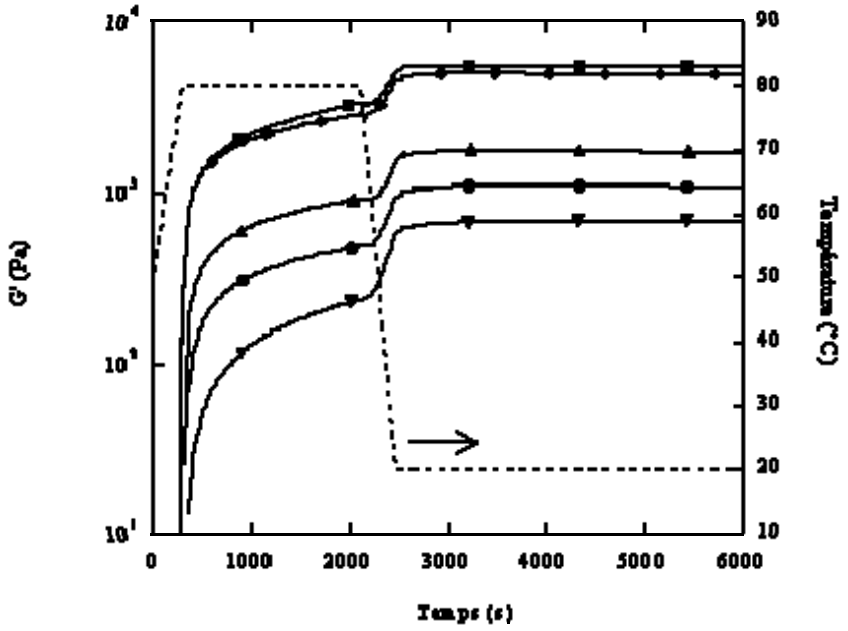
Tableau V.2 Calcul de la force ionique totale dans le système SAB seule et SAB/pectines LM en présence de teneurs croissantes en NaCl.

	NaCl (mM)	**9**	**12**	**25**	**30**	**40**	**50**	**75**	**100**
SAB	**I (mM)**	9	12	25	30	40	50	75	100
SAB/pectines LM	**I (mM)**	21,5	24,5	37,5	42,5	52,5	62,5	87,5	112,5

V.3.1 Gélification de la SAB

La cinétique de gélification de la SAB pour différentes concentrations en NaCl est présentée en Figure V.8. Les évolutions de G' sont comparables à celles déjà décrites dans le chapitre IV dans NaCl 100 mM. L'addition de concentrations croissantes de NaCl se traduit par un renforcement du gel, le module G' variant de ~ $7*10^2$ Pa pour 9 mM NaCl à ~ $6*10^3$ Pa pour NaCl 100 mM. On peut remarquer que l'addition de 12 mM de NaCl induit un renforcement du gel identique à celui observé lorsque 0,85 % de pectine LM est ajouté à la SAB en absence de sel (Figure V.5). La force ionique intrinsèque des pectines, égale à 12,5 mM (due aux contre-ions Na^+) agirait de façon analogue sur la rigidité du gel de SAB que l'ajout d'une quantité équivalente de NaCl.

Figure V.8 Gélification de la SAB 8 % avec I= 9 (▼), 12 (●), 25 (p), 50 (¿) 100 (¢) mM (addition de NaCl) à pH 6,8.



Aucune information supplémentaire n'a été apportée par les microstructures observées en MCBL: comme dans NaCl 100 mM, quelle que soit la force ionique aucune structure n'est mise en évidence.

Nous avons vu que la description de tel systèmes n'est possible par diffusion de la lumière que pour des forces ioniques inférieures à 100 mM. L'augmentation de la teneur en sel se traduit pour 8 % de SAB par des masses apparentes m_a augmentant avec la teneur en sels dans le milieu (Figure III.12a).

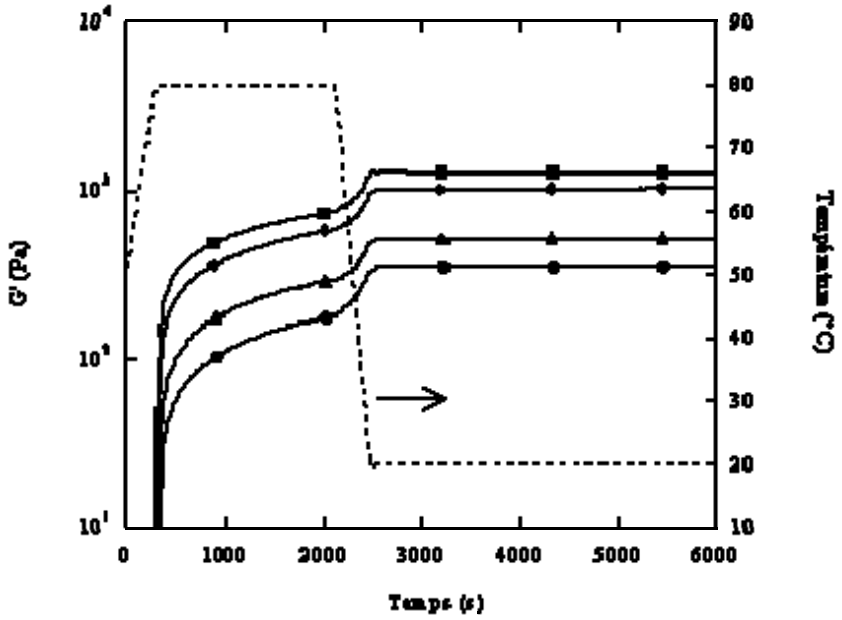
L'effet d'écrantage entre les protéines chargées négativement induirait un renforcement du gel, l'ajout des ions sodium favorisant la gélification de la protéine comme décrit par Tobitani & Ross-Murphy (1997b).

V.3.2 Gélification du mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 %

La présence de pectines LM pour différentes concentrations de NaCl ne change pas l'allure des courbes de gélification (Figure V.9) qui restent également comparables à celles observées dans l'eau (figure V.5). L'augmentation de la teneur en NaCl se traduit par une

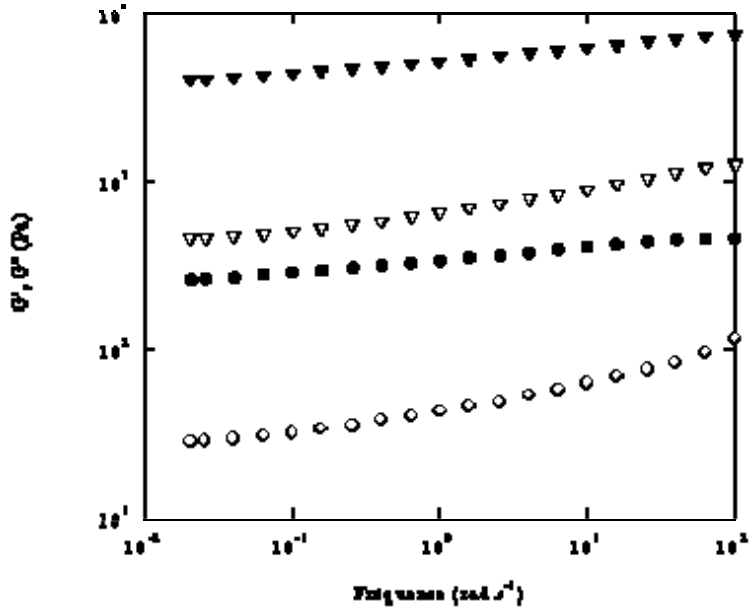
diminution de la force du gel. La rigidité des gels pour I = 21,5 mM est équivalente à celle mesuré dans l'eau (G' ~ 10^3 Pa); elle diminue à ~300 Pa pour I = 112,5 mM (NaCl 100 mM).

Figure V.9 Gélification des mélanges SAB 8 %/Pectines LM 0,85 % avec I = 21,5 (■), 37,5 (◆), 62,5 (▲), 112,5 (●) mM (addition de NaCl) à pH 6,8.



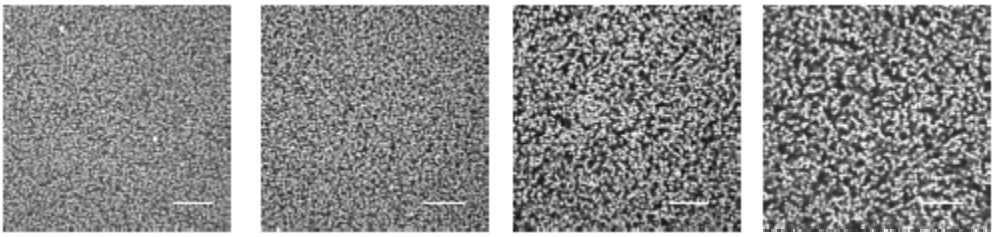
Par comparaison avec les gels de SAB, les gels obtenus à partir du mélange en présence de NaCl sont moins rigides. L'effet est donc inverse de celui constaté pour les mêmes systèmes dans l'eau. Les allures des spectres mécaniques pour le mélange et la protéine seule sont très proches témoignant des comportements viscoélastiques identiques (Figure V.10).

Figure V.10 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C) :
I = 100 mM (NaCl) : SAB 8 % (▼)
I= 112,5 mM (NaCl) mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 % (●)
(symboles pleins: G'; symboles vides: G'').



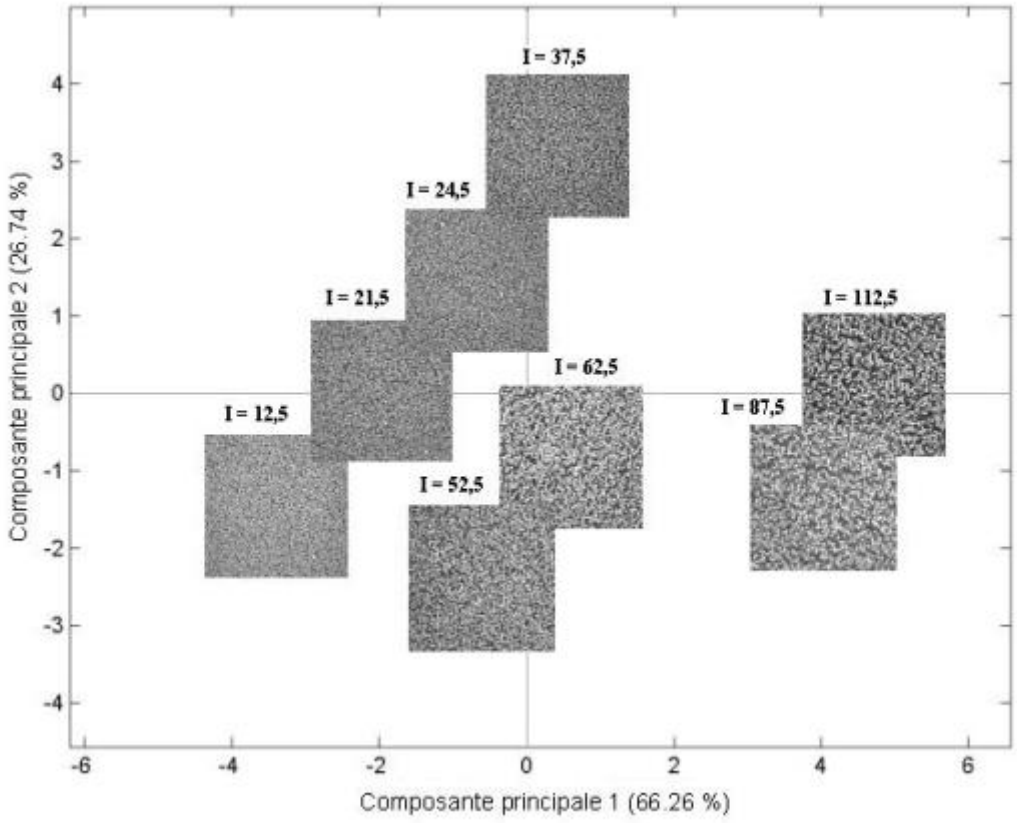
Quelles que soient les conditions ioniques, la séparation de phase est clairement mise en évidence par MCBL (Figure V.11) mais différentes structures sont observées selon les teneurs en sels dans le milieu. La carte factorielle des deux premières composantes principales présentée sur la Figure V.12 montre que ces clichés peuvent être distingués de façon objective par analyse d'images.

Figure V.11 Observations par MCBL des structures finales des mélanges SA*B*-RITC 8 %/Pectines LM 0,85 % avec I = 12,5 (**a**) ; 37,5 (**b**) ; 62,5 (**c**) et 112,5 mM (**d**) (addition de NaCl) à pH 6,8. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.



a. **b.** **c.** **d.**

Figure V.12. Carte factorielle obtenue avec les structures finales des gels SA*B*-RITC 8%/Pectines LM 0,85 % pour I variant entre 12,5 et 112,5 mM (addition de NaCl) à pH 6,8. Pour chaque système une image représentative est placée au milieu du groupe de 10 images.



L'axe 1 sépare les images en fonction de la force ionique en distinguant trois ensembles: l'un pour I compris entre 12,5 et 37,5 mM, l'autre pour I = 52,5 et 62,5 mM et enfin pour I= 87,5 et 112,5 mM. Les paramètres associés aux images du dernier ensemble (énergie, corrélation, moment différentiel inverse), situées vers la droite de l'axe 1, indiquent de grandes zones de même intensité de niveaux de gris en opposition avec les images obtenues pour le premier ensemble, situées vers la gauche de l'axe, où les paramètres (contraste, entropie) montrent de nombreuses variations de niveaux de gris et des images plus complexes. Cette classification suggère qu'une séparation de phase plus marquée est mise en évidence lorsque la teneur en sels augmente. En comparant cette analyse avec les résultats rhéologiques il apparaît que l'axe 1 sépare les systèmes en fonction de la fermeté des gels.

V.3.3 Discussion et conclusions

L'ajout de sel à la protéine seule et aux mélanges se traduit d'un point de vue rhéologique par des effets opposés. Les gels de protéines seules sont renforcés alors que les gels obtenus à partir des mélanges sont affaiblis. Cet affaiblissement fortement dépendant de la force ionique est attribuable au processus de séparation de phase.

Des variations de rigidité du même type ont été mises en évidence par Neiser *et al.* (1998) sur les mélanges SAB/alginate comparés aux gels de SAB à pH 5,9. Les auteurs ont attribué ces comportements aux interactions électrostatiques attractives locales aux faibles forces ioniques et aux interactions répulsives aux forces ioniques élevées.

A pH 6 et à pH 8, Beaulieu (2002) a montré un renforcement des gels protéines de lactosérum/pectine pour des concentrations croissantes en NaCl. Les observations en MCBL laissaient supposer que la séparation de phase était dans ce cas réduite par la présence de sels, ce qui est contraire à nos observations.

Comme nous l'avons décrit précédemment, nous pouvons supposer que la séparation de phase a lieu après que les protéiques soient agrégées sous forme de particules sphériques, un mécanisme de déplétion des chaînes de pectines LM conduisant à la floculation de particules protéiques.

Afin d'expliquer les résultats obtenus, nous pouvons considérer l'effet du potentiel d'interaction global entre particules (dans notre cas les particules protéiques) en présence d'un polymère (les pectines LM). Le calcul de ce potentiel dépend de potentiels énergétiques individuels liés aux forces de van der Waals, aux forces électrostatiques, aux forces stériques (qui sont nulles en l'absence d'adsorption du polymère sur la particule) et aux forces induites par la déplétion. Chacun de ces potentiels prend en compte à la fois les caractéristiques des particules protéiques et des polymères ainsi que le milieu environnant.

A pH 6,8, la SAB et les pectines LM portent une charge nette négative. L'influence de la force ionique sur le potentiel d'interaction global du système se traduit alors de façon différente pour les deux composants du système, les particules protéiques et les pectines LM.

D'une part, pour les particules protéiques, l'augmentation de la force ionique va se traduire principalement par une diminution de l'épaisseur de la double couche électrique aboutissant à une diminution des répulsions électrostatiques interparticulaires. Il en résulte une diminution

du potentiel électrostatique intervenant dans le calcul d'interaction global des particules. La floculation des particules protéiques est ainsi favorisée.

D'autre part, lorsque la force ionique augmente, l'effet polyélectrolyte des pectines LM est diminué et de ce fait influence l'intensité du potentiel de déplétion des particules. Dans le calcul de ce potentiel, la pression osmotique de la solution est prise en compte. Celle-ci est d'autant plus forte que la charge du polymère est grande, en raison des répulsions électrostatiques intramoléculaires. Cet effet de charge se produit lorsque la force ionique du système est relativement faible, c'est à dire à une concentration en sels telle que la contribution des contre-ions n'est pas négligeable (Snowden *et al.*, 1991). Lorsque la force ionique du système augmente, le volume hydrodynamique occupé par le polyélectrolyte est plus faible car les répulsions électrostatiques intramoléculaires sont moindres. Ceci se traduit alors par une diminution de la couche de déplétion, et par une diminution de la pression osmotique de la solution du polymère, impliquant une baisse de la force d'attraction de déplétion (Nashima *et al.*, 1992).

Par conséquent, selon la force ionique du système, l'augmentation du potentiel d'interaction des particules serait gouvernée pour les faibles forces ioniques, par le mécanisme de déplétion floculation et pour les fortes forces ioniques, par la diminution des répulsions électrostatiques entre les particules chargées.

L'ensemble des résultats obtenus suggère qu'avec une teneur en NaCl croissante dans les mélanges SAB/pectines LM, la diminution des interactions électrostatiques répulsives entre les particules protéiques sont dominantes par rapport à la diminution de la force d'attraction de déplétion par la présence des pectines LM. La présence de pectines LM induit une séparation de phase au sein des systèmes et l'ajout de NaCl va favoriser la floculation des particules protéiques définissant ainsi de larges zones, isolées entre elles par des espaces contenant les pectines LM. Lorsque la séparation de phase est plus marquée, on doit donc constater un affaiblissement du gel. Pour le gel de protéine seule, l'effet inverse est observé, la présence de sels augmentant la connectivité du réseau protéique.

Les différences observées avec la littérature pourraient être liées à des répulsions électrostatiques entre particules protéiques plus ou moins fortes en fonction du pH, du traitement thermique appliqué et de la nature des protéines globulaires.

V.4 Influence de la force ionique (en $CaCl_2$)

Les concentrations en $CaCl_2$ varient entre 3 et 33 mM. Dans le cas des mélanges, la force ionique des pectines LM égale à 12,5 mM, est prise en compte. Le tableau ci-dessous rappelle les correspondances entre la teneur en ions et la force ionique des systèmes.

Tableau V.3 Calcul de la force ionique totale dans le système SAB seule et SAB/pectines LM en présence de teneurs croissantes en $CaCl_2$.

	$CaCl_2$ (mM)	3	4	8,3	16,7	33,3
SAB	**I (mM)**	9	12	25	50	100
Pectines LM	**I (mM)**	21,5	24,5	37,5	62,5	112,5
SAB/pectines LM	**I (mM)**	21,5	24,5	37,5	62,5	112,5

	$CaCl_2$ (mM)	3	4	8,3	16,7	33,3
SAB	I (mM)	9	12	25	50	100
Pectines LM	I (mM)	21,5	24,5	37,5	62,5	112,5
SAB/pectines LM	I (mM)	21,5	24,5	37,5	62,5	112,5

V.4.1 Gélification des pectines LM

L'ajout de $CaCl_2$ à la solution de pectine LM à des concentrations supérieures à 4 mM (I = 24,5 mM) conduit localement à la formation d'agrégats gélifiés sous forme d'isolats dispersés dans le solvant. Le système est non homogène, ce qui ne permet pas de réaliser des mesures rhéologiques de manière pertinente.

Les profils de gélification des pectines LM pour I = 21,5 mM ($CaCl_2$ 3 mM) et 24,5 mM ($CaCl_2$ 4 mM) (Figure V.13) sont similaires à celui décrit dans NaCl 100 mM en présence de $CaCl_2$ 3 mM (Figure IV.9a). Cependant pour la même teneur en calcium, le module est beaucoup plus faible (G' < 1 Pa pour I = 21, 5 mM) que celui mesuré en présence de NaCl 100 mM (G' ~ 10^2 Pa) et le spectre mécanique montre qu'un gel faible est formé (Figure V.14). En présence de 4 mM de $CaCl_2$, le gel est renforcé (G' ~35 Pa) et en comparant les Figures V.14 et IV.10b, on constate que la structure du gel est alors assez comparable à celle des gels formés dans NaCl 100 mM.

Figure V.13 Gélification des Pectines LM 0,85 % avec I = à 21,5 ($CaCl_2$ 3 mM) (■) mM et 24,5 mM ($CaCl_2$ 4 mM) (●)à pH 6,8.

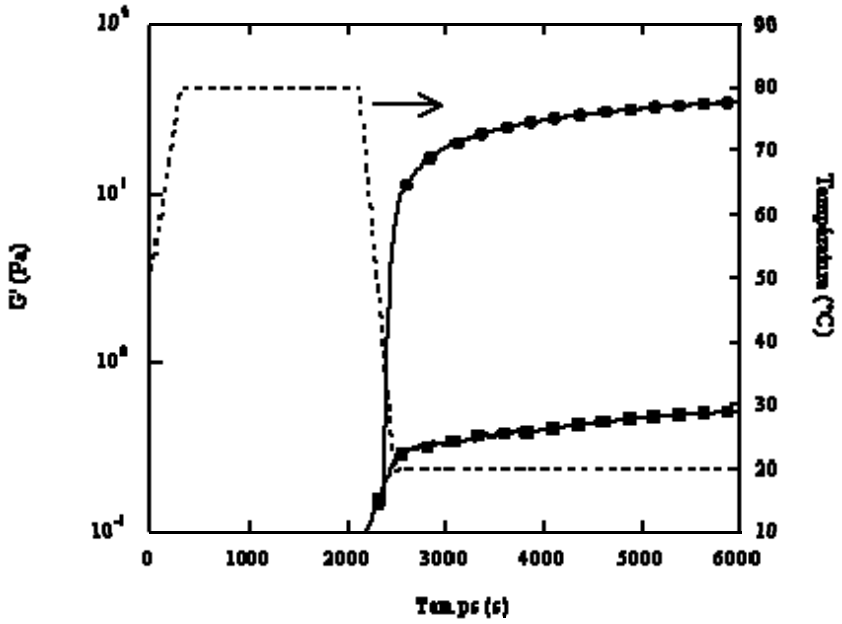
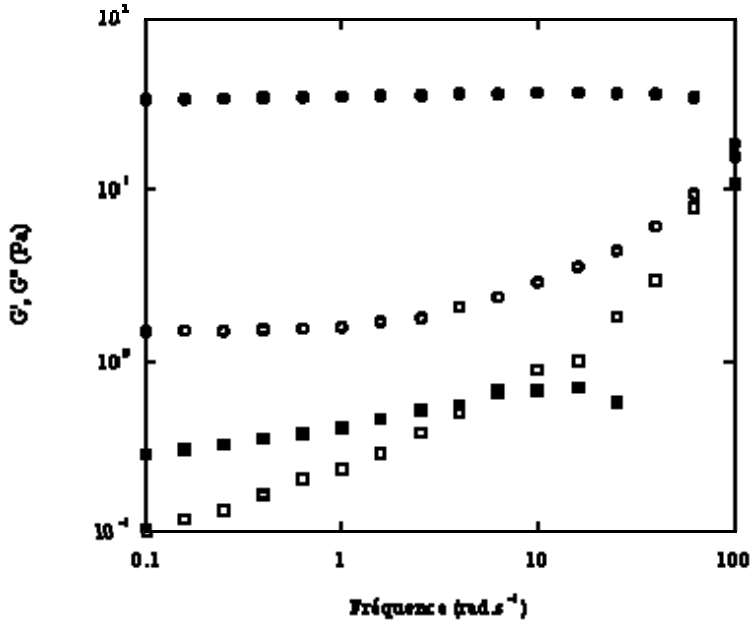


Figure V.14 Spectres mécaniques en fin de cinétiques (mesures à 20 °C) des pectines LM 0,85 % avec I = à 21,5 ($CaCl_2$ 3 mM) (■) mM et 24,5 mM ($CaCl_2$ 4 mM) (●) (addition de $CaCl_2$) à pH 6,8 (symboles pleins: G'; symboles vides : G'').



En absence de NaCl dans le milieu, les ions calcium doivent d'abord écranter les charges des chaînes pectiques pour minimiser les répulsions électrostatiques avant que les zones de jonctions ne puissent s'établir. La quantité d'ions calcium nécessaire à la gélification du système est de ce fait plus élevée qu'en présence de NaCl (Garnier *et al.*, 1993).

V.4.2 Gélification de la SAB

Les profils de gélification de la SAB en présence de calcium sont présentés sur la Figure V.15. Les allures générales sont comparables à celle observée en présence de NaCl (Figure V.8). L'augmentation de la force ionique se traduit par un maximum de rigidité pour I = 12 mM (G' ~ $5*10^3$ Pa). Au-delà, un fort affaiblissement des gels est constaté. Ainsi pour 25 mM, G' ~ 200 Pa, puis pour 50 et 100 mM, les profils sont identiques (G'~70 Pa). On remarque pour I = 50 et 100 mM un «décrochage» inhabituel de G' pendant le refroidissement; ceci est probablement lié à des phénomènes de glissement sur les parois du système de mesure. Les spectres mécaniques pour I = 9 et 100 mM (Figure V.16) sont assez similaires bien que les rigidités des gels soit nettement différentes. Ceci indique que les propriétés viscoélastiques des différents gels relèvent du même type d'organisation.

Figure V.15. Gélification de la SAB 8 % avec I = 9 (■), 12 (●), 25 (▲), 50 (▼), 100 (◆) mM (addition de $CaCl_2$) à pH 6,8.

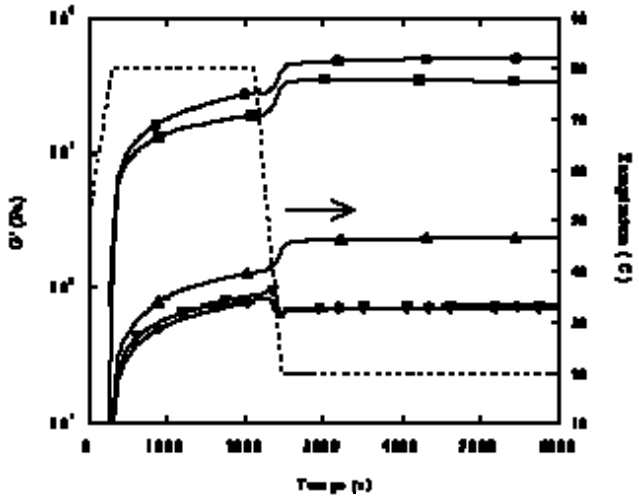
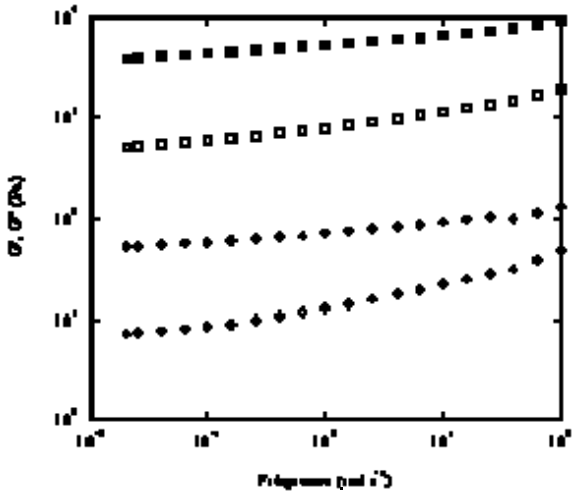
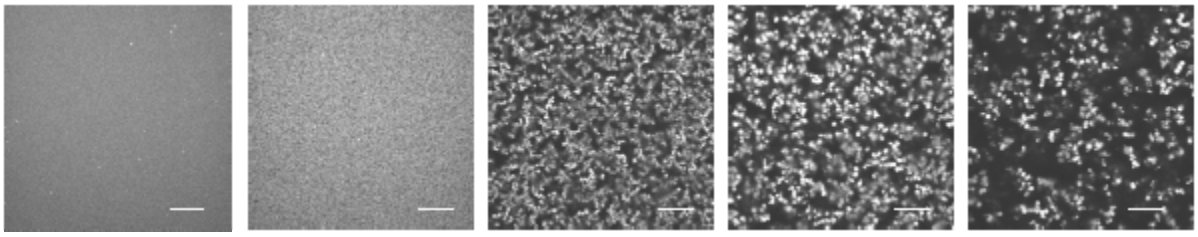


Figure V.16 Spectres mécaniques en fin de cinétiques (mesures à 20 °C) : SAB 8 % avec I = 9 (■) et 100 mM (◆) (addition de $CaCl_2$) à pH 6,8. (symboles pleins: G' ; symboles vides : G'').



En MCBL, pour I = 9 et 12 mM (Figure V.17 a, b), un réseau homogène est observé alors que pour 25 mM et au-delà (Figure V.17 c, d, e) une séparation de phase apparaît de manière évidente. Plus la force ionique augmente plus l'étendue des zones sombres est grande indiquant une diminution de connectivité entre particules sphériques enrichies en protéines. Ceci peut être mis en relation avec l'affaiblissement des gels mesuré en rhéologie.

Figure V.17 Observations par MCBL des structures finales des gels SA*B*-RITC 8 % avec I = 9 (**a**), 12 (**b**) ; 25 (**c**) ; 50 (**d**) et 100 mM (**e**) (addition de $CaCl_2$) à pH 6,8. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.



a. **b.** **c.** **d.** **e.**

Cet effet n'a pas été mis en évidence lorsque la force ionique est apportée par NaCl uniquement. Ceci peut être lié au fait que les forces ioniques à mettre en œuvre pour observer des effets similaires sont différentes selon la nature de l'ion (Cassin & Bouhallab, 2004). Le calcium a donc une efficacité maximale sur la rigidité des gels de SAB pour des

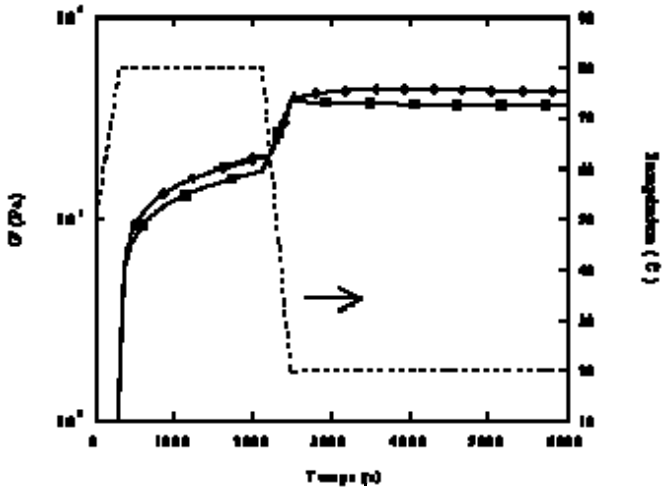
concentrations très inférieures à celle du NaCl. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans des études similaires par Matsudomi *et al.* (1991) et Yasuda *et al.* (1986) où les auteurs ont attribué le renforcement des gels de SAB par le calcium à des liaisons spécifiques entre les groupements négatifs de la protéine dénaturée.

Dans le chapitre III, nous avons montré que la structure du gel de SAB en présence de calcium dépendait étroitement du rapport molaire R (R = $[Ca^{2+}]$/[SAB]). Les conditions de concentrations choisies ici (SAB 8 %, $CaCl_2$ = 3-33 mM, soit R compris entre 2,5 et 27,5) ne permettent pas de caractériser la structure du réseau protéique par diffusion de la lumière car les systèmes formés sont trop turbides. Bien que les conclusions du chapitre III s'appuient sur la structure de gel formé après un temps de chauffage de 48 h au lieu de 30 min, nous pouvons toutefois comparer les résultats en se basant sur des valeurs de R identiques. Nous avions constaté que l'augmentation du rapport R se traduisait par une augmentation de la masse apparente m_a des agrégats constitutifs du système. Pour des concentrations en protéines faibles (< ~1 %) et pour $CaCl_2$ ³ 0,75 mM (5< R< 50), nous avions observé la formation de structures très hétérogènes opaques qui peuvent précipiter. Pour des concentrations en protéines élevées (> 6 %) pour $CaCl_2$> 1,5 mM, des structures homogènes et des systèmes transparents ont été observés. Dans cette partie nous avons montré que l'augmentation de la concentration en calcium (donc de R), pour SAB (8 %), se traduit par la formation de systèmes de plus en plus hétérogènes visibles par MCBL au delà de I = 12 mM ($CaCl_2$ 4 mM). Ceci suggère qu'à cette concentration en SAB, pour une concentration en calcium supérieure à 4 mM (donc R > 3,3), la structure du système est fortement modifiée, résultant probablement d'un excès d'ions calcium disponibles à la protéine.

