



**HAL**  
open science

# Étude de la coacervation complexe entre la bêta-lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse

Christophe Schmitt

► **To cite this version:**

Christophe Schmitt. Étude de la coacervation complexe entre la bêta-lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2000. Français. NNT : 2000INPL101N . tel-01750502

**HAL Id: tel-01750502**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750502>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

136025 2043

00 INPL 2015

[R] 2000 SCHMITT, C.

Institut National Polytechnique de Lorraine  
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

---

Thèse pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine  
Spécialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires

présentée par

**Christophe SCHMITT**

---

**Etude de la coacervation complexe entre la  $\beta$ -lactoglobuline et  
la gomme d'acacia en solution aqueuse**

---

Service Commun de la Documentation  
INPL  
Nancy-Brabois

Soutenue publiquement le 27 octobre 2000 devant la commission d'examen :

Président : M. Joël Hardy, Professeur, INPL-ENSAIA, Nancy

Rapporteurs : M. Cees G. de Kruif, Professeur, NIZO food research, Ede, Pays-Bas  
M. Ilias Iliopoulos, Directeur de Recherche, ESPCI, Paris

Examineurs : Mme Sylvie Turgeon, Professeure, Université Laval, Québec, Canada  
M. Denis Renard, Chargé de Recherche, INRA, Nantes  
M. Christian Sanchez, Maître de Conférences, INPL-ENSAIA, Nancy



« Mais que se passe-t-il si, quand vous arrivez, il n'y a que du brouillard ? Vous pouvez toujours espérer ceci ou cela, vous pouvez toujours énoncer des théorèmes sur la topologie des lignes de partage des eaux ; mais si vous vous retrouvez dans une nuée où se condensent des formes vagues et où il vous est impossible de distinguer sol et ciel ? Toutes vos belles théories s'effondrent ! Voilà le genre d'aventure qui nous arrive de temps à autre ! »

(Richard Feynman, 1918-1988)



A mes grands-parents  
A mes parents  
A ma sœur

## **Avant-propos**

Ce travail de recherche a été réalisé au Laboratoire de Physico-Chimie et Génie Alimentaires de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires sous la direction de Monsieur Joël Hardy, Professeur à l'ENSAIA. Je tiens à le remercier pour la grande liberté d'action qu'il m'a accordée au cours de cette thèse, mais également pour les commentaires éclairés et les suggestions pertinentes dont il m'a fait part durant la rédaction de ce document.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Christian Sanchez, Maître de Conférences à l'ENSAIA et co-directeur de cette thèse pour le soutien et pour la confiance qu'il m'a témoignés durant ces années passées au laboratoire. Je tiens à le remercier de m'avoir inculqué les principes qui sont à la base de toute démarche scientifique : la curiosité, la rigueur, la ténacité et l'humilité. Je le remercie pour les innombrables heures passées à discuter et à tenter de comprendre les résultats obtenus pour en arriver parfois à des considérations métaphysiques. Qu'il soit assuré ici de ma plus sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur Cees G. de Kruif, Professeur à l'Université d'Utrecht et responsable du département Product Technology au NIZO food research de Ede et Monsieur Ilias Iliopoulos, Directeur de Recherche à l'ESCPI de Paris pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier tout particulièrement Madame Sylvie Turgeon, Professeure à l'Université Laval de Québec et Monsieur Denis Renard, Chargé de Recherche à l'INRA de Nantes pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie également Monsieur Cees G. de Kruif pour m'avoir permis de passer deux mois au NIZO food research de Ede. Ils ont constitué pour moi une expérience riche en découvertes tant scientifiques que culturelles.

Je remercie ici également Messieurs Denis Renard et Paul Robert de l'INRA de Nantes pour m'avoir fait partager les mystères de la spectroscopie infra-rouge et de la diffusion de la lumière durant mon séjour à Nantes. Nos discussions sur l'apparition du pic d'absorbance du CO<sub>2</sub> sur les spectres infra-rouges resteront pour moi un souvenir impérissable.

Je tiens également à remercier Alf Lamprecht, étudiant en thèse et Monsieur Claus-Michael Lehr, Professeur à l'Université de Saarbrücken pour m'avoir accueilli durant plus d'un mois au sein du Laboratoire de Biopharmacie et Pharmacie Galénique. Je remercie tout particulièrement Alf pour les heures que nous avons passées dans la bonne humeur à observer la structure des coacervats.

Je voudrais également remercier Monsieur Fabien Thomas, Directeur de Recherche au Laboratoire Environnement Minéralurgie de l'INPL-CNRS pour m'avoir permis de réaliser les mesures de mobilité électrophorétique. Je tiens également à le remercier pour les discussions que nous avons eues durant la préparation des publications.

Je remercie Monsieur Harry S. Rollema, Chercheur au NIZO food research pour sa grande sympathie et pour l'aide apportée dans la réalisation des spectres RMN de la gomme



d'acacia à la Faculté des Sciences de Nijmegen. Mes remerciements également à Monsieur Erik ten Grotenhuis, Chercheur au NIZO food research pour ses conseils dans la réalisation des mesures de diffusion de la lumière en milieu turbide.

Je tiens également à remercier ici Séverine Despond et Ghozlène Mekhloufi pour avoir choisi d'étudier la coacervation complexe durant leur DEA. Toutes deux sont pétées de qualités et travailler avec elles fut un bonheur. Que dire des séances hebdomadaires de course à pied et de badminton... Qu'elles trouvent ici le témoignage de mon indéfectible amitié.

Je remercie Madame Marie-Noëlle Maucourt pour sa sympathie et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée durant cette thèse. Un grand merci également à Carole Pierret pour le sérieux et l'enthousiasme avec lesquels elle a accepté de réaliser des expériences complémentaires de turbidimétrie en fin de thèse. Je remercie Madame Angèle Colas pour sa gentillesse et sa disponibilité malgré les nombreuses tâches qui l'occupent. Je tiens également à remercier Madame Sylviane Lemaire pour sa bonne humeur, sa disponibilité et ses conseils avisés dans la recherche de nombreux articles et monographies.

Je tiens à remercier Marine, Marie-Laure, Philippe et Cyril pour les fous-rires et agréables moments passés au laboratoire et ailleurs. Merci également à Cristina, Claude, Raquel, Michel, Pierre, Benjamin et Excellent pour leur bonne humeur et leur amitié. Je tiens également à saluer ici Gilles, Patricia et Erika rencontrés aux Pays-Bas et avec lesquels j'ai passé des journées mémorables. Je ne saurais oublier la fine équipe des administrateurs de l'association ARIA : Isabelle, Sophie, Lionel, Claude, Silvère et Stéphane avec lesquels j'ai vécu des moments de joie et de stress intenses lors de la préparation des journées Biotechno. Je souhaite à tous une pleine réussite future tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je remercie également tous membres du Laboratoire de Physico-Chimie et Génie Alimentaires grâce à qui ces quatre années ont été pour moi riches d'échanges et d'anecdotes inénarrables.

Je salue également la sympathie des Enseignants-Chercheurs du service de Chimie de l'IUT de Nancy.

Je terminerais cet avant-propos en remerciant les organismes qui ont financièrement contribué à la réalisation de cette thèse avec en premier lieu les Ministères de l'Éducation Nationale et de la Recherche, l'Académie d'Agriculture de France (Fondation Jean et Marie-Louise Dufrenoy), l'Union Européenne (Programme COST) et enfin l'Office Allemand d'Échanges Universitaires (DAAD).

---

**Sommaire**

<b>Avant-propos</b> .....	<b>4</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>6</b>
<b>Nomenclature</b> .....	<b>11</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapitre 1 Revue bibliographique</b> .....	<b>19</b>
<b>1 Stabilité des mélanges de biopolymères</b> .....	<b>19</b>
1.1 Approche thermodynamique .....	19
1.1.1 <i>L'entropie combinatoire de mélange</i> .....	19
1.1.2 <i>Contribution interactionnelle</i> .....	20
1.1.3 <i>L'effet de volume libre</i> .....	21
1.1.4 <i>Séparation de phase dans les mélanges de biopolymères</i> .....	21
1.1.5 <i>Différenciation macroscopique entre séparation de phase ségrégative et associative</i> .....	22
<b>2 La coacervation complexe</b> .....	<b>25</b>
2.1 Historique de la coacervation complexe .....	25
2.2 La coacervation complexe : modèles théoriques .....	26
2.2.1 <i>Théorie de Voorn et Overbeek (1957)</i> .....	26
2.2.2 <i>Théorie de Veis et Aranyi (1960)</i> .....	27
2.2.3 <i>Théorie de Nakajima et Sato (1972)</i> .....	28
2.2.4 <i>Théorie de Tainaka (1979, 1980)</i> .....	28
<b>3 Nature des interactions entre les constituants d'un coacervat</b> .....	<b>29</b>
3.1 Interactions électrostatiques.....	29
3.2 Interactions non-électrostatiques .....	32
3.2.1 <i>Liaisons hydrogènes</i> .....	33
3.2.2 <i>Interactions hydrophobes</i> .....	34
3.2.3 <i>Liaisons covalentes</i> .....	35
<b>4 Paramètres physico-chimiques et physiques influençant la formation des coacervats</b> .....	<b>36</b>
4.1 Influence du pH .....	37
4.2 Influence de la force ionique .....	41
4.3 Influence de la densité de charge des macromolécules .....	44
4.4 Influence de la masse moléculaire des biopolymères.....	45
4.5 Influence du ratio massique protéine : polysaccharide.....	46
4.6 Influence de la concentration totale en biopolymères .....	48

4.7	Influence des paramètres physiques sur la coacervation complexe.....	48
4.7.1	Température.....	48
4.7.2	Pression.....	50
4.7.3	Agitation et temps d'agitation.....	51
<b>5</b>	<b>Mécanisme de formation et structure des coacervats.....</b>	<b>52</b>
5.1	Mécanisme de formation des coacervats.....	52
5.2	Structure des complexes macromoléculaires et des coacervats.....	55
<b>6</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>58</b>

## Chapitre 2 Caractérisation préliminaire de la $\beta$ -lactoglobuline et de la gomme d'acacia utilisés dans cette étude ..... 60

<b>1</b>	<b>Présentation des biopolymères utilisés.....</b>	<b>60</b>
1.1	La $\beta$ -lactoglobuline.....	60
1.1.1	Structures primaire, secondaire et tertiaire de la $\beta$ -lactoglobuline.....	61
1.1.2	Structure quaternaire de la $\beta$ -lactoglobuline.....	62
1.1.2.1	Influence du pH.....	62
1.1.2.2	Influence de la force ionique.....	63
1.1.2.3	Influence de la température.....	64
1.1.2.4	Rôle biologique et autres propriétés physico-chimiques de la $\beta$ -lactoglobuline.....	64
1.2	La gomme d'acacia.....	65
1.2.1	Composition chimique de la gomme d'acacia.....	66
1.2.2	Structure de la gomme d'acacia.....	66
1.2.3	Principales propriétés physico-chimiques de la gomme d'acacia.....	68
1.2.4	Rôle biologique et autres propriétés de la gomme d'acacia.....	69
<b>2</b>	<b>Matériels et méthodes de caractérisation des biopolymères.....</b>	<b>69</b>
2.1	Matériels.....	69
2.2	Méthodes.....	70
2.2.1	Analyses physico-chimiques et contrôle de la pureté des poudres de $\beta$ -lactoglobuline et de gomme d'acacia.....	70
2.2.1.1	Analyses physico-chimiques.....	70
2.2.1.2	Contrôle de la pureté des poudres de $\beta$ -lactoglobuline et de gomme d'acacia.....	70
2.2.1.2.1	Chromatographie haute performance en phase inverse de la $\beta$ -lactoglobuline.....	70
2.2.1.2.2	Spectre RMN $C^{13}$ de la gomme d'acacia.....	71
2.2.2	Structure et caractéristiques physico-chimiques des dispersions de $\beta$ -lactoglobuline et de gomme d'acacia.....	71
2.2.2.1	Préparation des dispersions de $\beta$ -lactoglobuline et de gomme d'acacia.....	71
2.2.2.2	Solubilité des dispersions de $\beta$ -lactoglobuline et de gomme d'acacia.....	72
2.2.2.3	Mesure de la taille et de la distribution de taille des agrégats de $\beta$ -lactoglobuline.....	72
2.2.2.4	Mesure de la masse moléculaire de la $\beta$ -lactoglobuline et de la gomme d'acacia.....	73
2.2.2.5	Détermination des rayons hydrodynamiques de la $\beta$ -lactoglobuline et de la gomme d'acacia.....	73