V.4.3 Gélification du mélange SAB 8 %/pectines LM 0,85 %

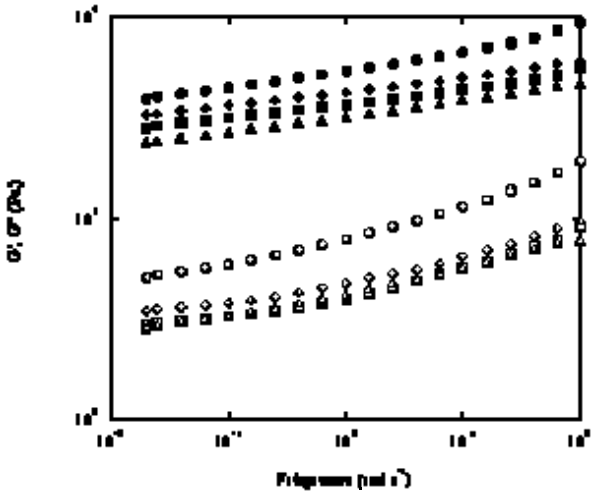
Pour les raisons évoquées dans le cas des gels pectiques le suivi de la gélification des mélanges n'été réalisé que pour I = 21,5 et 24,5 mM ($CaCl_2$ 3 et 4 mM) (Figure V.18).

Figure V.18 Gélification des mélanges SAB 8 %/pectines LM 0,85 % avec I = 21,5 ($CaCl_2$ 3 mM) (◆) et 24,5 ($CaCl_2$ 4 mM) (■) mM à pH 6,8.



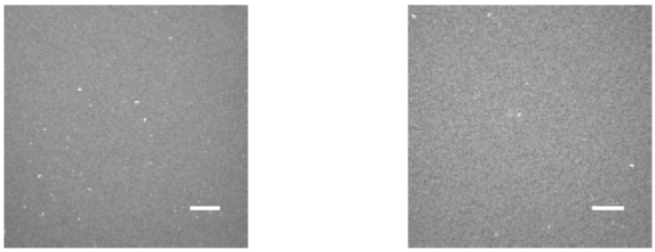
Les courbes de gélification sont comparables à celle de la gélification du mélange en absence de sel (Figure V.5). En comparant avec les gels de SAB (Figure V.15), les gels sont moins rigides que celui de SAB formé avec 4 mM de $CaCl_2$ et légèrement plus rigides que le gel de SAB obtenu dans 3 mM $CaCl_2$. Les spectres mécaniques correspondants (Figure V.19) montrent des comportements viscoélastiques pour les mélanges très proches de ceux de la SAB en présence des mêmes quantité de $CaCl_2$. On peut noter que ces comparaisons ne se font pas en fonction de la force ionique totale du système mais en fonction de la concentration en sels ajoutés.

Figure V.19 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C) (addition de 3 et 4 mM $CaCl_2$) à pH 6,8 :mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 %; I = 21,5 mM (◆) et 24,5 (■) mM SAB 8 % I = 9 mM (▲) et 12 mM (●) (symboles pleins: G'; symboles vides: G'').



Les clichés de MCBL de ces mélanges ne montrent aucune indication d'hétérogénéité de structure (Figure V.20). Ceci contraste avec toutes les observations précédentes où, quel que soit le type de milieu étudié, les mélanges SAB/pectine montraient clairement une séparation de phase. Il n'est pas exclu cependant que ce type de phénomène ne puisse pas être montré à une échelle d'observation plus faible.

Figure V.20 Observations par MCBL des structures finales des mélanges SA*B*-RITC (8 %)/Pectines LM (0,85 %) avec I = 21,5 (**a**) ; 24,5 (**b**) mM (addition de $CaCl_2$) à pH 6,8. Barre d'échelle 25 µm.



a. **b.**

L'ensemble de ces résultats suggère que les ions calcium jouent le même rôle dans le gel de SAB seule et dans le mélange en favorisant la gélification de la protéine. Les ions calcium auraient ainsi une affinité plus grande pour la SAB que pour les pectines LM. La rigidité des mélanges étant très proche des gels de SAB en présence de 3 mM de $CaCl_2$, on peut supposer que la contribution du gel pectique à la rigidité finale des mélanges est très faible.

Ce comportement diffère de celui observé en présence de NaCl 100 mM et de $CaCl_2$ 3 mM, discuté dans le chapitre précédent. Dans ce cas nous avions montré que la gélification des pectines LM gouvernait la gélification du mélange, les protéines agrégées contribuant de manière secondaire à la rigidité finale du mélange.

V.4.4 Conclusions

L'ajout de calcium aux biopolymères ou leurs mélanges se traduit par des comportements différents de ceux observées en présence de sodium. Ceci est bien entendu lié au fait que les deux biopolymères ont une affinité spécifique pour les ions calcium. Dans le cas des pectines LM un gel faible est formé. Pour la SAB, un gel plus ferme qu'en absence de sel est formé.

Dans le mélange SAB/pectine LM, l'affinité entre la SAB et les ions calcium semble dominer. La gélification de la protéine gouvernerait ainsi la gélification du système. D'un point de vue cinétique la structure homogène observée suppose que la gélification a lieu avant une possible séparation de phase.

V.5 Influence de la force ionique (en NaCl/$CaCl_2$)

Les ions calcium et sodium affectant de façon différente les propriétés des systèmes, nous avons voulu détailler l'effet combiné de ces deux cations en complétant ainsi l'étude du chapitre IV réalisée avec une concentration en NaCl (100 mM) et en $CaCl_2$ (3 mM). La concentration en calcium est fixée à 3 mM et les concentrations en NaCl sont comprises entre 3 et 91 mM. Dans le cas des mélanges, la force ionique intrinsèque des pectines LM égale à 12,5 mM est prise en compte. Le tableau ci-dessous rappelle les correspondances entre la teneur en ions et la force ionique des systèmes.

Tableau V.4 Calcul de la force ionique totale dans le système SAB seule et SAB/pectines LM en présence de teneurs croissantes en NaCl en présence de $CaCl_2$ 3 mM.

	NaCl (mM)	3	16	21	31	41	66	91
	CaCl	3	3	3	3	3	3	3
SAB	I (mM)	12	25	30	40	50	75	100
Pectines	I (mM)	24,5	37,5	42,5	52,5	62,5	87,5	112,5
SAB/pectines LM	I (mM)	24,5	37,5	42,5	52,5	62,5	87,5	112,5

V.5.1 Gélification des biopolymères seuls

La Figure V.21 présente les profils de gélification des pectines LM pour différentes forces ioniques, apportées par 3 mM de $CaCl_2$ et des teneurs croissantes en NaCl. L'augmentation de la force ionique se traduit par une rigidité croissante des gels et la formation de gels « vrais » (Figure V.22). En comparant à la rigidité du gel obtenu en présence de 3 mM de $CaCl_2$ seul (G' <1 Pa) (Figure V.13), on constate que l'augmentation de rigidité est visible dès l'ajout d'une faible quantité de NaCl (G'~8 Pa avec I = 24,5 mM soit NaCl = 3 mM). Comme évoqué précédemment, le calcium présent dans le milieu va permettre la formation de jonctions ioniques et ce d'autant plus facilement que les répulsions électrostatiques interchaînes sont minimisées par l'ajout de concentrations croissantes en NaCl (Garnier *et al.*, 1993).

Figure V.21. Gélification des pectines LM 0,85 % avec I = 24,5 (▲), 42,5 (▼), 62,5 (◆), 112,5 (●) mM (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM)) à pH 6,8.

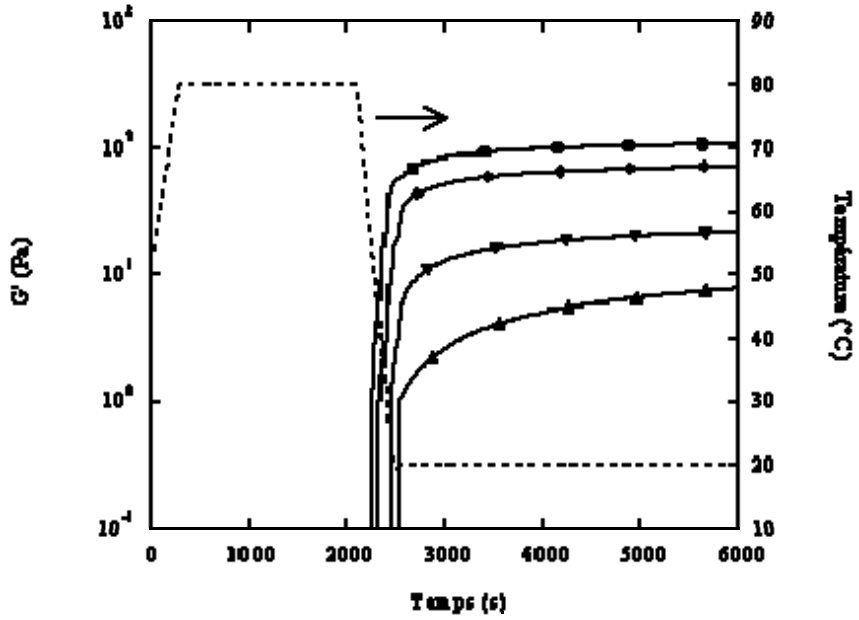
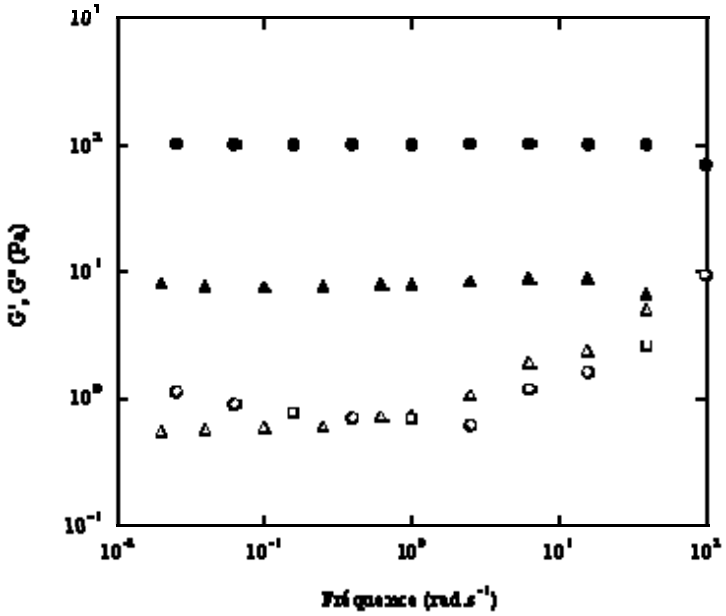


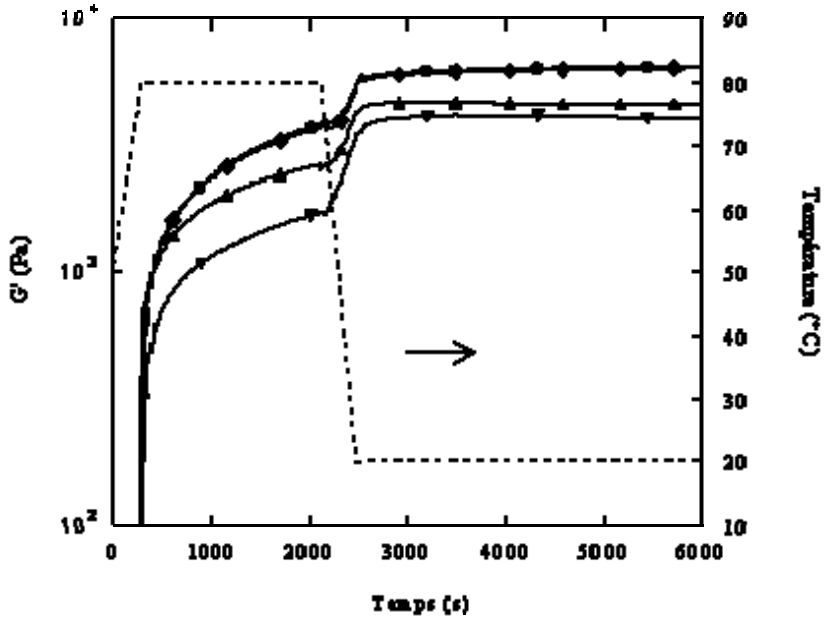
Figure V.22 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): Pectines LM 0,85 % avec I = 24,5 (▲) et 112,5 (●) mM (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM)) à pH 6,8. (symboles vides : G'; symboles pleins: G'').



Pour la SAB, la gélification en fonction de la force ionique est présentée sur la Figure V.23. Nous observons le même type de profil que dans le chapitre IV et on note une

augmentation de la fermeté des gels lorsque la teneur en sels augmente. Pour I = 50 et 100 mM, les deux courbes sont superposées; l'effet de la force ionique est donc moins marqué. Les microstructures obtenues sont d'apparence granuleuse comme celles décrites en présence de NaCl 100 mM (Figure IV.12). Cette hétérogénéité de structure est mise en évidence pour les différentes teneurs en sels étudiées mais aucune distinction n'a pu être réalisée par analyse d'image.

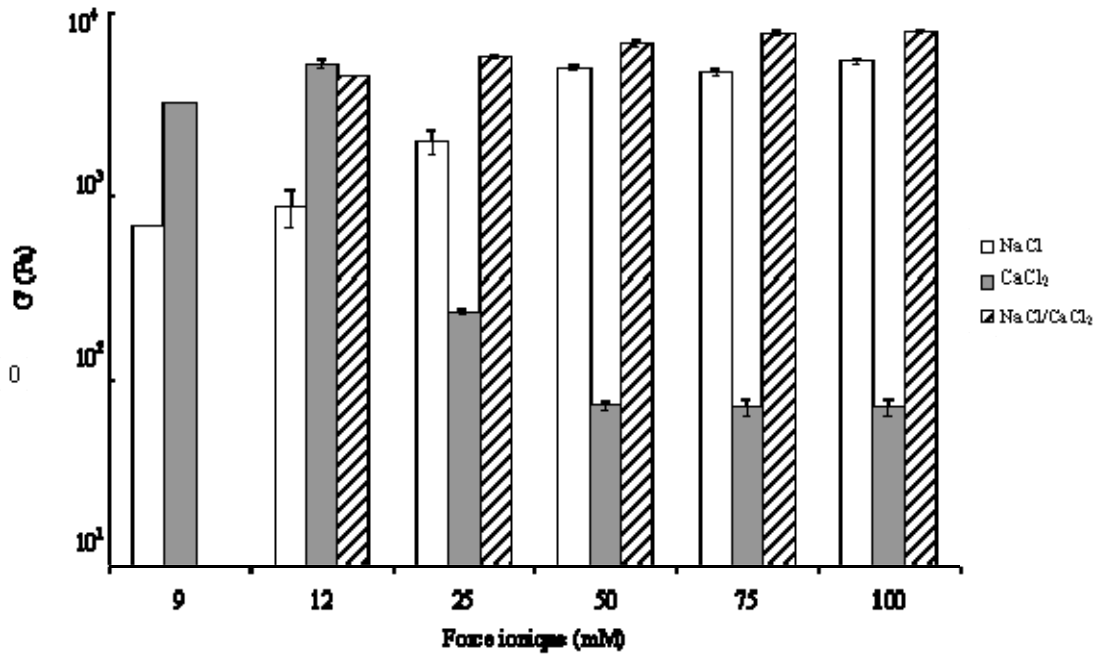
Figure V.23 Gélification de la SAB 8 % avec I = 12 (▼), 25 (▲), 50 (◆), 100 (●) mM (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM) à pH 6,8.



La figure V.24 compare les rigidités finales des gels lorsque la force ionique est apportée par NaCl, $CaCl_2$ ou les deux. L'effet de $CaCl_2$ seul se distingue facilement des autres, un maximum de rigidité étant observé pour I = 12 mM. En présence de NaCl, la rigidité des gels augmente avec la force ionique et varie faiblement au-delà de I = 50 mM. En présence de NaCl/$CaCl_2$, on observe le même comportement et des gels plus rigides qu'en présence de NaCl sont obtenus quelle que soit la force ionique. Ceci pourrait être lié au fait que les ions sodium diminuent les répulsions électrostatiques entre protéines tandis que des liaisons spécifiques avec les ions calcium s'établissent. Pour des forces ioniques égales à 25 mM et au-delà, le renforcement des gels formés en présence en NaCl/$CaCl_2$ par rapport aux

systèmes formés en présence de NaCl seul est de moins en moins marqué. Dans ce cas l'effet des ions calcium serait masqué par les ions sodium nettement majoritaires.

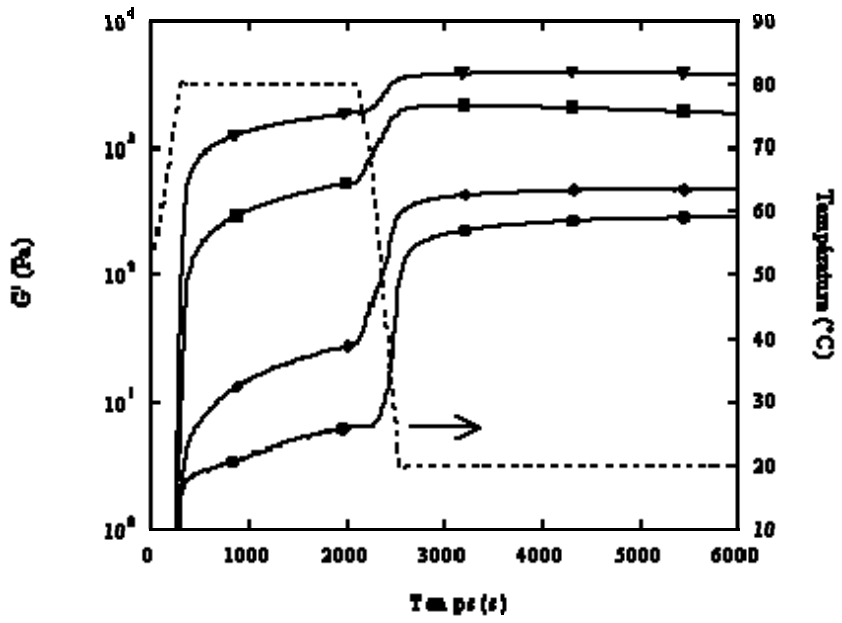
Figure V.24 Comparaison des modules G' finaux mesurés après 1 h à 20 °C des gels SAB (8 %) pour des forces ioniques variables résultant de l'addition de NaCl, $CaCl_2$ ou NaCl/$CaCl_2$ à pH 6,8 (3 mesures pour chaque condition).



V.5.2 Mélanges SAB 8 %/pectines LM 0,85 %

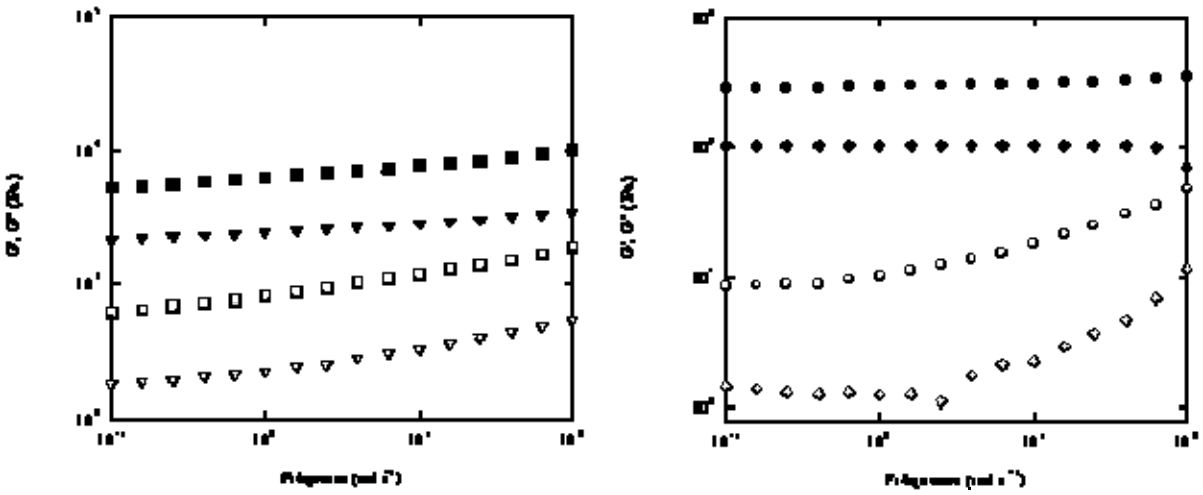
Les profils rhéologiques des mélanges en présence des deux cations sont présentés sur la Figure V.25. Pour I = 24, 5 et 42, 5 mM, les courbes de gélification sont similaires à celles de la protéine seule dans les mêmes conditions. Dans la Figure V.26a, nous comparons le spectre mécanique du mélange pour I = 24,5 mM à celui de la SAB pour I = 25 mM. Les spectres sont comparables malgré le fait qu'ils soient décalés l'un par rapport à l'autre. Le comportement du mélange est donc déterminé par le réseau protéique.

Figure V.25 Gélification des mélanges SAB 8 %/pectines LM (0,85 %) avec I = 24,5 (▼), 42,5 (■), 62,5 (◆) et 112,5 (●) mM (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM) à pH 6,8.



Pour des forces ioniques supérieures (I = 62,5 et 112,5 mM), l'évolution de G' au niveau du plateau à 80 °C est assez limitée et est suivie par une augmentation assez nette au cours du refroidissement vers 60 °C. La Figure V.26b montre que le spectre mécanique du mélange pour I =112,5 mM se rapproche de celui du gel de pectine pour la même force ionique. La structure du gel mixte se rapproche donc de celle des gels de pectines LM. Ces résultats rappellent ainsi les observations du chapitre IV pour le mélange dans NaCl 100 mM/$CaCl_2$ 3 mM (soit I = 109 mM): pour 24,5 £ I £ 42,5 mM, la gélification semble être gouvernée par la SAB alors que pour 52,5 £ I £ 109 mM la gélification des pectines LM jouerait un rôle dominant. De plus on note que quelle que soit la force ionique, les gels obtenus en présence des deux cations sont moins rigides que les gels de SAB correspondants.

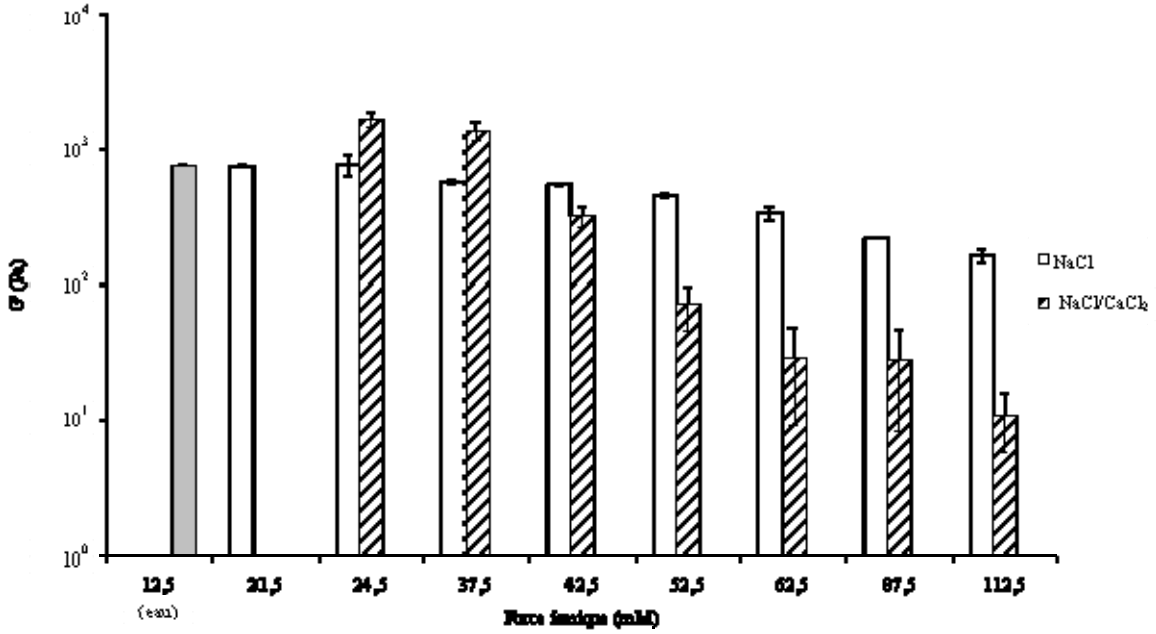
Figure V.26 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C) (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM) :
mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 %; I =24,5 mM (▼) (**a**); 112,5 mM (●) (**b**); SAB 8 %: I = 25 mM (■) (**a**), pectines LM 0,85 %: I = 112,5 mM (◆) (**b**) (symboles vides : G'; symboles pleins: G'').



a. **b.**

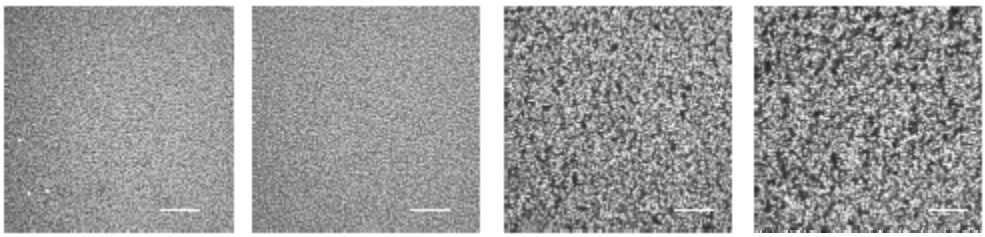
Si nous comparons les valeurs des modules G' mesurés au bout de 30 min à 80 °C pour les mélanges en fonction de la force ionique apportée par NaCl ou NaCl/$CaCl_2$ (Figure V.27), on constate que ce n'est que pour les plus faibles forces ioniques (I < 37,5 mM) que les modules en présence NaCl/$CaCl_2$ sont plus élevés qu'en présence de NaCl. Pour des forces ioniques supérieures ou égales à 42,5 mM, l'effet inverse est observé. Nous avons montré précédemment que la lente gélification qui a lieu au cours du traitement thermique à 80 °C témoigne de la compétition entre séparation de phase et formation du gel protéique. Les présents résultats suggèrent que dans la gamme de forces ioniques étudiées, cette compétition est plus marquée en présence de NaCl/$CaCl_2$ qu'en présence de NaCl ou de $CaCl_2$. Ceci induit des rigidités finales de gels plus grandes en présence de NaCl/$CaCl_2$ pour I < 42,5 mM qu'en présence de NaCl et proches pour des forces ioniques plus grandes.

Figure V.27 Comparaison des modules G' mesurés après 30 min à 80 °C pour les mélanges SAB (8 %)/Pectines LM (0,85 %) pour des forces ioniques variables résultant de l'addition de NaCl ou NaCl/$CaCl_2$ à pH 6,8 (3 mesures pour chaque condition).



L'hétérogénéité des clichés montre bien qu'une séparation de phase a eu lieu (Figure V.28).

Figure V.28 Observations par MCBL des structures finales des mélanges SA*B*-RITC (8 %)/ Pectines LM (0,85 %) avec I = 24,5 (**a**) ; 42,5 (**b**) ; 62,5 (**c**) et 112,5 mM (**d**) (addition de $NaCl/CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM) à pH 6,8. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.

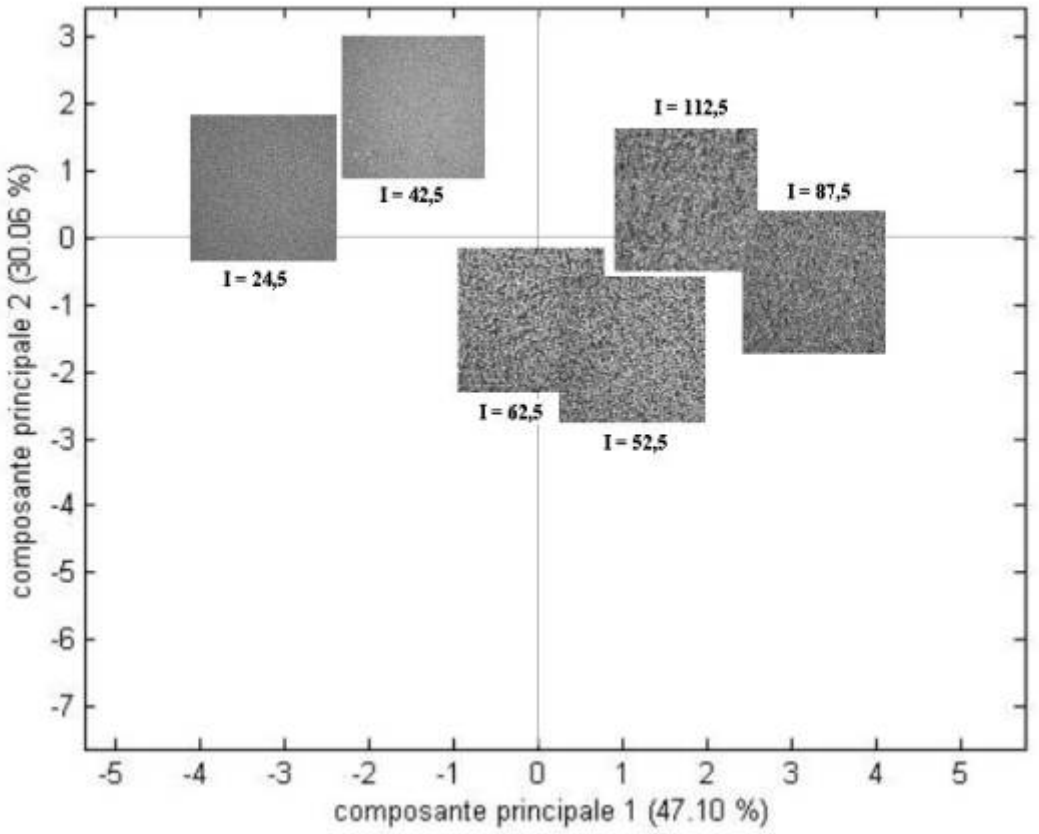


a. **b.** **c.** **d.**

La carte factorielle des deux premières composantes principales de l'analyse d'image effectuée pour les mélanges aux différentes forces ioniques est présentée en Figure V.29. L'axe 1 sépare deux groupes: l'un (pour I = 24,5 et 42,5 mM) vers la gauche de l'axe et l'autre pour I allant de 52,5 à 112, 5 mM vers la droite de l'axe. Les paramètres associés au premier groupe (entropie, contraste) décrivent des systèmes plus hétérogènes que pour les systèmes avec I $\geq$ 52,5 mM, où de grandes zones de même intensité de niveaux de gris sont

mises en évidence par les paramètres énergie, corrélation, moment différentiel inverse, reflétant une séparation de phase plus marquée.

Figure V.29 Carte factorielle obtenue avec les structures finales des gels SA*B*-RITC 8%/Pectines LM 0,85 % pour I comprise entre 24,5 et 112,5 mM (addition de NaCl/$CaCl_2$, $CaCl_2$ 3 mM) à pH 6,8.



Cette distinction peut se rapprocher des mesures rhéologiques: pour les faibles forces ioniques la gélification des systèmes est gouvernée par celle de la protéine et un réseau fortement connecté est observé tandis que pour les forces ioniques plus élevées ce sont les pectines qui prédominent dans la formation du gel mixte, probablement du fait que la séparation de phase est plus accentuée définissant ainsi un espace suffisant pour qu'un réseau pectique s'organise dans la phase continue.

V.5.3 Discussion et conclusions

La présence simultanée des deux cations se traduit par un renforcement des gels de biopolymères seuls en raison de liaisons spécifiques entre les ions calcium et le biopolymère et la diminution des répulsions électrostatiques par les ions sodium. En fixant la concentration en calcium à 3 mM et en faisant varier la concentration en sodium, le rapport $[Na^+]/[Ca^{2+}]$ se situe entre 1 et 30. Dans les mélanges SAB 8%/pectines 0,85 %, nous avons montré qu'en présence de NaCl 100 mM et $CaCl_2$ 3 mM, la gélification des systèmes contenant 0,85 % de pectines LM était gouvernée par la gélification des pectines LM. Ceci a été vérifié pour des forces ioniques supérieures ou égales à 52,5 mM ($[Na^+]/[Ca^{2+}] > 10$); en deçà la gélification est gouvernée par celle de la SAB.

De plus en s'appuyant sur les microstructures observées, on peut supposer que pour les faibles forces ioniques les interactions SAB/calcium sont dominantes; la gélification de la SAB domine la séparation de phase et la structure du gel est similaire au gel de SAB, les pectines étant régulièrement dispersées dans le réseau protéique. En revanche pour des forces ioniques plus grandes, l'effet inverse est observé. La séparation de phase est figée par la gélification de la protéine lors du chauffage. Les pectines et les protéines sont séparées dans deux phases distinctes. La gélification des pectines lors du refroidissement d'autant plus marquée que la force ionique augmente aboutit à une structure de type gel composite.

V.6 Conclusion sur l'influence de la force ionique apportée par des sels de différentes natures

Les interactions des ions avec les biopolymères diffèrent, elles peuvent être spécifiques (en présence de calcium) ou pas (en présence de sodium), dominantes ou pas selon les concentrations dans le système (en présence conjointe de sodium et de calcium) au cours du processus thermique.

La température de transition thermique de la SAB n'est pas affectée par la nature des ions dans le milieu et par la présence de pectine.

En absence de sel, la force ionique apportée par les pectines LM contribue à la force ionique totale du mélange et renforce le gel de SAB de manière équivalente à un ajout simple de NaCl. Cette augmentation de rigidité est liée à une augmentation de la concentration locale en protéine induite par une séparation de phase.

En présence de NaCl ou NaCl/$CaCl_2$ ou $CaCl_2$, l'agrégation des protéines est favorisée par la diminution des répulsions électrostatiques entre protéines dénaturées et par la présence

de liaisons spécifiques avec le calcium. Ceci induit la formation d'un réseau homogène en deçà d'une certaine force ionique qui est plus basse en présence de $CaCl_2$ seul (évalué à I = 12 mM) qu'en présence de NaCl ou NaCl/$CaCl_2$ (supérieure à I = 100 mM).

Concernant les pectines LM, la gélification en présence de $CaCl_2$ seul est limitée par la formation de structures hétérogènes et favorisée en présence des ions Na^+ qui écrantent les charges du polyélectrolyte et favorisent ainsi les interactions entre les chaînes pectiques et le calcium.

Pour le mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 %, dans NaCl ou NaCl/$CaCl_2$, la teneur en NaCl intervient dans la cinétique de séparation de phase très probablement en jouant un rôle dans le mécanisme de déplétion-floculation.

En augmentant la concentration en NaCl et au-delà du rapport $[Na^+]/[Ca^{2+}] > 10$, ceci aboutit à une faible connectivité protéique au cours du plateau à 80 °C. Dans ces conditions, au refroidissement, un gel pectique se forme et la gélification du système est gouverné par celle des pectines. Le gel peut être décrit comme un composite avec des microparticules de protéines dispersées dans un réseau continu de pectines.

Pour des rapports $[Na^+]/[Ca^{2+}] <10$ ou en présence de $CaCl_2$ seul, la gélification est gouvernée par les protéines et on suppose que les interactions SAB/calcium jouent un rôle essentiel. Bien que la séparation de phase soit moins marquée en présence de NaCl/$CaCl_2$ dans ces conditions, elle est visible sur les clichés de MCBL. La cinétique de gélification des protéines serait plus rapide que celle de la séparation de phase aboutissant à un système totalement différent dominé par le réseau protéique. Il est difficile sur la base de ces résultats de savoir si les pectines forment elles-mêmes un réseau.

L'ensemble de ces résultats démontre le rôle essentiel du rapport $[Na^+]/[Ca^{2+}]$ dans les mécanismes évoqués.

En revanche, en présence de $CaCl_2$ seul (I £ 24,5 mM), le système est homogène à l'échelle d'observation du MCBL. Ceci suggère que les pectines sont réparties de façon assez uniforme dans le mélange et dans ces conditions la gélification des protéines fige le système encore plus rapidement. Ceci pourrait être lié aux fortes interactions entre SAB et calcium existant dans ces conditions.

VI. Gélification thermique des mélanges β-Lg/pectines LM : - Effet de la nature du solvant - Comparaison avec les systèmes à base de SAB

Dans les chapitres précédents, nous avons décrit les propriétés des biopolymères et des mélanges SAB/pectines selon différentes conditions ioniques. L'objectif de ce chapitre est de considérer les différences de comportements induites par la nature de la protéine globulaire en étudiant le mélange β-Lactoglobuline (β-Lg)/pectines LM, dans des conditions identiques à celles retenues pour le système SAB/pectines LM. Nous nous sommes limités aux systèmes dans l'eau ou en NaCl 100 mM en présence ou non et de $CaCl_2$ 3 mM. Les concentrations en protéines et en pectines LM sont fixées, respectivement, à 8 % et à 0,21, 0,43 et 0,85 %. Le même traitement thermique que celui décrit pour le chapitre V est appliqué.

La majorité des résultats concernant les systèmes à base de SAB ont déjà été présentés. Cependant pour réaliser totalement cette comparaison, nous avons eu besoin de compléter les résultats du chapitre V.2 (portant sur le mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 % dans l'eau) avec les concentrations en pectines égales à 0,21 et 0,43 %. Par ailleurs, en raison du changement d'échantillon, toutes les mesures du chapitre IV (portant sur les mélanges SAB 8%/pectines 0,21; 0,43 et 0,85 % dans NaCl 100 mM) ont été répétées.

VI.1 Gélification des systèmes à base de β-Lg

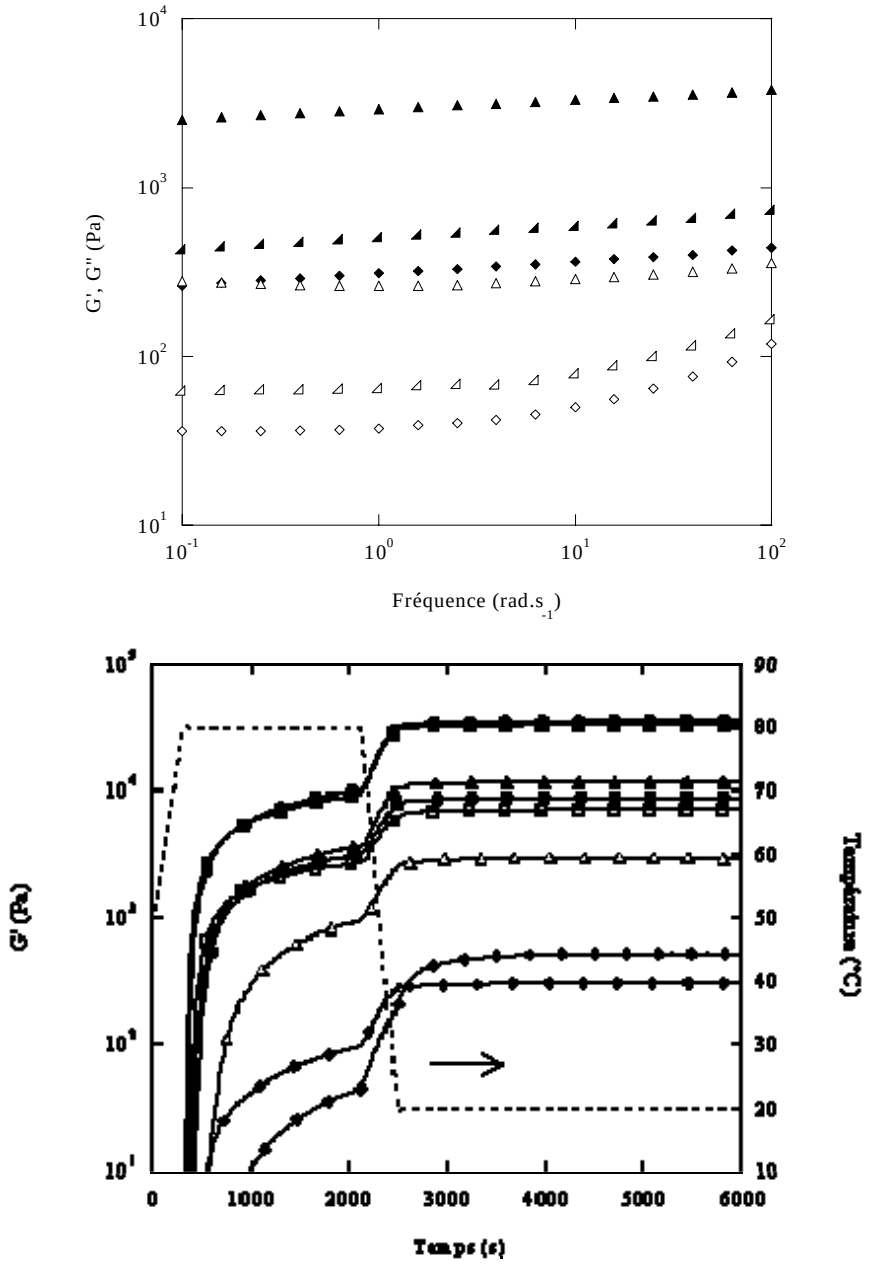
VI.1.1 Etude des systèmes à base de β-Lg dans l'eau

VI.1.1.1 Gélification de la β-Lg en présence de pectines LM

- *β-Lg seule dans l'eau*

L'évolution du module G'au cours du traitement thermique pour la β-Lg seule et pour les mélanges est présentée en Figure VI.1. Tous ces profils sont similaires et peuvent être comparés à ceux déjà présentés pour la SAB et pour les mélanges SAB/pectines LM : G' augmente fortement dès que la température de 80 °C est atteinte et continue d'augmenter durant le traitement thermique. Une seconde augmentation du module moins importante se produit au cours du refroidissement. Au bout d'une heure à 20 °C, le module G' n'évolue plus et le système est considéré comme stable.

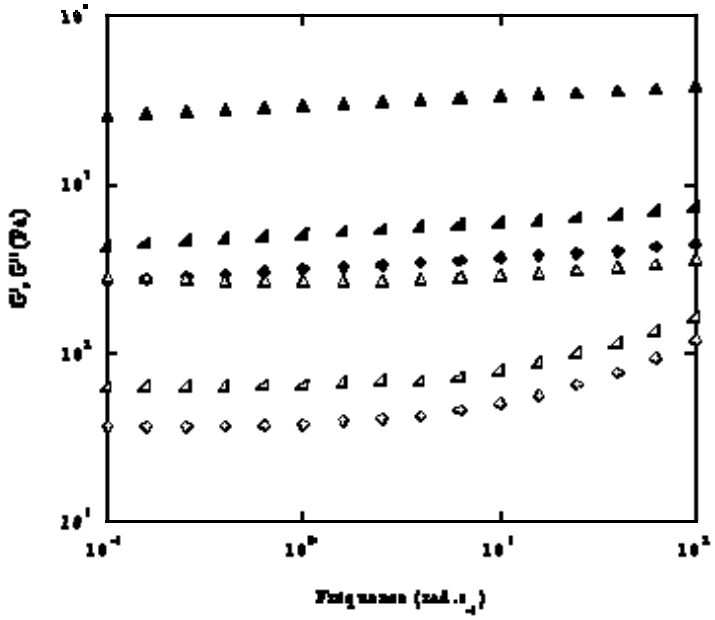
Figure VI.1 Gélification dans l'eau : β-Lg 8 % (△), mélanges β-Lg 8 %/pectines LM 0,21 (○) ; 0,43 (□) ; 0,85 (◇) % en absence (symboles vides) ou en présence (symboles pleins) de 3 mM $CaCl_2$ à pH 6,8 (trait en pointillé: profil de température).



.La rigidité finale du gel de *β*-Lg est assez élevée (G' = 2900 Pa), un gel ferme est formé comme le montre le spectre mécanique de la Figure VI.2, typique des gels de protéines globulaires, les modules G' et G'' variant légèrement avec la fréquence. Ceci montre bien que la concentration limite de gélification dans ces conditions, est assez nettement inférieure à 8 %. Ndi *et al.* (1996) ont cependant montré qu'en absence de sels la *β*-Lg (10 %) ne formait pas de gel suite à un traitement thermique de 95 °C, 5 min à pH 6,5, de même Mulvihill &

Kinsella (1988) par des mesures en compression avec un traitement thermique de 90 °C, 30 min à pH 8. Par ailleurs il a été reporté qu'avec un temps de chauffage plus long (24 h à 80 °C), la β-Lg (10 %) peut former un gel en absence de sels ajouté (Baussay *et al.*, 2003). Dans ce cas cependant, il faut souligner que la solution de protéine était dialysée intensivement au préalable. Renard & Lefebvre (1992) ont également évalué visuellement qu'une solution de β-Lg gélifiait après 1 h à 100 °C à pH 7 pour une concentration supérieure à 8 %.

Figure VI.2 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): *β*-Lg sans calcium (p), mélanges *β*-Lg 8%/pectines LM 0,85 % en absence (®) et en présence de calcium (y) (G' symboles pleins, G'' symboles vides).



Ces différents résultats montrent que selon le type de traitement thermique et les caractéristiques intrinsèques des solutions de protéines, la concentration minimale de gélification de la *β*-Lg peut différer. De plus, il est important de souligner que l'absence de sels telle qu'elle est décrite dans la littérature n'implique pas que la force ionique n'est pas négligeable. Les conditions opératoires choisies ici (absence de dialyse, présence d'azoture de sodium (0,02 %), pH 6,8), et la composition minérale de notre échantillon (Na^+ = 103 mM, Ca^{2+} = 1,2 mM, Cl^- = 69,8 mM; valeurs calculées à partir des équations présentées dans le chapitre II.2.1.2) pourraient expliquer nos résultats.

Comme décrit pour les gels de SAB (paragraphe V.4.2), les clichés MCBL (Figure VI.3a) ne montrent aucune structure à cette échelle d'observation.

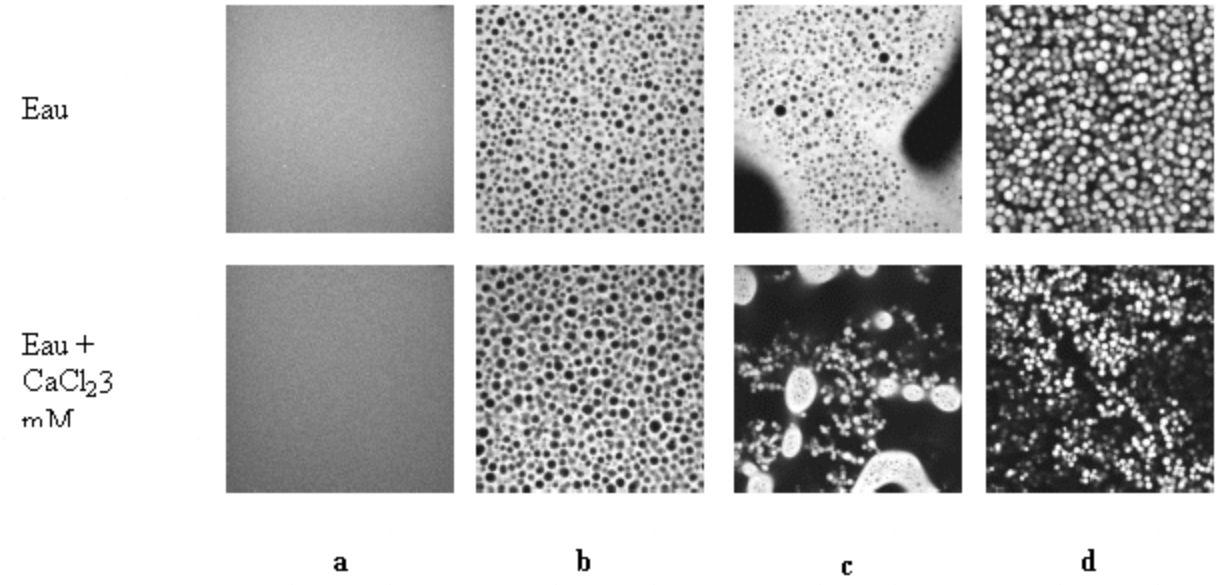
- *Mélanges β-Lg/pectines LM dans l'eau*

L'addition de concentrations croissantes en pectines LM ne modifie pas les profils de gélification de la protéine mais la rigidité des gels varie largement (Figure VI.1). Les gels contenant 0,21 et 0,43 % de pectines LM sont plus rigides (G' > 7000 Pa) que le gel de protéine seule. Un effet inverse est observé en présence de 0,85 % de pectines par une diminution très nette des modules (G' = 310 Pa) et l'augmentation de G' au cours du traitement thermique à 80 °C est également beaucoup plus lente comme nous l'avons déjà

remarqué dans certains mélanges SAB/pectines LM. L'allure des spectres mécaniques, même pour le mélange β-Lg/pectine 0,85 % (Figure VI.2), est similaire à celui du gel de protéine seule.

D'un point de vue structural, l'addition de Pectines LM se traduit par une distribution non homogène de la fluorescence (Figure VI.3 bcd-1ère rangée).

Figure VI.3 Observations par MCBL des structures finales des systèmes en absence et en présence de $CaCl_2$ 3 mM dans l'eau: β-Lg-RITC (**a**), mélanges β-Lg-RITC/Pectines LM 0,21 (**b**), 0,43 (**c**) et 0,85 (**d**) %. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.



Cependant les structures observées sont assez différentes de celles que nous avons décrites pour la SAB. Lorsque 0,21 % de Pectines LM sont ajoutées à la protéine, des inclusions sphériques sont nettement définies et leurs diamètres est de ~ 2-4 μm. Elles sont sombres et contiennent les pectines LM. Les protéines se retrouvent dans la phase continue qui enchâsse ces inclusions. Cette phase continue est bien entendue gélifiée. L'ajout de 0,43 % de Pectines LM met toujours en évidence des zones sombres sphériques au sein d'une matrice protéique. Cependant, une grande hétérogénéité apparaît avec d'autres zones sombres beaucoup plus larges, contenant probablement aussi des pectines LM. Enfin l'addition de 0,85 % de pectines LM montre des inclusions sphériques contenant les protéines, plus ou moins connectées entre elles (de taille régulière avec un diamètre de l'ordre de 5 μm) enchâssées dans une phase pectique.

Ces structures sont la conséquence évidente d'une séparation de phase. Une inversion de phase se produit donc en passant de 0,21 et 0,85 % de pectines. Celle-ci se situe très certainement au voisinage de 0,4 % de pectines LM. Ces observations se rapprochent de celles de Dumay *et al.* (1999) qui ont également montré un tel changement de structures pour le mélange *β*-Lg 12 %/pectines (0,1-1 %) (voir paragraphe I.3.3.3).

VI.1.1.2 Effet de l'ajout de calcium dans le milieu

- *β-Lg en présence de calcium seul*

L'effet de l'ajout de calcium est illustré dans les mêmes figures (Figures VI.1, VI.2 et VI.3). Pour la *β*-Lg seule, une même évolution de G' que dans l'eau est observée mais un gel encore plus ferme est obtenu (G' ~ 12000 Pa). Comme nous l'avons déjà mentionné, il existe un optimum de concentration en sels pour lequel le gel est renforcé; au-delà de cette concentration, il est affaibli. Matsudomi *et al.* (1991) ont montré que pour des gels de *β*-Lg (5 %) à pH 8, cet optimum, en présence de $CaCl_2$, se situait entre 2 et 5 mM alors que Mulvihill & Kinsella (1988) l'ont estimé à 10 mM pour un gel de *β*-Lg (10 %) au même pH. On peut donc supposer que les conditions opératoires retenues ($CaCl_2$ 3 mM) sont assez proches de cet optimum. Il a été proposé que des interactions électrostatiques spécifiques entre le calcium et la *β*-Lg dénaturée chargée négativement ont lieu (Matsudomi *et al.*, 1991). De plus, selon Jeyarajah & Allen (1994), la présence d'ions calcium favoriserait la formation de ponts disulfures et les interactions hydrophobe. La forte augmentation de la rigidité du gel de *β*-Lg en présence de calcium observée ici est ainsi cohérente avec ces descriptions.

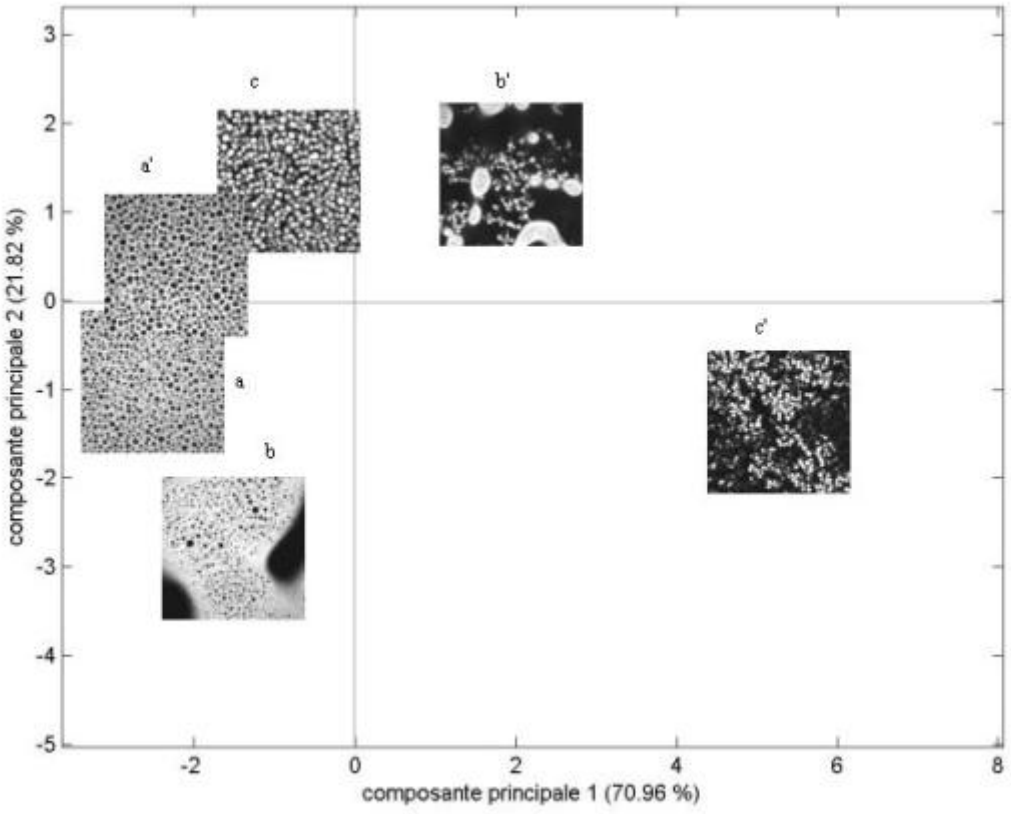
Comme pour la SAB et la *β*-Lg en absence de calcium, aucune information supplémentaire n'est apportée par l'observation des systèmes en MCBL (Figure VI.3a).

- *Mélanges β-Lg/pectines LM en présence de calcium seul*

Pour les mélanges contenant 0,21 et 0,43 % de pectines, les profils sont similaires à ceux observés en absence de calcium (Figure VI.1) mais sont totalement confondus. Les gels formés sont beaucoup plus rigides (G' ~ 35000 Pa contre ~ 9000 Pa à 0,21 % et ~ 7000 Pa à 0,43 % en absence de calcium). Enfin, pour 0,85 % de pectines dans le mélange, le profil est assez proche de celui observé en absence de calcium avec cependant quelques différences: au niveau du plateau à 80 °C, alors que le module G' est plus faible, l'augmentation est plus marquée au cours du refroidissement. Le gel est donc légèrement plus ferme (G' = 510 Pa contre 310 Pa). L'allure des spectres mécanique en présence de calcium pour le mélange

contenant 0,85 % de pectines est assez similaire de celui de la protéine seule comme il l'est en absence de calcium (Figure VI.2). Notons également que c'est le cas pour des concentrations en pectines plus faibles. Les observations en MCBL de ces systèmes (Figure VI.3 bcd-2ère rangée) montrent des structures similaires à celles décrites en absence de calcium. On note cependant quelques différences, en particulier une grande tendance à l'agrégation des microparticules protéiques à 0,85 % de pectines en présence de calcium. La carte factorielle des deux premières composantes principales de l'ensemble des clichés obtenus est présentée sur la Figure VI.4.

Figure VI.4. Carte factorielle des structures finales dans l'eau des mélanges de *β*-Lg-/Pectines LM 0,21 (a, a'); 0,43 (b, b'), 0,85 (c, c') en absence (a, b, c) ou en présence de $CaCl_2$ 3 mM (a', b', c') à pH 6,8. Pour chaque système une image représentative est placée au milieu du groupe de 10 images.



Les systèmes situés vers la gauche de l'axe 1 sont caractérisés par les variables entropie, contraste, traduisant une image plus complexe. Cet ensemble regroupe les mélanges en absence de calcium (a, b, c) ainsi que le mélange *β*-Lg/pectine en présence de calcium (a').

Dans ce mélange, le calcium influence donc assez peu la structure obtenue. L'image située vers la droite de l'axe (c') est caractérisé par les variables énergie, corrélation, moment différentiel inverse traduisant des zones de même intensité de niveaux de gris avec des zones sombres assez grandes contenant la phase pectique et des zones claires correspondant aux inclusions sphériques de protéine. Elle correspond au système contenant 0,85 % de pectines LM (c'): la distribution des particules sphériques protéiques est moins homogène qu'en absence de calcium et la taille de ces particules apparaît plus petite (~3 μm au lieu de ~5 μm). L'image b', correspondant au mélange contenant 0,43 % de pectines, est située entre ces deux groupes du fait de la structure très hétérogène observée qui se distingue plus nettement que celle du système en absence de calcium (b).

VI.1.1.3 Conclusions

D'après Tolstoguzov (1995), au voisinage de l'inversion de phase, un maximum de rigidité est atteint pour le système, ce qui est constaté ici pour le mélange contenant 0,43 % de pectines LM. Par ailleurs, le fait qu'à 0,85 % de pectines en absence de calcium ce soit la phase pectique qui constitue la phase continue explique la faible fermeté du gel puisque le polyoside ne gélifie pas dans ces conditions.

L'addition de calcium dans le mélange se traduit d'un point de vue structural par une séparation de phase plus importante. Les résultats rhéologiques suggèrent que la gélification des systèmes est gouvernée par la protéine. Les interactions β-Lg/calcium domineraient ainsi dans le mélange et la contribution des gels pectiques resterait assez faible.

VI.1.2 Etude des systèmes à base de β-Lg dans NaCl 100 mM

VI.1.2.1 Gélification des systèmes en absence de calcium

La Figure VI.5 présente les cinétiques de gélification des systèmes dans NaCl 100 mM. En comparant les Figure VI.5 et VI.1, on constate que l'évolution de G' pour la β-Lg et pour les mélanges est identique dans NaCl 100 mM et dans l'eau. La rigidité finale des gels en présence ou non de NaCl 100 mM est indiquée dans la Figure VI.7. Les gels de β-Lg sont plus rigides dans NaCl (G' = 3,5 $*10^4$ Pa). Ce renforcement peut être attribué à une diminution des répulsions électrostatiques entre les protéines par un écrantage des charges (Relkin, 1996; Matsudomi *et al.*, 1991). En revanche pour les mélanges, l'addition de NaCl se traduit par une diminution très nette de la rigidité des gels. On retrouve également le même

profil pour 0,85 % avec une augmentation de G' très lente à 80 °C résultant en un gel de rigidité plus faible que pour les autres mélanges (G'~100 Pa contre G' > 3000 Pa pour les autres mélanges) (Figure VI.5). Les spectres mécaniques des mélanges (seul celui contenant 0,85 % de pectine est présenté sur la Figure VI.6) ont une allure comparable à celui de la protéine seule.

Figure VI.5 Gélification dans NaCl 100 mM: *β*-Lg 8 % (r), mélanges *β*-Lg 8 %/pectines LM 0,21 (™) ; 0,43 (£) ; 0,85 (¯) % en présence (symboles pleins) ou en absence (symboles vides) de 3 mM $CaCl_2$ à pH 6,8 (trait en pointillé: profil de température).

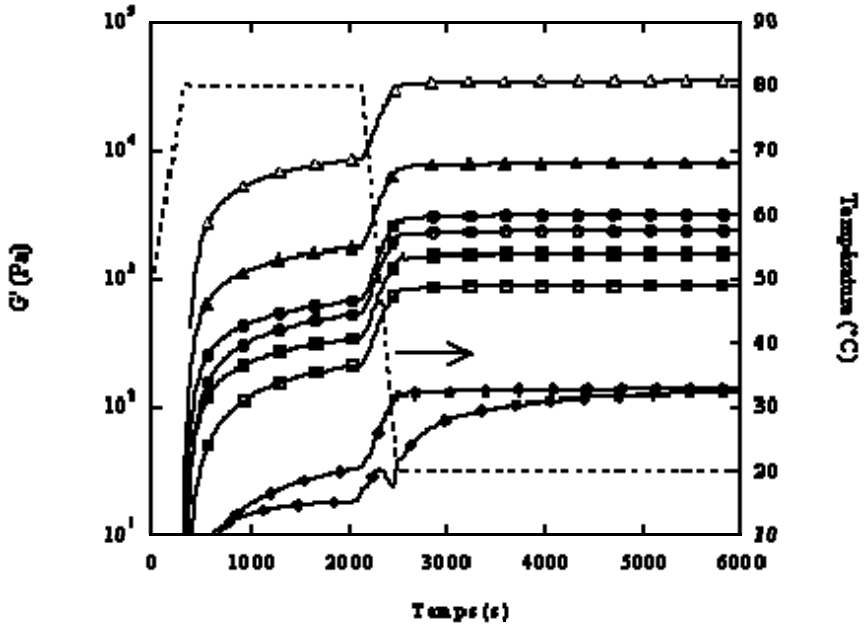


Figure VI.6 Spectres mécaniques en fin de cinétique (mesures à 20 °C): *β*-Lg sans calcium (p), mélanges *β*-Lg 8 %/pectines LM 0,85 % en absence (¿) et en présence de calcium (˜) (G' symboles pleins, G'' symboles vides).

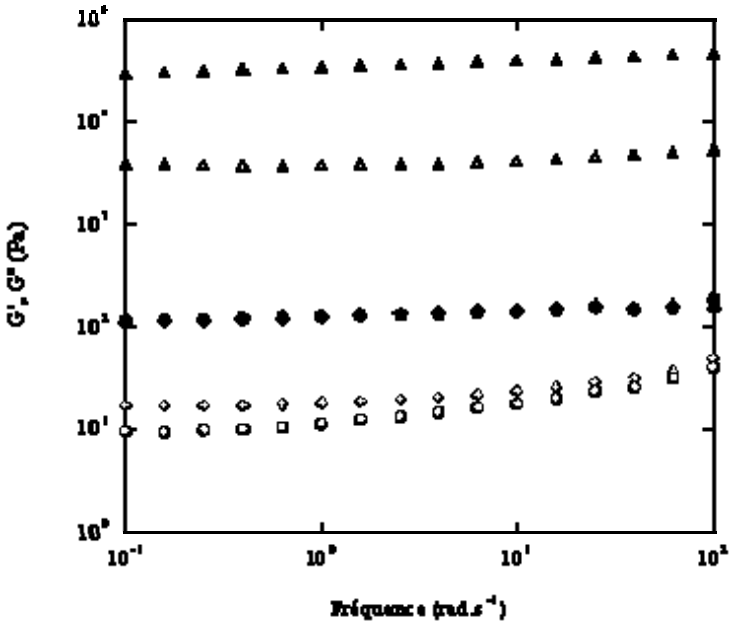


Figure VI.7 Comparaison des modules G' finaux dans l'eau (barres vides) ou NaCl 100 mM (barres pleines) à pH 6,8 pour des gels de *β*-Lg (8 %) en fonction de la concentration en pectines LM (2 mesures pour chaque condition).

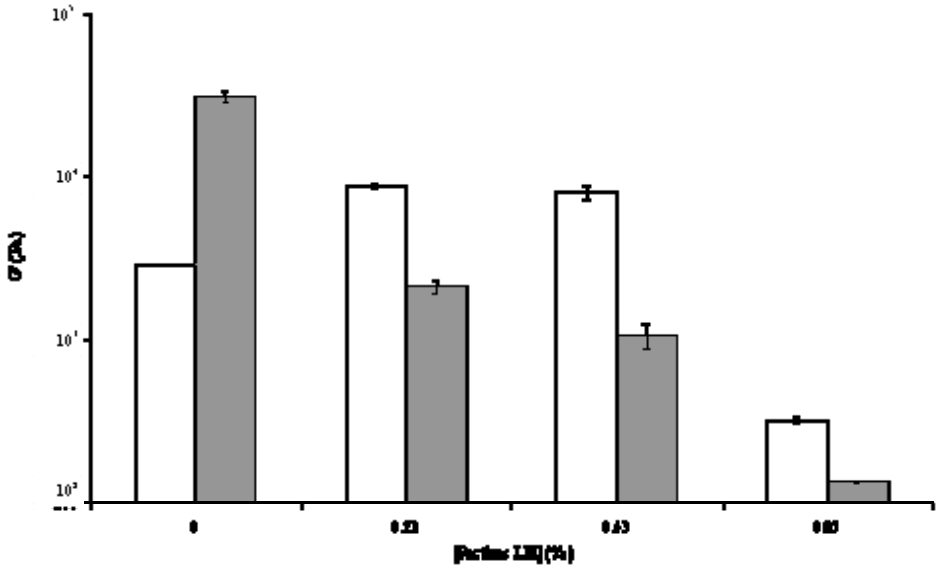


Figure VI.8 Comparaison des modules G' finaux en présence de $CaCl_2$ 3 mM dans l'eau (barres vides) ou NaCl 100 mM (barres pleines) à pH 6,8 pour des gels de *β*-Lg (8 %) en fonction de la concentration en Pectines LM (2 mesures pour chaque condition).