2.2.2.6 Détermination de la mobilité électrophorétique des dispersions de $\beta$ -lg et de gomme d'acacia .....	74
<b>3 Résultats et discussion.....</b>	<b>75</b>
3.1 Analyses physico-chimiques et pureté des macromolécules .....	75
3.2 Solubilité des macromolécules .....	77
3.3 Caractérisation des différentes dispersions obtenues : détermination des masses moléculaires, rayons hydrodynamiques et diamètre des agrégats protéiques .....	80
3.3.1 Gomme d'acacia .....	80
3.3.2 $\beta$ -lactoglobuline .....	84
3.4 Mobilité électrophorétique des dispersions de BLG <sub>agr</sub> , BLG et gomme d'acacia.....	88
<b>4 Conclusion.....</b>	<b>91</b>
<b>Chapitre 3 Etude de la stabilité et de la structure des mélanges <math>\beta</math>-lactoglobuline/gomme d'acacia/eau : influence du pH, du ratio Pr : Ps, de la concentration totale et de la polydispersité.....</b>	<b>93</b>
<b>1 Introduction .....</b>	<b>93</b>
<b>2 Matériels et méthodes .....</b>	<b>93</b>
2.1 Matériels .....	93
2.2 Méthodes .....	93
2.2.1 Etude macroscopique des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau .....	94
2.2.1.1 Construction des diagrammes de phases ternaires.....	94
2.2.1.2 Suivi de l'absorbance à 650 nm dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau.....	95
2.2.1.3 Détermination de la composition des phases après deux jours .....	96
2.2.1.4 Observation visuelle des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau .....	96
2.2.2 Etude mésoscopique des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau .....	96
2.2.2.1 Mobilité électrophorétique des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau.....	96
2.2.2.2 Taille et distribution de taille des particules .....	97
2.2.2.3 Morphologie et structure des particules dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau .....	97
2.2.2.3.1 Microscopie optique à contraste de phase .....	97
2.2.2.3.2 Microscopie confocale à balayage laser .....	97
2.2.3 Etude moléculaire des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau.....	98
2.2.3.1 Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier.....	99
2.2.3.2 Dichroïsme circulaire.....	100
2.2.3.3 Spectroscopie de fluorescence frontale .....	100
2.2.4 Analyse statistique .....	101
<b>3 Résultats et Discussion.....</b>	<b>101</b>
3.1 Etude macroscopique des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme acacia/eau .....	102
3.1.1 Diagrammes de phases ternaires à pH 4,2.....	102
3.1.2 Influence du pH et du ratio protéine : polysaccharide (Pr : Ps).....	104
3.1.2.1 Diagrammes de phases partiels.....	104
3.1.2.2 Variation de l'absorbance des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme	

d'acacia/eau à 650 nm.....	106
3.1.3 <i>Observation de la séparation de phase après deux jours et étude de la composition des deux phases obtenues</i> .....	109
3.1.3.1 Observation macroscopique de la séparation de phase.....	109
3.1.3.2 Etude de la composition en $\beta$ -lactoglobuline et en gomme d'acacia des deux phases à l'équilibre thermodynamique .....	113
3.1.4 <i>Conclusion de l'étude macroscopique de la séparation de phase dans les mélanges <math>\beta</math>-lactoglobuline/gomme d'acacia/eau</i> .....	118
3.2 Etude mésoscopique de la séparation de phase dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau.....	119
3.2.1 <i>Mobilité électrophorétique des particules obtenues dans les mélanges <math>\beta</math>-lactoglobuline/gomme d'acacia/eau</i> .....	119
3.2.2 <i>Tailles et distributions de taille des particules obtenues après séparation de phase dans les mélanges <math>\beta</math>-lactoglobuline/gomme d'acacia/eau</i> .....	120
3.2.3 <i>Structure et morphologie des particules obtenues après séparation de phase dans les mélanges <math>\beta</math>-lactoglobuline/gomme d'acacia/eau</i> .....	124
3.2.3.1 Microscopie optique à contraste de phase .....	124
3.2.3.2 Microscopie confocale à balayage laser .....	128
3.2.4 <i>Conclusion de l'étude mésoscopique de la séparation de phase dans les mélanges <math>\beta</math>-lactoglobuline/gomme d'acacia/eau</i> .....	135
3.3 Etude moléculaire de la séparation de phase .....	136
3.3.1 <i>Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier</i> .....	136
3.3.2 <i>Dichroïsme circulaire</i> .....	140
3.3.3 <i>Fluorescence frontale</i> .....	142
<b>4 Conclusion de l'étude moléculaire de la séparation de phase dans les mélanges <math>\beta</math>-lactoglobuline/gomme d'acacia eau</b> .....	<b>144</b>
<b>Chapitre 4 Approche cinétique de la stabilité et de la structure des mélanges <math>\beta</math>-lactoglobuline/gomme d'acacia/eau</b> .....	<b>145</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>145</b>
<b>2 Matériels et méthodes</b> .....	<b>145</b>
2.1 Matériels .....	145
2.2 Méthodes .....	146
2.2.1 <i>Suivi de la cinétique de séparation de phase par diffusion dynamique de la lumière en milieu turbide</i> .....	146
2.2.1.1 Principe de la diffusion de la lumière en milieu turbide.....	146
2.2.1.2 Dispositif expérimental.....	147
2.2.2 <i>Suivi de la séparation de phase par microscopie confocale à balayage laser</i> ..	147
2.2.3 <i>Suivi de la séparation de phase et de la structuration des mélanges par diffusion statique de la lumière aux petits angles</i> .....	148
2.2.3.1 Principe de l'étude des phénomènes de séparation de phase par diffusion de la lumière au cours du temps.....	148
2.2.3.2 Dispositif expérimental.....	151
<b>3 Résultats et discussion</b> .....	<b>152</b>

3.1	Suivi de la structure au cours du temps des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau par diffusion dynamique de la lumière en milieu turbide (DLMT).....	152
3.2	Suivi de la stabilité des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau par microscopie confocale à balayage laser.....	158
3.3	Etude de la cinétique de séparation de phase dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau par diffusion statique de la lumière aux petits angles.....	168
<b>4</b>	<b>Conclusion de l'étude cinétique de la séparation de phase dans les mélanges <math>\beta</math>-lactoglobuline/gomme d'acacia/eau .....</b>	<b>180</b>
	<b>Conclusions et perspectives de l'étude .....</b>	<b>183</b>
<b>1</b>	<b>Résultats fondamentaux obtenus au cours de cette étude .....</b>	<b>183</b>
1.1	Influence des paramètres physico-chimiques sur la coacervation complexe entre la $\beta$ -lactoglobuline et la gomme d'acacia.....	183
1.2	Structure et stabilité des particules formées .....	183
1.3	Modifications de la structure moléculaire de la $\beta$ -lactoglobuline .....	184
1.4	Cinétique de structuration des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau.....	184
<b>2</b>	<b>Validité des méthodes expérimentales utilisées .....</b>	<b>185</b>
<b>3</b>	<b>Perspectives de cette étude .....</b>	<b>185</b>
<b>4</b>	<b>Domaines d'application de cette étude .....</b>	<b>186</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>187</b>

## Nomenclature

AED	Analyse enthalpique différentielle
AG	Fraction arabino-galactane de la gomme d'acacia
AGP	Fraction arabino-galacto-protéique la gomme d'acacia
ASB	Albumine de sérum bovin
ASH	Albumine de sérum humain
$a_w$	Activité de l'eau
BLG	Dispersion de $\beta$ -lactoglobuline native
BLG <sub>agr</sub>	Dispersion de $\beta$ -lactoglobuline contenant des agrégats
C14TABr	Bromure de tétradécyltriméthylammonium
CE	Chromatographie d'exclusion
CHC	Théorie de Cahn-Hilliard-Cook
CMC	Carboxyméthylcellulose
CPDMDAA	Chlorure de poly(diméthylallylammonium)
CS	Cellulose sulfatée
$C_t$	Concentration totale en biopolymères
D ou $D_0$	Coefficient de diffusion des particules ( $m^2 s^{-1}$ )
$D_{app}$	Diamètre apparent d'une particule (m)
DC	Dichroïsme circulaire
DDL	Diffusion dynamique de la lumière
$d_f$	Dimension fractale
DLMT	Diffusion de la lumière en milieu turbide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
$d_s$	Contribution de surface à la structure de l'interface
DS	Dextrane sulfaté ou décomposition spinodale
DSLPA	Diffusion statique de la lumière aux petits angles
$d_v$	Contribution de volume à la structure de l'interface
E	Champ électrique ( $V m^{-1}$ )
EEP	pH d'équivalence électrique
F(q)	Facteur de forme en DSLPA
FITC	Fluorescéine isothiocyanate

## Nomenclature

---

$g_1(t)$	Fonction de corrélation de variation de champ électrique
$g_2(t)$	Fonction de corrélation de variation d'intensité diffusée en DLMT
$g_2(\Delta t)$	Fonction de corrélation de variation d'intensité diffusée en DDL
GP	Fraction glyco-protéique de la gomme d'acacia
HMPA	Polyacrylate de sodium modifié par greffage hydrophobe
$I(q)$	Intensité diffusée en DSLPA
$I_{\max}$	Maximum d'intensité diffusée en DSLPA
$I_0$	Rigidité intrinsèque d'un polymère
$k_B$	Constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ )
$k_0$	Paramètre intervenant dans le calcul de $\tau_0$ en DLMT
$l$	Longueur de corrélation dans une dispersion en DLMT (m)
$l^*$	Distance minimale de transport de la lumière donnant lieu à une rétro-diffusion en DLMT (m)
$M_{\text{app}}$	Masse moléculaire apparente ( $\text{kg mol}^{-1}$ )
MCBL	Microscopie confocale à balayage laser
MOCP	Microscopie optique à contraste de phase
$n$	Indice de réfraction d'un milieu
NaHy	Hyaluronate de sodium
NAPAMS	Sel sodique de l'acide poly(2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique)
NAPSS	Sel sodique de l'acide polystyrène sulfonique
NC	Nucléation et croissance
$P(s)$	Probabilité pour que la lumière suive un trajet optique $s$ en DLMT
PAI	Protéine agrégée insoluble
PAS	Protéine agrégée soluble
$\text{pH}_c$	pH de formation des complexes macromoléculaires
$\text{pH}_i$	pH isoélectrique d'une protéine
$\text{pH}_{\text{morph}}$	pH de stabilisation des complexes macromoléculaires
$\text{pH}_{\text{precip}}$	pH de précipitation des complexes macromoléculaires
$\text{pH}_0$	pH de séparation de phase macroscopique
PNS	Protéine native soluble
$q$	Vecteur d'onde d'intensité diffusée ( $\text{m}^{-1}$ )
$q_{\max}$	Vecteur d'onde correspondant à $I_{\max}$ ( $\text{m}^{-1}$ )
$R$	Constante des gaz parfaits ( $8,3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )



$r$	Masse moléculaire d'un biopolymère ( $\text{kg mol}^{-1}$ )
$R(q)$	Facteur de linéarisation dans la théorie de Cahn-Hilliard-Cook
$R_h$	Rayon hydrodynamique (nm)
RITC	Rhodamine B isothiocyanate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RP-HPLC	Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse
$s$	Trajet optique ou nombre de trajets optiques en DLMT
$S(q)$	Facteur de structure en DSLPA
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SFF	Spectroscopie de fluorescence frontale
SIRTF	Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier
$T$	Température absolue (K)
$t$	Temps (s)
TFA	Acide trifluoroacétique
tpm	Tours par minute
TTAB	Bromure de tétradécyltriméthylammonium
$V$	Volume total du mélange ( $\text{m}^3$ )
$V_i$	Volume molaire du composé $i$ ( $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$ )
$z$	Nombre de coordination dans la théorie de Flory-Huggins
$Z_p$	Charge de la protéine ( $V$ )
$\mu_E$	Mobilité électrophorétique ( $\text{m m}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
$\Delta E_i$	Chaleur de vaporisation du composé $i$ à pression nulle ( $\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$ )
$\Delta G_M$	Variation d'énergie libre du mélange (J)
$\Delta H_M$	Variation d'enthalpie du mélange ( $\text{J mol}^{-1}$ )
$\Delta S_M$	Variation d'entropie du mélange ( $\text{J K}^{-1}$ )
$\Delta \alpha_j$	Variation de l'énergie d'interaction associé à la création d'un segment $i$ - $j$ dans la théorie de Flory-Huggins (J)
$\Lambda$	Rayon d'un «patch» de densité de charge porté par une protéine ou longueur de corrélation d'un domaine structural en DSLPA (m)
$\alpha$	Indice de croissance de $q_{\max}$ selon une loi en puissance $t$
$\alpha$ -la	$\alpha$ -lactalbumine
$\beta$	Constante instrumentale de DLMT ou indice de croissance de $I_{\max}$ selon une loi en puissance $t$

## Nomenclature

---

$\beta$ -lg	$\beta$ -lactoglobuline
$\chi_{ij}$	Paramètre d'interaction de Flory-Huggins entre des composés i et j
$\delta_i$	Paramètre de solubilité du composé i
$\phi$	Fraction volumique
$\gamma$	Pente de l'asymptote des fonctions normalisées de $I(q)$ en fonction de $q$ ou valeur de l'exposant du modèle de Furukawa
$\eta$	Viscosité apparente (Pa s)
$\eta_s$	Viscosité du solvant (Pa s)
$\phi_i$	Fraction volumique du composé i
$\kappa$	Paramètre électrostatique de Debye-Hückel
$\lambda$	Longueur d'onde (m)
$v$	Vitesse des particules dans un champs électrique ( $\text{m s}^{-1}$ )
$\theta$	Angle de diffusion de la lumière (rad) ou angle d'observation de la lumière diffusée
$[\theta]$	Ellipticité molaire ( $\text{deg m}^2 \text{mol}^{-1}$ )
$\sigma$	Densité de charge d'un biopolymère ( $\text{V m}^{-2}$ )
$\sigma_c$	Densité de charge critique ( $\text{V m}^{-2}$ )
$\tau$	Temps de diffusion des particules (s)
$\tau_0$	Temps de corrélation correspondant à une diffusion simple de la lumière en DLMT (s)
$\tau_{1/2}$	Temps de demi-décroissance de $g_2(t)$ en DLMT (s)
$\xi$	Densité de charge linéaire d'un polymère ( $\text{V m}^{-1}$ )
$\zeta$	Potentiel zéta (V)

## Introduction

Environ 80% des produits alimentaires consommés aujourd'hui sont des mélanges complexes d'ingrédients tels que protéines, polysaccharides, lipides, minéraux, arômes, vitamines, conservateurs. Les propriétés intrinsèques de chaque molécule, mais surtout les différents types d'interactions déterminent la stabilité, la structure, la texture et les propriétés organoleptiques des produits. Parmi les molécules utilisées, les protéines et les polysaccharides jouent un rôle important car elles possèdent à la fois des propriétés nutritionnelles et techno-fonctionnelles importantes. Si l'on excepte le fait que leur polydispersité soit rarement prise en compte, les propriétés fonctionnelles des molécules prises séparément sont assez bien connues au niveau moléculaire. Il en va tout autrement lorsque l'on considère le rôle des interactions protéine-polysaccharide sur les propriétés fonctionnelles des systèmes multiphasiques obtenus comme les solutions, les gels ou les émulsions alimentaires.

De manière générale, les mélanges de biopolymères en solution aqueuse sont caractérisés par une instabilité due à une prévalence des contributions entropiques sur les contributions enthalpiques, du fait de la masse moléculaire élevée de ces macromolécules. Cette instabilité se traduit macroscopiquement par une séparation de phase et conduit, en fonction de l'équilibre entre les différents types d'interactions solvant-solvant, solvant-biopolymère ou biopolymère-biopolymère, à deux phénomènes bien distincts. Lorsque les interactions solvant-biopolymère sont favorisées, les deux phases contiennent préférentiellement un des biopolymères présents initialement, le solvant étant quant à lui réparti de façon homogène dans les deux phases. Ce type de séparation de phase est appelé incompatibilité thermodynamique ou séparation de phase ségrégative. Si, en revanche, les interactions biopolymère-biopolymère sont favorisées, les biopolymères se trouvent concentrés dans l'une des deux phases, la seconde contenant principalement du solvant. On parle alors de coacervation complexe ou de séparation de phase associative.