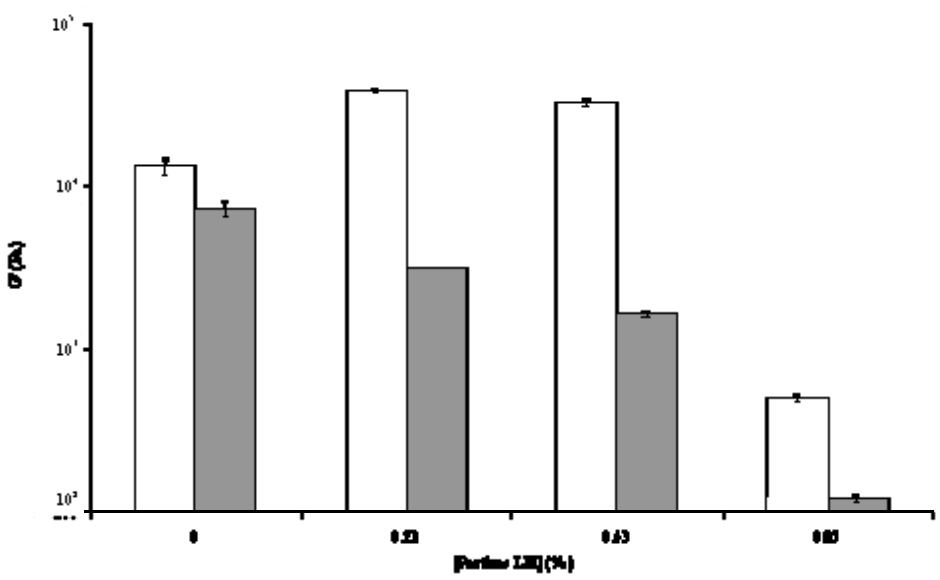
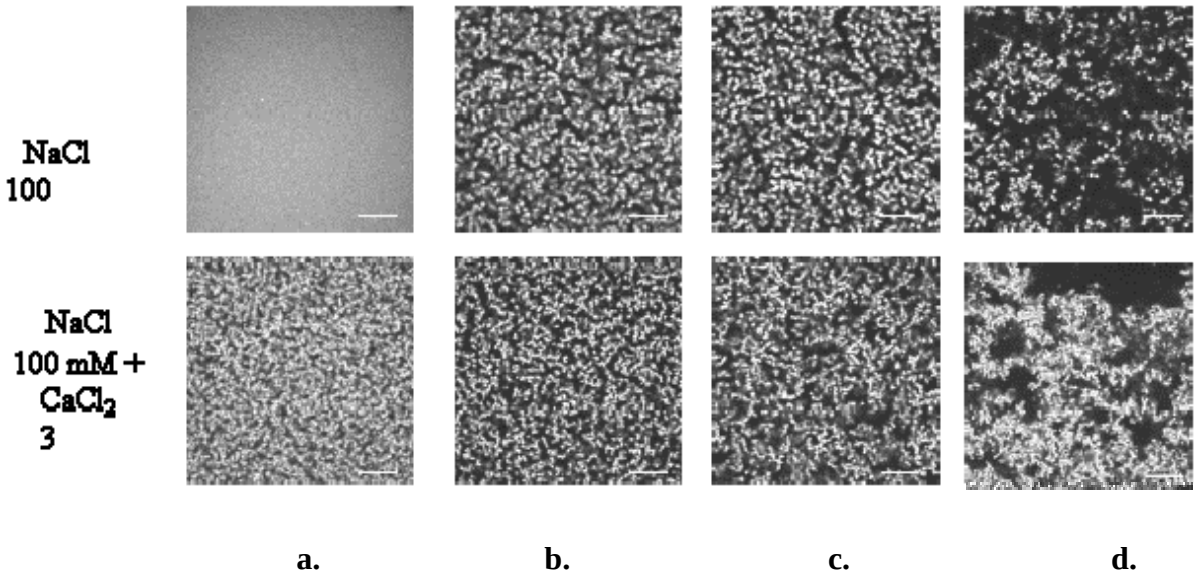


Figure VI.9 Observations par MCBL des systèmes en absence et en présence de $CaCl_2$ 3 mM dans NaCl 100 mM à pH 6,8: β-Lg-RITC (**a**); mélanges β-Lg-RITC/Pectines LM 0,21 (**b**), 0,43 (**c**) et 0,85 (**d**) % après une heure à 20 °C. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.



Les clichés MCBL des mélanges (Figure VI.9 bcd-1ère rangée) sont nettement différents de ceux décrits précédemment. Dans ce cas, on note la présence de microsphères protéiques (zones claires) (de diamètre de l'ordre de 2 µm) insérées dans la phase pectique (zones sombres). Quelle que soit la concentration en pectines, toutes ces structures se ressemblent. Dans aucun cas, on ne note de gouttelettes de pectines enchâssées dans le réseau protéique. En comparaison avec les clichés de la Figure VI.3, l'étendue des zones sombres paraît plus large en NaCl 100 mM. Il apparaît clairement que la séparation de phase est plus marquée en présence de NaCl que dans l'eau et aucune inversion de phase n'est observée. La différence de rigidité des gels par rapport à l'eau pourrait être ainsi liée à ces différences structurales.

V.1.2.2 Effet de l'ajout de calcium

Les mêmes figures (Figures VI.5, VI.6 et VI.9) illustrent l'effet de l'ajout de calcium dans les systèmes. Le profil de gélification de la β-Lg (Figure VI.5) reste le même que dans l'eau (Figure VI.1), des gels plus rigides étant obtenus en présence de NaCl. La présence de calcium se traduit par un effet opposé à celui mis en évidence dans l'eau : un affaiblissement du gel est observé (G' diminue d'un facteur 4 environ). Le même comportement a été observé

par Kuhn & Foegeding (1991) en présence de ces deux types de sels, mais dans des conditions différentes (β-Lg 7 %, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 20 mM, pH 7).

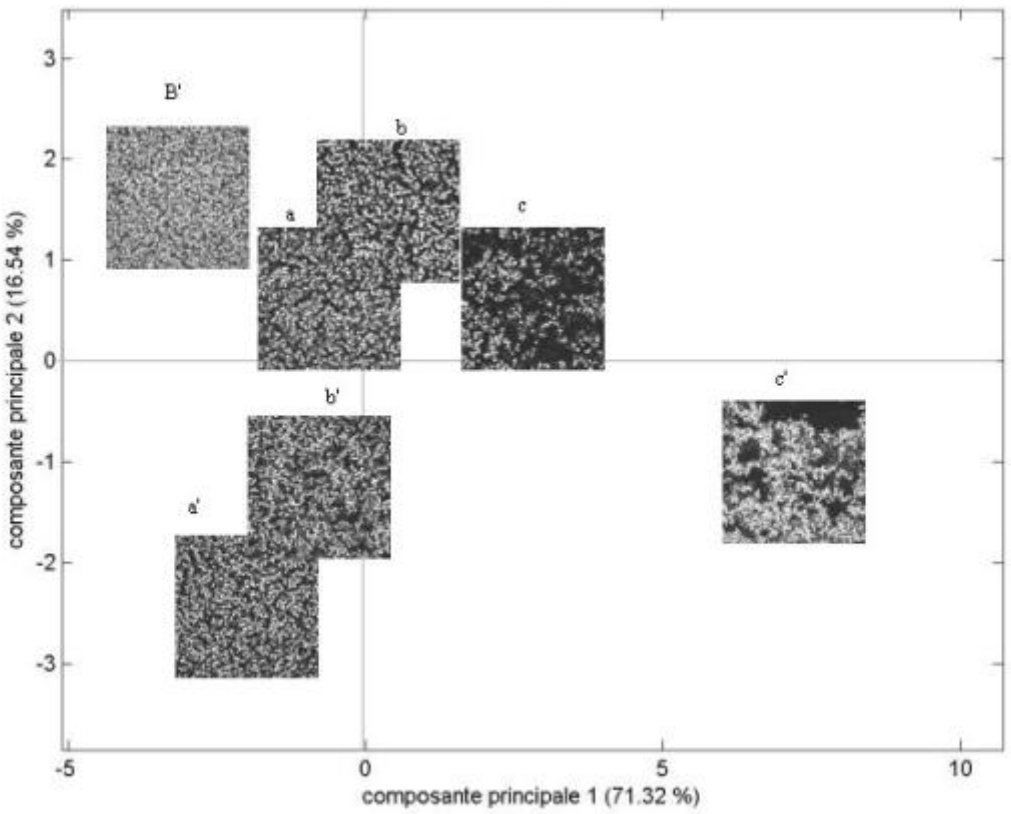
La structure finale du gel (Figure VI.9 a-2ère rangée) montre une distribution non homogène de la fluorescence avec des particules sphériques concentrées en protéines, de petites tailles (< 2 μm), connectées entre elles et séparées par des zones sombresdépourvues de protéines. Par rapport aux systèmes sans calcium (Figure VI.3 a-1ère rangée), où aucune structure n'est visible, cette organisation structurale suggère une diminution de la connectivité du réseau qui pourrait expliquer l'affaiblissement du gel mis en évidence en rhéologie. Notons que cet effet a déjà été constaté pour le gel de SAB 2 % dans les mêmes conditions (Figure IV.12).

Pour les mélanges contenant 0,21 et 0,43 % de pectines LM, l'addition de calcium se traduit par des profils similaires à ceux obtenus en NaCl seul et dans l'eau (Figure VI.5). En comparant les modules finaux des gels dans NaCl et dans l'eau en présence de calcium (Figure VI.8) on remarque que les gels obtenus dans NaCl sont moins rigides. Les spectres mécaniques des mélanges en présence de NaCl et de calcium, se rapprochent de celui de la protéine seule et des systèmes sans calcium (Figure VI.6).

En présence de 0,85 % de pectines, on retrouve des profils de même type que dans l'eau (avec ou sans $CaCl_2$) et que dans NaCl 100 mM: G' augmente plus lentement à 80 °C en présence de calcium mais à la fin du processus thermique un gel de fermeté équivalente à celui obtenu en absence de calcium est observé. Le spectre mécanique de ce mélange (Figure VI.6) montre que le caractère élastique du système est légèrement plus marqué en présence de calcium (à 1 rad.s^{-1}, tan $\delta \sim$ 0,09 contre ~ 0,16 en absence de calcium). Pour la protéine seule, le même type de spectre est observé en présence et en absence de calcium (tan δ = ~0,11 à 1 rad.s^{-1}).

Les structures correspondantes (Figure VI.9 bcd-2ème rangée) sont assez proches de celles observées sans ajout de calcium (Figure VI.3 bcd-2ème rangée). Pour les mélanges et la protéine seule en présence de calcium, la carte factorielle des deux premières composantes principales est représentée sur la Figure VI.10. Les systèmes situés vers la droite de l'axe 1, sont caractérisés par des variables (énergie, moment différentiel inverse et corrélation) mettant en évidence une séparation de phase de plus en plus marquée. On remarque que ce classement correspond à une concentration croissante en pectines. La plus faible rigidité des systèmes mesurée en rhéologie peut ainsi être attribuée à la diminution de connectivité du réseau protéique.

Figure VI.10 Carte factorielle des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM : *β*-Lg 8% en présence de calcium (B'); mélanges *β*-Lg 8% /Pectines LM 0,21 (a, a') ; 0,43 (b, b') , 0,85 (c, c') en absence (a, b, c) ou en présence de $CaCl_2$ 3 mM (a', b', c') à pH 6,8. Pour chaque système une image représentative est placée au milieu du groupe de 10 images.



Sur l'axe 2, les images situées vers le haut de l'axe sont caractérisées par les variables entropie et corrélation traduisant de nombreuses variations de niveaux de gris et des systèmes plus hétérogènes par contraste au bas de l'axe défini par les variables écart, contraste, énergie traduisant des structures organisée de façon plus régulière. On peut remarquer que cette distinction est liée à la présence ou non de calcium: les systèmes situés vers le haut de la carte factorielle étant ceux ne contenant pas de calcium.

L'image obtenue pour la protéine seule en présence de calcium (B) se situe au niveau du groupe des mélanges en absence de calcium selon l'axe 2 et à gauche du système contenant 0,21 % de Pectines LM (a) selon l'axe 1. L'addition de calcium à la protéine semble donc avoir un effet analogue au niveau des clichés microscopiques que l'addition d'une faible concentration de pectines LM.

V.1.2.3 Conclusions

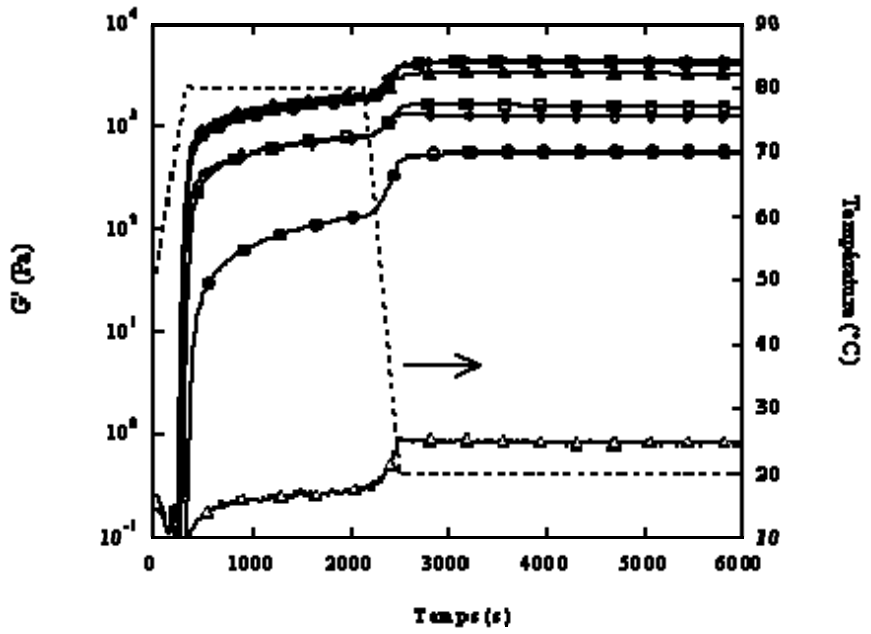
L'ensemble de ces observations suggère que les propriétés des mélanges contenant 0,21 et 0,43 % de pectines en présence ou non de calcium sont gouvernées par le gel protéique et que la contribution du gel pectique, qui peut se former en présence de calcium, est faible. Les interactions β-Lg/calcium seraient alors dominantes. Pour le mélange contenant 0,85 % de pectines en présence de calcium, la cinétique de gélification à 80 °C est nettement ralentie en raison de la séparation de phase plus marquée et la contribution du gel pectique serait plus marquée dans ces conditions au cours du refroidissement. Dans ce cas une partition des ions calcium entre les deux phases du système au cours du processus thermique n'est pas à exclure. Cependant, le fait que des gels de propriétés viscoélastiques très voisines sont obtenus en présence ou en absence de calcium suggère qu'à la fin du processus le réseau pectique est, quoiqu'il en soit, très faible.

VI.2 Comparaison avec les systèmes à base de SAB

VI.2.1 Influence de la nature du solvant sur la gélification des protéines seules

La Figure VI.11 présente les profils de gélification de la SAB et des mélanges SAB/pectines LM dans l'eau en présence ou non de calcium. Les courbes correspondant à la protéine seule et aux mélanges contenant 0,85 % de pectines ont été présentées dans le chapitre V (Figure V.5 et V.13).

Figure VI.11 Gélification des systèmes dans l'eau : SAB 8 % (r), mélanges SAB 8 %/Pectines LM 0,21 (™); 0,43 (£); 0,85 (¯) % en présence (symboles pleins) ou en absence (symboles vides) de 3 mM $CaCl_2$ à pH 6,8.



Nous avons montré précédemment que la concentration de 8 % est très proche de la concentration critique de gélification de la SAB dans l'eau (Figure V.5 et V.6) alors que pour la *β*-Lg les résultats suggèrent que l'on se situe bien au-delà de cette concentration. Dans le chapitre III nous avons également souligné que les concentrations critiques de gélification de la SAB sont plus élevées que celles évaluées pour la *β*-Lg dans l'étude de Baussay *et al.* (2003). Cette comparaison a toutefois été établie à partir d'échantillons dialysées dans les deux cas et après un temps de chauffage à 80°C très long (24 h pour la *β*-Lg et 48 h pour la SAB). Les différences de comportements observées dans le présent chapitre pour la *β*-Lg par rapport à la SAB pourraient être liées, d'une part, à la durée de chauffage qui affecte les concentrations critiques de gélification des gels de SAB (Figure III.3a), ceci n'ayant pas été montré à notre connaissance pour les gels de *β*-Lg, et d'autre part, à la contribution des ions présents dans les échantillons qui pourrait ne pas être négligeable dans ces conditions.

L'ajout de NaCl (100 mM) se traduit pour les deux protéines par un renforcement des gels. Le profil de gélification de la *β*-Lg (figure VI.5) est identique à celui de la SAB mais des gels plus fermes sont obtenus (G'~3,5 $*10^4$ Pa contre ~ $5*10^3$ Pa pour la SAB). Les ions sodium écrantant les répulsions électrostatiques entre les protéines dénaturées, la différence de rigidité entre les deux systèmes pourrait provenir d'une différence de charge nette des deux protéines au pH de l'étude (égale à –18 pour la SAB et –7,8 pour la *β*-Lg).

L'ajout de calcium (3 mM) à la *β*-Lg se traduit par un renforcement des gels moins marqué pour la SAB que pour la *β*-Lg (G' est ~5 fois plus grand alors que G' passe de 1 à 3000 Pa pour la SAB) (Figure VI.1). Ce renforcement peut être attribué à des interactions

spécifiques entre les ions calcium et la protéine. Or, il a été noté dans le cas des protéines natives, que l'affinité des ions calcium est assez faible (Peters, 1996; Dufour *et al.*, 1994). Il est cependant possible que dans l'état dénaturé cette affinité soit modifiée pour les deux protéines.

L'ajout de calcium (3 mM) en présence de NaCl (100 mM) se traduit de façon opposée pour les deux protéines. Alors qu'un gel moins rigide est formé avec la *β*-Lg (Figure VI.8), un renforcement du gel du gel de SAB a été observé (Figure V.26). Ces résultats suggèrent que la concentration en sels optimale en deçà de laquelle le gel est renforcé a été dépassée par la présence simultanée des deux cations pour la *β*-Lg.

VI.2.2 Gélification des mélanges

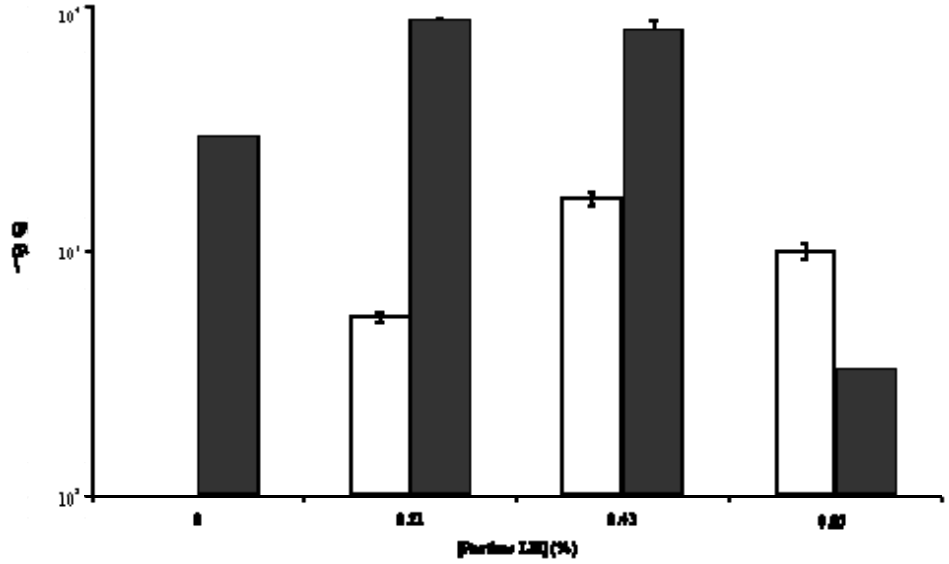
VI.2.2.1 Gélification des mélanges dans l'eau

- *En absence de calcium*

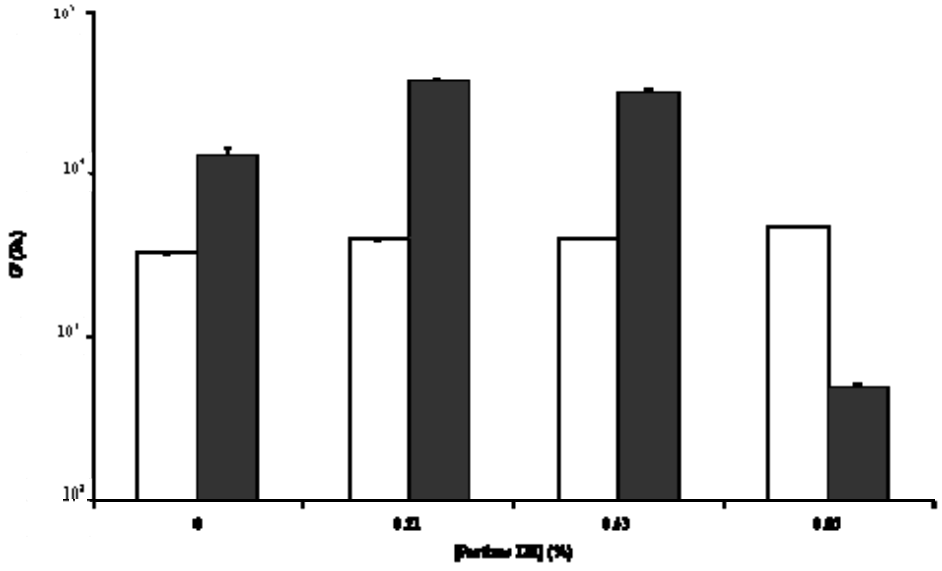
Par rapport aux résultats du chapitre V sur le mélange SAB/pectines LM 0,85 %, la Figure VI.11 montre que les profils de gélification en présence de concentrations en pectines plus faibles (0,21 et 0,43 %) sont identiques. Un renforcement du gel de protéines seules est observé et ce de façon moins marquée en présence de 0,21 % de pectine. Ceci est attribué à la séparation de phase au sein des mélanges qui concentre localement la protéine. Comme le montrent les structures des systèmes observés (Figure VI.13 –1ère rangée), cette séparation de phase est plus marquée lorsque la concentration en pectines augmente.

La Figure VI.12 a compare les modules G' finaux mesurés pour les systèmes à base de *β*-Lg et SAB en absence de calcium. La rigidité maximale de ces mélanges est mesurée en présence de 0,21 % de pectines avec la *β*-Lg et 0,43 % de pectines avec la SAB. Ceci peut être mis en relation avec les différences très nettes de structures observées entre les deux systèmes, les systèmes à base de *β*-Lg présentant une inversion de phase (Figure VI.3).

Figure VI.12 Comparaison des modules G' finaux dans l'eau des systèmes à base de SAB (barres vides) et à base de β-Lg (barres pleines) en fonction de la concentration en pectines LM à pH 6,8 en absence (a) et en présence (b) de 3 mM $CaCl_2$ (2 mesures pour chaque condition).

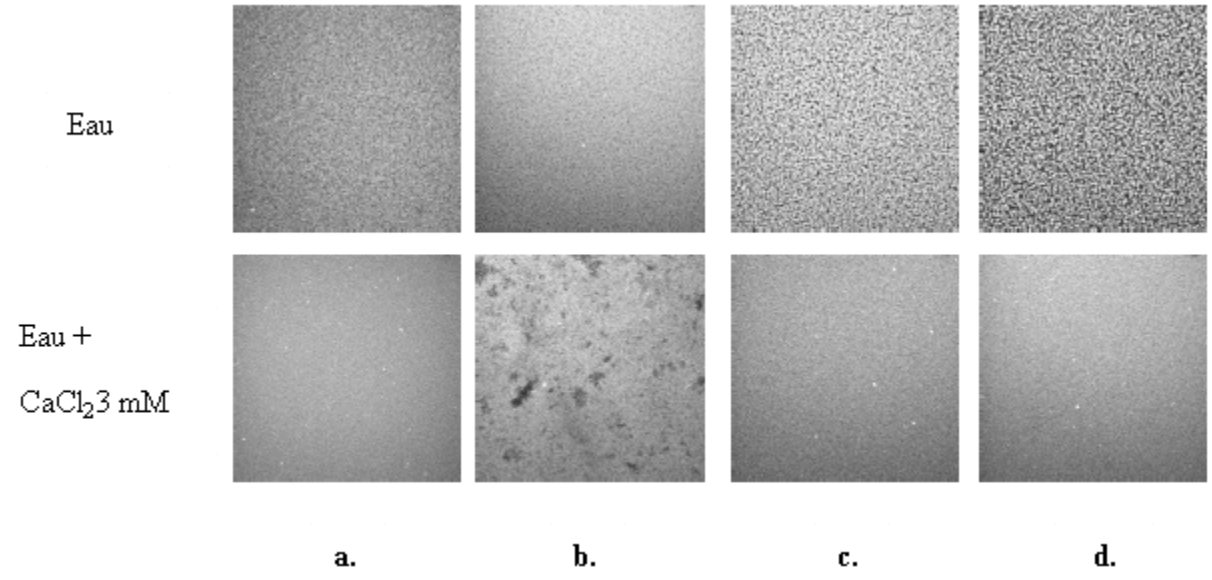


a.



b.

Figure VI.13 Observations par MCBL des systèmes en absence et en présence de $CaCl_2$ 3 mM dans l'eau à pH 6,8 : SA*B*-RITC (**a**), mélanges SA*B*-RITC/Pectines LM 0,21 (**b**), 0,43 (**c**) et 0,85 (**d**) %. Les protéines apparaissent en clair. Barre d'échelle 25 µm.



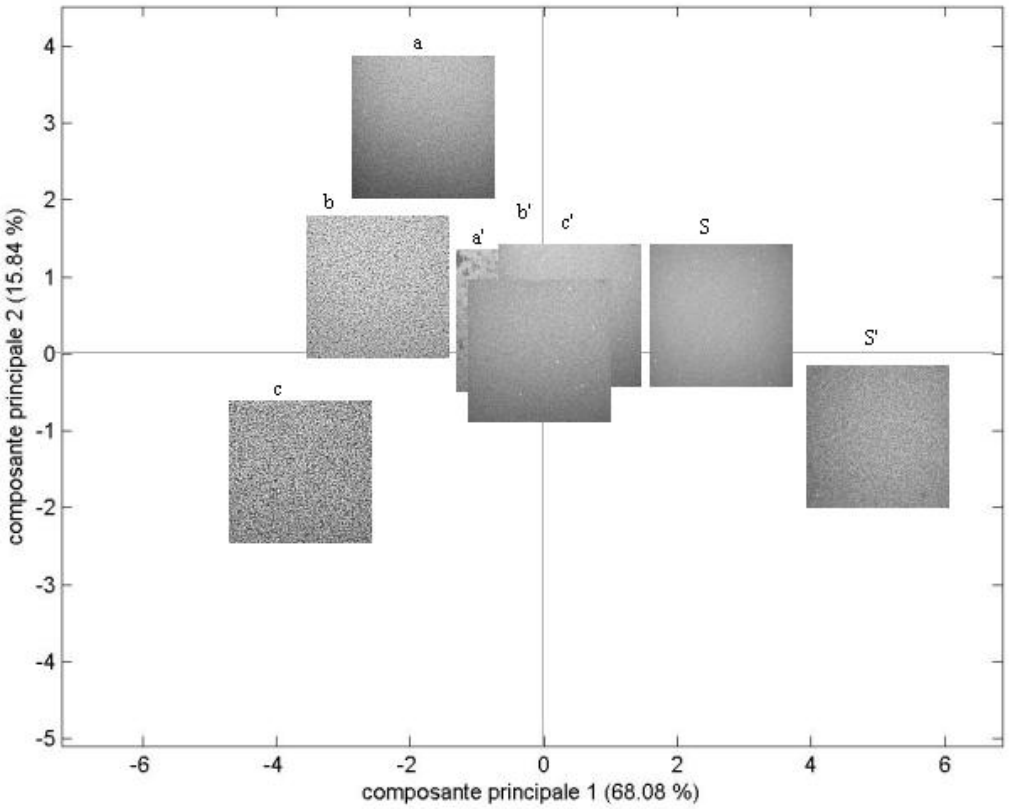
- *En présence de calcium*

L'ajout de calcium au mélange contenant la SAB se traduit par une rigidité plus élevée mais indépendante de la concentration en Pectines LM (les courbes sont quasiment superposées) (Figure VI.11). Nous avons déjà montré dans le chapitre V que les spectres mécaniques des mélanges en présence de calcium ont la même allure que celui de la protéine seule en présence de calcium, comme pour les systèmes à base de *β*-Lg.

D'après la Figure VI.12b, montrant les rigidités finales des gels à base des deux protéines globulaires, en présence de calcium, on constate que la rigidité des systèmes à base de *β*-Lg augmente en présence de pectines LM 0,21 et 0,43 % puis diminue fortement pour 0,85 % alors que pour la SAB la rigidité varie peu en fonction de la concentration en pectine.

Contrairement aux mélanges *β*-Lg/pectines LM, aucune structure des gels SAB/pectines LM (0,43 et 0,85 %) n'est visible par MCBL (Figure VI.13 cd-2ème rangée). Le mélange contenant 0,21 % de Pectines LM (Figure VI.13 *b*-2ème rangée) présente toutefois une certaine hétérogénéité de fluorescence. La carte factorielle des deux premières composantes principales des images obtenues pour les systèmes contenant la SAB est présentée en Figure VI.14.

Figure VI.14 Carte factorielle des structures finales des systèmes dans l'eau à pH 6,8 : SA*B*-RITC 8 % (S, S'), des mélanges SA*B*-RITC (8%) /Pectines LM 0,21 (a, a') ; 0,43 (b, b') , 0,85 (c, c') en absence (S, a, b, c) ou en présence de $CaCl_2$ 3 mM (S', a', b', c'). Pour chaque système une image représentative est placée au milieu du groupe de 10 images.



Comme pour les systèmes à base de *β*-Lg, la distinction des systèmes se fait selon la présence de calcium dans le système (selon l'axe 1) et selon les différences de concentrations en pectine (selon l'axe 2). Cependant aucune distinction n'a été faite entre les mélanges SAB/pectines LM en présence de calcium. Quelle que soit la concentration en pectines LM, l'addition de calcium se traduit par une homogénéisation du système. Les images de la protéine seule sont proches de celles des mélanges en présence de calcium. Ce classement peut être mis en relation avec les rigidités des gels qui sont similaires.

L'analyse d'images des structures finales des systèmes à base de *β*-Lg et de SAB dans ces conditions ne donnent pas d'informations supplémentaires car les différences entre ces systèmes sont clairement visibles à l'œil nu.

L'augmentation de rigidité en absence de calcium pour les deux types de systèmes pourrait ainsi être attribuée aux interactions protéine/calcium qui domineraient les interactions

pectines/calcium. D'après les différentes structures obtenues, on peut supposer que dans le cas des systèmes à base de β-Lg, l'étendue de la séparation de phase est beaucoup plus marquée.

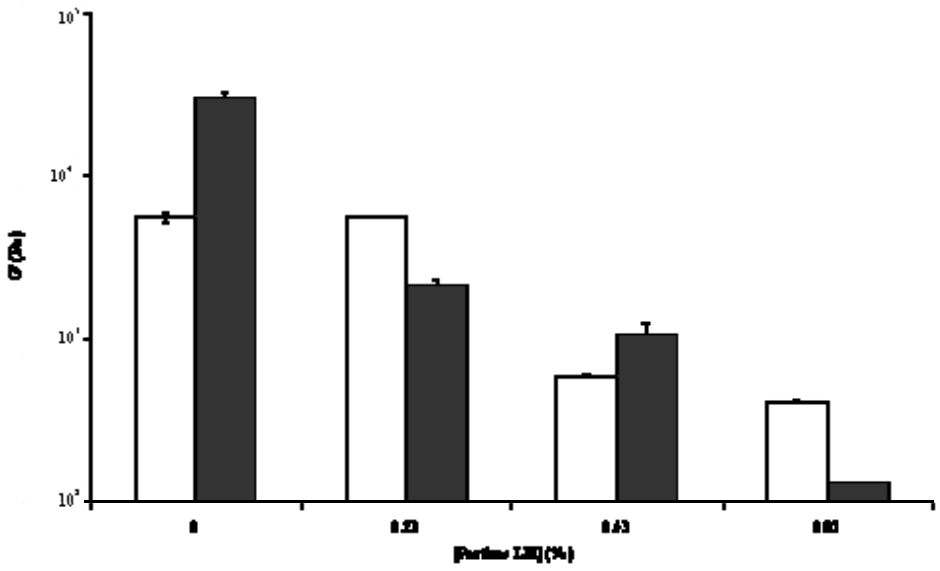
VI.2.2.2 Gélification des mélanges dans NaCl 100 mM

L'ensemble des modules finaux des gels obtenus dans NaCl 100 mM pour les deux types de protéines globulaires est présenté sur la Figure VI.15.

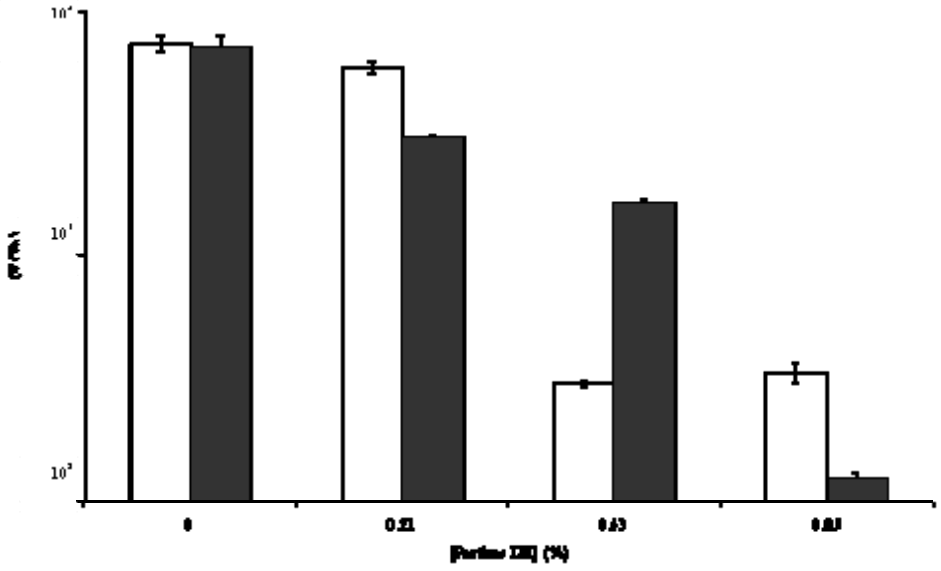
La présence de concentrations croissantes en pectines se traduit pour les deux systèmes par une diminution de la rigidité des gels. En absence de calcium (Figure VI.15a), cette diminution est marquée à partir de 0,43 % de pectines LM pour la SAB et dès 0,21 % de pectines pour la β-Lg. En présence de calcium (Figure VI.15b), cette diminution est plus marquée à partir de 0,43 % de pectines en mélange avec la SAB et à partir de 0,85 % de pectines pour la β-Lg.

Les structures des gels à base de SAB dans NaCl 100 mM, décrits dans le chapitre IV (Figures IV.8 et IV.18), sont assez similaires à celles observées en présence de β-Lg (Figure IV.9). Nous avons donc comparé les ultrastructures des deux systèmes entre elles en séparant les systèmes avec et sans calcium.

Figure VI.15 Comparaison des modules G' finaux dans NaCl 100 mM des systèmes à base de SAB (barres vides) et à base de *β*-Lg (barres pleines) en fonction de la concentration en pectines LM à pH 6,8 en absence (a) et en présence (b) de 3 mM $CaCl_2$ (2 mesures pour chaque condition).



a.

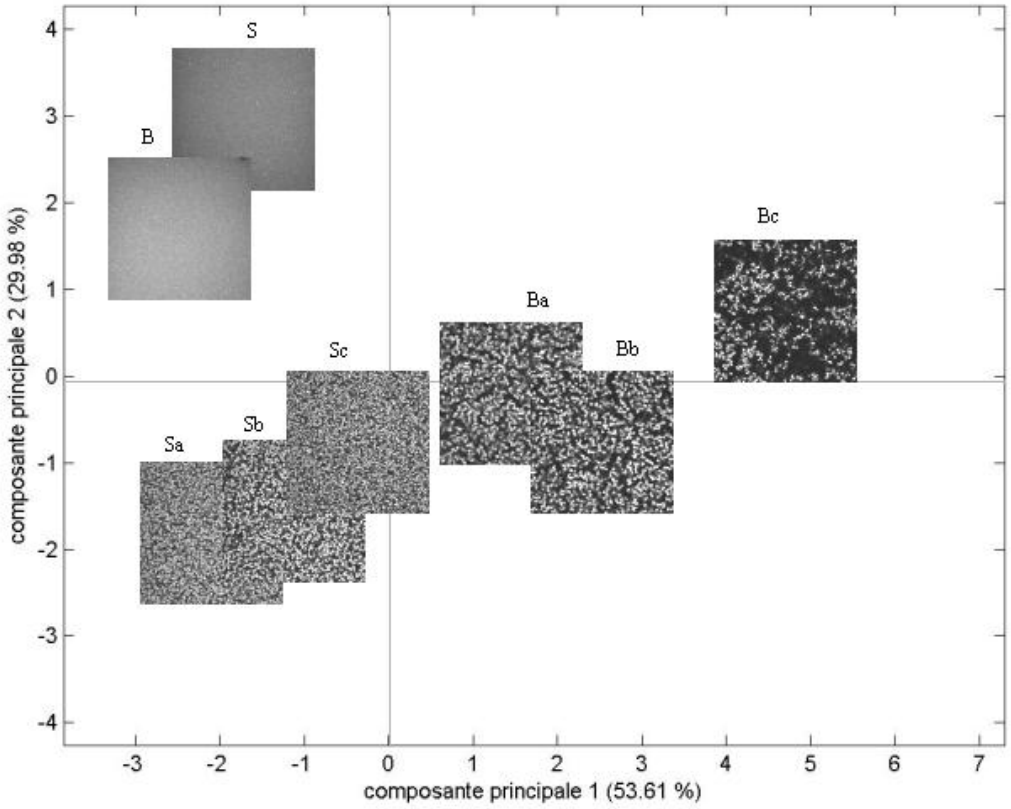


b.

- *Ultrastructure en absence de calcium*

La carte factorielle des deux premières composantes principales de l'analyse d'images des systèmes à base de *β*-Lg et SAB en absence de calcium est présentée sur la Figure VI.16. L'axe 1 sépare nettement les images en deux groupes selon de la nature de la protéine globulaire.

Figure VI.16 Carte factorielle obtenue des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM : SAB (S); *β*-Lg (B) 8%; mélanges de SAB ou *β*-Lg 8%/Pectines LM 0,21 (Sa, Ba); 0,43 (Sb, Bb) , 0,85 (Sc, Bc) à pH 6,8.



Les mélanges à base de *β*-Lg se situent vers la droite de l'axe et les systèmes à base de SAB vers la gauche de l'axe. Au sein de chaque groupe d'images regroupant les mélanges, on constate que l'axe 1 sépare les images en fonction de la concentration en pectines LM: elles se décalent vers la droite de l'axe 1 quand la concentration en pectines augmente. Les paramètres associés à la partie droite de l'axe sont l'énergie, le moment différentiel inverse et la corrélation traduisant de grandes zones de même intensité de niveaux de gris ce qui indique

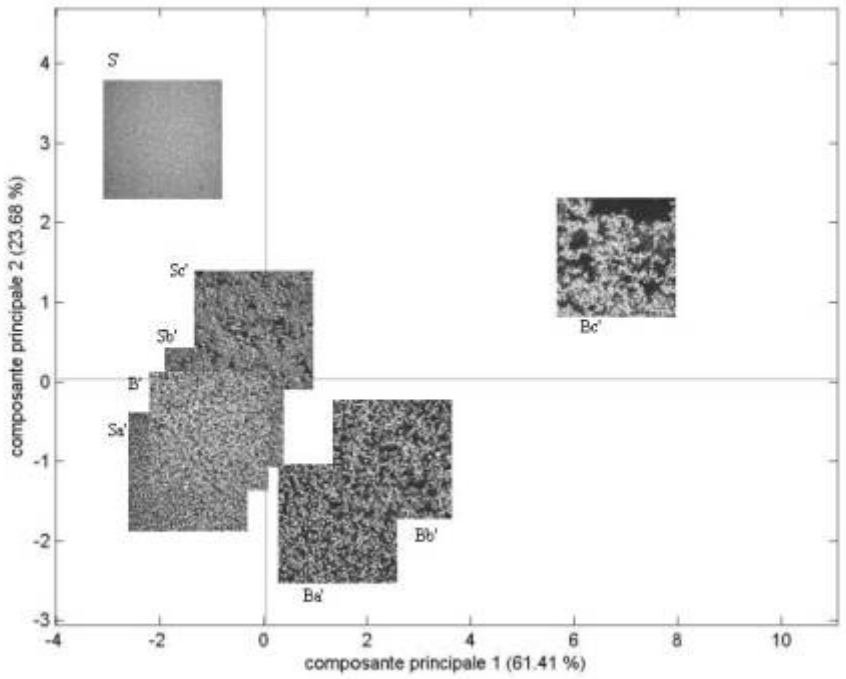
que la séparation de phase est plus prononcée. A l'opposé, les paramètres associés à la partie gauche de l'axe sont l'entropie et le contraste traduisant des systèmes avec un réseau protéique plus dense et des zones sombres de petites tailles. Ce type de structure pourrait ainsi expliquer que la diminution de rigidité induite par la présence de pectines LM soit visible pour une faible quantité de pectines (0,21 %) pour les système à base de *β*-Lg et non pour ceux à base de SAB.

L'axe 2 sépare les images correspondant à la protéine seule (en haut de l'axe) des mélanges (en bas de l'axe). Dans ce cas la nature de la protéine ne semble pas influencer la structure des systèmes car les images sont proches l'une de l'autre sur la carte factorielle.

- *Ultrastructure en présence de calcium*

La carte factorielle des deux premières composantes principales de l'analyse d'images des systèmes à base de *β*-Lg et SAB en présence de calcium est présentée sur la Figure VI.17. La même discrimination des systèmes a lieu qu'en absence de calcium. Le mélange *β*-Lg/pectines 8 % (Bc') est nettement isolé à droite de l'axe, indiquant une séparation de phase plus marquée qui peut être rapprochée de la forte diminution de rigidité observée en rhéologie. On remarquera cependant que l'image correspondant au gel de *β*-Lg seule se trouve dans le groupe d'images correspondant aux mélanges SAB/Pectines LM.

Figure VI.17 Carte factorielle obtenue des structures finales des systèmes dans NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 3 mM : SAB (S') et β-Lg (B') 8%; mélanges de SAB (S) ou β-Lg (B) 8%/Pectines LM 0,21 (Sa', Ba'); 0,43 (Sb', Bb'), 0,85 (Sc', Bc') à pH 6,8.



VI.3 Conclusions

Nous avons étudié sur des bases similaires à la SAB l'influence de la concentration en pectines LM et l'influence de la nature du solvant sur la gélification thermique de la β-Lg. Comme pour la SAB, une certaine diversité de propriétés et de structures ont été mises en évidence. Cependant pour des conditions de concentrations en biopolymères équivalentes et pour les mêmes conditions de milieu, des différences sont observées dans ces mélanges selon le type de protéines globulaires.

Dans l'eau, les différentes structures suggèrent que la séparation de phase est plus marquée pour les mélanges β-Lg/pectine que pour les mélanges équivalents à base de SAB. Dans NaCl 100 mM, les structures sont moins discernables à l'œil nu et l'analyse d'image a permis de classer celles-ci selon la nature de la protéine globulaire. Dans ce cas, la séparation de phase semble plus marquée pour la β-Lg.

D'après l'ensemble des observations, en comparant avec la représentation schématique établie par Syrbe (1997) des structures résultantes de la compétition entre séparation de phase

et gélification (Figure I. 25), on peut supposer que la séparation de phase au moment de la formation du réseau protéique soit plus avancée en présence de β-Lg qu'avec la SAB.

La partition des ions calcium dans les systèmes pourrait différer selon le type de système. Dans l'eau, il semble que les ions interagissent majoritairement avec la protéine mais, dans le cas des mélanges contenant la β-Lg, une partie serait également disponible pour les pectines LM. Dans NaCl 100 mM, il semble que les interactions pectines LM/calcium soient plus grandes que pour le système à base de SAB, car pour la β-Lg la gélification du mélange est toujours majoritairement gouvernée par celle de la protéine. Ces différences pourraient être liées aux différentes affinités des protéines pour les ions calcium et aux changements structuraux impliqués lorsque ces interactions s'établissent.

Conclusion générale

Ce travail de thèse avait pour objectif de comprendre la structuration et les propriétés des mélanges protéines globulaires/pectines LM soumis à un traitement thermique. La majorité de ce travail a porté sur les systèmes à base de SAB et une partie sur les systèmes contenant la β-Lg.

Dans cette optique, **la structure** des systèmes a été observée à différentes échelles à l'aide de plusieurs techniques:

- La diffusion de la lumière couplée aux mesures de turbidité a permis de caractériser la structure des gels de SAB après chauffage à 80 °C entre ~50 et 500 nm. Les mesures de diffusion de la lumière ont été réalisées de façon analogue à celles effectuées sur d'autres protéines globulaires (α-Lactalbumine (Weijers *et al.*, 2004) et β-Lactoglobuline (Pouzot *et al.*, 2004b).

- Les systèmes mixtes et les gels de SAB ont été observés à des échelles plus grandes, de l'ordre du μm, par microscopie confocale à balayage laser (MCLB). Cette technique est couramment employée dans l'observation des mélanges de biopolymères (Turgeon *et al.*, 2003). Les observations ont pu être réalisées au cours du processus thermique à l'aide d'une platine chauffante permettant ainsi une approche de caractérisation dynamique de la structure. Peu d'études similaires ont été réalisées à ce jour. Une approche comparable a cependant été utilisée récemment sur l'étude des mélanges β-Lg/amylopectine par Olsson *et al.* (2002).

- Les clichés de MCBL ont ensuite été comparés entre eux de façon objective par une méthode d'analyse de «texture» d'image, la méthode de co-occurrence. Cette méthode est basée sur la description des variations de niveaux de gris de l'image. Elle permet de distinguer clairement des systèmes qui, à l'œil nu, peuvent paraître semblables. Cette approche employée jusqu'à présent dans des domaines différents, à partir d'observations réalisées avec d'autres techniques d'acquisition (images modélisées, images satellites, images médicales), est nouvelle dans le domaine des biopolymères. Elle représente ainsi un enjeu intéressant dans

l'exploitation des données issues des observations microscopiques. Toutefois, cette méthode ne permet pas de caractériser de façon précise la structure des systèmes. Pour cela, nous avons tenté d'appliquer une autre méthode d'analyse d'images, en utilisant la fonction de corrélation de paires définie à partir de l'intensité des pixels de l'image. Nous n'avons cependant pas déterminé la structure de façon précise car un certain nombre d'hypothèses (épaisseur des pixels, relation entre l'intensité et la concentration en biopolymère) n'ont pas pu être vérifiées.

De manière pertinente, les observations MCBL ont pu être comparées aux **propriétés rhéologiques** aux faibles déformations mesurées au cours du processus thermique appliqué (chauffage des systèmes de 50 à 80 °C et refroidissement à 20 °C).

L'ensemble des techniques mises en œuvre a permis d'apporter des informations sur les **propriétés rhéologiques et structurales des biopolymères seuls et de leurs mélanges.**

- Concernant **les pectines LM,** la gélification en présence des ions calcium et l'effet de la présence de NaCl ont été décrits. Les conditions de concentration choisies s'étendant du régime dilué à semi-dilué ($C[\eta]$ variant de 0,5 à 2) et la concentration en $CaCl_2$ (3 mM) retenue ont montré des comportements généraux proches de ceux décrits dans la littérature (Garnier *et al.*, 1993).

- Une étude approfondie de la structure et des propriétés rhéologiques des gels de **SAB** a été réalisée. Elle a permis de caractériser les gels à une échelle différente de celles évoquées jusqu'à présent dans la littérature. En effet, l'influence du NaCl sur la structure des gels de SAB avait été caractérisée par diffusion des rayons X aux petits angles (Clark & Tuffnell, 1980) et par microscopie électronique (Clark *et al.*, 1981) mais aucune étude n'avait été réalisée sur la structure des gels à pH neutre, en présence de NaCl ou de $CaCl_2$ à une autre échelle d'observation probablement du fait de la turbidité des systèmes. L'utilisation de la diffusion de la lumière en milieu turbide a permis l'étude de tels systèmes, dans une gamme de concentrations toutefois réduite si la turbidité est trop grande. L'utilisation de la microscopie confocale de façon complémentaire a permis de visualiser (sans caractériser de façon précise) la structure des gels à une échelle plus grande. Ces observations ont pu alors être corrélés avec les différences de rigidités des gels mesurées en rhéologie.

En outre, les mesures de turbidité et de diffusion de la lumière réalisées au cours du chauffage ont permis d'appréhender l'évolution de la structuration des gels de SAB en fonction du temps, ce qui n'avait pas été évoqué jusqu'à présent.

De l'ensemble des résultats, nous avons montré que, selon la teneur et la nature des sels, des gels filamenteux plus ou moins turbides ou des coagula opaques pouvant précipiter sont formés au-delà d'une concentration critique de gélification.

Au cours du chauffage, les ions sodium vont écranter les charges des protéines dénaturées et l'augmentation de la teneur en sel se traduit par une augmentation de la masse apparente (m_a) des agrégats. Pour NaCl > 10 mM, en augmentant la concentration en SAB, nous avons montré que m_a passait par un maximum au niveau de la concentration critique de gélification du fait d'une agrégation protéique croissante. Au-delà, la diminution de m_a pourrait s'expliquer l'augmentation des interactions électrostatiques répulsives et des interactions d'exclusion de volume entre agrégats protéiques.
Pour des forces ioniques supérieures ou égales à 100 mM, une nouvelle augmentation de m_a a été notée. Aucune explication n'a pu être donnée à ce phénomène.

Concernant l'effet des ions calcium sur les propriétés des gels de SAB il semblerait que le rapport molaire R = $[Ca^{2+}]/[SAB]$ joue un rôle déterminant sur la structure et les propriétés des gels. Pour des concentrations en calcium inférieures ou égales à $CaCl_2$ 1,5 mM, l'augmentation de la teneur en calcium (et par conséquent de R) se traduit par une augmentation de m_a et cet effet est moins marqué lorsque la concentration en SAB augmente (et de ce fait diminue R). Pour des concentrations supérieures en $CaCl_2$ (3-33 mM), m_a n'est plus mesurables car les systèmes sont trop turbides et les observations en MCBL ont montré des structures de plus en plus hétérogènes. D'un point de vue rhéologique, l'ajout de calcium se traduit par une augmentation de la rigidité des gels de SAB 8 % jusqu'à un maximum évalué à $CaCl_2$ 4 mM.

Il est important de noter que les mesures de turbidité et de diffusion de la lumière ont été réalisées après un chauffage de 48 h à 80 °C alors que les observations MCBL et les mesures rhéologiques ont été réalisées après un chauffage de 30 min, ce qui peut limiter la comparaison des résultats. En effet, le temps de chauffage semble affecter de façon significative la structure des gels, une évolution de la turbidité et des m_a ayant été notée au cours d'un chauffage de 48 h.

Pour les **mélanges protéines globulaires/pectines LM, l**orsque la protéine est sous forme native, les mélanges formés sont homogènes et les biopolymères sont compatibles. A l'inverse, une séparation de phase est observée après un traitement thermique à 80 °C et nous avons montré comment les concentrations en biopolymères et les conditions ioniques pouvaient intervenir dans le processus pour aboutir à une gamme assez large de structures et de comportements théologiques.

L'ensemble de nos observations sur la base des mesures rhéologiques et de la microscopie nous permet de distinguer deux types de comportements.

-Processus 1: Le profil rhéologique du mélange et l'allure des spectres mécaniques sont identiques à ceux de la protéine. Seule la rigidité des gels diffère. Le module G' augmente fortement au cours du traitement thermique et une deuxième augmentation moins importante est observée au cours du refroidissement à 20 °C. Le module mesuré au bout d'une heure à 20 °C ne varie plus et le système est stable. La gélification du mélange est gouvernée par celle de la protéine. La séparation de phase entre les pectines LM et les protéines est clairement observée. Les protéines s'agrègent sous forme de microparticules agrégées.

Ce type de processus conduit à un renforcement ou un affaiblissement du gel de protéines seules dans les différentes conditions observées:

- Pour de faibles concentrations en pectines (0,21 % soit C[η] =0,5), en mélange avec SAB 2, 4 ou 8 %, en absence de calcium, un effet synergique est mis en évidence lié à une séparation de phase relativement limitée induisant une augmentation de la concentration locale en protéine. En présence de calcium pour les mélanges contenant SAB 4 et 8 % des gels de rigidités proches de la protéine seules sont obtenus.

  Pour des concentrations en pectines plus élevées (0,43 % soit C[η] =1 et 0,85 % soit C[η] =2), en absence de calcium, les gels sont moins rigides que celui de la SAB seule en raison d'une séparation de phase prononcée diminuant la connectivité des agrégats protéiques.
- En présence de NaCl seul, dans le mélange SAB 8%/pectines LM 0,85 %, la rigidité du gel est toujours plus faible que celle du gel de SAB. La fermeté du gel en mélange diminue lorsque la concentration en sel augmente en relation avec une séparation de phase de plus en plus marquée.
- En présence de $CaCl_2$ seul (3 et 4 mM), la rigidité des gels SAB 8 %/pectines LM est très proche de celle des gels de SAB quelle que soit la concentration en pectines. Aucune séparation de phase n'a été observée à l'échelle du MCBL.
- En présence de $CaCl_2$ (3 mM) et de NaCl et pour des rapports de concentration $[Na^+]/[Ca^{2+}] <10$, les gels SAB 8%/pectines LM 0,85 % sont moins rigides que la protéine seule et la séparation de phase semble relativement limitée.
- Pour tous les mélanges étudiés à base de β-Lg (8 %), une séparation de phase est mise en évidence dans NaCl 100 mM et dans l'eau en présence ou pas de calcium

($CaCl_2$ 3 mM). Les gels obtenus dans l'eau en présence ou non de calcium sont plus rigides que pour la β-Lg seule excepté ceux contenant 0,85 % de pectines. En revanche tous les gels obtenus dans NaCl, en présence ou non de calcium, sont moins rigides que celui de la β-Lg seule.

-Processus 2: Le profil rhéologique du mélange et l'allure des spectres mécaniques sont nettement différents de ceux de la protéine seule. Une faible augmentation du module G' est notée au cours du traitement thermique à 80 °C. Le module G' augmente fortement au cours du refroidissement à partir de ~ 60 °C. Le module mesuré au bout d'une heure à 20 °C ne varie plus et le système est stable. Le spectre mécanique du mélange se rapproche de celui du gel de pectines LM seule. Dans ce cas, la gélification est gouvernée par celle des pectines LM. Une séparation de phase est observée. Par rapport au processus 1, les particules protéiques sont plus agrégées et l'espace occupé par la phase continue pectique est plus large.
Ce type de processus a été observé en présence de calcium, dans les mélanges SAB (2,4,8 %)/pectines LM (0,43 et 0,85 %) et pour le mélange SAB 2 %/pectines LM 0,21 % en NaCl 100 mM. Une étude plus approfondie du mélange SAB 8%/pectines 0,85 % a montré que ce processus se produisait en présence de $CaCl_2$ (3 mM) et de NaCl pour des rapports de concentration $[Na^+]/[Ca^{2+}] > 10$.

D'après l'ensemble de ces résultats, les interactions physico-chimiques au sein des mélanges protéines globulaires/pectines LM au cours du processus thermique peuvent s'inscrire dans le cadre d'un **schéma d'interprétation général**.

Lors du chauffage, la protéine est dénaturée. Nous avons montré dans le cas des mélanges à base de SAB, que la température de transition thermique, du passage de l'état natif à l'état dénaturé, n'est pas modifiée par les pectines LM. Au sein du mélange, la présence de pectine se traduit par l'observation, en MCLB, d'inclusions sphériques riches en protéines dispersées dans une phase continue contenant les pectines. En nous appuyant sur les résultats de Syrbe (1997), nous pouvons supposer que ces structures témoignent de l'existence d'une séparation de phase de type liquide-liquide entre les biopolymères. Au long du traitement thermique à 80 °C, ces particules vont alors gélifier. A ce stade, en assimilant les structures protéiques à des particules colloïdales, on peut supposer qu'un mécanisme de déplétion-floculation des particules protéiques par la présence de pectines LM a lieu (Tuinier *et al.*, 2000) formant ainsi des agrégats protéiques de tailles variables selon les conditions. La structure observée, dès

que le plateau à 80 °C est atteint, est conservée tout au long du traitement thermique. Simultanément à cette séparation de phase, la gélification protéique tend à figer le système. Au cours du refroidissement aucun changement structural n'est observé.
La **compétition entre les cinétiques de gélification de la protéine et de démixtion** des biopolymères va ainsi déterminer la structure et les propriétés rhéologiques finales des mélanges. En présence de calcium, les pectines LM peuvent gélifier. La structure du système est ainsi modifiée: un gel constitué de protéines gélifiées et d'un réseau pectique est formé. Par ailleurs, la gélification des pectines LM ne modifie par les structures observées à l'échelle du MCLB.

Les deux processus décrits, engendrent de fait différents types d'interactions dans le mélange en fonction des paramètres intrinsèques et extrinsèques du système, en particulier les conditions ioniques.

-Processus 1: L'agrégation des particules protéiques est faiblement perturbée par la présence des pectines. Dans ce cas, la gélification du système est plus rapide que la séparation de phase. Le gel mixte est formé par un réseau protéique continu dans lequel sont réparties les pectines LM.

L'augmentation de la teneur en NaCl semble fortement influencer la floculation des agrégats protéiques du fait de l'écrantage des répulsions électrostatiques entre protéines dénaturées expliquant ainsi une séparation de phase plus prononcée.

En présence de calcium seul, en revanche, les interactions protéines/calcium sont dominantes traduisant des propriétés proches des gels de protéines seuls.

Dans le cas des systèmes à base de β-Lg 8 % dans l'eau, une inversion de phase est observée entre 0,21 et 0,85 % de pectines. Le gel mixte est alors formé par des inclusions pectiques insérées dans une phase continue protéique (pour 0,21 % de pectines LM) puis par un réseau de particules protéiques enchâssées dans la phase pectique (pour 0,85 % de pectines LM).
La taille des microsphères protéiques observées, plus grande que pour les systèmes à base de SAB, suggère que la séparation de phase est plus marquée pour les systèmes à base de β-Lg.

-Processus 2: La formation du réseau protéique est fortement contrariée par la présence des pectines, de calcium et de sodium. Dans ce cas, les interactions biopolymères/calcium au cours du processus thermique semblent différer du processus 1. Une compétition entre les interactions SAB/calcium et pectines/calcium aurait lieu. Au cours du chauffage les

interactions SAB/calcium peuvent avoir lieu renforçant les interactions entre protéines dénaturées mais elles sont gênées par la présence de pectines. Au cours du refroidissement, les interactions pectines/calcium augmentent. Ce comportement est accentué lorsque la concentration en sodium augmente ainsi que la concentration en pectines.

L'ensemble de ces travaux a été réalisé sur des systèmes modèles encore éloignés des systèmes alimentaires réels plus complexes. Néanmoins des éléments de réponse peuvent être apportés par une telle étude qui a combiné caractérisations rhéologiques, observations macroscopiques, microscopiques et la diffusion de la lumière.

Nous avons clairement montré que les systèmes protéines globulaires/pectines LM en mélange ont des propriétés différentes des biopolymères seuls. Le contrôle de la texture et de la stabilité des systèmes peut être réalisé par l'intermédiaire de nombreux facteurs extrinsèques et intrinsèques comme la nature de la protéine globulaire, la concentration en biopolymère, la durée du traitement thermique et plus particulièrement par la nature et la teneur en sels (NaCl et ou $CaCl_2$).

A l'aide des méthodes que nous avons mises en œuvre, nous ne pouvons pas conclure de façon précise sur la partition exacte du calcium dans le système au cours du processus thermique. Des essais de localisation du calcium par des observations en MCBL et par spectroscopie de fluorescence, après marquage du calcium avec la sonde fluorescente Calcium Green-2 ont été réalisés mais n'ont donné aucun résultat. Les techniques et/ou la sonde employée étant probablement inappropriées. D'autres sondes fluorescentes ou d'autres conditions opératoires (systèmes plus dilués) pourraient être envisagés pour aborder cette question.

Par ailleurs, le pH qui est un autre facteur affectant fortement la charge des biopolymères, n'a pas été considéré dans cette étude. Au vu de nos résultats, il serait très intéressant d'étudier l'effet combiné du pH et de la force ionique sur les propriétés des systèmes.

Nous avons soulevé le problème de l'influence du temps de chauffage sur la structure des gels de SAB. Il serait intéressant de caractériser de façon analogue les gels obtenus à partir des mélanges pour voir si le même effet est constaté.

L'influence de la nature de la protéine globulaire sur les propriétés des mélanges et sur la structuration des gels de protéines seules a été abordée. Il pourrait être intéressant de poursuivre cette comparaison en réalisant des mélanges de protéines globulaires de façon à «mimer» le comportement des protéines du lactosérum (mélanges de SAB, β-Lg et α-Lactalbumine), couramment utilisées en industrie alimentaire.

Références Bibliographiques

Albertsson, P.A. (**1962**). "Partition methods for fractionation of cell particles and macromolecules." *Methodological Biochemical Analysis* 10: 229-262.

Alberty, R.A. & Marvin, H.H.Jr (**1951**). "Study of protein-ion interaction by the moving boundary method. The combination of bovine serum albumin with chloride ion." *Journal of The American Chemical Society* 73: 3220-3223.

Ananthanarayananan, V.S., Ahmad, F. & Bigelow, C.C. (**1977**). "The denaturation of *β*-Lactoglobulin at pH 2." *Biochimica Biophysica Acta* 492: 194-203.

Antonov, Y.A., Grinberg, N.V., Zhuravskaya, N.A. & Tolstoguzov, V.B. (**1980**). "Liquid two-phase water-protein-polysaccharide systems and their processing into textured protein products." *Journal of Texture Studies* 11: 199-215.

Aoki, K. & Foster, T.J. (**1957**). "Electrophoretic and hydrogen ion binding behavior of bovine plasma albumin in presence of 0,02 M thyiocyanate ion." *Journal of The American Chemical Society* 79: 3393-3396.

Asakura, S. & Oosawa, F. (**1954**). "On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules." *Journal of Chemical Physics* 22: 1255-1256.

Asakura, S. & Oosawa, F. (**1958**). "Interaction between particles suspended in a solution of macromolecules." *Journal of Polymer Science* 33: 183-192.

Axelos, M.A. & Branger, M. (**1997**). "The effect of the degree of esterification on the thermal stability and chain conformation of pectins." *Food Hydrocolloids* 7: 91-102.

Axelos, M.A.V., Garnier, C, Renard, C.M.G.C. & Thibault, J.F. (**1996**). Interactions of pectins with multivalent cations: phase diagrams and structural aspects. dans *The Chemistry and Technology of Pectin*. Editeur: Walter, R.H., Academic Press: 109-118.

Axelos, M.A.V. & Thibault, J.F. (**1991a**). "Influence of the substituents of the carboxyls groups and the rhamnose content on the properties and flexibility of pectins." *International Journal of Biological Macromolecules* 13: 77-82.

Axelos, M.A.V. & Thibault, J.F. (**1991b**). The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. dans *The Chemistry and Technology of Pectin*. Editeur: Walter, R.H., New York, Academic Press: 109-118.

Aymard, P., Gimel, J.-C. & Nicolai , T. (**1996**). "Experimental evidence for a two-step process in the aggregation of β-Lactoglobulin at pH 7." *Journal de Chimie Physique* 93: 987-997.

Barone, G., Giancola, C. & Verdoliva, A. (**1992**). "DSC studies on the denaturation and aggregation of serum albumins." *Thermochimica Acta* 199: 197-205.

Baumy, J.J. & Brulé, G. (**1988**). "Binding of cations to α-lactalbumin et β-lactoglobulin: effet of pH and ionic strength." *Le Lait* 68: 33-48.

Baussay, K., Le Bon, C., Durand, D. & Nicolai , T. (**2003**). "Influence of ionic strength on the heat-induced aggregation of the globular protein β-Lactoglobulin at pH 7." *International Journal of Biological Macromolecules* 34: 21-28.