La coacervation complexe n'est pas le cas le plus fréquemment rencontré dans les mélanges protéine-polysaccharide car il requiert des conditions strictes de compatibilité entre les macromolécules, permettant alors la formation de complexes macromoléculaires. Ceux-ci interagissent ensuite pour former des gouttelettes concentrées appelées coacervats. Les interactions protéine-polysaccharide rencontrées dans le cadre de la coacervation complexe sont majoritairement de nature électrostatique si bien que de nombreux paramètres physico-chimiques (pH, force ionique, densité de charge de biopolymères, ratio de mélange protéine-polysaccharide, concentration totale en biopolymères) et physiques (pression, température, agitation) influencent la formation des complexes macromoléculaires et des coacervats.

Bien qu'il s'agisse d'un mécanisme de séparation de phase peu répandu dans les mélanges biopolymériques, la coacervation complexe fait l'objet d'un nombre croissant d'études fondamentales. En effet, l'étude des conditions de formation, de la structure et de la cinétique de structuration d'un coacervat « modèle », basé sur un système protéine/polysaccharide/solvant bien défini, contribuera à la compréhension des propriétés des macromolécules biologiques dans les systèmes auto-organisés. La meilleure connaissance de la coacervation complexe est en effet indispensable à l'étude des milieux biologiques, en particulier des mécanismes de formation et d'organisation des complexes entre des protéines (enzymes, histones) ou des acides nucléiques (ADN, ARN) dans un environnement rappelant celui du cytoplasme cellulaire. Si l'on considère les applications industrielles potentielles de

la coacervation complexe, la compréhension des mécanismes de formation des coacervats dans différentes conditions de milieu est essentielle si l'on veut prévoir et améliorer les propriétés techno-fonctionnelles des coacervats. En effet, il a été montré que les propriétés fonctionnelles des biopolymères complexés étaient supérieures à celles des biopolymères seuls et que les domaines d'utilisation de ces assemblages macromoléculaires complexes étaient multiples. Mis à part l'élaboration de nouveaux ingrédients alimentaires multifonctionnels, on peut citer la purification de molécules biologiques par précipitation, la micro- ou nano-encapsulation de principes actifs en pharmacie, médecine ou cosmétologie, la synthèse de vecteurs thérapeutiques, la synthèse de biomatériaux biocompatibles ou l'élaboration de biocapteurs.

### ***Principales questions scientifiques posées***

La coacervation complexe est à l'heure actuelle décrite comme un mécanisme de séparation de phase liquide-liquide résultant de la formation de complexes électrostatiques intramoléculaires entre des macromolécules. L'agrégation de ces complexes, initialement solubles, conduit à la formation de complexes intermoléculaires insolubles, qui après floculation et coalescence forment des gouttelettes liquides appelées coacervats. Les coacervats soumis à la pesanteur flocculent et coalescent également pour aboutir à une séparation de phase macroscopique.

Nous pensons que cette vision globale et très schématique du phénomène de séparation de phase est beaucoup plus complexe lorsque l'on considère les mélanges de macromolécules biologiques en solution aqueuse. En effet, il faut alors tenir compte de l'effet de la polydispersité des biopolymères, de leur concentration totale dans le milieu et de l'effet combiné de ces deux variables sur la formation et la stabilité des coacervats.

### ***Objectifs***

Les objectifs principaux de ce travail sont acquérir des données fondamentales concernant la coacervation complexe dans un mélange protéine/polysaccharide/eau modèle. Plus précisément, nous souhaitons étudier l'influence de la polydispersité et de la concentration totale en biopolymères sur la formation des coacervats, puis sur leurs propriétés structurales et leur stabilité au cours du temps.

### ***Approche expérimentale***

L'étude de la structure des coacervats et de la cinétique de la coacervation complexe que nous nous proposons de réaliser nécessite l'utilisation d'un nombre important de techniques expérimentales. Nous avons choisi celles-ci en les adaptant au niveau structural étudié, mais également en tenant compte des limitations expérimentales imposées par les différents systèmes : turbidité, concentration en biopolymères, taille des particules.

Pour notre étude, nous avons considéré un système ternaire modèle constitué d'une protéine de lait, la  $\beta$ -lactoglobuline, d'un polysaccharide végétal, la gomme d'acacia et du solvant le plus largement rencontré dans le domaine alimentaire, l'eau.

Le choix de la  $\beta$ -lactoglobuline s'explique pour plusieurs raisons. Il s'agit tout d'abord d'une protéine très largement utilisée comme ingrédient alimentaire du fait de ses propriétés tensio-actives et gélifiantes. D'autre part, on peut l'obtenir assez facilement en grandes quantités à un état de pureté élevé. De plus, la structure moléculaire de la  $\beta$ -lactoglobuline est

à l'heure actuelle très bien connue ce qui fait que nous pourrions suivre l'évolution de celle-ci après complexation avec la gomme d'acacia. Cette protéine possède également des propriétés d'association et d'agrégation importante, ce qui permet de pouvoir faire varier facilement sa polydispersité. Enfin, la  $\beta$ -lactoglobuline est bien connue dans notre laboratoire puisqu'elle a fait l'objet de deux thèses traitant de son interaction avec le chlorure de sodium (Fanni, 1987) et avec la vitamine C (Dai-Dong, 1990).

La gomme d'acacia a également été retenue du fait de son utilisation intensive dans l'industrie alimentaire car elle possède des propriétés interfaciales remarquables et une faible viscosité. De plus, la gomme d'acacia est historiquement liée à la découverte de la coacervation complexe entre biopolymères lors de son interaction avec la gélatine. Elle est d'ailleurs toujours largement utilisée dans un grand nombre de procédés d'encapsulation faisant appel au phénomène de coacervation complexe.

### ***Plan de la thèse***

Le document présenté ici se compose de quatre chapitres qui s'attachent à considérer un point précis de l'étude globale.

Ainsi, le chapitre 1 est essentiellement consacré à la revue bibliographique des études concernant la coacervation complexe. Il débute en rappelant les bases théoriques de la stabilité des solutions macromoléculaires, puis fait le point sur l'état des connaissances sur les types d'interactions se produisant dans les complexes protéine-polysaccharide, l'influence des paramètres physiques et physico-chimiques. La structure et la stabilité des coacervats sont ensuite évoquées.

Le chapitre 2 concerne la caractérisation des deux biopolymères utilisés dans cette étude.

Dans le chapitre 3, qui constitue une part importante de ce travail de thèse, nous avons étudié l'interaction entre les deux biopolymères en choisissant diverses échelles d'observation, en caractérisant la séparation de phase macroscopique, la structure et les propriétés de surface des coacervats ainsi que les modifications de structure de la  $\beta$ -lg.

Finalement, nous avons dans le chapitre 4, caractérisé la stabilité des coacervats obtenus dans diverses conditions expérimentales en étudiant plus particulièrement l'influence de la polydispersité de la  $\beta$ -lactoglobuline sur la coacervation complexe.

Les chapitres 2, 3 et 4 contiennent une description détaillée des méthodes expérimentales utilisées, les résultats obtenus et la discussion de ceux-ci à la lumière des données bibliographiques disponibles.

En termes de valorisation de la recherche, cette étude a donné lieu aux publications et communications suivantes :

### **Revue internationale à comité de lecture :**

Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S. et Hardy J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 8, 689-753.

Schmitt, C., Sanchez, C., Thomas, F. et Hardy, J. (1999). Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 13, 6, 483-496.

Schmitt, C., Sanchez, C., Despond, S., Renard, D., Thomas, F. et Hardy, J. (2000). Effect of protein aggregates on the complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, 14, 4, 403-413.

Schmitt, C., Sanchez, C., Lamprecht, A., Renard, D., Lehr, C.-M., de Kruif, C. G. et Hardy, J. (2001). Study of  $\beta$ -lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 20, 3, 267-280.

**Chapitre d'ouvrage :**

Schmitt, C., Sanchez, C., Despond, S., Renard, D., Robert, P. et Hardy, J. (2001). Structural modification of  $\beta$ -lactoglobulin as induced by complex coacervation with acacia gum. Dans E. Dickinson et R. Miller (Eds), *Food Colloids : Fundamentals of Formulation*, Cambridge : Royal Society of Chemistry, 323-331.

**Communications orales dans des congrès internationaux avec actes :**

Schmitt, C., Sanchez, C. et Hardy, J. (2000). Influence of the initial protein-aggregated state on the complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum in aqueous media. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Food Rheology and Structure, 12-16 Mars, Zürich, Suisse.

Schmitt, C., Sanchez, C., Despond, S., Renard, D., Robert, P. et Hardy, J. (2000). Structural modification of  $\beta$ -lactoglobulin as induced by complex coacervation with acacia gum. *Food Colloids 2000 : Fundamentals of Formulation*, 2-5 Avril, Postdam, Allemagne.

## Chapitre 1 Revue bibliographique

Les mélanges de biopolymères en solution aqueuse sont très souvent caractérisés par des phénomènes de compatibilité ou d'incompatibilité se traduisant par une séparation de phase macroscopique du système à plus ou moins long terme. La compatibilité ou l'incompatibilité entre les biopolymères proviennent de la faible entropie de mélange des composés macromoléculaires, qui ne peut compenser des valeurs même très faiblement positives de l'enthalpie de mélange, défavorables à la stabilité de celui-ci (Frugier, 1988).

### 1 Stabilité des mélanges de biopolymères

Afin de cerner plus en détail les différents paramètres déterminant les conditions de stabilité des mélanges biopolymériques, il est indispensable de rappeler les bases thermodynamiques ayant permis d'étudier et de prédire la stabilité des mélanges de biopolymères.

#### 1.1 Approche thermodynamique

L'approche la plus communément utilisée dans le traitement théorique des problèmes de stabilité des solutions biopolymériques découle de la théorie de Flory-Huggins (Flory, 1942 ; Huggins, 1942), développée à l'origine pour des mélanges de polymères fondus. Ainsi, si l'on considère un mélange de biopolymères avec un solvant, la stabilité du système obtenu dépend en vertu du Second Principe de la Thermodynamique de la variation de l'énergie libre du mélange  $\Delta G_M$  qui, pour que le mélange soit stable (monophasique), doit être négative et ne posséder qu'un seul minimum local selon l'équation (1.1) :

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M < 0 \quad (1.1)$$

Les termes  $\Delta H_M$  et  $\Delta S_M$  représentent, respectivement, les variations d'enthalpie et d'entropie dues au mélange.  $T$  est la température absolue exprimée en K. La stabilité d'un mélange biopolymérique dépend donc principalement de la contribution des termes  $\Delta H_M$  et  $\Delta S_M$  dans l'équation (1.1). Cette contribution s'exprime principalement au travers de trois effets thermodynamiques qui sont l'entropie combinatoire de mélange, la contribution des interactions entre les molécules et l'effet de volume libre (Tompa 1956 ; Patterson, 1982).

Nous allons détailler ces différents effets en nous plaçant dans le cas simple d'un mélange binaire (solvant1-solvant2, solvant-biopolymère ou biopolymère1-biopolymère2), puis nous généraliserons les résultats obtenus aux mélanges biopolymériques ternaires.

##### 1.1.1 L'entropie combinatoire de mélange

Dans l'approche proposée par Flory et Huggins, le volume total d'un mélange est assimilé à un réseau constitué d'unités répétitives appelées sites qui sont composées d'un cube d'arête  $a$  et de volume  $a^3$  (Flory, 1953). La somme des volumes de tous ces sites est égale au volume total du mélange et chaque site peut être occupé indifféremment par une molécule de solvant ou par un monomère constituant le polymère en solution. De ce modèle, il découle que l'énergie combinatoire de mélange,  $\Delta S_M$ , représente le nombre de positions différentes pouvant être occupées par les molécules à l'intérieur du réseau (mélange). En d'autres termes, l'état de désordre potentiel du mélange. Il va de soi que plus les molécules

considérées auront un volume voisin de  $a^3$ , plus l'entropie combinatoire de mélange sera élevée.  $\Delta S_M$  peut alors être définie par l'équation (1.2) :

$$\Delta S_M / RV = - [(\phi_1 \ln \phi_1) / V_1 + (\phi_2 \ln \phi_2) / V_2] \quad (1.2)$$

où  $\phi_i$  est la fraction volumique du composé  $i$  dans le mélange,  $V_i$  son volume molaire.  $R$  la constante des gaz parfaits ( $8,3144 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ) et  $V$  le volume total du mélange. En considérant cette équation, on comprend aisément l'une des causes de l'instabilité des mélanges de biopolymères puisque dans ce cas  $V_i$  est élevé, ce qui entraîne une diminution de  $\Delta S_M$  et donc une augmentation défavorable de  $\Delta G_M$ .

### 1.1.2 Contribution interactionnelle

La contribution interactionnelle à l'énergie libre de mélange ou chaleur de mélange,  $\Delta H_M$ , repose sur l'existence de forces intermoléculaires répulsives (hydratation, répulsions électrostatiques ou stériques) ou attractives (interactions électrostatiques, hydrophobes, Van der Waals) entre les molécules et les atomes des différents constituants du mélange. Cette quantité peut être définie par l'équation (1.3) :

$$\Delta H_M = V(\delta_1 - \delta_2)^2 \phi_1 \phi_2 \text{ et } \delta_i = (\Delta E_i / V_i)^{1/2} \quad (1.3)$$

où  $V$  est le volume total du mélange,  $\Delta E_i$  la chaleur de vaporisation du composé  $i$  à pression nulle,  $V_i$  le volume molaire du composé  $i$ ,  $\delta_i$  le paramètre de solubilité défini par Scott et Hildebrand (1951). La valeur de  $\Delta H_M$  dépend principalement du terme  $(\delta_1 - \delta_2)^2$ . Scott et Hildebrand ont étudié l'évolution de celui-ci dans différentes conditions de mélange. Ils ont conclu que les forces dispersives (dipôle-dipôle induit) contribuaient toujours positivement à  $\Delta G_M$  ( $\Delta H_M > 0$ ). Dans ce cas,  $\Delta H_M$  ne contribue pas à la stabilisation du mélange. Dans de rares cas d'interactions faibles et non-spécifiques (transfert de charges, liaisons hydrogènes),  $\Delta H_M < 0$  et le système se trouve stabilisé (Scott, 1949). Il faut noter que l'enthalpie de mélange peut également s'écrire sous la forme :

$$\Delta H_M / RTV = [(z\Delta\omega_{12}) / k_B T V_s] \phi_1 \phi_2 = (\chi_{12} / V_1) \phi_1 \phi_2 \quad (1.4)$$

où  $z$  est le nombre de coordination (nombre de plus proches voisins du site du réseau considéré),  $V_s$  ( $= a^3$ ) le volume d'un site,  $k_B$  la constante de Boltzmann ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ) et  $\Delta\omega_{12}$  la variation de l'énergie d'interaction du système associée à la création d'une liaison de type 1-2 dans le mélange entre des segments des sites occupés par des composés 1 et 2, respectivement :

$$\Delta\omega_{12} = \omega_{12} - [(\omega_{11} + \omega_{22}) / 2] \quad (1.5)$$

où  $\omega_j$  est l'énergie d'interaction entre des sites occupés par des composés  $i$  et  $j$ ,  $\chi_{12}$  est le paramètre d'interaction entre les composés  $i$  et  $j$  défini selon Flory et Huggins par :

$$\chi_{12} = (z\Delta\omega_{12}r_1) / k_B T \quad (1.6)$$

$r_i$  étant la longueur du composé  $i$  (nombre de sites par molécule). Si l'on combine les équations (1.2) et (1.4), on obtient pour  $\Delta G_M$  l'expression suivante :



$$\Delta G_M/RTV = (\phi_1 \ln \phi_1)/V_1 + (\phi_2 \ln \phi_2)/V_2 + (\chi_{12}/V_1)\phi_1\phi_2 \quad (1.7)$$

Dans le cas des mélanges de biopolymères,  $V_1$  et  $V_2$  sont généralement élevés, la stabilisation entropique du système est alors négligeable et c'est alors le terme d'interaction  $\chi_{12}$  qui contrôle la stabilité du mélange.