Beaulieu, M. (**2002**). Etude de la gélification d'un système mixte composé de protéines de lactosérum et de pectine. *Thèse de Doctorat, Département de Science des Aliments et Nutrition*. Québec, Université Laval.

Beaulieu, M., Turgeon, S. & Doublier, J.L. (**2001**). "Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium." *International Dairy Journal* 11: 961-967.

Berman, H.M., Westbrook, J. , Feng, Z., G., Gilliland, Bhat, T.N. , Weissig, H. , I.N., Shindyalov & Bourne, P.E. (**2000**). "The protein data bank." *Nucleic Acids Research* 28: 235-242.

Bernal, V.M., Smajda, C.H., J.L., Smith & D.W, Stanley (**1987**). "Interactions in protein/polysaccharide/calcium gels." *Journal of Food Science* 5: 1121-1136.

Bourriot, S., Garnier, C & Doublier, J.L. (**1999**). "Phase separation, rheology and structure of micellar casein/galactomannan mixtures." *International Dairy Journal* 9: 353-357.

Braccini, I., Grasso, R.P. & Perez, S. (**1999**). "Conformation and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation." *Carbohydrate Research* 317: 119-130.

Braccini, I. & Perez, S. (**2001**). "Molecular basis of Ca^{2+}-Induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited." *Biomacromolecules* 2: 1089-1096.

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

Brownlow, S., Morais Cabral, J. H., Cooper, R., Flower, D. R. , Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A.C. & Sawyer, L. (**1997**). "Bovine β-Lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin." *Structure* 5: 481-495.

Bryant, C.M. & Mc Clements, D.J. (**2000**). "Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels." *Food Hydrocolloids* 14: 383-390.

Cahn, J.W. (**1965**). "Phase separation by spinodal decomposition in isotropic systems." *Journal of Chemical Physics* 42: 93-99.

Cai, R. & Arntfield, S.D. (**1997**). "Thermal gelation in relation to binding of bovine serum albumin-polysaccharide systems." *Journal of Food Science* 62(6): 1129-1134.

Cannan, R.K., Palmer, A.H. & Kibrick, A.C. (**1942**). "The hydrogen ion dissociation curve of β-Lactoglobulin." *Journal of Biological Chemistry* 142: 803-822.

Capron, I., Nicolai, T. & Durand, D. (**1999a**). "Heat induced aggregation and gelation of β-Lactoglobulin in the presence of κ-carrageenan." *Food Hydrocolloids* 13: 1-5.

Capron, I., Nicolai, T. & Durand, D. (**1999b**). "Effect of addition of κ-carrageenan on the mechanical and structural properties of β-Lactoglobulin gels." *Carbohydrate Polymers* 40: 233-238.

Cardoso, S.M., Coimbra, M.A. & Lopes Da Silva, J.A. (**2003**). "Temperature dependance of the formation and melting of pectin-Ca^{2+} networks: a rheological study." *Food Hydrocolloids* 17: 801-807.

Carter, D.C. & Ho, J.X. (**1994**). Structure of serum albumin. dans *Advances in Protein Chemistry*. Editeur: Schumaker, V.N., San Diego. 45: 153-203.

Cassin, F. & Bouhallab, S. (**2004**). Environnement minéral et propriétés fonctionnelles des protéines sériques. dans *Minéraux et produits laitiers*. Editeur: Gaucheron, F., Paris, Tec & Doc: 343-390.

Cayot, P. & Lorient, D. (**1998**). *Structures et technofonctions des protéines du lait*. Paris, Lavoisier Tec et Doc.

Clark, A.H. (**2000**). "Direct analysis of experimental tie line data (two polymer-one solvent systems) using Flory-Huggins theory." *Carbohydrate Polymers* 42: 337-351.

Clark, A.H. & Farrer, D.B. (**1996**). "Shear modulus-concentration relationships for low DM pectin-calcium gels in the temperature range 20-85°C." *Food Hydrocolloids* 10: 31-39.

Clark, A.H., Judge, E., Richards, J.B., Stubbs, J.M. & Sugget, A. (**1981**). "Electron microscopy of network structures in thermally -induced globular protein gels." *International Journal of Peptide and Protein Research* 17: 380-392.

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

Clark, A.H. & Lee-Tuffnell, C.D. (**1986**). Gelation of globular protein. dans *Functional properties of food macromolecules*. Editeur: Mitchell, J.R., London, Elsevier Applied Science: 203-272.

Clark, A.H. & Ross-Murphy, S.B. (**1987**). "Structural and mechanical properties of biopolymer gels." *Advances in Polymer Science* 83: 57-192.

Clark, A.H. & Tuffnell, C.D. (**1980**). "Small-angle X-ray scattering studies of thermally-induced globular protein gels." *International Journal of Peptide and Protein Research* 16: 339-351.

Creamer, L.K., Parry, D.A.D. & Malcom, G.N. (**1983**). "Secondary structure of bovine β-Lactoglobulin B." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 227: 98-105.

Croguennoc, P., Durand, D., T., Nicolai & Clark, A.H. (**2001a**). "Phase separation and association of globular protein aggregates in the presence of polysaccharides: 1. Mixtures of preheated β-Lactoglobulin and κ-carrageenan et room temperature." *Langmuir* 17: 4372-4379.

Croguennoc, P., Durand, D., T., Nicolai & Clark, A.H. (**2001b**). "Phase separation and association of globular protein aggregates in the presence of polysaccharides: 2. Heated mixtures of native β-Lactoglobulin and κ-carrageenan at room temperature." *Langmuir* 17: 4380-4385.

Cros, S., Garnier, C., Axelos, M.A., Imberty, A. & Perez, S. (**1996**). "Solution conformations of pectin polysaccharides: determination of chain characteristics by small angle neutron scattering, viscosimetry, and molecular modelling." *Biopolymers* 39: 339-352.

Damodaran, S. (**1989**). "Influence of protein conformation on its adaptability under chaotropic conditions." *International Journal of Biological Macromolecules* 11: 2-8.

Damodaran, S. & Kinsella, J.E. (**1982**). Effects of ions on protein conformation and functionality. dans *Food protein deterioration mechanisms and functionality*. Symposium American Chemical Society, New York, American Chemical Society: 327-357.

de Kruif, C.G. & Tuinier, R. (**1999**). "Whey protein aggregates and their interaction with exo-polysaccharides." *International Journal of Food Science and Technology* 34: 487-492.

De Wit, J.N. (**1981**). "Structure and functional behaviour of whey proteins." *Netherland Milk Dairy Journal* 35: 47-64.

Dickinson, E & Mc Clements, D.J. (**1995**). Protein-polysaccharide interactions. dans *Advances in Food Colloids*. Editeurs: Dickinson, E & Mc Clements, D.J., Glasgow, Blackie Academic and Professional: 81-101.

Doi, E. (**1993**). "Gels and gelling of globular proteins." *Trends in Food Science & Technology* 4: 1-5.

Doublier, J.L., Castelain, C., Llamas, G. & Lefebvre, J. (**1995**). Rheology and phase separation in protein-polysaccharide mixtures. dans *Biopolymer mixtures*. Editeurs: Harding, S.E., Hill, S.E. & Mitchell, J.R., Nottingham, Nottingham University Press: 315-327.

Doublier, J.-L., Garnier, C., Renard, D. & Sanchez, C.. (**2000**). "Protein-polysaccharide interactions." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 5: 1-13.

Dufour, E., Dalgalarrondo, M. & Haertle, T. (**1994**). "Limited proteolysis of β-Lactoglobulin using thermolysin effects of calcium on the outcome of proteolysis." *International Journal of Biological Macromolecules* 16: 37-41.

Dumay, E., Laligant, A., Zasypkin, D. & Cheftel, J.C. (**1999**). "Pressure-and heat-induced gelation of mixed β-Lactoglobulin/ polysaccharide solutions: scanning electron microscopy of gels." *Food Hydrocolloids* 13: 339-351.

Edmond, E. & Ogston, A.G. (**1968**). "An approach to the study of phase separation in ternary aqueous systems." *Biochemistry Journal* 109: 569-576.

Fernandes, P.B. (**1998**). Interactions in whey protein/polysaccharide mixtures at pH 7. dans *Polysaccharide association structures in food*. Editeur: Walter, R.H., New York, Marcel Dekker: 257-271.

Figge, J., Rossing, T.H. & Fencl, V. (**1991**). "The role of serum albumin in acid-base equilibria." *Journal of Laboratory and Clinical Medecine* 117: 453-367.

Flory, P.J. (**1942**). "Thermodynamics of high polymer solutions." *Journal of Chemical Chemistry* 10: 51-61.

Foegeding, E.A., Bowland, E.L. & Hardin, C.C. (**1995**). "Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels." *Food Hydrocolloids* 9: 237-249.

Foegeding, E.A., Kuhn, P.R. & Hardin, C.C. (**1992**). "Specific divalent-cation induced changes during gelation of β-Lactoglobulin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2092-2097.

Garnier, C., Axelos, M.A.V. & Thibault, J.F. (**1993**). "Phase diagrams pectin-calcium systems: influence of pH, ionic strength, and temperature on the gelation of pectins with different degrees of methylation." *Carbohydrate Research* 240: 219-232.

Garnier, C., Axelos, M.A.V. & Thibault, J.F. (**1994**). "Selectivity and cooperativity in the binding of calcium ions by pectins." *Carbohydrate Research* 256: 219-232.

Gilsenan, P.M., Richardson, R.K. & Morris, E.R. (**2000**). "Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxyl pectin." *Carbohydrate Polymers* 41: 339-349.

Gimel, J.-C., Durand, D. & Nicolai , T. (**1994**). "Structure and distribution of aggregates formed after heat-induced denaturation of globular proteins." *Macromolecules* 27: 583-589.

Giroux, E. & Schoun, J. (**1981**). "Copper and zinc ion binding by bovine, dog and rat serum albumins." *Journal of Inorganic Biochemistry* 14: 354-362.

Gosal, W.S. & Ross-Murphy, S.B. (**2000**). "Globular protein gelation." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 5: 188-194.

Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C. & Thom, D. (**1973**). "Biological interactions between polysaccharides and divalent ions: the egg-box model." *FEBS Lett.* 32: 195-198.

Grinberg, V.Y., Grinberg, N.V., Bikbov, T.M., Bronich, T.K. & Mashkevich, A.Y. (**1992**). "Thermotropic gelation in food proteins." *Food Hydrocolloids* 6: 69-96.

Grinberg, V.Y. & Tolstoguzov, V.B. (**1997**). "Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions." *Food Hydrocolloids* 11: 145-158.

Gumpen, S., Hegg, P. & Martens, H (**1979**). "Thermal stability of fatty acid-serum albumin complexes studied by differential scanning calorimetry." *Biochimica Biophysica Acta* 574: 189-196.

Hagiwara, T., Kumugai, H., Matsunaga, T. & Nakamura, R. (**1996**). "Analysis of aggregates structure in food protein gels with the concept of fractal." *Bioscience Biotechnology Chemistry* 61: 1063-1667.

Hagiwara, T., Kumugai, H. & Nakamura, R. (**1997**). "Fractal analysis of aggregates formed by heating dilute BSA using light scattering methods." *Bioscience Biotechnology Chemistry* 60: 1757-1763.

Hagiwara, T., Kumugai, H. & Nakamura, R. (**1998**). "Fractal analysis of aggregates in heat - induced BSA gels." *Food Hydrocolloids* 12: 29-36.

Hambling, S.G., Mc Alpine, A.S. & Sawyer, L. (**1992**). *β-Lactoglobulin*. London, Elsevier Applied science.

Haque, Z.Z. & Aryana, K.J. (**2002**). "Effect of copper, iron, zinc and magnesium ions on bovine serum albumin gelation." *Food Science Technology Research* 8(1): 1-3.

Haralick, R. M. (**1979**). *Statistical and structural approaches to texture* IEEE Trans. Syst. Man. Cybernet.

Haralick, R. M., Shanmugam, K. & Dinstein, I. (**1973**). "Textural features for image classification." *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 3: 610-621.

He, X.M. & Carter, D.C. (**1992**). "Atomic structure and chemisty of human serum albumin." *Nature* 358: 209-214.

Hegg, P. (**1982**). "Conditions for the formation of heat-induced gels of some globular food proteins." *Journal of Food Science* 47: 1241-1244.

Higgins, J.S. & Benoit, K.C. (**1994**). *Polymer and neutron scattering*. Oxford, Clarendon Press.

Hines, M.E. & Foegeding, E.A. (**1993**). "Interaction of *α*-Lactalbumin and Bovine Serum Albumin with *β*-Lactoglobulin in thermally induced gelation." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 341-346.

Hoskins, R., Robb, I.D., Williams, P.A. & Warren, P. (**1996**). "Phase separation in mixtures of polysaccharides and proteins." *Journal of Chemical Society, Faraday Trans.* 92(22): 4515-4520.

Huggins, M.L. (**1942**). "Theory of solutions of high polymer." *Journal of The American Chemical Society* 64: 1712-1719.

Imeson, A.P., Ledward, D.A. & Mitchell, J.R. (**1977**). "On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28: 661-668.

Itoh, T., Wada, Y. & Nakanishi, T. (**1976**). "Differential thermal analysis of milk proteins." *Agricultural Biological Chemistry* 6: 1083-1086.

Jeyarajah, S. & Allen, J.C. (**1994**). "Calcium binding and salt-induced structural changes of native and preheated *β*-Lactoglobulin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 80-85.

Jin, Y.J. & Wang, Q.R. (**1991**). "TB (III) as a fluorescent probe for the structure of bovine serum albumin." *Biochemical Biophysical Research Communications* 177: 474-479.

Jolliffe, I. T. (**1986**). *Principal Component Analysis*. New York, Springer.

Kar, F. & Arslan, N. (**1999**). "Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity-molecular weight relationship." *Carbohydrate Polymers* 40: 277-284.

Kella, N.K. & Kinsella, J.E. (**1988**). "Enhancement thermodynamic stability of *β*-Lactoglobulin at low pH: A possible mechanism." *Biochemistry Journal* 255: 113-118.

Kelley, D. & Mc Clements, D.J. (**2003**). "Interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions." *Food Hydrocolloids* 17: 73-85.

Kelly, R., Gudo, E.S., Mitchell, J.R. & Harding, S.E. (**1994**). "Some observations on the nature of heated mixtures of bovine serum albumin with an alginate and a pectin." *Carbohydrate Polymers* 23: 115-120.

Kim, W.J., Rao, V.N.M. & Smit, C.J.B (**1978**). "Demethylation of pectin using acid and ammonia." *Journal of Food Science* 43: 74-78.

Kuhn, P.R. & Foegeding, E.A. (**1991**). "Factors influencing whey protein gel rheology: dialysis and calcium chelation." *Journal of Food Science* 56(3): 789-791.

Lau, J., Mcneil, M., Darvill, A.G. & Alberstsheim, P. (**1985**). "Structure backbone of rhamnogalacturonan. I. A pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants." *Carbohydrate Research* 137: 111-125.

Laurent, T.C. (**1963a**). "The interaction between polysaccharides and other macromolecules. V. The solubility of proteins in the presence of dextran." *Biochemical Journal* 89: 253-257.

Laurent, T.C. (**1963b**). "The interaction between polysaccharides and other macromolecules. VI. further studies on the solubility of proteins in dextran solutions." *Acta Chemica Scandinavia* 17: 2664-2668.

Le Bon, C., Nicolai , T. & Durand, D. (**1999a**). "Growth and structure of heat-denatured *β*-Lactoglobulin." *International Journal of Food Science and Technology* 34: 451.

Le Bon, C., Nicolai , T. & Durand, D. (**1999b**). "Kinetics of aggregation and gelation of globular proteins after heat-induced denaturation." *Macromolecules* 32: 6120-3127.

Liang, J., Edelsbriunner, H. & Woodward, C. (**1998**). "Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design." *Protein Science* 7: 1884-1897.

Lohmann, G. (**1995**). "Analysis and synthesis of textures: a co-occurrence based approach." *Computer and Graphics* 19: 29-36.

Malovikova, A., Rinaudo, M. & Milas, M. (**1993**). "On the characterization of polygalacturonate salts in dilute solution." *Carbohydrate Polymers* 22: 97-92.

Matsudomi, N., Rector, D. & Kinsella, J.E. (**1991**). "Gelation of Bovine Serum Albumin and *β*-lactoglobulin; Effects of pH, salts and thiol reagents." *Food Chemistry* 40: 55-69.

Michel, F., Thibault, J.F. & Doublier, J.-L. (**1984**). "Viscosimetric and potentiometric study of high-methoxyl pectins in the presence of sucrose." *Carbohydrate Polymers* 4: 298-297.

Morris, E.R. & Wilde, P.J. (**1997**). "Interactions of food biopolymers." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2: 567-572.

Morris, G.A., Foster, T.J. & Harding, S.E. (**2002**). "A hydrodynamic study of the depolymerisation of a high methoxyl pectin at elevated temperature." *Carbohydrate Polymers* 48: 361-367.

Mulvihill, D.M. & Donovan, M. (**1987**). "Whey proteins and their thermal denaturation-A review." *Irish Journal of Food Science and Technology* 11: 43-75.

Mulvihill, D.M. & Kinsella, J.E. (**1988**). "Gelation of β-Lactoglobulin: effect of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels." *Journal of Food Science* 53: 231-236.

Nashima, T., Sudo, H. & Furusawa, K. (**1992**). "Flocculation of polymer latex dispersion induced by a polyelectrolyte." *Colloids and Surfaces* 6: 95-100.

Ndi, E.E., Swanson, B.G., Barbosa-Canovas, G.V. & Luedecke, L.O. (**1996**). "Rheology and Microstructure of β-Lactoglobulin/ Sodium Polypectate." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 86-92.

Neiser, S., Draget, K.I. & Smidsrød, O. (**1998**). "Gel formation in heat-treated bovine serum albumin-sodium alginate systems." *Food Hydrocolloids* 12: 127-132.

Neiser, S., Draget, K.I. & Smidsrød, O. (**1999**). "Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems." *Food Hydrocolloids* 13: 445-458.

Neiser, S., Draget, K.I. & Smirod, O. (**2000**). "Gel formation in heat-treated bovine serum albumin-κ-carrageenan systems." *Food Hydrocolloids* 14: 95-110.

Nicolai, T., Urban, C. & Schurtenberger, P. (**2001**). "Light scattering of turbid heat-set globular protein gels using cross-correlation dynamic light scattering." *Journal of Colloid and Interface Science* 240: 419-424.

Norton, I.T. & Frith, W.J. (**2001**). "Microstructure design in mixed biopolymer composites." *Food Hydrocolloids* 15: 543-553.

Novales, B., Guillaume, S., Devaux, M.F. & Chaurand, M. (**1998**). "Particle size characterisation in in-flow milling products by video image analysis using global features." *Journal of Science and Food Agriculture* 78: 187-195.

Olsson, C., Langton, M. & Hermansson, A.M. (**2002**). "Dynamic measurements of β-Lactoglobulin structures during aggregation, gel formation and break-up in mixed biopolymer systems." *Food Hydrocolloids* 16: 477-488.

Ould Eleya, M.M. & Turgeon, S.L. (**2000a**). "Rheology of κ-carrageenan and β-Lactoglobulin mixed gels." *Food Hydrocolloids* 14: 29-40.

Ould Eleya, M.M. & Turgeon, S.L. (**2000b**). "The effects of pH on the rheology of β-Lactoglobulin/κ-carrageenan mixed gels." *Food Hydrocolloids* 14: 29-40.

Ousalem, M., Busnel, J.P. & Nicolai , T. (**1993**). "A static and dynamic light scattering study of sharp pectin fractions in aqueous solution." *International Journal of Biological Macromolecules* 15: 209-213.

Paulsson, M., Hegg, P.-O. & Castberg, H.B. (**1986**). "Heat-induced gelation of individual whey proteins. A dynamic rheological study." *Journal of Food Science* 51: 87-90.

Peters, T (**1975**). Serum Albumin. dans *The plasma protein*. Editeur: Putman, F.W., New York, Academic press. 1: 133-181.

Peters, T (**1996**). Ligand Binding by Albumin. dans *All about albumin: Biochemistrry, Genetics and Medical Applications*. Editeur: Peters, T., San Diego, Academic Press: 79-133.

Piculell, L., Bergfeldt, K. & Nilsson, S. (**1994**). Factors determining phase behaviour of multicomponent polymers systems. dans *Biopolymers Mixtures*. Editeurs: Harding, S.E., Hill, S.E. & Mitchell, J.R., Nottingham, Nottingham University Press: 13-35.

Piculell, L. & Lindman, B. (**1992**). "Association and Segregation in Aqueous Polymer/Polymer, Polymer Surfactant, and Surfactant Mixtures - Similarities and Differences." *Advances in Colloid and Interface Science* 41: 149-178.

Pouzot, M., Durand, D. & Nicolai , T. (**2004b**). "Influence of ionic strength on the structure of heat-set globular proteins at pH 7. I. β-Lactoglobulin." *Macromolecules (sous presse)*.

Pouzot, M., Nicolai , T., Durand, D. & Benyahia, L. (**2004a**). "Structure factor and elasticity of heat-globular protein gel." *Macromolecules* 37: 614-620.

Pouzot, M., Nicolai , T., Visschers, R.W. & Weijers, M. (**2004c**). "X-ray and light scattering study of the structure of large protein aggregates at neutral pH." *Food Hydrocolloids (sous presse)*.

Powell Baker, H.P. & Saroff, H.A. (**1965**). "Binding of sodium ions to β-Lactoglobulin." *Biochemistry* 4: 1670-1677.

Powell, D.A., Morris, E.R., Gidley, M.J. & Rees, D.A. (**1982**). "Conformations and interactions of pectin. II : Influence of residue sequences on chain association in calcium pectate gels." *Journal of Molecular Biology* 155: 517-531.

Privalov, P.L. & Monaselidze, D.R. (**1963**). "Thermal denaturation of bovine albumin." *Biofizica* 8: 420-426.

Qi, X.L., Holt, C., Mc Nulty, D., Clarke, D.T., Brownlow, S. & Jones, G.R. (**1997**). "Effect of temperature on the secondary structure of β-Lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis." *Biochemistry Journal* 324: 341-346.

Relkin, P. (**1996**). "Thermal unfolding of β-Lactoglobulin, α-Lactalbumin, and bovine serum albumine. A thermodynamic approach." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36(6): 565-601.

Renard, D. (**1994**). Etude de l'agrégation et de la gélification des protéines globulaires: application à la β-lactoglobuline. *Science des Aliments Physico-chimie des bioproduits*. Nantes, Université de Nantes.

Renard, D., Axelos, M.A. & Lefebvre, J. (**1995**). Investigation of sol-gel transitions of β-Lactoglobulin by rheological and small-angle neutron scattering measurements. dans *Food Macromolecules and Colloids*. Editeurs: Dickinson, E. & Lorient, D., Cambridge, Royal Society of Chemistry: 390-.

Renard, D., Boue, F. & Lefebvre, J. (**1997**). "Protein-polysaccharide mixtures structure of the systems and the effect of shear studied by SANS." *Physica B* 234-236: 289-291.

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.

Renard, D., Lefebvre, J., Griffin, M.C.A. & Griffin, W.G. (**1998a**). "Effect of pH and salt environement on the association of β-Lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies." *International Journal of Biological Macromolecules* 22: 41-49.

Rinaudo, M. & Domard, A. (**1973**). "Hydrodynamic behavior of poly(L-glutamic acid) in isoionic dilution." *Comptes Rendus des Séances de l'Academie des Sciences* 227(177): 339-342.

Ross, P.D. & Shrake, A. (**1988**). "Decrease in stability of human albumin with increase in protein concentration." *The Journal of Biological Chemistry* 263: 11196-11202.

Saroff, H.A. & Lewis, M.S. (**1963**). "The binding of calcium ions to serum albumin." *Journal of Physical Chemistry* 67: 1211-1216.

Schmitt, C, Sanchez, C, Desobry-Banon, S & Hardy, J. (**1998**). "Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(8): 689-753.

Scott, R.L. (**1949**). "The thermodynamics of high polymer solutions.V. Phase equilibria in the ternary system: Polymer1-polymer2-Solvent." *The Journal of Chemical Physics* 17(3): 279-284.

Semenova, M.G., Bolotina, V.S., Dmitrochenko, A.P., Leontiev, A.L., Polyakov, V.I., Braudo, E.E. & Tolstoguzov, V.B. (**1991**). "The factors affecting the compatibility of serum albumin and pectinate in aqueous medium." *Carbohydrate Polymers* 15: 367-385.

Semenova, M.G. & Savilova, L.B. (**1998**). "The role of biopolymer structure in interactions between unlike biopolymers in aqueous medium." *Food Hydrocolloids* 12: 65-75.

Simonet, F., Garnier, C & Doublier, J.-L. (**2002**). "Description of the thermodynamic incompatibility of the guar/dextran aqueous system by light scattering." *Carbohydrate Polymers* 47: 313-321.

Smidsrød, O. & Haug, A. (**1971**). "Estimation of the relative stiffness of the molecular chains in polyelectrolytes from measurements of viscosity at different ionic strengths." *Biopolymers* 10: 1213-1227.

Snowden, M.J., Clegg, S.M., Williams, P.A. & Robb, I.D. (**1991**). "Flocculation of silica particles by adsorbing and non-adsorbing polymers." *Journal of Chemical Society Faraday Trans.* 87(14): 2201-2207.

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

Stading, M., Langton, M. & Hermansson, A.M. (**1993**). "Microstructure and rheological behaviour of particulate β-Lactoglobulin gels." *Food Hydrocolloids* 7: 1445-1450.

Strynadka, N.C.J. & James, N.G. (**1989**). "Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins." *Annual Review in Biochemistry* 58: 951-998.

Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M. & Kobayashi, K. (**1999**). "Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution." *Protein Engineering* 12: 439-446.

Swaisgood, H.E. (**1982**). Chemistry of milk proteins. dans *Developments in dairy chemistry-I.Proteins*. Editeur: Fox, P.F., London, Applied Science Publishers: 1-59.

Syrbe, A (**1997**). Polymer incompatibility in aqueous whey protein and polysaccharide solutions. *Thèse de Doctorat, Technishe Universitat Munchen*. Munich.

Syrbe, A., Bauer, W.J. & Klostermeyer, H. (**1998**). "Polymer science concepts in dairy systems- An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction." *International Dairy Journal* 8: 179-193.

Syrbe, A., Fernandes, P.B., Dannenberg, F., Bauer, W.J. & Klostermeyer, H. (**1995**). Whey protein + polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its application. dans *Food Macromolecules and Colloids*. Editeurs: Dickinson, E. & Lorient, D., London, The Royal Society of Chemistry: 328-339.

Takada, N. & Nelson, P.E. (**1983**). "Pectin-Protein interaction in tomato products." *Journal of Food Science* 48: 1408-1411.

Tanaka, H. (**2000**). "Viscoelastic phase separation." *Journal of Physics : Condensed Matter* 12: R207-R264.

Tanford, C., Bunville, L.G. & Nozaki, Y. (**1959**). "The reversible transformation of *β*-Lactoglobulin at pH 7.5." *Journal of Americal Chemican Society* 81: 4032-4036.

Thakur, B.R., Rakesh, K.S. & Handa, K.H. (**1997**). "Chemistry and uses of pectin-A review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37(1): 47-73.

Timasheff, S.N., Mescanti, L., Basch, J.J. & Townend, R. (**1966b**). "Conformational transitions of bovine β-lactoglobulins A, B and C." *Journal of Biological Chemistry* 241: 2496-2501.

Timasheff, S.N. & Townend, R. (**1964**). "Structure of β-Lactoglobulin tetramer." *Nature* 203: 517-519.

Tobitani, A. & Ross-Murphy, S.B. (**1997a**). "Heat induced gelation of globular proteins.1.Model for the effects of time and temperature on the gelation time of BSA gels." *Macromolecules* 30: 4845-4854.

Tobitani, A. & Ross-Murphy, S.B. (**1997b**). "Heat induced gelation of globular proteins.2. Effect of environmental factors on single-component and mixed-protein gels." *Macromolecules* 30: 4855-4862.

Tolstoguzov, V.B. (**1991**). "Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction." *Food Hydrocolloids* 4: 429-468.

Tolstoguzov, V.B. (**1995**). "Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels." *Food Hydrocolloids* 9: 317-332.

Tolstoguzov, V.B. (**1998**). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. dans *Functional properties of food macromolecules*. Editeurs: Hill, S.E., Ledward, D.A. & Mitchell, J.R., Gaithersburg, Maryland, Aspen Publishers: 252-277.

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 isolectric point." *Journal of The American Chemical Society* 82: 3161-3168.

Tromp, R.H., Rennie, A.R. & Jones, R.A.L. (**1995**). "Kinetics of the simultaneous phase separation and gelation in solutions of dextran and gelatin." *Macromolecules* 28: 4129-4138.

Tuinier, R. & de Kruif, C.G. (**1999**). "Phase behaviour of casein micelles/exocellular polysaccharide mixtures: experiment and theory." *Journal of Chemical Physics* 110: 9296-9304.

Tuinier, R., Dhont, J.K.G. & de Kruif, C.G. (**2000**). "Depletion-induced phase separation of aggregated whey protein colloids by exocellular polysaccharide." *Langmuir* 16: 1497-1507.

Tuinier, R., Ten Grotenhuis, E., Holt, C., Timmins, P.A. & de Kruif, C.G. (**1999**). "Depletion interaction of casein micelles and an exocellular polysaccharide." *Physical Review E* 60: 848-856.

Turgeon, S. & Beaulieu, M. (**2001**). "Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides." *Food Hydrocolloids* 15: 583-591.

Turgeon, S., Beaulieu, M., Schmitt, C & Sanchez, C (**2003**). "Protein-polysaccharide interactions: phase ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8: 401-414.

Urban, C. & Schurtenberger, P. (**1988**). "Characterization of Turbid Colloidal Suspensions Using Light Scattering Techniques Combined with Cross-Correlation Methods." *Journal of Colloid and Interface Science* 207: 150-158.

Van Kleef, F.S.M. (**1986**). "Thermally induced protein gelation and rheological characterization of highly concentrated ovalbumin and soybean protein gels." *Biopolymers* 25: 31-39.

Verma, R., Crocker, J.C., Lubensky, T.C. & Yodh, A.G. (**2000**). "Attractions between hard colloidal spheres in semiflexible polymer solutions." *Macromolecules* 33: 177-186.

Vincken, J.-P., Schols, H.A., Oomen R, J.F.J., Mc Cann, M.C., Ulvkov, P., Voragen, A & Visser, R.G.F. (**2003**). "If homogalacturonan were a sidechain of rhamnogalacturonan. I. Implications for cell wall architecture." *Plant Physiology* 132: 1781-1789.

Voragen, A, Thibault, J.F., Pilnik, W., Axelos, M.A.V. & Renard, C.M.G.C. (**1995**). Pectins. dans *Food polysaccharides and their applications*. Editeur: Stephen, A.M., New York, Marcel Dekker: 287-339.

Vrij, A. (**1976**). "Polymers at interfaces and the interactions in colloidal dispersions." *Pure Application Chemistry* 48: 471-483.

Wang, Q. & Damodaran, S. (**1990**). "Thermal gelation of globular proteins: weight -average molecular weight dependance of gel strength." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1157-1164.

Wang, Q., Dijk, J.A.P.P., Odijk, T. & Smit, J.A.M. (**2001**). "Depletion-induced demixing in aqueous protein-polysaccharide solutions." *Biomacromolecules* 2: 1080-1088.

Wang, Q. & Qvist, K.B. (**2000**). "Investigation of the composite system of β-Lactoglobulin and pectin in aqueous solutions." *Food Research International* 33: 683-690.

Weijers, M., Visschers, R.W. & Nicolai , T. (**2002**). "Light scattering study of heat-induced aggregation and gelation of ovalbumin." *Macromolecules* 35: 4753-4762.

Weijers, M., Visschers, R.W. & Nicolai , T. (**2004**). "Influence of ionic strength on the structure of globular protein gels at pH 7. Part II Ovalbumin." *Macromolecules sous presse*.

Wolf, B., Scirocco, R., Frith, W.J. & Norton, I.T. (**2000**). "Shear-induced anisotropic microstructure in phase-separated biopolymer mixtures." *Food Hydrocolloids* 14: 217-225.

Wolthers, W., Van Den Ende, D., Breedved, V., Duits, M.H.G., Potanin, A.A., Wientjes, R.H. & Mellema, J. (**1997**). "Linear viscoelastic behavior of aggregated colloidal dispersions." *Physical Review* 56: 5726-5733.

Yamasaki, M. & Hiroshige, Y. (**1990**). "Differential scanning calorimetry on bovine serum albumine: I. Effect of pH and ionic strength." *International Journal of Biological Macromolecules* 12: 263-268.