### 1.1.3 L'effet de volume libre

Cette contribution à l'énergie libre de mélange est liée à la variation de volume induite par le mélange des molécules constituant le mélange, généralement le solvant et le (ou les) biopolymère(s). Il représente l'influence de la différence entre les volumes libres du solvant et des biopolymères. Le volume libre du biopolymère est considéré comme très faible par rapport à celui du solvant du fait de la différence de taille entre les molécules. En conséquence, le mélange qui tend à rapprocher les molécules les unes des autres contribue négativement à  $\Delta S_M$  et  $\Delta H_M$ . Par convention, l'effet de volume libre est intégré dans le terme d'interaction  $\chi_{12}$ .

### 1.1.4 Séparation de phase dans les mélanges de biopolymères

La séparation de phase macroscopique d'un mélange est obtenue lorsqu'une valeur critique de  $\chi_{12}$  est atteinte. Celle-ci est obtenue pour les conditions critiques à partir de l'équation (1.7) :

$$(\partial^2 \Delta G_M/RTV) / \partial \phi_2^2 = (\partial^3 \Delta G_M/RTV) / \partial \phi_2^3 = 0 \quad (1.8)$$

si  $\chi_{12}$  est indépendant de  $\phi$ ,

$$(\chi_{12}/V_1)_{cr} = 1/2[(1/\sqrt{V_1}) + (1/\sqrt{V_2})]^2 \quad (1.9)$$

Dans un mélange binaire, la démixtion se produit donc lorsque  $\chi_{12} > \chi_{12cr}$ . Si l'on considère un mélange solvant/biopolymère,  $V_2$  étant élevé, la valeur de  $\chi_{12cr}$  sera faible, ce qui explique que l'on peut observer une séparation de phase pour de très faibles variations positives de  $\chi_{12}$  (Zeman et Patterson, 1972). Pour un mélange ternaire solvant1/biopolymère2/biopolymère3, et si l'on se place dans le cas où les deux biopolymères ont la même taille ( $V_2 = V_3$ ), le paramètre d'interaction biopolymère2/biopolymère3 qui contrôle la stabilité du système s'écrit :

$$\chi_{23cr} = 2/V_2(1 - \phi_1) \quad (1.10)$$

où  $\phi_1$  est la fraction volumique du solvant. Il est ici clair que  $\chi_{23cr}$  n'atteint des valeurs élevées, et par conséquent produit un mélange thermodynamiquement stable, que pour des valeurs de  $\phi_1$  proches de l'unité, c'est à dire pour des solutions macromoléculaires très diluées (Hsu et Prausnitz, 1974). Il est également remarquable que l'incompatibilité entre les molécules sera d'autant plus élevée que la masse moléculaire des biopolymères sera grande ( $V_2$  étant alors grand et par conséquent  $\chi_{23}$  petit).

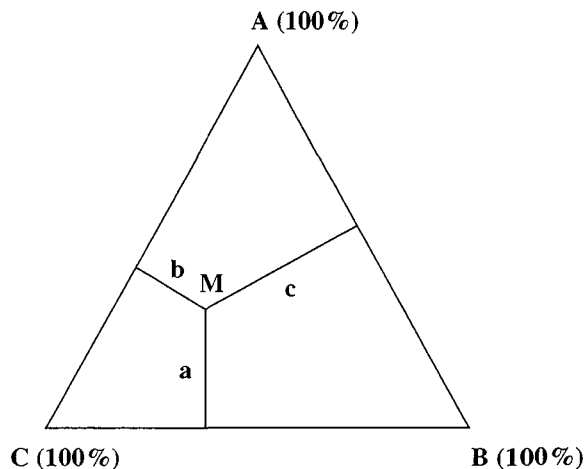
En considérant la variation de  $\chi_{23}$  dans un mélange ternaire, il est possible de distinguer deux types de séparation de phase (Kötz et Beitz, 1997).

Dans le cas où  $\chi_{23}$  est positif, ce qui traduit une répulsion nette entre les biopolymères en solution, les interactions de type solvant1/biopolymère2 et solvant1/biopolymère3 sont favorisées. Ce phénomène est principalement contrôlé par le volume exclu des macromolécules, qui les empêche d'arriver suffisamment près les uns des autres et d'interagir (Tolstoguzov, 1999). Le mélange se sépare alors en deux phases, chacune contenant préférentiellement l'un des deux biopolymères ainsi que du solvant. Cette séparation de phase a été historiquement qualifiée d'incompatibilité thermodynamique (Tolstoguzov, 1986), puis par la suite de séparation de phase de type ségrégative (Piculell et Lindman, 1992). Celle-ci est courante dans les mélanges de macromolécules de type protéine/polysaccharide que l'on utilise dans l'industrie alimentaire. Elle permet d'obtenir un grand nombre de produits possédant des structures et des textures différentes après traitement technologique des mélanges (Samant et al., 1993 ; Ledward, 1994 ; Tolstoguzov, 1997 ; Dickinson, 1998). Il est également intéressant de noter que ce phénomène de séparation de phase est également connu des biologistes. Il est alors dénommé « macromolecular crowding », car il est à l'origine des équilibres de partition des macromolécules (enzymes, phospholipides, ADN, polysaccharides) dans les différents compartiments cellulaires (Albertsson, 1971 ; Johansson et al., 2000).

Lorsque  $\chi_{23}$  est négatif, traduisant une attraction nette entre les macromolécules, le mélange se sépare en deux phases, mais cette fois-ci les macromolécules se retrouvent concentrées dans une phase alors que la seconde phase est essentiellement composée de molécules de solvant. Historiquement, ce type de séparation de phase a été appelé coacervation complexe (Bungenberg de Jong, 1949). On l'a cependant, comme pour l'incompatibilité thermodynamique, rebaptisé séparation de phase associative (Piculell et Lindman, 1992). Ce type de séparation de phase fait alors référence à un phénomène de démixtion induite soit par des interactions directes (électrostatiques ou hydrogènes) entre les biopolymères, ce qui est le cas de la coacervation complexe, soit par des conditions de mauvais solvant, pour lesquelles aucune interaction n'est nécessaire entre les biopolymères.

### **1.1.5 Différenciation macroscopique entre séparation de phase ségrégative et associative**

L'étude de la séparation de phase dans les mélanges de biopolymères se fait généralement par la construction de diagrammes de phases obtenus à l'équilibre thermodynamique du système (Reisman, 1970). Le même type d'approche est utilisé par exemple pour l'étude des propriétés des alliages métalliques ou des sols composés de plusieurs fractions minérales. Le diagramme de phases permet de localiser en fonction de différents paramètres physico-chimique ou physiques, tels que le pH, la force ionique, la température ou la pression la composition d'un mélange donné et de prévoir son évolution si l'on modifie par exemple cette composition.



**Figure 1.1 :** Diagramme de phases pour un mélange ternaire ABC.

Le cas le plus classique d'utilisation du diagramme de phases dans les mélanges ternaires est de présenter celui-ci en deux dimensions, sous la forme d'un triangle équilatéral. Chaque sommet du triangle représente alors une composition du mélange égale à 100% du composé considéré (Figure 1.1). Il est possible de représenter des mélanges contenant plus de trois composants en construisant par exemple un diagramme de phases pyramidal ayant pour base un triangle équilatéral (Thalberg et al., 1991).

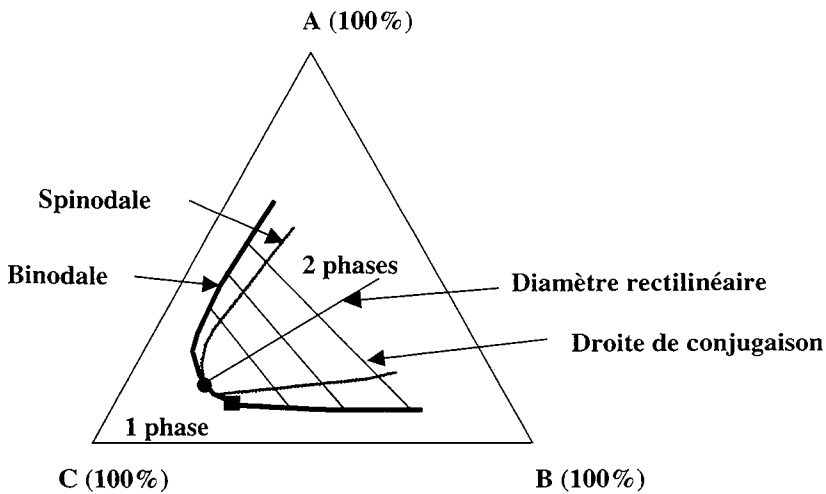
Nous considérerons le triangle équilatéral puisqu'il est le plus couramment utilisé dans les mélanges de deux macromolécules dans un solvant. Dans ce cas, la hauteur du triangle possède la particularité de correspondre à la composition totale du mélange. La concentration relative de chaque composant varie entre 0 et 100% le long des côtés du triangle. Un mélange ternaire peut être visualisé par un point dans le triangle (M, Figure 1.1). La composition de ce point est obtenue en traçant les perpendiculaires du côté opposé au sommet duquel se trouve le composant dont on veut connaître la proportion dans le mélange. Étant donné que la hauteur représente la totalité du mélange, il suffit de connaître les proportions de deux composants pour obtenir celle du troisième qui est donnée par :

$$a + b + c = 100\% \quad (1.11)$$

Il est notable que ce type de diagramme permet d'obtenir les proportions relatives des différents composants, mais en aucun cas leur concentration réelle dans le mélange. Pour déterminer celle-ci, il convient de connaître les concentrations totales réelles des mélanges ayant donné lieu à la détermination des proportions relatives aux points considérés dans le diagramme.

Dans le cas d'un mélange ternaire subissant une séparation de phase macroscopique, il est possible de repérer sur le diagramme de phases toutes les compositions pour lesquelles le système passe d'un état monophasique à un état biphasique (visuellement ou par une méthode turbidimétrique par exemple). Toutes ces compositions permettent de placer les points qui forment la limite entre la zone monophasique et la zone biphasique (Figure 1.2). Cette

technique de construction du diagramme de phases, même si elle est très largement utilisée, est cependant limitée par le fait que la zone macroscopiquement monophasique peut, à une échelle d'observation plus locale, présenter des régions de séparation de phase (Renard et al., 1998). Celles-ci sont alors négligées et ne peuvent être décelées que par l'utilisation de techniques de rayonnement sophistiquées comme la diffusion des neutrons ou des rayons X aux petits angles, ou par combinaison de technique turbidimétrique et de diffusion dynamique de la lumière (Kaibara et al., 2000).

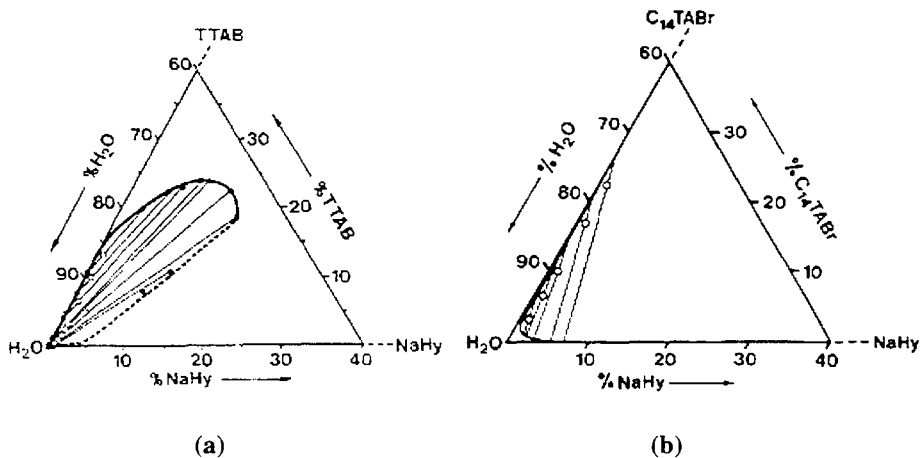


**Figure 1.2 :** Caractéristiques remarquables d'un diagramme de phases ternaire. (●) point critique ; (■) point seuil ; (▨) zone métastable.

La limite entre la zone monophasique et biphasique est appelée binodale, car elle correspond aux valeurs pour lesquelles la fonction d'énergie libre du mélange  $\Delta G_M$  possède deux minima. La binodale permet donc de connaître les compositions des deux phases à l'équilibre après démixtion du système. Ces compositions, obtenues pour un mélange initial donné, sont reliées entre elles par une droite dite de conjugaison. Tout mélange se trouvant sur cette droite sera sujet à une séparation de phase, les compositions à l'équilibre étant identiques ; seuls les volumes des deux phases diffèrent. Une seconde ligne de stabilité du mélange appelée spinodale est également définie à l'intérieur de la zone biphasique. Celle-ci relie toutes les compositions pour lesquelles la dérivée seconde de la fonction d'énergie libre du mélange est nulle. Pour ces compositions, le mélange se trouve dans un état intermédiaire entre l'état monophasique et l'état biphasique. C'est pour cette raison que la zone comprise entre la binodale et la spinodale est qualifiée de métastable (Binder, 1991). Le point critique est obtenu par l'intersection entre la binodale et le diamètre rectilinéaire qui relie les milieux des droites de conjugaison. Au point critique, les deux phases obtenues après démixtion du mélange ont exactement la même composition et le même volume. Le point seuil correspond à la plus faible composition du mélange pour laquelle une séparation de phase macroscopique intervient.

La construction des diagrammes de phases permet ensuite facilement de distinguer la séparation de phase associative de la séparation de phase ségrégative (Tolstoguzov, 1995). En effet, dans le cas de la séparation de phase ségrégative la limite supérieure de la zone

biphasique est indépendante de la concentration totale en biopolymères, alors que ce n'est pas le cas pour la séparation de phase de type associative. Ainsi, un diagramme de phases correspondant à une séparation de phase associative présentera spécifiquement une zone biphasique fermée en forme de goutte d'eau, localisée le plus souvent près du sommet correspondant au solvant dans le triangle équilatéral (Figure 1.3a). Au contraire, dans le cas d'une séparation de phase ségrégative, la zone biphasique sera ouverte du côté du triangle reliant les deux sommets correspondants aux biopolymères (Figure 1.3b). Il faut noter qu'en fonction des masses moléculaires des biopolymères, du pH, de la force ionique, de la température, etc... les diagrammes de phases expérimentaux peuvent différer des cas classiques présentés ici.



**Figure 1.3 :** Diagrammes de phases correspondant à une séparation de phase de type associative (a), de type ségrégative (b) dans un même mélange ternaire hyaluronate de sodium (NaHy)/bromure de tétradecyltriméthylammonium (C<sub>14</sub>TABr ou TTABr)/eau (H<sub>2</sub>O) à une concentration totale de 0,9% (p/p). Le passage du type associatif au type ségrégatif est obtenu par addition de NaBr 1M (d'après Thalberg et al., 1991).

## 2 La coacervation complexe

Ce cas particulier de séparation de phase associative nous intéresse plus particulièrement puisqu'il est à l'origine de la formation de complexes macromoléculaires et de diverses particules possédant d'intéressantes propriétés techno-fonctionnelles. Nous allons dans un premier temps rappeler brièvement l'historique de la découverte de la coacervation complexe, puis nous détaillerons les différents modèles théoriques qui la décrivent.

### 2.1 Historique de la coacervation complexe

L'engouement suscité par l'étude de la coacervation complexe dans les années 20-40 est historiquement lié aux premières expériences menées sur les mélanges de macromolécules biologiques entreprises par Tiebackx (1911). Cet auteur avait en effet constaté qu'un mélange de gélatine et de gomme d'acacia en milieu aqueux pouvait conduire, selon les conditions expérimentales, à la formation d'une phase concentrée. Ces travaux ont été relayés par le chercheur hollandais Bungenberg de Jong et ses collègues à partir des années 20 (Bungenberg de Jong, 1936). C'est d'ailleurs lui qui donna le nom de coacervation complexe (du latin

*acervus* qui signifie entassé, lié) au phénomène de séparation de phase qu'il avait mis en évidence dans des mélanges composés de solutions aqueuses de gélatine et de gomme d'acacia. En effet, Bungenberg de Jong avait observé à l'aide d'un microscope que les mélanges gélatine/gomme d'acacia donnaient lieu à la formation de gouttelettes liquides, généralement sphériques et plus ou moins vacuolisées qui n'étaient pas sans rappeler des cellules vivantes. Il baptisa ces gouttelettes coacervats. Ces travaux suscitèrent également l'attention d'un biologiste russe, Oparin, qui voyait dans le coacervat le chaînon manquant de l'évolution permettant de passer de la « soupe primitive » constituée de macromolécules individualisées à la cellule organisée (Oparin, 1957 ; Evreinova et al., 1974). Cette théorie est toujours d'actualité, et de récentes études n'ont toujours pas permis de l'affirmer ou de l'infirmer de manière indéniable (Lucido, 1998). Elle reste donc une base de réflexion intéressante.

L'étude expérimentale de la coacervation complexe fut quelque peu abandonnée par la suite, certains auteurs tentant plutôt d'établir des modèles théoriques permettant de l'expliquer. La fin des années 60 marque le regain d'intérêt concernant la coacervation complexe puisque plusieurs équipes soviétiques se sont intéressées à son application dans différents domaines tels que l'industrie alimentaire, afin d'obtenir de nouveaux ingrédients alimentaires (Tolstoguzov, 1986), la médecine pour la synthèse d'allergènes composés de complexes protéine-polymère (Petrov et al., 1985) et la biotechnologie, afin de tenter de purifier des protéines à grande échelle (Kabanov et al., 1977). La fin des années 80 et le début des années 90 marquent le retour de la coacervation complexe sur le devant de la scène scientifique puisqu'on l'étudie à des fins de purification des protéines (équipe du Pr Dubin) ou de formulation de microcapsules biodégradables en pharmacie et en médecine (Burgess et collaborateurs). D'autres voies de recherche concernent la synthèse de biomatériaux (Taravel et Domard, 1994 ; Ellis et Yannas, 1996), biofilms (Yan et al., 2000), de sang artificiel (Prouchayret et al., 1992), de biocapteurs (Caruso et al., 1997) et la fabrication d'ingrédients alimentaires complexes (Sanchez et Paquin, 1997).

## 2.2 La coacervation complexe : modèles théoriques

Plusieurs modèles ont été proposés pour rendre compte de ce phénomène de séparation de phase pour le moins atypique (Burgess, 1990).

### 2.2.1 Théorie de Voorn et Overbeek (1957)

Il s'agit de la première théorie proposée pour expliquer thermodynamiquement la coacervation complexe. Elle repose sur l'analyse des résultats obtenus par Bungenberg de Jong (1949) sur le système gélatine/gomme d'acacia. D'après Voorn et Overbeek, la coacervation complexe doit être considérée comme un phénomène spontané s'établissant entre deux biopolymères chargés de manière opposée. Il résulte de la compétition entre les forces électrostatiques attractives (effets enthalpiques) qui tendent à les rapprocher et les effets entropiques qui tendent à les éloigner. Dans ce modèle, les chaînes composant la structure des biomolécules s'associent électrostatiquement pour former le coacervat qui contient toutefois également des molécules de solvant. Celles-ci continuent à augmenter l'entropie du système en favorisant les réarrangements moléculaires. Pour ces raisons, le coacervat est de nature liquide et totalement réversible.

Afin d'appliquer leur théorie, Voorn et Overbeek ont émis quelques postulats concernant le système initial : i) les macromolécules possèdent une structure composée d'une chaîne désordonnée non perturbée, ii) la distribution des charges dans le mélange est considérée homogène, indépendamment du fait qu'elles puissent se trouver sur les

biopolymères ou sur les contre-ions, iii) il n'y a pas d'association spécifique entre les macromolécules, iv) les interactions solvant/soluté sont équivalentes pour chaque macromolécule durant tout le processus de coacervation complexe.

Dans le traitement théorique effectué, les auteurs utilisent les équations de Debye et Hückel (1923, 1924) pour rendre compte des interactions électrostatiques et la théorie de Flory-Huggins pour ce qui concerne les effets entropiques. Dans un système binaire composé d'un solvant et d'un biopolymère, les conditions critiques de compatibilité sont atteintes lorsque  $\sigma^3 r \geq 0,53$ , donc lorsque la densité de charge  $\sigma$  et la masse moléculaire,  $r$ , du biopolymère sont suffisamment élevées.

Ce modèle a ensuite été étendu à des mélanges ternaires ou quaternaires, la valeur de  $\sigma^3 r$  est alors simplement augmentée, passant à 1,06. Voorn (1956) explique que la suppression de la coacervation complexe lors de la présence d'un excès de sels dans le mélange ou pour des ratios en polyions asymétriques non stœchiométriques peut être prédite par son modèle. La présence de contre-ions augmente la solubilité des macromolécules mais un excès entraîne une diminution partielle de la densité de charge des polyélectrolytes par écrantage de leurs charges. Ce modèle a été appliqué avec succès pour rendre compte de la coacervation complexe entre l'albumine et la gomme d'acacia à des  $\text{pH} < \text{pH}_i$  de l'albumine et de faibles forces ioniques ; dans ces conditions la densité de charge  $\sigma$  de la gélatine est en effet élevée (Burgess et al., 1991).

### 2.2.2 Théorie de Veis et Aranyi (1960)

Cette théorie est fondée sur la coacervation complexe d'homopolymères de gélatine ayant des charges opposées dans des conditions où  $\sigma^3 r < 0,53$ , c'est à dire dans des conditions de faible densité de charge des biopolymères pour lesquelles la théorie de Voorn et Overbeek n'est pas applicable. Dans ce modèle, dit d'agrégation de la phase diluée, le mécanisme de coacervation complexe est décomposé en deux phases distinctes plutôt qu'en un phénomène spontané.

Dans un premier temps, les molécules de gélatine chargées interagissent par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques, formant alors des agrégats dont l'entropie est faible. Ces agrégats se réarrangent ensuite lentement pour former le coacervat. Le moteur de la réaction est constitué, selon les auteurs, par l'augmentation d'entropie due à la formation du coacervat par interaction aléatoire des agrégats et dilution de cette phase. De plus, le terme enthalpique est ici modifié par un terme dépendant de la densité de charge  $\sigma$  des biopolymères mais également de la fraction volumique  $\phi$  de ceux-ci. Ce terme représente la variation d'énergie libre du système induite par le passage d'un segment de biopolymère de la phase diluée à la phase concentrée. Il a été démontré pour ce modèle que  $\chi_{ij}$  augmentait linéairement avec la concentration totale en biopolymères ( $C_1$ ) jusqu'à une valeur critique. Ce point critique correspond à la concentration à partir de laquelle on assiste à une suppression de la coacervation complexe. Ce modèle prédit également une suppression de la coacervation complexe par des concentrations salines importantes. En effet, dans ces conditions, les charges portées par les macromolécules sont partiellement ou totalement écrantées, entravant la première phase de formation des complexes électrostatiques nécessaire à la formation ultérieure des coacervats.

#### *Remarques concernant ces deux modèles*

Les principales différences concernant ces deux modèles peuvent être résumées de la façon suivante : i) le premier point de divergence concerne le moteur de la séparation de phase. La théorie de Voorn et Overbeek considère que la coacervation complexe est contrôlée

par les interactions électrostatiques (phénomène majoritairement enthalpique) alors qu'au contraire Veis et Aranyi pensent qu'il s'agit plutôt d'un phénomène entropique lié au réarrangement des agrégats électrostatiques obtenus lors de la phase initiale de la réaction, ii) dans le modèle de Voorn et Overbeek, les interactions solvant-soluté sont considérées homogènes alors que ce n'est pas le cas dans la théorie de Veis et Aranyi qui introduisent le paramètre d'interaction de Flory-Huggins dans leurs calculs, iii) la distribution des charges dans le mélange est supposée homogène dans la théorie de Voorn et Overbeek, ce qui permet un libre mouvement des molécules. Au contraire, Veis et Aranyi considèrent que les charges sont localisées sur les biopolymères et entraînent la formation d'agrégats électrostatiques après réaction des paires de polyélectrolytes portant des charges opposées, iv) la dernière différence entre ces deux théories est d'ordre mécanistique puisque Voorn et Overbeek considèrent qu'il s'agit d'une réaction spontanée alors que pour Veis et Aranyi ce phénomène peut mettre des heures voir des jours pour atteindre son équilibre thermodynamique.

La validité de la théorie de Veis et Aranyi a été vérifiée par les travaux de Burgess et Carless (1984, 1985) qui ont mis en évidence un processus en deux étapes pour la coacervation complexe entre deux types de gélatine. Ils ont en effet détecté, par diffusion de la lumière, la formation d'agrégats de petite taille dans les premiers stades de la réaction. Dans une autre étude, la coacervation complexe entre l'albumine et l'alginate à également été décrite selon la théorie de Voorn et Overbeek (Singh et Burgess, 1989). Dans ce système, les auteurs ont cependant montré que pour certaines conditions expérimentales, cette théorie n'était pas applicable, alors même que les conditions critiques étaient vérifiées ( $\sigma^3 r \geq 0,53$ ). Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'on ne peut alors négliger le paramètre de Flory-Huggins et considérer la nature distributive des charges portées par les molécules. Des observations similaires ont été rapportées lors de l'étude de la coacervation complexe entre la gélatine et la gomme d'acacia (Burgess, 1994). Des études récentes concernant la coacervation complexe entre l'albumine de sérum bovin (ASB) et des polyélectrolytes synthétiques ont montré que le mécanisme réactionnel incluant une succession de plusieurs phases proposée par Veis et Aranyi semblait se confirmer (Li et al., 1995 ; Mattisson et al., 1999 ; Wang et al., 1999 ; Kaibara et al., 2000). Nous y reviendrons plus en détail dans la description du mécanisme de la coacervation complexe.

### 2.2.3 Théorie de Nakajima et Sato (1972)

Cette théorie est basée sur la coacervation complexe entre des polymères d'alcool polyvinylique chargés de façon opposée et possédant des densités de charges très élevées. Elle constitue en fait une amélioration de la théorie de Voorn et Overbeek, dans la mesure où elle fait intervenir le terme d'interaction de Flory-Huggins  $\chi_{ij}$  entre les deux macromolécules. Il s'avère cependant que le terme électrostatique  $\sigma^3 r$  calculé pour ce système est très faible (0,025 comparé à 0,53) par rapport aux équations de Voorn. Les auteurs sont cependant en accord avec l'hypothèse d'une répartition uniforme des charges entre les phases diluée et concentrée, ce qui apparaît discutable. Cette théorie n'est du reste que très peu utilisée.

### 2.2.4 Théorie de Tainaka (1979, 1980)

Il s'agit ici de la théorie la plus récente qui ait été développée spécifiquement pour la coacervation complexe. Elle a pour base le modèle de Veis et Aranyi, à savoir l'interaction d'un polyanion avec un polycation.

Comme dans le modèle de Veis et Aranyi, les agrégats formés par interaction électrostatique entre les macromolécules interagissent pour former le coacervat. Dans ce modèle, les agrégats sont présents à la fois dans la phase diluée et dans la phase concentrée.



Tainaka utilise la procédure appliquée par Veis dans la phase diluée pour les deux phases, ainsi, les agrégats interagissent également dans la phase concentrée. Ceci se traduit par un gain d'énergie électrostatique provoqué par l'augmentation de la densité en biopolymère dans la zone d'interaction. De ce fait, le moteur de la séparation de phase réside dans les interactions électrostatiques attractives qui sont favorisées par l'augmentation de la masse moléculaire des macromolécules et par l'augmentation de leur densité de charge (Li et al., 1995).