Yamasaki, M. & Hiroshige, Y. (**1992**). "Differential scanning calorimetry on bovine serum albumine: III. Effect of sodium dodecyl sulphate." *International Journal of Biological Macromolecules* 14: 305-312.

Yasuda, K., Nakamura, R. & Hayakawa, S. (**1986**). "Factors affecting heat-induced gel formation of bovine serum albumin." *Journal of Food Science* 51(5): 1289-1292.

Zasypkin, D., Braudo, E.E. & Tolstoguzov, V.B. (**1997**). "Multicomponent biopolymer gels." *Food Hydrocolloids* 11: 159-170.

Zdobnov, E.M., Lopez, R., Apweiler, R. & Etzold, T. (**2002**). "The EBI SRS server-recent developments." *Bioinformatics* 18: 368-373.

Zhang, G. & Foegeding, E.A. (**2003**). "Heat-induced phase behavior of *β*-Lactoglobulin/polysaccharide mixtures." *Food Hydrocolloids* 17: 785-792.

Annexes

ANNEXE I. Diffusion de la lumière

La diffusion de la lumière est une technique permettant, entre autres, l'étude des suspensions colloïdales. C'est une méthode non destructrice qui permet de caractériser des particules de tailles allant de quelques nanomètres à plusieurs micromètres, selon les conditions de mesure.

Le principe de cette méthode est basé sur la façon dont la lumière interagit avec la matière.

I.1. Diffusion statique de la lumière

Un milieu parfaitement homogène ne diffuse pas de lumière mais les fluctuations de densité du solvant et/ou de concentration du soluté forment des inhomogénéités locales qui diffusent. Les inhomogénéités n'étant pas statiques (du fait de l'agitation thermique), l'intensité diffusée fluctue au cours du temps. Cette technique permet d'observer l'excès d'intensité diffusée d'une solution comparée à celle du solvant. On suppose alors que la radiation diffusée présente la même longueur d'onde que celle de la source primaire. On mesure des quantités « statiques » ou moyennées dans le temps.

I.1.1 Interaction lumière/matière

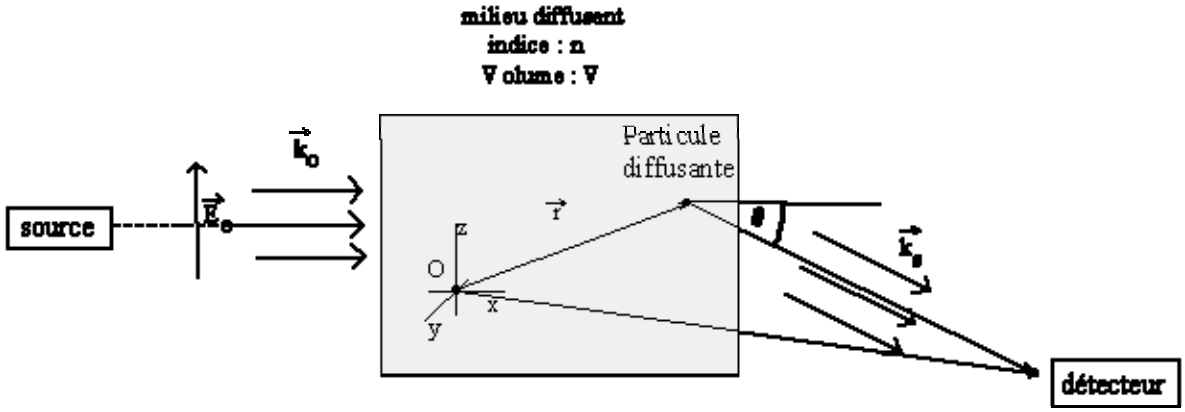
Soit (Oxyz) le référentiel du laboratoire. Considérons une onde plane, transversale, monochromatique de longueur d'onde λ, polarisée verticalement selon l'axe Oz et se propageant selon l'axe Ox. Le champ électrique complexe associé à cette onde au point $\vec{r}$ à l'instant t s'écrit:

$$\overrightarrow{E_0}(\vec{r},t) = \overrightarrow{E_0} \cdot exp(i \cdot \vec{k_0} \cdot \vec{r}) \cdot exp(-i \cdot \omega \cdot t) \qquad \textit{Equation A.1}$$

avec $k_0=(2\cdot\pi\cdot n)/\lambda$, le vecteur d'onde, n l'indice de réfraction du milieu considéré isotrope et $\omega = (2 \cdot \pi \cdot c/\lambda) = (k_0 \cdot c/n)$, la pulsation et c la vitesse de la lumière dans le vide. Supposons maintenant que le volume "éclairé", appelé volume diffusant V soit constitué de N_0 molécules identiques. Les particules se comportent comme des dipôles oscillants à la même fréquence

que le champ incident. Elles diffusent dans toutes les directions de l'espace et on définit le vecteur d'onde du champ diffusé k_s (Figure A.1).

Figure A.1 Schéma du principe de diffusion de la lumière



L'amplitude de la radiation diffusée dépend du pouvoir diffusant de la particule et de la distance au détecteur. On définit alors le vecteur de diffusion *q*:

$$q = \vec{k_0} - \vec{k_s} = \frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda} sin(\theta/2) \qquad \textit{Equation A.2}$$

avec θ l'angle de diffusion, formé entre le faisceau incident et le faisceau diffusé. Ainsi à chaque angle d'observation est associé un vecteur de diffusion. *q* dont la norme est inversement proportionnel à une distance, et pour une longueur d'onde donnée, est fonction de l'angle θ. La mesure de l'intensité diffusée par la solution à différents angles revient ainsi à regarder la solution à différentes échelles spatiales (q^{-1}).

Nous limiterons la description du principe de la diffusion de la lumière aux systèmes agrégés.

Pour des systèmes formés de N_0 particules identiques de rayon r_0 en concentration C ($= N_0/V$) agrégées entre elles. On distingue alors plusieurs cas: dilué/concentré et monodispersé/polydispersé.

Toutes les mesures d'intensité sont corrigées par une valeur de référence mesurée avec le toluène qui est un polymère dont l'intensité diffusée ne varie pas avec l'angle de mesure, de façon à s'affranchir des problèmes liés à la fluctuation de puissance du faisceau.

I.1.2 Diffusion de la lumière en régime dilué

L'hypothèse du milieu dilué sous-entend que l'on tend vers un seul objet dans le système ou que les objets sont suffisamment éloignés les uns des autres pour ne pas interagir entre eux.

- *Cas de particules monodispersées isotropes*

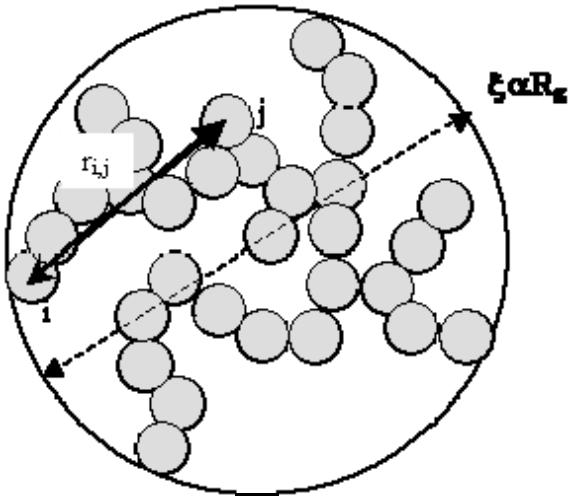
On considère que les N_0 particules sont agrégées sous forme d'amas identiques monodispersés formés de m monomères. La moyenne temporelle de l'intensité diffusée s'écrit alors :

$$I(q) = K \cdot C \cdot m \cdot S_m(q) \qquad \textit{Equation A.3}$$

où K est une constante d'appareillage.

$S_m(q)$ est fonction de la forme des agrégats. Pour le définir considérons deux monomères *(i, j)* appartenant au même agrégat distants d'une distance $r_{i,j}$ *(*Figure A.2*)*.

Figure A.2 Représentation schématique d'un agrégat de m-mères



On a alors pour un système isotrope :

$$S_m(q) = \frac{1}{m^2} \sum_{i,j=1}^{m} \frac{\sin(q \cdot r_{i,j})}{q \cdot r_{i,j}} \qquad \textit{Equation A.4}$$

$S_m(q)$ fait donc intervenir une somme sur toutes les distances au sein de l'agrégat et de ce fait est relié à la fonction de corrélation de paires $g_m(r)$.

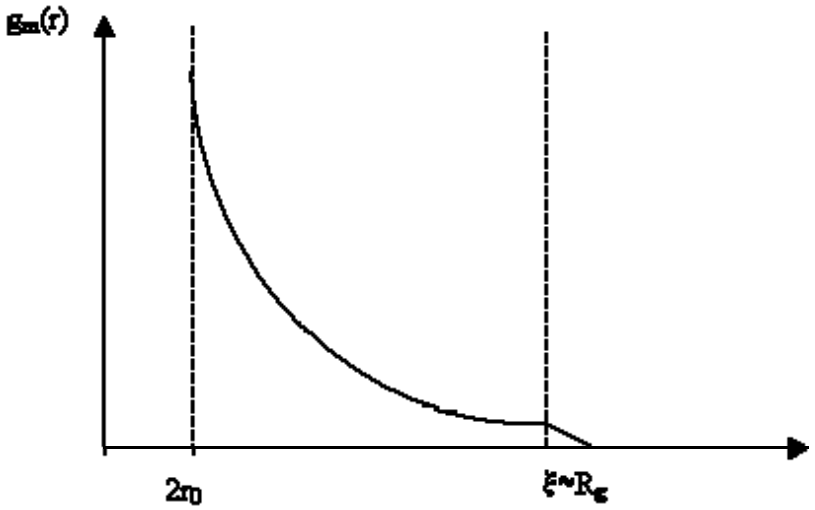
$$S_m(q) = \frac{1}{m}(1 + \int_0^\infty g_m(r) \cdot 4 \cdot \pi \cdot r^2 \frac{sin(qr)}{qr} dr) \qquad \textit{Equation A.5}$$

avec

$$\int_0^\infty g_m(r) \cdot 4 \cdot \pi \cdot r^2 dr = m - 1 \qquad \textit{Equation A.6}$$

$g_m(r)$ correspond à la concentration en nombre de monomères dans un petit élément de volume situé à une distance r d'un autre monomère. En d'autre terme cette fonction rend compte de la probabilité de trouver de la matière à une distance r d'un monomère choisi au hasard comme point de départ. $g_m(r)$ est une fonction strictement nulle pour $r < 2r_0$ (en considérant que les monomères ne sont pas pénétrables). Elle est maximale à $2\ r_0$ et décroît ensuite pour s'annuler au-delà d'une distance caractéristique χ (Figure A.3).

Figure A.3 Evolution de la fonction de corrélation de paire $g_m(r)$ dans le cas d'agrégats dilués monodispersés.



χ correspond à la distance au delà de laquelle le système est homogène. Dans le cas présent au-delà de cette grandeur la concentration est nulle et donc $g_m(r)$ tend vers 0. Dans ces conditions, χ est proportionnel au rayon de giration de l'agrégat Rg.

- Observations aux petits angles : $qR_g<<1$

Dans ce cas, en utilisant un développement limité au deuxième ordre au voisinage de zéro de l'équation A.4, on obtient:

$$S_m(q) = 1 - \frac{q^2 \cdot R_g^2}{3} \qquad \textit{Equation A.7}$$

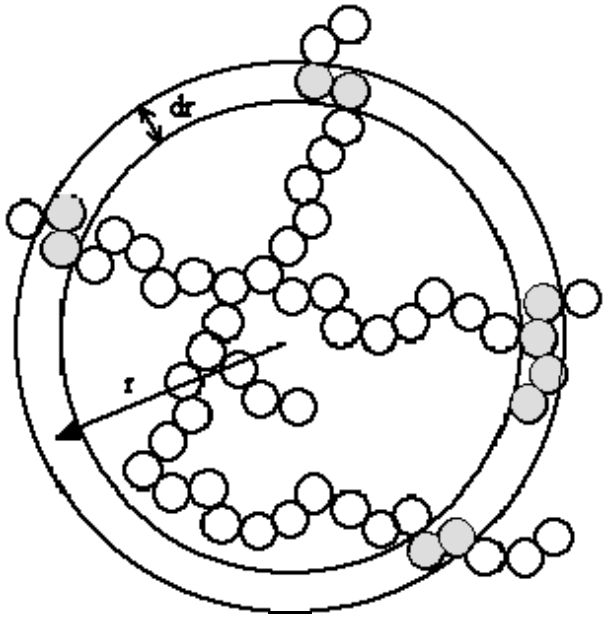
- Observations aux grands angles : cas des objets fractals : $r_0<<q^{-1}<<Rg$

La majorité des processus d'agrégation donnent naissance à des objets fractals. On considère dans ce cas que les m-mères sont des objets isotropes autosimilaires de dimension fractale $1<df<3$. *df* est une mesure de la capacité qu'ont les objets à remplir l'espace. Lorsqu'elle est inférieure à 3, cela signifie que les objets ne remplissent pas l'espace de façon compacte, autrement dit que leur densité est d'autant plus faible que leur taille est grande. Leur densité est donc une fonction décroissante de leur degré de polymérisation m. Pour des échelles d'observations comprises entre r_0 et *Rg*, la fractalité de l'agrégat implique :

$$m(r) \sim r^{df} \qquad \textit{Equation A.8}$$

avec *m(r)* le nombre moyen de monomère contenus dans une sphère de rayon *r* centrée sur un monomère donné de l'agrégat (Figure A.4).

Figure A.4 Répartition de la matière à l'intérieur d'un agrégat fractal



Comme les objets sont isotropes, la fonction de corrélation de paires $g_m(r)$ est uniquement une fonction de *r*. Le nombre de monomères contenus dans une « coquille sphérique » de rayon *r* et d'épaisseur *dr* est égal à

$$dm(r) = 4 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot g_m(r) dr \qquad \textit{Equation A.9}$$

Or d'après l'équation A.9 :

$$dm = r^{df-1} dr \qquad \textit{Equation A.10}$$

On obtient alors

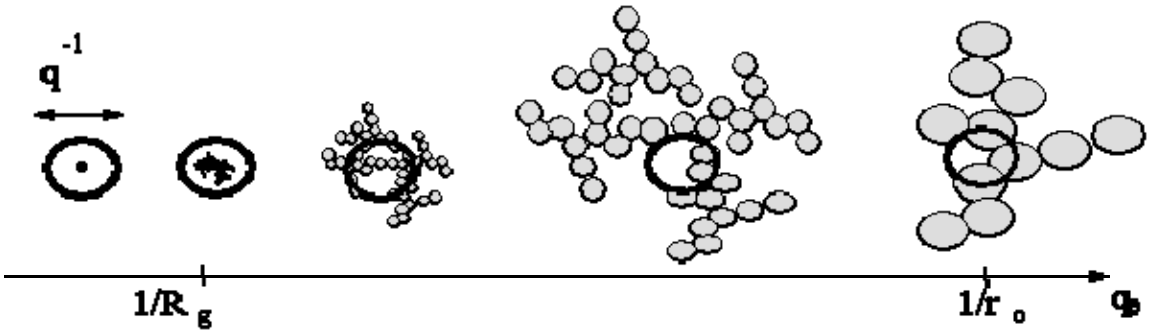
$$g_m(r) \sim r^{(df-3)} \qquad \textit{Equation A.11}$$

Et on peut montrer que :

$$S_m(q) \sim q^{-df} \qquad \textit{Equation A.12}$$

L'observation des systèmes aux différents angles de mesures permet ainsi de renseigner sur la structure des systèmes. La Figure A.5 présente un schéma récapitulatif des différentes échelles spatiales considérées.

Figure A.5 Observation de la structure des systèmes en fonction du vecteur de diffusion q.



Cette partie a montré qu'il est possible de calculer la masse m des agrégats, leur rayon de giration Rg et la dimension fractale des amas dans le cas de particules monodispersées isotropes en milieu dilué. Nous allons désormais nous intéresser au cas de particules polydisperses en régime dilué.

- *Cas de particules polydispersées isotropes*

Dans ce cas on considère que les N_0 monomères sont regroupés dans une population d'agrégats de tailles différentes définie par la fonction de distribution des agrégats $N(m)$ égale à :

$$N_0 = \sum_{m=1}^{\infty} m \cdot N(m) \qquad \textit{Equation A.13}$$

L'intensité diffusée par les agrégats sera alors égale à :

$$I(q) = K \cdot C \cdot m_w \cdot S_z(q) \qquad \textit{Equation A.14}$$

avec m_w, le degré d'agrégation moyen en masse des agrégats égal à :

$$m_w = \frac{\sum_{m=1}^{\infty} m^2 \cdot N(m)}{\sum_{m=1}^{\infty} m \cdot N(m)} \qquad \textit{Equation A.15}$$

et le facteur de structure moyen en z, $S_z(q)$ est égal à:

$$S_z(q) = \frac{\sum_{m=1}^{\infty} m^2 \cdot N(m) \cdot S_m(q)}{\sum_{m=1}^{\infty} m \cdot N(m)} \qquad \textit{Equation A.16}$$

$Sz(q)$ est alors relié à la fonction de corrélation de paire moyenne en masse $g_w(r)$ défini par :

$$S_z(q) = \frac{1}{m_w}\left(1 + \int_0^{\infty} g_w(r) \cdot 4 \cdot \pi \cdot r^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dr\right) \qquad \textit{Equation A.17}$$

Et $$g_w(r) = \frac{\sum_{m=1}^{\infty} m \cdot N(m) \cdot g_m(r)}{\sum_{m=1}^{\infty} m^2 \cdot N(m)} \qquad \textit{Equation A.18}$$

En pratique lorsque q tend vers zéro, $S_z(q)$ tend vers 1 et on peut ainsi définir m_w en traçant I(q)/KC en fonction de q.

- Observations aux petits angles : $r_{ij} << q^{-1}$

Dans ce cas:

$$S_z(q) = (1 + \frac{q^2 \cdot R_{gz}^{\ 2}}{3})^{-1} \qquad \text{Equation A.19}$$

avec $R_{gz}^{\ 2}$ la moyenne en z des rayons de giration carrés des agrégats définie par :

$$R_{gz}^{\ 2} = \frac{\sum_{m=1}^{\infty} m^2 \cdot N(m) \cdot Rg(m)^2}{\sum_{m=1}^{\infty} m^2 \cdot N(m)} \qquad \text{Equation A.20}$$

avec $R_g(m)$ le rayon de giration d'un amas de m monomères.

- Observations aux grands angles : cas des objets fractals : $r_0 << q^{-1} << Rg$

Dans le cas où la solution n'est pas trop polydisperse (loin du point de gel) :

$$Sz(q) \sim q^{-df} \qquad \text{Equation A.21}$$

Ainsi dans le cas polydispersée, la diffusion de la lumière statique permet de calculer m_w, R_{gz} et la dimension fractale de la population d'amas.

I.1.3 Diffusion de la lumière en régime concentré

L'intensité diffusée s'exprime alors comme:

$$I(q) = K \cdot C \cdot m_a \cdot S(q) \qquad \text{Equation A.22}$$

Avec m_a la masse apparente moyenne des agrégats (et $m_a \rightarrow m_w$ quand $C \rightarrow 0$).

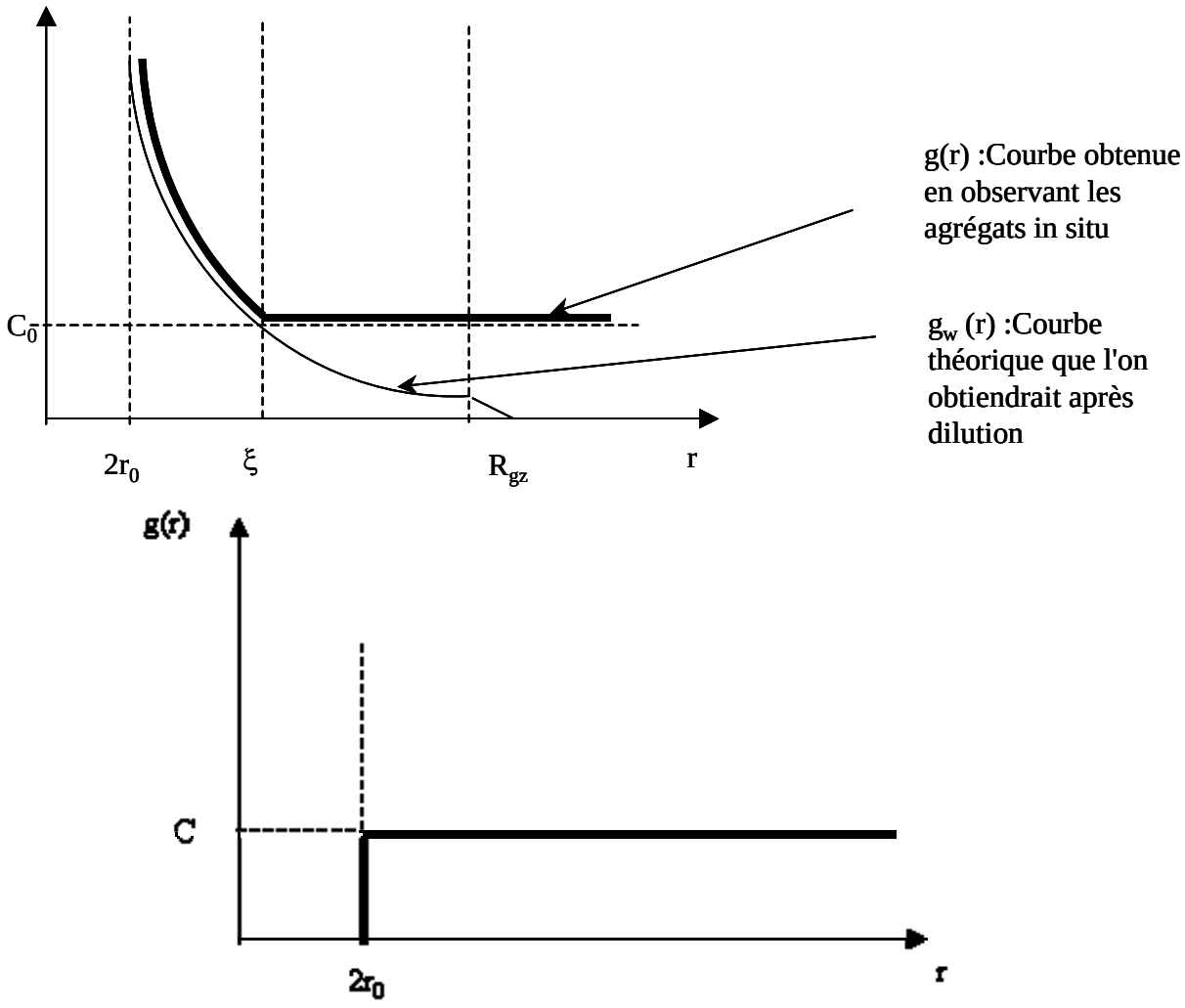
$S(q)$ est le facteur de structure de la solution : il prend en compte à la fois les interactions inter et intra agrégats.

On considère cette fois ci, la fonction de corrélation de paire du système dans son ensemble : $g(r)$. Elle se définit comme la concentration en monomère à une distance r d'un monomère choisi comme point de départ et tend vers C, la concentration du système.

Dans le cas où le système n'est pas agrégé (Figure A.6), la fonction $g(r)$ est égale à C pour $r \geq 2r_0$; en deçà de cette distance elle est nulle. En réalité de légères oscillations peuvent

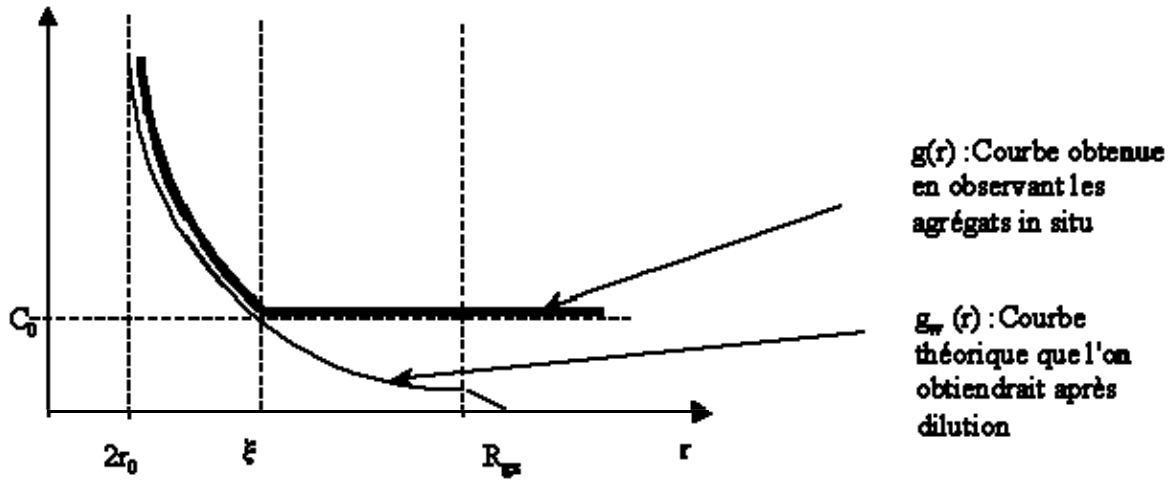
apparaître pour $r \geq 2r_0$ lorsque la fraction volumique occupée par les monomères est supérieure à 30 %.

Figure A.6 Evolution de la fonction de corrélation de paire g(r) du système dans le cas non agrégés



Dans le cas où le système est agrégé, *g(r)* est nulle pour $r < 2r_0$, s'accroît brutalement pour $r = 2r_0$ et décroît jusqu'à $r << \chi$ et devient égale à C pour $r >> \chi$. χ est alors appelée la longueur de corrélation et donne une idée de l'échelle spatiale à partir de laquelle le système est considéré comme homogène. La figure A.7 compare les allures de *g(r)* et de g_w(r).

Figure A.7 Evolution de la fonction de corrélation de paire dans le cas d'agrégats concentrés polydispersés (courbe en trait épais) et dans le cas dilué (courbe en trait fin).



On définit *S(q)* en fonction de *g(r)* par l'équation :

$$S(q) = \frac{1}{m_a}(1 + \int_0^\infty (g(r) - C) \cdot 4 \cdot \pi \cdot r^2 \frac{sin(qr)}{qr} dr) \qquad \textit{Equation A.23}$$

Avec :

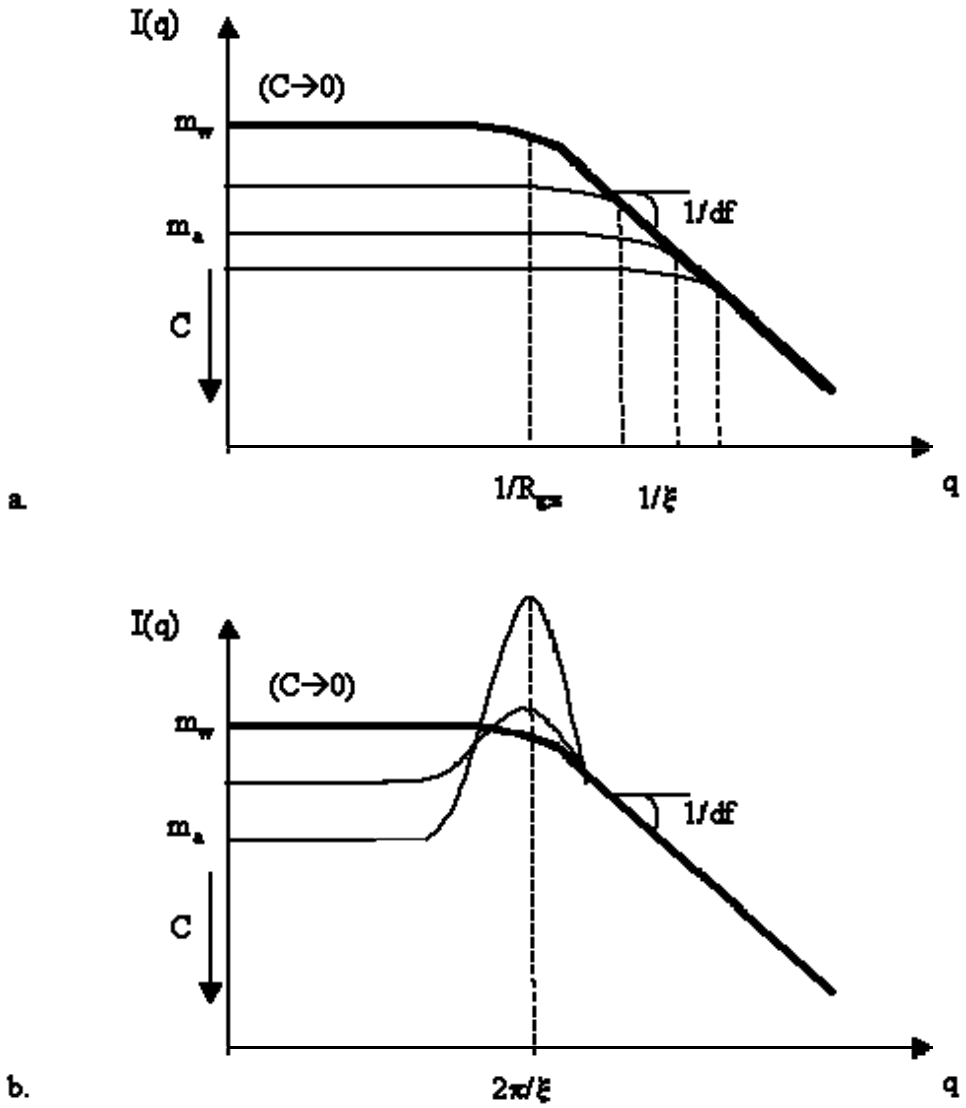
$$\int_0^\infty (g(r) - C) \cdot 4 \cdot \pi \cdot r^2 dr = m_a - 1 \qquad \textit{Equation A.24}$$

Et on peut définir le rayon apparent des agrégats Ra:

$$R_a^2 = \frac{1}{2m_a} \cdot (1 + \int_0^\infty (g(r) - C) \cdot 4 \cdot \pi \cdot r^4 dr) \qquad \textit{Equation A.25}$$

Dans la pratique, l'allure de *S(q)* au voisinage de χ^{-1} dépend énormément de la façon dont *g(r)* tend vers *C*. *S(q)* peut rester une fonction monotone décroissante (Figure A.8).

Figure A.8 Deux types d'évolution de I (q) en fonction de q depuis le cas dilué (courbe en trait épais) jusqu'au cas concentré (courbes entraits fins) pour (par exemple) des chaînes de polymères linéaires (a) et des agrégats colloïdaux (b).



Dans ce cas, χ est proportionnel à *Ra* et on peut utiliser la relation

$$S(q) = (1 + \frac{1}{3} \cdot q^2 \cdot R_a^2)^{-1} \qquad \textit{Equation A.26}$$

voire même dans certains cas ajuster l'ensemble de *S(q)* par l'équation A.25.

$$S(q) = \frac{1}{1 + \cdot q^2 \cdot \xi^2} \qquad \textit{Equation A.27}$$

Mais S(q) peut également présenter un pic au voisinage de $2\pi/\chi$ (Figure A.8b).

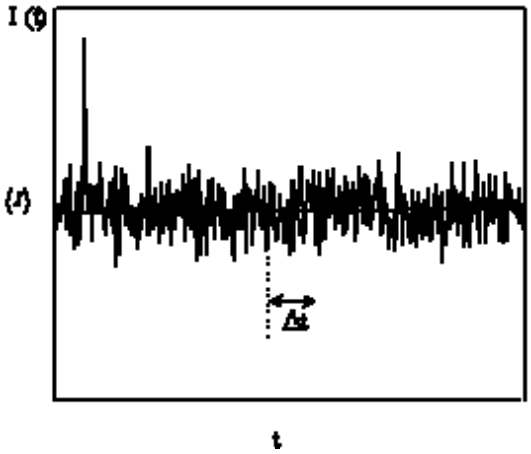
A partir des équations A.21 et A.25 on peut ainsi calculer la masse apparente ma des agrégats et le rayon Ra ou la longueur χ de corrélation de la solution.

Dans le cas de systèmes autosimilaires agrégés selon le modèle fractal, Ma augmente avec Ra^{df} *et* $S(q) \sim q^{df}$ *pour* $qRa>>1$ *(Higgins & Benoit, 1994; Brown, 1996).*

I.2. Diffusion dynamique de la lumière

En diffusion statique de la lumière, on s'intéresse à la moyenne temporelle de l'intensité diffusée. Or, l'agitation thermique du système provoque des fluctuations de l'intensité diffusée (Figure A.9).