Cette théorie permet également d'expliquer le phénomène de suppression de la coacervation complexe à forte concentration totale en biopolymères. Dans ce cas, le gain énergétique potentiel lié à une concentration locale des macromolécules induite par leur interaction électrostatique est en effet très limité. Ce modèle décrit avec succès la coacervation complexe entre la gélatine et la gomme d'acacia (Burgess, 1990), ainsi qu'entre l'albumine et la gomme d'acacia à  $\text{pH} < \text{pH}_i$  et faible force ionique (Burgess et al., 1991).

### 3 Nature des interactions entre les constituants d'un coacervat

Avant de décrire plus en détail le mécanisme de la coacervation complexe ou des différents paramètres physico-chimiques qui l'influencent, il apparaît nécessaire de faire un rappel rapide des différents types d'interactions susceptibles de se produire entre les macromolécules qui interagissent pour former tout d'abord des complexes macromoléculaires primaires, puis des complexes macromoléculaires interpolymériques dont l'évolution ultime se trouve être la formation un coacervat ou d'un précipité (Tsuchida, 1994).

Selon Tolstoguzov (1997), les interactions macromoléculaires responsables de la formation des complexes peuvent être regroupées en trois classes distinctes : i) les interactions entre les molécules chargées, ii) les interactions entre les résidus acides ou basiques des chaînes latérales des macromolécules et iii) les interactions entre les autres chaînes latérales des macromolécules. Ces interactions peuvent être regroupées également en fonction de leur intensité, de leur spécificité et de leur nature, attractive ou répulsive. Les interactions répulsives sont toujours non spécifiques et de durée transitoire. Elles sont majoritairement liées aux effets de volume exclu (Tolstoguzov, 1998 ; 1999) ou à des interactions électrostatiques. Généralement, ces interactions sont de faible intensité, sauf dans les cas où elles se produisent à de faibles distances ou à de faibles forces ioniques. Ce type d'interaction peut être rencontré dans le cas de mélanges macromoléculaires entre des protéines et des polysaccharides non-ioniques ou avec des polysaccharides anioniques lorsque le pH est supérieur au  $\text{pH}_i$  de la protéine (Imeson et al., 1977). Les interactions attractives peuvent être spécifiques, d'intensité élevée et permanentes (liaisons covalentes). Les interactions attractives non spécifiques résultent généralement d'une multitude d'interactions faibles entre les macromolécules (interactions ioniques, hydrophobes, liaisons hydrogènes).

#### 3.1 Interactions électrostatiques

La formation initiale de complexes macromoléculaires par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques est considérée comme une étape essentielle de la coacervation complexe. Plusieurs théories récentes concernant l'interaction électrostatique entre des macromolécules chargées ont d'ailleurs été développées (Borue et Erukhimovich, 1990; Pogodina et Tsvetkov, 1997; Kong et Muthukumar, 1998 ; Netz et Joanny, 1998, 1999). Celles-ci ne sont pas spécifiques à la coacervation complexe mais, elles servent souvent de base à la description et à l'analyse des résultats concernant les phases précoces du phénomène dans les mélanges macromoléculaires (Wen et Dubin, 1997).

Généralement, l'établissement de liaisons électrostatiques entre les molécules chargées entraîne une diminution de l'énergie libre électrostatique du système par diminution de la mobilité et de la flexibilité des biopolymères. Cependant, la perte d'entropie engendrée est en partie compensée par les contributions enthalpique et entropique provenant de la libération des contre-ions associés aux macromolécules et également par la libération de molécules d'eau (Piculell et al., 1995 ; Tolstoguzov, 1997). L'une des premières études ayant mis en évidence l'implication de liaisons électrostatiques dans la formation de complexes protéine-polysaccharide est à mettre à l'actif de Tiebackx (1911).

En travaillant sur le système gélatine/gomme d'acacia, celui-ci a mis en évidence la possibilité d'obtenir des complexes insolubles à partir de biopolymères initialement solubles. De plus, la formation de ces complexes se trouvant être dépendante de la quantité d'acide ajouté dans le mélange, Tiebackx imagina que les liaisons impliquées devaient mettre en jeu la charge des deux molécules. Sur le même système, Bungenberg de Jong (1949) confirma ces premières hypothèses en étudiant l'influence du pH et de la force ionique sur la coacervation complexe.

Depuis ces travaux que l'on peut qualifier de pionniers, l'amélioration des techniques d'étude a permis de réaliser de nombreuses autres observations sur des systèmes protéine/polysaccharide différents. Nous n'avons pas pour intention de faire une description exhaustive de toutes ces études dont les principales sont reprises dans le tableau 1, mais certains exemples intéressants méritent d'être développés. Citons par exemple les travaux de Noguchi (1959) qui consistent en l'étude de la réactivité de l'albumine de sérum humain (ASH) avec différents polysaccharides anioniques [carboxyméthylcellulose (CMC) et cellulose sulfatée (CS)] ou des polysaccharides neutres (dextrane) en utilisant des mesures électrophorétiques. Il est intéressant de noter qu'aucun complexe n'a été obtenu en faisant réagir l'ASH avec le dextrane à pH 5,2-6,5, c'est à dire au-dessus du  $pH_i$  de l'ASH. En revanche, une interaction a été mise en évidence avec la CMC ou la CS, bien qu'à ces pH l'ASH soit globalement chargée négativement, comme les polysaccharides. Ceci est rendu possible par la présence de zones à forte densité de charge appelées « patches » que l'on trouve à la surface des protéines (Park et al., 1992 ; Xia et Dubin, 1994). La densité de charge de ces zones permet localement de surmonter la répulsion électrostatique entre les macromolécules et la formation d'interactions électrostatiques attractives. Les travaux de Mattison et al. (1998) sur l'interaction de l'ASB avec un sel d'ammonium cationique (le chlorure de poly(dimethyldiallylammonium) ou CPDMDAA) ont par la suite confirmés ces résultats puisque des complexes ont également été obtenus au  $pH_i$  de l'ASB et au-dessus.

Il est admis que deux types de complexes macromoléculaires peuvent être obtenus lors de la mise en jeu d'interactions électrostatiques. D'une part, des complexes solubles lorsque le nombre de charges entre les molécules interagissant ne s'équilibrent pas entièrement. Dans ce cas, la charge globale portée par le complexe obtenu permet à celui-ci de rester soluble en interagissant avec les molécules de solvant. D'autre part, des complexes insolubles lorsque la neutralisation des charges portées par les deux macromolécules est totale, la charge globale du complexe obtenu étant nulle. On qualifie ces complexes de type-M car ils sont obtenus par mélange des deux macromolécules au pH où l'interaction électrostatique est maximale. Il est possible dans certains cas, de solubiliser les complexes de type-M comme c'est par exemple le cas pour des complexes insolubles ASB/dextrane sulfaté obtenus à faible force ionique et à des pH proches du  $pH_i$  de l'ASB (4,9). Pour cela, il suffit de titrer les complexes de type-M par un acide, ce qui a pour effet de les solubiliser, donnant alors lieu à la formation des complexes de type-T (Tolstoguzov, 1997).

**Tableau 1.1** : Exemples de systèmes protéine-polysaccharide ou protéine-polyélectrolyte montrant l'implication des interactions électrostatiques.

Protéine(s)	Polysaccharide(s) ou polyélectrolyte(s)	Technique(s) de mesure	Référence(s)
Albumine d'œuf, ASH	CMC, CS	Electrophorèse	Noguchi (1956, 1959)
ASB	Acide hyaluronique	Pression osmotique	Laurent et Ogston (1963)
Protéines de lait écrémé	Carraghénanes, alginate, gomme d'acacia, CMC	Centrifugation, électrophorèse	Grinrod et Nickerson (1968)
$\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg)	NaCMC, CS, $\kappa$ -carraghénane, gomme guar	Mobilité électrophorétique	Hidalgo et Hansen (1969)
Caséines	Carraghénanes	Diffusion de la lumière	Payens (1972)
Gélatine, caséinate de sodium, protéines de soja	CMC	Viscosimétrie	Ganz (1974)
Caséines	Dextrane sulfaté (DS)	Titration turbidimétrique	Wainerman et al. (1975)
Caséine $\kappa$	$\kappa$ -carraghénane	Centrifugation, sédimentation	Snoeren et al. (1975)
Protéines de lactosérum	Chitosane	Turbidimétrie	Bough et Landes (1976)
Albumine d'œuf	Pectine, alginate, chondroïtine sulfatée, carraghénanes	Dichroïsme circulaire (DC), spectrophotométrie UV-visible	Strelzowa et Tolstoguzov (1977)
Myoglobine, ASB	Alginate, pectate, CMC	Analyse enthalpique différentielle (AED), chromatographie	Imeson et al. (1978)
ASB	DS	AED, néphélométrie, DC	Gurov et al. (1978)
Gélatine	$\kappa$ -carraghénane	Rhéologie	Watase et Nishinari (1983)
Gélatine	Gomme d'acacia	Microélectrophorèse, viscosimétrie, turbidimétrie	Burgess et Carless (1984)
Protéines de lactosérum	Pectine de pomme	Centrifugation	Serov et al. (1985)
ASB	DS	Centrifugation	Gurov et Nuss (1986)
Ovalbumine, ASB, $\alpha$ -lactalbumine, $\beta$ -lg, lysozyme	DS, chondroïtine sulfatée, $\kappa$ -carraghénane	Diffusion de la lumière, chromatographie d'exclusion	Kato et al. (1989)
$\beta$ -lg	Dextrane sulfaté, alginate	Spectrophotométrie	Dickinson et Galazka (1991a)
Caséines	Pectine	Spectrophotométrie	Ambjerg Pedersen et Jørgensen (1991)

**Tableau 1.1 (suite) :** Exemples de systèmes protéine-polysaccharide ou protéine-polyélectrolyte montrant l'implication des interactions électrostatiques.

Protéine(s)	Polysaccharide(s) ou polyélectrolyte(s)	Technique(s) de mesure	Référence(s)
Protéines de plasma humain	Glycosaminoglycanes (GAG's)	Ultrafiltration, chromatographie	Calatroni et al. (1992)
Collagène	Chitosane	Turbidimétrie, conductimétrie, spectroscopie infrarouge	Taravel et Domard (1994)
ASB	Cellulose microcristalline	Potentiel électrocinétique de surface	Paquot et al. (1994)
Caséine $\beta$ , albumine d'œuf	CMC, glutamate glucane	Rhéologie, DC, AED	Delben et Stefancich (1997)
Gélatine	Polystyrène sulfonate (NaPSS), poly(2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonate) de sodium (NaPAMS)	Diffusion de la lumière, viscosimétrie	Bowman et al. (1997)
Lysozyme de blanc d'œuf	Alginate, CMC, pectine hautement méthoxylée, $\kappa$ -carraghénane	Dosage protéique	Yang et al. (1998)
Ovalbumine	CMC, glutamate glucane	DC, AED, rhéométrie, spectrophotométrie	Delben et Stefancich (1998)
ASB	$\iota$ et $\kappa$ -carraghénanes	AED, CE, fluorescence	Galazka et al. (1999)
ASB	Chitosane	Zétamétrie	Chern et al. (1999)
Immunoglobulines de jaune d'œuf	Alginate, $\lambda$ -carraghénane, CMC, pectine	Analyses chimiques	Chang et al. (2000)
Gélatine	$\iota$ -carraghénanes	Spectrophotométrie, analyses chimiques	Michon et al. (2000)

### 3.2 Interactions non-électrostatiques

Dans un grand nombre de cas, les interactions électrostatiques entre des protéines et des polysaccharides chargés de manière opposée prévalent lors de la formation des complexes macromoléculaires. Cependant, il existe des systèmes pour lesquels les interactions initiales entre les biopolymères peuvent être des interactions hydrogènes ou des interactions hydrophobes (Azegami et al., 1997 ; Tribet et al., 1998 ; Sedlák et Antalík, 1998). D'autre part, dans certains mélanges, les complexes électrostatiques primaires peuvent être stabilisés par des interactions non-électrostatiques qui deviennent alors des interactions secondaires. Ceci est particulièrement vrai si l'on considère les liaisons hydrophobes et covalentes que l'on cherche à favoriser lors des traitements thermiques postérieurs des mélanges biopolymériques

après complexation électrostatique (Sanchez et Paquin, 1997). Généralement, ces interactions s'établissent lorsque les biopolymères sont suffisamment proches les uns des autres au sein du complexe électrostatique et que des groupements réactifs entrent en contact (Tolstoguzov, 1993). Elles dépendent fortement de la composition et de la structure des macromolécules en présence, facteurs qui dépendent quant à eux de paramètres physico-chimiques comme le pH, la force ionique ou la température du mélange. Dans le cas des protéines et des polysaccharides, il s'agit des séquences en acides aminés et en résidus glucidiques, de l'état de compactage des chaînes ou de la longueur de celles-ci (Xia et al., 1993).

### 3.2.1 Liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogènes ont un caractère ionique et font référence à une interaction entre un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (N, O ou S) et un autre atome électronégatif (O d'un groupe carbonyle par exemple). De telles interactions ont été mises en évidence dans le cadre de la formation de complexes entre la gélatine et la pectine (Braudo et Antonov, 1993).

Dans cette étude, il a été montré qu'il était possible d'obtenir des complexes solubles entre les deux molécules sur une large gamme de pH, en particulier pour des valeurs de  $\text{pH} > \text{pH}_i$  de la gélatine (4,8). De plus, l'interaction entre les deux molécules se trouvait être favorisée par l'augmentation du degré d'estérification de la pectine et était dépendante de la distribution de ces groupements sur la chaîne glucidique. La formation de liaisons hydrogènes a été confirmée par l'apparition d'un point critique de miscibilité des molécules à basse température (20°C), qui favorise l'établissement de ces liaisons. Dans une étude plus récente sur le même système, mais également le système gélatine/alginat, les mêmes conclusions ont été obtenues (Antonov et al., 1996). Dans ce cas, une pectine possédant différents degrés de substitution ainsi que de l'alginat présentant différentes compositions en blocs acide gluronique/acide mannuronique ont été utilisés. Pour des  $\text{pH} > \text{pH}_i$  de la gélatine (4.75) et des forces ioniques  $> 0.2\text{M}$  (limitation des interactions électrostatiques), des complexes faibles ont été obtenus, essentiellement maintenus par des liaisons hydrogènes. Cette hypothèse a été confortée en démontrant la corrélation entre la formation de ces complexes et la composition des molécules utilisées. De plus, comme dans l'étude précédente, l'action de la diminution de température en faveur de la formation des complexes a été mise en évidence. D'autres mélanges de macromolécules ont été étudiés afin de mettre en évidence la formation de liaisons hydrogènes, ils se trouvent résumés dans le tableau 1.2.

**Tableau 1.2 :** Exemples d'études réalisées sur des complexes protéine-polysaccharide ou protéine-polyélectrolyte montrant le rôle d'interactions spécifiques et non-spécifiques autres que les interactions électrostatiques.

Interactions	Protéine(s)	Polysaccharide(s) ou polyélectrolyte(s)	Conditions expérimentales	Référence(s)
<b>Hydrogènes</b>	Protéines myofibrillaires	Alginate	pH 5.2-6.2. urée 5M, 0.5M NaCl, 0.5M NaSCN, propylène glycol 10%, 0.2M mercaptoethan-2-ol	Ustunol et al. (1992)
	Gélatine	Pectine	pH 7.6. 0.01-0.1M NaCl	Braudo et Antonov (1993)
	Caséine $\alpha_s$	$\lambda$ -carraghénane, CMC	pH 6.6. 0.1M CaCl <sub>2</sub>	Phillips et Williams (1995)
	Gélatine	Pectine, alginate	pH 6.0. 0.5M NaCl	Antonov et al. (1996)
<b>Hydrophobes</b>	Protéines du lait	Gomme xanthane	pH 3.7-6.3	Soucie et Chen et al. (1986)
	ASB	CPDMDAA	pH 8.0. 0.16M NaCl	Li et al. (1996)
	Lysozyme, ASB	Polyacrylate de sodium modifié (HMPA)	pH 9.0	Petit et al. (1994)
	Cytochrome c	Sulfate de polyvinyle, sulfonate de poly-4-styrène	pH 7.0. 0.01M	Sedlak et Antalík (1998)

### 3.2.2 Interactions hydrophobes

Les interactions hydrophobes, au même titre que les liaisons hydrogènes, sont susceptibles de s'établir dans les complexes protéine-polysaccharide. Ces interactions sont de nature endothermique et sont donc favorisées par une augmentation de la température. Les liaisons hydrophobes s'établissent généralement lors de modifications de la conformation et de la structure des macromolécules. Ces modifications permettent aux zones hydrophobes des protéines qui, se trouvent généralement à l'intérieur de celles-ci, d'entrer en contact et d'interagir.

La formation des liaisons hydrophobes est également très dépendante de la distribution du solvant autour des macromolécules. Dans le cas où le solvant possède une faible affinité pour les macromolécules, celles-ci s'agrègent par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes, comme dans le cas de la coacervation simple. Ce type de phénomène a été récemment mis en évidence dans le système élastine/eau (Kaibara et al., 2000a). Les interactions hydrophobes

sont essentielles dans le traitement thermique de stabilisation des complexes électrostatiques (Sanchez et Paquin, 1997), comme c'est par exemple le cas dans le système composé de protéines de lactosérum et de la gomme xanthane (Chen et al., 1989). D'autres études sont résumées dans le tableau 1.2.

Dans certains cas, les interactions hydrophobes peuvent être le moteur de la complexation macromoléculaire, même si les deux macromolécules sont chargés de manière opposée. Ainsi, Tribet et al. (1998) ont montré que des complexes macromoléculaires majoritairement maintenus par des liaisons hydrophobes pouvaient être obtenus dans des mélanges composés de ASB et de polyacrylate de sodium modifié par greffage de groupements hydrophobes à des pH supérieurs au  $pH_i$  de la protéine. Des résultats similaires ont été mis en évidence lorsque cette même protéine interagit avec un polycation à des pH supérieurs à son  $pH_i$  et des ratio protéine : polycation supérieurs à 10 (Li et al., 1996).

De même, il faut noter que dans certains mélanges, l'intensité des interactions hydrophobes peut être telle qu'elle contrebalance les interactions électrostatiques, limitant ou supprimant alors le phénomène de coacervation complexe. Ce type de réaction a été mis en évidence très récemment pour un mélange contenant deux polyélectrolytes possédant des régions hydrophobes (Tsianou et al., 1999). L'explication résiderait dans le fait que les polyélectrolytes formeraient des agrégats plutôt que des complexes électrostatiques. La phase concentrée serait alors chargée, empêchant la libération des contre-ions. Un tel phénomène n'a pas été mis en évidence dans des systèmes protéine-polysaccharide, mais on peut imaginer qu'il puisse apparaître dans le cas de protéines très hydrophobes et de polysaccharides modifiés.

### 3.2.3 Liaisons covalentes

La liaison covalente est une liaison très spécifique pouvant s'établir entre une protéine et un polysaccharide (Stainsby, 1980). Généralement, ce type de liaison est obtenu par réaction chimique des groupements aminés des protéines avec les groupes carboxyliques des polysaccharides pour former une liaison de type amide. Cette réaction est favorisée par la déshydratation du complexe (chauffage ou cryo-séchage) ou par l'utilisation d'une enzyme (transglutaminase) ou par l'utilisation d'un agent réticulant (glutaraldéhyde, carbodiimide), que l'on évitera toutefois d'utiliser dans le cas d'une application alimentaire. La liaison covalente représente en somme un moyen efficace de stabiliser et de rendre irréversible une interaction électrostatique théoriquement sensible aux variations de pH ou de force ionique.

La synthèse de conjugués protéine-polysaccharide a fait l'objet d'un nombre important d'études du fait des propriétés fonctionnelles de ces complexes (Kato, 1996). Ainsi, la conjugaison peut se révéler être un moyen efficace de diminuer l'allergénicité de certaines protéines comme cela a été mis en évidence sur des systèmes protéine-polymère par les travaux de Petrov et al. (1985). Plus récemment, Babiker et al. (1998) proposent de diminuer l'allergénicité de la protéine de soja en la conjuguant avec des galactomannanes par le biais d'une transglutaminase. La réaction avec les anticorps spécifiques de la protéine de soja diminue de façon considérable après ce traitement, indiquant un masquage de la zone antigénique par la conjugaison. Des résultats semblables ont été obtenus récemment pour des conjugués composés de  $\beta$ -lg et de chitosane (Hattori et al., 2000). Du point de vue de l'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéines par conjugaison avec un polysaccharide, Kato et al. (1989) ont travaillé sur le système lysozyme de blanc d'œuf/dextrane, la conjugaison étant obtenue par réaction de Maillard (incubation à 60°C, humidité relative 78,9%, 3 semaines). Après avoir fait subir ce traitement, les auteurs ont montré que la température de dénaturation du lysozyme avait augmenté par rapport à la

protéine native. De plus, les propriétés émulsifiantes du conjugué étaient alors près de 30 fois supérieures à celle du lysozyme non conjugué.

Le même type d'amélioration de la stabilité thermique a été obtenu par Nagasawa et al. (1996) après conjugaison de la  $\beta$ -lg avec de la CMC en utilisant un agent réticulant, preuve d'une certaine généralisation de l'effet de la conjugaison sur la protection des protéines contre la dénaturation thermique. D'autres études concernant des systèmes protéine-polysaccharide conjugués sont rassemblées dans le tableau 1.2.

**Tableau 1.2 (suite) :** Exemples d'études réalisées sur des complexes protéine-polysaccharide ou protéine-polyélectrolyte montrant le rôle d'interactions spécifiques et non-spécifiques autres que les interactions électrostatiques.

Interactions	Protéine(s)	Polysaccharide(s) ou polyélectrolyte(s)	Conditions expérimentales	Référence(s)
Covalentes	Ovalbumine	Polyéthylène glycol	Diméthylformamide, 2 h à 20°C puis 24 h à 4°C	Lee et Schon (1978)
	Ovalbumine	Poly-4-vinyl pyridine, 2-méthyl-5-vinylpyridine	Cu <sup>2+</sup>	Mustafaev et al. (1990)
	$\beta$ -lg	Dextrane, DS	60°C, 3 semaines	Dickinson et Galazka (1991a)
	Globuline ASB,	Dextrane,	60°C, 3 semaines	Dickinson et Semenova (1992)
	Caséine $\beta$	galactomannanes		
	Caséine $\alpha_s$	Dextrane	60°C, 24 heures	Kato et al. (1992)
	$\beta$ -lg	Amidon de pomme de terre	25°C, 3 heures	Hattori et al. (1994)
	Protéines de lactosérum	de carboxyméthylé	24°C, 5 heures.	Hattori et al. (1995)
	Albumine d'œuf,	CMC, glutamate	60°C, 20 jours	Stefancich et Delben (1997)
	caséine $\beta$	glucane		

#### 4 Paramètres physico-chimiques et physiques influençant la formation des coacervats

La coacervation complexe étant principalement contrôlée par des interactions électrostatiques entre les biopolymères lors de la formation des complexes macromoléculaires primaires, les paramètres physico-chimiques influençant ces interactions ont un effet important sur la séparation de phase.

Dans un premier temps, nous distinguerons des paramètres que nous qualifierons de physico-chimiques comme le pH, la force ionique, la masse moléculaire des macromolécules, la densité de charge des macromolécules, le ratio massique des macromolécules et la concentration totale en biopolymères (Wen et Dubin, 1997). On pourra, dans une optique de



raisonnement industriel, considérer que ces paramètres relèvent de technique de formulation des produits.

Dans un second temps, nous décrirons d'autres paramètres, qualifiés de physiques, car ils mettent en jeu un ensemble de forces pouvant influencer la structure et la stabilité des complexes et coacervats. Il pourra s'agir dans ce cas de la température, la pression, l'agitation et le temps d'agitation. Ces paramètres externes peuvent être assimilés aux différents traitements technologiques industriels appliqués aux mélanges protéine-polysaccharide, dans l'industrie alimentaire par exemple.

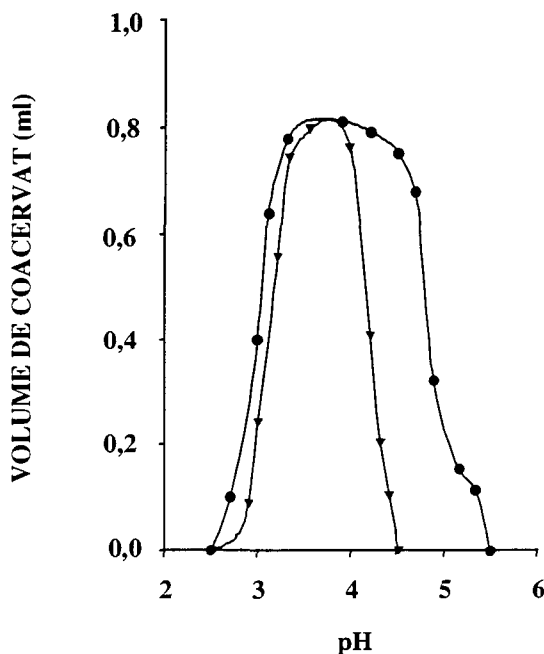
#### 4.1 Influence du pH

Le pH a un rôle important dans le phénomène de coacervation complexe entre les protéines et les polysaccharides puisqu'il contrôle le degré d'ionisation des groupements des chaînes latérales des protéines, mais aussi celui des groupements carboxyliques des résidus polysaccharidiques. Pour cette raison, lorsque l'on considère par exemple un mélange composé d'une protéine et d'un polysaccharide anionique, le maximum de coacervation sera obtenu pour des  $\text{pH} < \text{pH}_i$  de la protéine qui portera alors un excès de charges positives. Le point de neutralisation totale du nombre de charges portées par les deux biopolymères correspond au pH d'équivalence électrique (EEP), pH pour lequel l'intensité d'interaction électrostatique est maximale (Burgess, 1990).

Comme cela a été rappelé dans l'historique de la coacervation complexe, l'influence du pH sur la formation des complexes électrostatiques entre les macromolécules en solution aqueuse a été mise en évidence dès le début du siècle par Tiebackx (1911). Celui-ci avait démontré macroscopiquement que la précipitation d'un mélange composé de gélatine (0,5% p/p) et de gomme d'acacia (2% p/p) était dépendante de la quantité et de la normalité de l'acide ajouté afin d'ajuster le pH. L'influence du pH avait également été mise en évidence dans le cas de l'étude de la compatibilité entre l'albumine d'œuf et des amidons de différentes sources (Ostwald et Hertel, 1929). Ainsi, un optimum avait été mis en évidence pour l'obtention de complexes insolubles en fonction de la quantité d'acide ajouté. D'autres travaux vinrent ensuite confirmer ces premières expériences, par exemple, Bungenberg de Jong (1949) qui étudia en détail le système gélatine-gomme d'acacia. Plus récemment, Hansen et al. (1971) décrivent un nouveau procédé de purification des protéines du lactosérum par complexation avec la CMC. Un maximum de 90% de précipitation des protéines était obtenu à pH 3,2 lorsque toutes les protéines de lactosérum sont globalement chargées positivement. De façon intéressante, ces auteurs ont également montré qu'il était possible de complexer les 10% restants par simple ajustement du pH à 7,5–8,0. L'analyse de cette fraction a par la suite révélé une composition majoritairement constituée de protéoses-peptones, laissant envisager que la purification des protéines pouvait être spécifique par simple contrôle de l'ajustement du pH, comme cela a été également mis en évidence pour des mélanges protéiques par Strege et al. (1990). Des résultats similaires ont été rapportés par Bough et Landes (1976) qui ont proposé de purifier le lactosérum en ajustant cette fois-ci le pH à 6,0 et en complexant les protéines avec un polysaccharide cationique, le chitosane. Dans ce cas, un rendement de purification de 90% a également été rapporté.

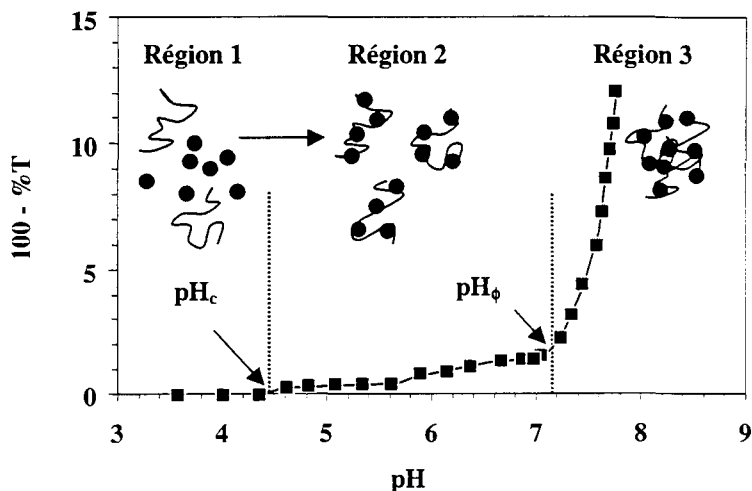
La sensibilité de la coacervation complexe envers le pH est telle que des variations de pH de l'ordre de 0,5 unité pH sont suffisantes pour que le phénomène de séparation de phase soit réduit de manière significative. Cela a été particulièrement bien mis en évidence dans le cas du mélange composé d'albumine et de gomme d'acacia étudié à une force ionique de 10mM (Burgess et Singh, 1993). Dans ce cas, le maximum de coacervation complexe est

obtenu à pH 3,9 alors qu'il est beaucoup plus faible à pH 3,85 ou 4,00. Des résultats similaires ont été obtenus pour des mélanges à 1% (p/p) de gélatine (alcaline ou acide)/gomme d'acacia comme cela est représenté sur la figure 1.4.