Figure A.9 Fluctuations temporelles de l'intensité diffusée

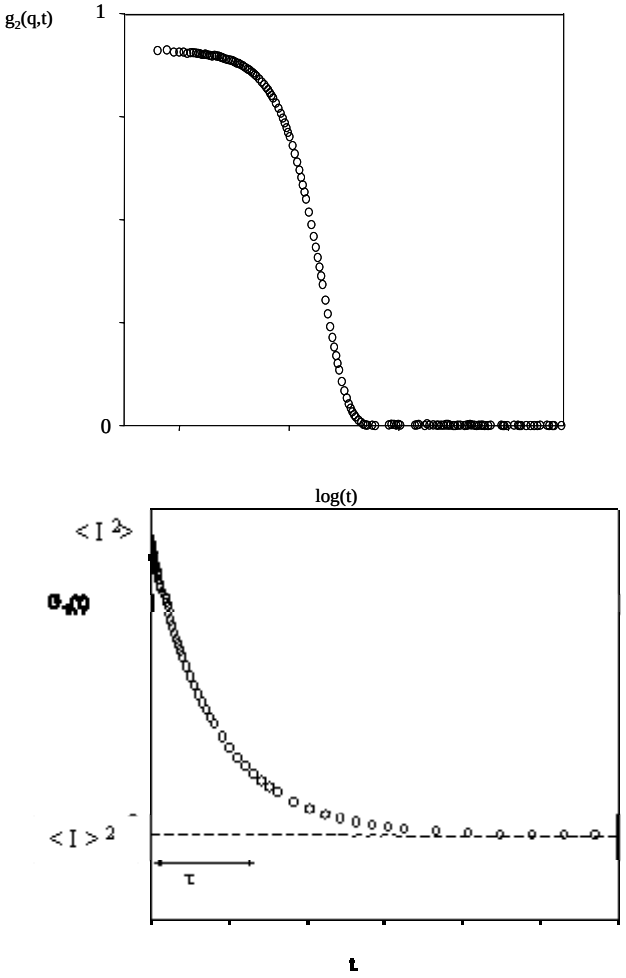


Pour le solvant, il s'agit de fluctuations locales de densité. Pour les macromolécules, ces variations sont dues non seulement à des fluctuations de concentrations mais aussi à des mouvements de rotation ou encore à leur flexibilité. L'importance relative de ces fluctuations est fonction de l'échelle spatiale d'observation q^{-1}. Ainsi, en fonction de l'échelle à laquelle on observe la solution, on pourra relier les fluctuations de l'intensité diffusée à des effets de diffusion translationnelle, rotationnelle ou encore à la dynamique interne des macromolécules. La fonction d'auto corrélation temporelle de l'intensité diffusée $G_2\ (q,\Delta t)$ désignée par la suite par $G_2\ (q,t)$, permet d'appréhender l'aspect dynamique de la solution. Elle est définie comme le produit de l'intensité à un instant t par l'intensité à un instant $t+\Delta t$ moyenné sur une longue période :

$$G_2(q,t) = \left\langle I(t) \cdot I(t + \Delta t) \right\rangle \qquad \textit{Equation A.28}$$

et à t=0, $G_2(q,t) = \left\langle I(t)^2 \right\rangle$ et décroît ensuite jusqu'à $G_2(q,t) = \left\langle I(t) \right\rangle^2$ comme le montre la Figure A.10. La « relaxation » de $G_2\ (q,t)$ avec le temps peut être caractérisée par un temps de corrélation caractéristique τ tel que pour $t>>\tau$, $G_2\ (q,t)$ est très proche de sa valeur asymptotique. τ renseigne donc sur la dynamique de la solution (Figure A.10).

Figure A.10 Evolution de G_2 (q,t) rn fonction du temps



Après normalisation de $G_2\ (q,t)$ on définit $g_2(q,t)$.

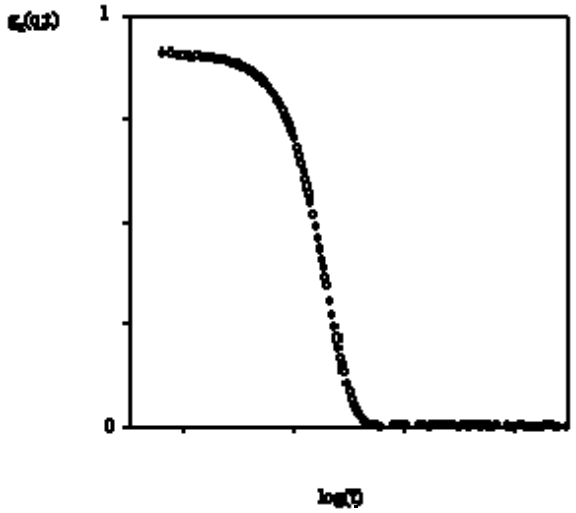
$$g_2(q,t) = \frac{G_2(q,t)}{\left\langle I(t) \right\rangle^2} \qquad \textit{Equation A.29}$$

Elle est reliée à la fonction d'auto-corrélation du champ électrique, $g_1(q,t)$, par la relation de Siegert :

$$g_2(q,t) = 1 + (a \cdot g_1(q,t)^2) \qquad \textit{Equation A.30}$$

a dépend des caractéristiques de l'appareillage utilisé et est compris entre 0 et 1. Dans le cas idéal $a = 1$ mais pour des raisons d'appareillage $a<1$ (Figure A.11).

Figure A.11 Evolution de g_1 (q,t) en fonction de log (t)



I.2.1 Diffusion dynamique de la lumière en milieu dilué

- *Cas de particules monodispersées isotropes avec qRg<<1 à C→0*

La fonction $g_1(q,t)$ est caractérisée alors par un seul temps de relaxation du à la diffusion des agrégats :

$$g_1(q,t) = exp(-t/\tau_r) \qquad \textit{Equation A.31}$$

Le temps de relaxation τ_r est directement relié au coefficient d'auto-diffusion translationnel D par la relation :

$$\left(1/\tau_r\right) = D \cdot q^2 \qquad \textit{Equation A.32}$$

En utilisant la relation de Stockes-Einstein, on peut alors calculer le rayon hydrodynamique des agrégats *Rh*. Il se définit comme étant le rayon de la sphère dure ayant le même coefficient de diffusion.

$$R_h = \frac{k \cdot T}{D \cdot 6 \cdot \pi \cdot \eta} \qquad \textit{Equation A.33}$$

avec k le facteur de Boltzmann (=1,38*10^{-23} J.K^{-1}) et η la viscosité du solvant et T la température absolue.

- *Cas de particules polydispersées isotropes avec qRg<<1 à $C \to 0$*

Dans la plupart des cas, les particules étudiées ne sont pas monodisperses. $g_1(q,t)$ est alors caractérisée par une distribution de temps de relaxation $A(\tau_r)$ reflétant la distribution de tailles présentes dans la solution.

$$g_1(q,t) = \int_t A(\tau_r) \cdot exp(t/\tau_r) d\tau_r \qquad \textit{Equation A.34}$$

$$et \int_t A(\tau_r) d\tau_r = 1 \qquad \textit{Equation A.35}$$

L'utilisation de logiciels permet d'extraire $A(\tau_r)$ et de calculer le temps de corrélation moyen de cette distribution et ainsi d'en obtenir le coefficient de diffusion moyen en z de la population d'amas (D_z).

I.2.2 Diffusion dynamique de la lumière en milieu concentré

Dans le cas où $q \to 0$, en supposant que la perte de corrélation est uniquement due à un mouvement d'origine Brownienne, on mesure alors le coefficient de diffusion mutuel (D mutuel) des agrégats donné par la loi de Fick:

$$J = -D_{mutuel} \cdot \overrightarrow{grad} C \qquad \textit{Equation A.36}$$

où J est le flux de matière et C la concentration.

Lorsque $C \to 0$, D_{mutuel} est égal au coefficient d'autodiffusion D.

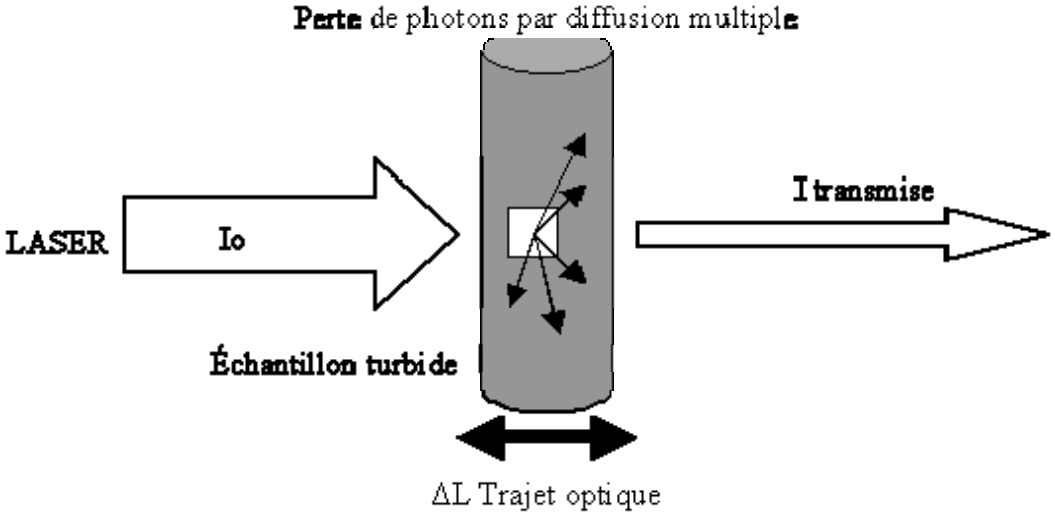
I.3 Diffusion en milieu turbide

La turbidité des systèmes est liée à la diffusion multiple. Pour des systèmes de turbidité infinie, la diffusion de lumière se fait de façon équivalent dans toutes les directions de l'espace.

I.3.1 Principe

Dans le cas de solutions turbides, un photon pourra être diffusé de façon multiple et ne portera donc pas la même information qu'un photon diffusé simplement (Figure A.12).

Figure A.12 Diffusion de la lumière en milieu turbide



On décompose ainsi l'intensité diffusée par la relation :

$$I_{mesuré} = I_{diffusion\ simple} + I_{diffusion\ multiple} \qquad \textit{Equation A.37}$$

Plusieurs corrections doivent être apportées de façon à calculer l'intensité issue de la diffusion simple (Nicolai *et al.*,, 2001). A partir de cette correction, on peut alors se replacer dans le cas de la diffusion simple et en extraire les valeurs caractéristiques des systèmes la masse apparente m_a, le rayon apparent *Ra* et l'évaluation de χ; la majorité des situations étudiées étant le cas de systèmes polydispersés concentrés.

- *Correction de l'intensité diffusée multiplement*

En pratique, deux faisceaux L1 et L2, issus de la même source traversent la solution et sont reçus sur deux photomultiplicateurs PM1 et PM2 (voir Chapitre II- Figure II.4). La corrélation entre la lumière diffusée par les deux faisceaux L1 et L2 est alors égale à pour Δtg0:

$$G_2(t) = \left\langle I_{L1}(0) I_{L2}(t) \right\rangle \qquad \textit{Equation A.38}$$

Si les photons sont diffusés simplement, la lumière reçue aux deux PM sera en phase et l'intensité mesurée sera alors équivalente aux deux PM: $I_{L1}(t) \sim I_{L2}(t)$. La fonction d'auto-correlation sera alors égale à

$$G_2(t) = \left\langle I(0) I(t \to 0) \right\rangle = G_2(t)_{idéal} \qquad \textit{Equation A.39}$$

Avec le montage comprenant les deux faisceaux, $G_2(t \to 0)_{idéal}$ est égal à 0,25 en théorie. Si une partie des photons est diffusée de façon multiple, la lumière reçue au PM1 ne sera pas en phase avec la lumière reçue au PM2 et $I_{L1}(t) \neq I_{L2}(t)$. On mesurera ainsi une fonction d'auto-correlation $G_2(t \to 0)$ renseignant sur la part des photons issus de la diffusion simple.

L'intensité de la fraction de photons diffusés simplement s'écrit alors :

$$I_{corrigé\ pour\ la\ diffusion\ multiple} = \sqrt{G_2(t \to 0) / G_2(t \to 0)_{idéal}} \cdot I_{mesuré} \qquad \textit{Equation A.40}$$

- *Correction de la turbidité*

Il existe par ailleurs un autre phénomène qui modifie la valeur de l'intensité mesurée : la turbidité (τ). En effet, une partie des photons est perdue à cause de la diffusion multiple (Figure II.20). Cette perte d'intensité est proportionnelle au chemin optique (ΔL) :

$$I_{\ corrigée\ pour\ la\ turbidité} = I_{\ mesuré}\, exp(\tau\ \Delta L) \qquad \textit{Equation A.41}$$

- *Correction de l'intensité par le toluène*

Comme il est très difficile de travailler sur des intensités absolues, l'intensité reçue mesurée est comparée à celle émise par le Ludox dont l'intensité diffusée n'a pas de dépendance angulaire. Le rapport entre le Ludox et le toluène est alors déterminé de façon à pouvoir comparer les mesures obtenues en diffusion simple et en diffusion multiple. L'intensité corrigée se définit par :

$$I_{corrigée\ par\ le\ toluène} = \frac{\sin\theta}{I_{Ludox90°}} \cdot r_{(Ludox/Toluène)} \cdot I_{mesurée} \qquad \textit{Equation A.42}$$

- *Conclusion*

Une fois ces mesures réalisées nous pouvons accéder à l'intensité résultant de la diffusion simple en combinant les équations A. 40,41 et 42:

$$I_{corrigée} = \sqrt{G_2(t\to 0)/G_2(t\to 0)_{idéal}} \cdot exp(T \cdot \Delta L) \cdot \frac{\sin\theta}{I_{Ludox90°}} \cdot r_{(Ludox/Toluène)} \cdot I_{mesurée} \qquad \textit{Equation A.43}$$

ANNEXE II. Etude rhéologique aux faibles déformations : essai harmonique

Cette méthode permet de caractériser les propriétés mécaniques des systèmes au cours de leurs structurations de façon non destructive. Des mesures rhéologiques en régime dynamique (ou harmonique) peuvent être réalisées. Le principe consiste à faire subir à l'échantillon une contrainte qui est une fonction sinusoïdale du temps.

Dans le domaine d'amplitude où le comportement viscoélastique est linéaire, la déformation (γ) et la contrainte (σ) sont deux fonctions sinusoïdales du temps mais avec un décalage de phase (δ). On les représente en utilisant des nombres complexes :

$$\sigma^* = \sigma_o (\cos \varsigma t + i \sin \varsigma t) \text{ et } \gamma^* = \gamma_o (\cos (\varsigma t + \delta) + i \sin (\varsigma t + \delta)) \qquad \text{Equation A.44}$$

avec ς pour la fréquence.

Ceci permet de définir un module complexe de cisaillement G*:

$$G^* = \sigma^*/\gamma^* = G' + i\, G'' \qquad \text{Equation A.45}$$

où G' est la partie réelle du module complexe appelé module « conservatif » mesurant l'énergie élastique accumulée pendant la période de déformation ; G'' est la partie imaginaire du module complexe appelée le module «dissipatif» mesurant l'énergie dissipée ou perdue.

G' et G'' sont indépendants de l'amplitude de la déformation dans la zone de viscoélasticité linéaire quelle que soit la fréquence de mesure.

Ainsi, à de faibles amplitudes de déformation, la gélification d'un système se traduit par un accroissement de G' en fonction du temps. La détermination de G' et G'' en fonction de la fréquence permet de caractériser le comportement viscoélastique du milieu et renseigne sur sa «structure», puisque G^* dépend des mouvements de chaînes et de la durée de vie des enchevêtrements.

ANNEXE III. Analyse d'image par la méthode de co-occurrence

La méthode de co-occurrences est basée sur l'observation des variations de niveaux de gris de pixels séparés par une distance donnée dans une direction déterminée. L'histogramme bidimensionnel résultant décrit la probabilité des paires de niveaux de gris existant dans un environnement spatial donné. Pour cette étude, nous avons considéré uniquement les paires de pixels adjacents. Le nombre de fois où un pixel ayant un niveau de gris i est trouvé adjacent à un pixel ayant un niveau de gris j a été calculé dans chaque direction (est, ouest, nord, sud). Les fréquences d'occurrences ($P_{i,j}$) sont alors assemblées dans une matrice appelée matrice de co-occurrences dont la taille est égale au nombre de niveaux de gris présents dans l'image (soit 256*256 dans notre cas). Pour chaque matrice de co-occurrences, 10 paramètres sont extraits et nommés selon la classification d'Haralick (Haralick *et al.* 1973; Haralick 1979) : énergie, entropie, contraste, corrélation, moment différentiel inverse, probabilité maximale, moyenne des lignes en x, moyenne des lignes en y, écart des lignes en x, écart des lignes en y dont les formules sont indiquées ci-dessous.

Tableau A.1: Définition mathématique des paramètres utilisés pour la méthode de co-occurrences. $P_{i,j}$ correspond à la fréquence d'occurrences calculée à partir du nombre de fois où un pixel de niveau de gris i est adjacent à un pixel de niveau de gris j .

Energie	$\sum_i \sum_j \left(P_{i,j}\right)^2$	**Probabilité maximale**	$Max_{i,j} P_{i,j}$
Entropie	$-\sum_i \sum_j P_{i,j} \log(P_{i,j})$	**Moyenne x**	u_x
Contraste	$\sum_i \sum_j \lvert i-j \rvert^2 \cdot P_{i,j}$	**Moyenne y**	u_y
Corrélation	$\sum_i \sum_j \frac{(i-u)\cdot(j-u)\cdot P_{i,j}}{\sigma^2}$	**Ecart des x**	σ_x
Moment Différentiel Inverse	$\sum_i \sum_j \frac{1}{1+(i-j)^2} P_{i,j}$	**Ecart des y**	σ_y

Chacun de ces paramètres renseigne sur la structuration du système (homogénéité, complexité, présences d'agrégats, de pores …). Les définitions théoriques de ces paramètres

ont été établies à partir d'étude préliminaires réalisées avec des images de synthèse (Lohmann, 1995).

- *Energie :* L'énergie est une mesure de l'homogénéité (uniformité) de l'image en regard de l'organisation spatiale des niveaux de gris dans l'image. Les plus grandes valeurs d'énergie sont obtenues pour des images uniformes, c'est à dire pour une image où un plus grand nombre de pixels voisins ont le même niveau de gris. Une image a une énergie faible quand les pixels proches les uns des autres présentent de grandes variations de niveaux de gris.
- *Entropie :* L'entropie est une mesure de la complexité à l'intérieur d'une image. Une valeur d'entropie est élevée lorsqu'un plus grand nombre de pixels ont la même intensité de niveau de gris et faible quand il existe une plus grande différence dans les niveaux de gris des pixels.
- *Contraste :* Le contraste mesure les variations locales des niveaux de gris dans l'image. Un fort contraste est obtenu pour une image ayant une grande quantité de variation locales de niveaux de gris en opposition avec une image plus uniforme (du point de vue des niveaux de gris). Le contraste peut renseigner sur la taille des « objets » et des structures de l'image. Une forte valeur correspond à des « objets » plus petits.
- *Corrélation :* La corrélation est une mesure des dépendances linéaires des tons de gris dans l'image. Pour une image ayant de grandes zones de même intensité, la corrélation sera plus forte que pour une image ayant des intensités plus bruitées, non corrélées. Ainsi, la corrélation permet de voir si l'image possède des zones de même intensité. La corrélation peut être plus grande pour une image de type ayant de grosses particules de même intensité ou une image ayant une structure 'linéaire' que pour une image avec de petites particules.
- *Moment différentiel inverse :* La valeur du moment différentiel est grande lorsque deux pixels ont des valeurs de niveaux de gris similaires c'est à dire quand l'image a de larges zones avec des niveaux de gris identiques ou proches.
- *Probabilité maximale :* La probabilité maximale donne le pourcentage de la valeur de la relation la plus fréquente se trouvant dans la matrice.

- *Moyenne des x (y) :* La moyenne des x (y) est la valeur de la moyenne des lignes x (ou y) de la matrice. Elle est élevée quand l'image est claire.
- *Ecart des x (y) :* Un fort écart des x (y) correspond à une grande gamme de niveaux de gris. Plus l'écart est grand, moins l'image est uniforme du point de vue des niveaux de gris.

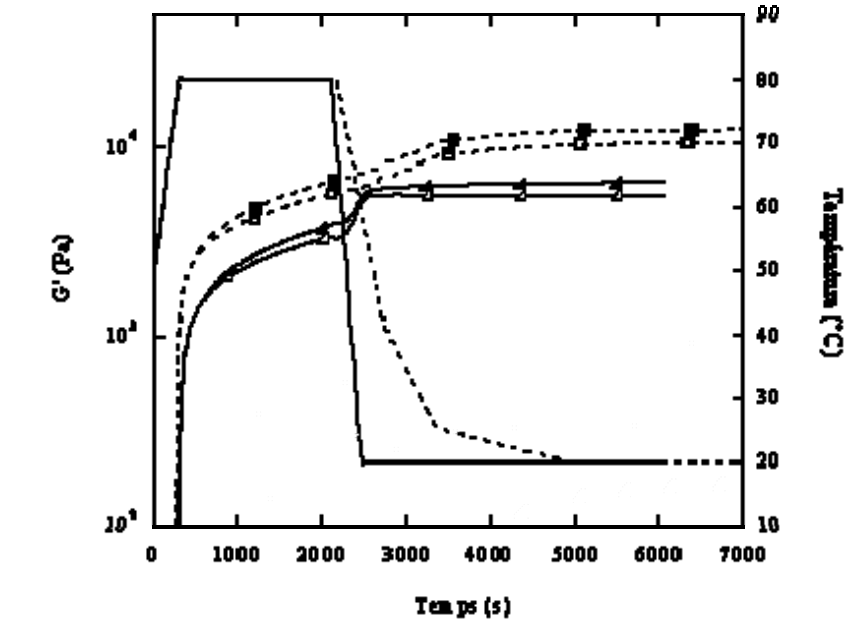
Une analyse en composante principale est alors appliquée à ces paramètres permettant d'obtenir des cartes factorielles distinguant les images entre elles.

Nous avons vérifié que la structure des systèmes observés n'avait pas d'orientation selon une direction préférentielle, les mêmes cartes factorielles étant obtenues. De façon arbitraire, nous avons choisi de calculer les variations de niveaux de gris selon la direction est.

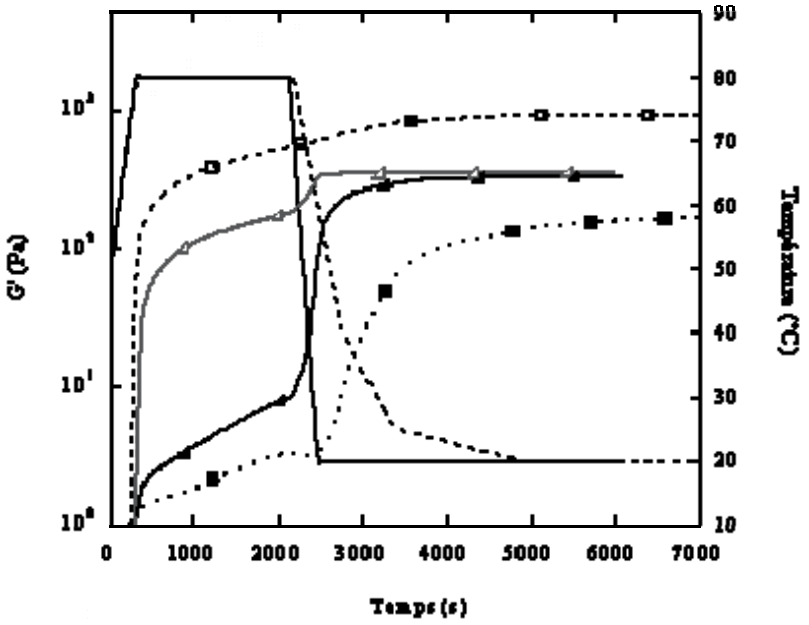
ANNEXE IV Comparaison des lots de SAB 85640 et R16077

Les figures A.13 et 14 montrent la comparaison des cinétiques de gélification et des microstructures finales obtenues pour la SAB (8 %) et pour le mélange SAB(8 %)/pectines LM (0,85 %) en fonction des différents lots utilisés. Le lot 85640 a été employé pour le chapitre IV et le lot R16077 pour tous les autres chapitres. Le traitement thermique du chapitre IV se distingue par un refroidissement en trois étapes (trait pointillé sur la Figure A.13) alors qu'une seule étape a été appliquée pour les autres chapitres (trait plein).

Figure A.13 Comparaison des modules G' finaux obtenus en fonction des lots pour **a**. la SAB 8% et **b.** pour le mélange SAB 8% /Pectines LM 0,85 % en absence (symboles vides) et en présence (symboles pleins) de 3 mM $CaCl_2$.
(¢): lot n° 85640 et (y) lot R16077 . Les deux traitements thermiques utilisés sont symbolisés par des traits pleins ou pointillés.

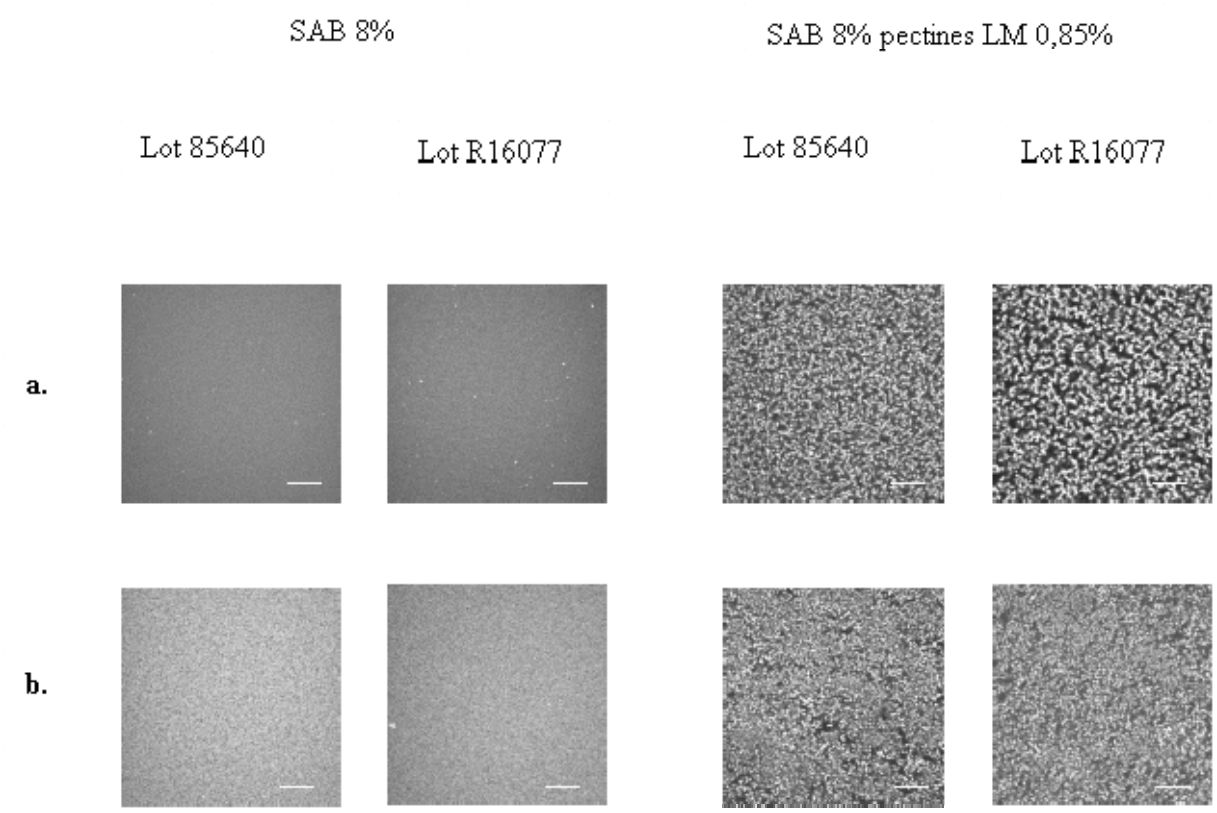


a.



b.

Figure A.*14* Comparaison des structures finales obtenues pour les différents lots de SAB pour la protéine seule(8 %) et pour le mélange SAB 8% /Pectines LM 0,85%, en absence (a) et en présence (b) de 3 mM $CaCl_2$.



Les profils rhéologiques de la SAB seule (Figure A.13a) sont similaires pour les deux lots et l'effet des ions calcium se traduit de façon identique par un léger renforcement du gel. Toutefois les modules obtenus avec le lot 85640 sont supérieurs aux modules obtenus avec le lot R16077. Les microstructures correspondantes observées par MCBL sont identiques (Figure A.14).

Les profils rhéologiques des mélanges (Figure A.13b) diffèrent sensiblement entre eux. Cependant les tendances restent les mêmes: en absence de calcium, les profils de gélifications sont similaires à ceux de la protéine seule et en présence de calcium, une faible gélification au cours du plateau à 80 °C est mesurée. Les microstructures des systèmes associés (Figure A.14) observées sont semblables mais les zones sombres sont plus importantes pour le lot R16077, montrant probablement une séparation de phase plus marquée.

Les comportements rhéologiques et les observations microscopiques des deux lots étant comparables, nous avons relié les conclusions de différents chapitres en tenant compte des différences induites par ce changement de lot.

Pour expliquer ces différences, on peut supposer qu'une modification du procédé de purification a eu lieu mais il ne nous a pas été possible d'obtenir des informations à ce sujet auprès du fournisseur ICN. En outre, les différences de teneurs en ions quantifiées (voir II.2.1.2) pourraient également jouer un rôle.

Résumé

La gélification thermique de protéines globulaires (albumine de sérum bovin (SAB) et *β*-Lactoglobuline) en mélange avec la pectine faiblement méthylée (pectine LM) a été étudiée par rhéologie et microscopie confocale à balayage laser couplée à une analyse d'image par la méthode de co-occurrences. Les propriétés des biopolymères seuls ont également été décrites. La différence entre le comportement des deux protéines globulaires en mélange a également été étudiée. La structure des gels de SAB, caractérisée par diffusion de la lumière, varie fortement selon la teneur en NaCl ou $CaCl_2$. Dans les mélanges, une compétition entre les cinétiques de gélification protéique et de séparation de phase est observée. Celle-ci est fortement dépendante des facteurs intrinsèques et extrinsèques du système, et en particulier de la teneur et la nature des sels ajoutés (NaCl et/ou $CaCl_2$). L'augmentation de concentration en pectine se traduit par une séparation de phase plus marquée. Selon les conditions de concentrations en biopolymères et la nature des sels dans le milieu, le gel de protéine est affaibli ou renforcé par la présence du polyoside. En présence de calcium, les deux biopolymères présentent une affinité spécifique pour ce cation qui se traduit, pour les pectines LM, par leur capacité à gélifier. En mélange, un gel composite est alors formé. Selon la teneur en NaCl, la gélification du mélange est gouvernée par celle des protéines ou celle des pectines LM. L'ensemble des résultats permet de proposer un schéma d'interprétation des mécanismes impliqués dans la formation des gels en mélange au cours du processus thermique basée sur la séparation de phase et la gélification des biopolymères.

Mots clés : SAB, *β*-Lactoglobuline, pectines LM, séparation de phase, gélification, structure, rhéologie, microscopie confocale à balayage laser, analyse d'image, diffusion de la lumière.

Abstract

Heat-induced gelation of globular protein (bovine serum albumin (BSA) and β-Lactoglobulin) mixed with low methoxyl pectin (LM pectin) was studied by rheology and confocal laser scanning microscopy coupled with texture image analysis using the co-occurrence method. Properties of individual biopolymers were also described. The difference between the two globular proteins in the mixture was also evaluated. The structure of BSA gels, characterized by light scattering, depended strongly on NaCl or $CaCl_2$ content. In the mixture, a competition between protein gelation and phase separation kinetics was evidenced. The control of the kinetics depends on intrinsic and extrinsic factors and especially on the nature and content of added salt. Increasing LM pectin concentration results in a more pronounced phase separation. Depending on biopolymer concentrations and the nature of salt in the medium, protein gels is weakened or strengthened by the presence of the polysaccharide. In presence of calcium, both biopolymers have a specific affinity for this cation that is traduced, for LM pectin, by its ability to form a gel. In the mixture, a composite gel is formed. Depending on NaCl content, gelation of the system is governed either by protein or LM pectin gelation. From all the results obtained, a schematic interpretation of mechanism implied in the formation of mixed gels during the heating process was proposed based on phase separation and gelation of biopolymers.

Key words : BSA, β-Lactoglobulin, LM pectin, phase separation, gelation, structure, rheology, confocal laser scanning microscopy, image analysis, light scattering.