**Figure 1.4 :** Influence du pH sur le maximum de coacervation complexe dans des mélanges gélatine/gomme d'acacia à une concentration totale en biopolymères de 1%. ( ● ) : gélatine A (type acide), ( ▼ ) : gélatine B (type basique) (d'après Burgess et Carless, 1984).

Sur un plan phénoménologique, l'influence du pH sur la coacervation complexe a été décrite par Park et al. (1992) en considérant le système composé d'une protéine globulaire, l'ASB, et un polyélectrolyte cationique se trouvant être un sel d'ammonium quaternaire, le chlorure de poly(diméthylallylammonium) ou CPDMDAA. Dans cette étude, le rapport massique protéine/polysaccharide avait été fixé à 5, la force ionique à 0,1M de NaCl et la concentration totale en (bio)polymères à 1 g.l<sup>-1</sup>. Ce mélange a ensuite été titré par une solution de soude et l'évolution de la turbidité de l'échantillon a été suivie en fonction du pH. Dans un premier temps, pour une valeur de pH < pH<sub>i</sub> de l'ASB (dans ce cas 4,9), les auteurs observent une faible augmentation de la turbidité, environ 0,2%, qu'ils attribuent à la formation de complexes solubles entre l'ASB et le polyélectrolyte. Cette valeur de pH est baptisée pH<sub>c</sub> en référence à la formation des complexes solubles (Figure 1.5). En poursuivant l'ajout de soude, la turbidité du mélange continue d'augmenter progressivement jusqu'à atteindre une valeur de plusieurs dizaines de % pour une valeur de pH que les auteurs qualifient de pH<sub>0</sub>, en référence à l'initiation de la séparation de phase macroscopique qui caractérise alors le système (Figure 1.5). Celle-ci serait essentiellement due à l'insolubilisation des complexes solubles formés précédemment qui auraient interagis. Ce scénario n'est pas sans rappeler celui proposé par Veis et Aranyi (1960) dans leur modèle théorique (chap. 1, § 2.2.2).



**Figure 1.5 :** Titration turbidimétrique d'un mélange ASB/polyélectrolyte dans 0,1M de NaCl. Les cercles noirs représentent la protéine, les lignes courbes représentent le polyélectrolyte cationique ASB : 0,6 g.l<sup>-1</sup>, CPMDDAA : 0,12 g.l<sup>-1</sup>, ratio protéine : polyélectrolyte : 5 (d'après Mattison et al., 1999).

Un autre résultat intéressant fait état de l'influence du type d'acide utilisé pour l'ajustement du pH sur la coacervation complexe. Daniels et Mittermaier (1995) ont en effet utilisé différents acides pour ajuster le pH d'un mélange gélatine/gomme d'acacia afin d'obtenir des coacervats. Les différents acides utilisés étaient l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique, l'acide sulfurique, l'acide acétique et l'acide citrique. Les auteurs ont démontré que dans tous les cas, sauf pour l'acide sulfurique, le pH d'équivalence électrique était de 3.8 avec des rendements de coacervation de l'ordre de 82%. Dans le cas de l'utilisation d'acide sulfurique, ce rendement était plus faible, moins de 80% et l'EEP décalé vers des pH inférieurs. Un tel phénomène s'expliquerait par l'action des ions sulfates libérés lors de la dissociation de l'acide. En effet, ceux-ci sont alors capables de réagir avec les molécules de gélatine du fait de leur double valence, diminuant par la même occasion le nombre de charges positives portées par la protéine. Le rendement de coacervation se trouve ainsi modifié. Cette étude, outre l'importance du pH, a mis en évidence l'influence de la présence d'ions sur le phénomène de coacervation complexe ce qui conduit tout naturellement à envisager l'influence de la force ionique. D'autres travaux décrivant l'influence du pH sur la coacervation complexe sont résumés dans le tableau 1.3.

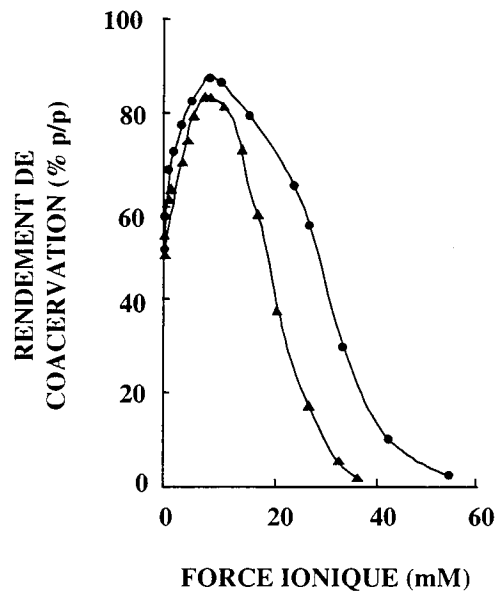
**Tableau 1.3 :** Influence de paramètres physiques et physico-chimiques sur la coacervation complexe dans des systèmes protéine/polysaccharide ou /polyélectrolyte.

Protéine(s)	Polysaccharide(s) ou polyélectrolyte(s)	Paramètre(s) étudié(s)	Référence(s)
Protéines de lactosérum	CMC	pH 2.5 - 7.0, force ionique 0 - 0,2M, ratio Pr : Ps 2 - 20	Hansen et al. (1971)
Protéines de lactosérum	CMC	pH 3.0 - 4.2, force ionique < 0,1M, degré de substitution 0,63 - 1,47	Hill et Zadow (1974)
Gélatine, caséine, protéine de soja	CMC	pH 2,5 - 7,0, force ionique (np), ratio Pr : Ps 1 - 9	Ganz (1974)
Caséines	DS	pH 1,0 - 7,0, force ionique 0 - 0,5M, ratio Pr :Ps 1 : 1, 8 : 2, 7 : 3	Wainerman et al (1975)
ASB	DS	Ratio Pr :Ps 2 : 3 - 1 : 1, température 25 - 87°C	Gurov et al. (1978)
ASB	Pectine, alginate, CMC	pH 2,5, force ionique < 0,001M, ratio Pr :Ps 1 : 9	Imeson et al. (1978)
Protéines de lactosérum	Pectine de pomme	pH 3,4, force ionique 0,01M, température 5 - 20°C	Serov et al. (1985)
Isolat de protéines de soja, ovalbumine, caséine	Gomme xanthane	pH 6,6, force ionique < 1M, ratio Pr :Ps 1 : 4 - 1 : 10, température 4 - 100°C, vitesse d'agitation < 90 tpm	Soucie et Cheng (1986)
Gélatine	CMC	pH 1,5 - 7,0, ratio Pr : Ps 9 : 1 - 1 : 9	Koh et Tucker (1988a, b)
Albumine	Gomme d'acacia	pH 2 - 8, force ionique 0 - 100mM pH 2 - 10, force ionique 0 - 2,5M, température 25 - 70°C	Burgess et al. (1991) Singh et Burgess (1996)
Acide methacrylique (polycation)	Acide diméthylaminoéthylmethacrylate (polyanion)	Densité de charge élevée (np)	Wen et al. (1991a)

np : valeur du paramètre non précisée.

## 4.2 Influence de la force ionique

Le nombre d'ions présents dans un mélange de biopolymères est un paramètre très important car celui-ci intervient dans les composantes entropique et enthalpique de l'énergie libre de mélange (Tolstoguzov, 1997). En effet, si la libération des contre-ions lors de la complexation entre les macromolécules favorise le gain entropique de mélange et l'énergie libre électrostatique, de fortes concentrations salines produisent un effet inverse, les ions présents entrant alors en compétition avec les macromolécules, pouvant aller jusqu'à supprimer totalement la coacervation complexe comme cela a été prédit par la théorie de Veis et Aranyi (1960). Cet effet spécifique de la force ionique, de même que le type d'ions présents, avait été mis en évidence initialement par Bungenberg de Jong (1936) pour le système gélatine/gomme d'acacia. Ainsi, les ions divalents avaient pour effet de supprimer la coacervation complexe à des forces ioniques inférieures aux ions monovalents, cette suppression pouvant cependant être levée par dilution du mélange. Plus récemment, lors de l'étude de la coacervation complexe entre la myoglobine et des polysaccharides anioniques, Imeson et al. (1977) ont montré que l'augmentation de la force ionique entraînait une perte de l'action protectrice du polysaccharide pour la protéine qui était alors dénaturée après traitement thermique. En effet, la température de dénaturation de la myoglobine déterminée par AED était de 69,1°C à une force ionique de 0,025M alors qu'elle n'était plus que de 68,3°C pour une force ionique huit fois plus élevée (0,2M). L'explication de ce phénomène réside dans la dissociation des complexes électrostatiques initialement formés par masquage d'une partie des charges par les contre-ions.



**Figure 1.6 :** Influence de la force ionique sur le maximum de coacervation complexe dans des mélanges gélatine/gomme d'acacia à une concentration totale en biopolymère de 1%. (●) : gélatine A (type acide), (▲) : gélatine B (type basique) (d'après Burgess, 1990).

La coacervation complexe est généralement favorisée à de faibles forces ioniques. Ceci s'explique par le fait que les ions vont avoir tendance à modifier la conformation de la molécule par un effet de « salting-in », ce qui va permettre l'exposition de nouveaux groupements réactifs et favoriser l'interaction avec le polysaccharide. Ce type de phénomène a été mis en évidence pour le système gélatine/gomme d'acacia, pour lequel le maximum de coacervation n'était pas obtenu à force ionique nulle mais à 10mM comme cela est visible sur la figure 1.6 (Burgess, 1990). La forte diminution de la coacervation complexe à de très faibles forces ioniques s'explique, selon l'auteur précédent, par une précipitation rapide des macromolécules plutôt que par une complexation électrostatique, ceci du fait de la forte densité de charge de la molécule de gélatine dans ces conditions.

Dans un système gélatine-polyélectrolyte, Bowman et al. (1997) ont également mis en évidence une valeur critique de force ionique de l'ordre de 10mM pour laquelle le rayon de giration des complexes obtenu est le plus élevé (110 nm). Contrairement à l'étude précédente, ces auteurs expliquent la diminution de la taille des complexes à faible et forte force ionique par une solubilisation des complexes macromoléculaires du fait de l'excès de charges présentes dans la dispersion, interprétation reprise par Wang et al. (1999) pour expliquer le même phénomène dans un système composé de micelles anioniques et d'un polymère cationique.

Pour conclure sur l'influence de la force ionique, rappelons que celle-ci a un effet sur la valeur du pH de formation des complexes macromoléculaires,  $pH_c$ , comme cela a été montré par Mattison et al. (1999). En effet, une étude récente menée sur la coacervation complexe entre des micelles anioniques de surfactant (Triton X – SDS) et un polycation (CPDMDAA) a montré que la force ionique avait une influence directe sur la neutralisation des charges dans les complexes macromoléculaires (Wang et al., 1999). Par conséquent, à faible ou forte force ionique la formation des complexes solubles anioniques ou cationiques est favorisée, ce qui limite la coacervation complexe. En revanche, pour des valeurs de forces ioniques comprises entre 0,05 et 0,6M, et des valeurs de pH proches de  $pH_c$ , l'insolubilisation des complexes macromoléculaires par neutralisation des charges se produit, donnant lieu à la formation de coacervats. Comme nous venons de le voir, la force ionique influence le nombre de charges portées par la protéine, et une relation linéaire entre la charge  $Z_p$  de la protéine et la racine carrée de la force ionique a été établie (Mattison et al., 1995). Une étude récente menée par Galazka et al. (1999) sur l'effet de la force ionique sur la protection contre la dénaturation des protéines après traitement par des hautes pressions a été réalisée sur le système ASB/dextrane sulfaté (pH 7,0, ratio 2,5/1). En utilisant la chromatographie d'exclusion, les auteurs ont mis en évidence une perte de l'effet protecteur du polysaccharide lorsque la force ionique atteignait 20mM. D'autres exemples sont présentés dans le tableau 1.3.

**Tableau 1.3 (suite) : Influence de paramètres physiques et physico-chimiques sur la coacervation complexe dans des systèmes protéine/polysaccharide ou /polyélectrolyte**

Protéine(s)	Polysaccharide(s) ou polyélectrolyte(s)	Paramètre(s) étudié(s)	Référence(s)
Acide methacrylique (polycation)	Acide diméthylaminoéthylmethacrylate (polyanion)	Densité de charge faible (np)	Wen et al. (1991b)
ASB, lysozyme, RNase	Polyanions, polycations	Densité de charge	Park et al. (1992)
ASB	Alginate, pectine, dextran	Ratio Pr : Ps (np), température 25 - 100°C	Harding et al. (1993)
ASB	CPDMDAA	Force ionique 0.01 - 0.1M	Ahmed et al. (1994)
Gélatine	Gomme d'acacia	pH 3.75 - 3.97	Daniels et Mittermaier (1995)
Inhibiteur de la trypsine de soja	Polyampholyte	pH 3 - 9, force ionique 0 - 0.075M, ratio Pr : Ps 1 : 50 - 1 : 400	Nath et al. (1995)
ASB	CPDMDAA	pH 4.2 - 9.6, force ionique 0.02 - 0.2M, ratio Pr : Ps 5 - 40, masse moléculaire du polyélectrolyte $2.2 \times 10^4$ - $1.25 \times 10^6$	Mattison et al. (1995)
ASB, ribonucléase, $\beta$ -lg, $\gamma$ -globuline	CPDMDAA	pH 7 - 10, force ionique 0.02 - 0.1M, ratio Pr : Ps 5 - 20, Masse moléculaire du polyélectrolyte $9.8 \times 10^4$ - $1 \times 10^6$	Wang et al. (1996)
ASB	$\iota$ et $\kappa$ -Carraghénanes, dextrane, dextrane sulfaté	pH 6 - 8, force ionique 0 - 100mM, densité de charge des polysaccharides (np), pression 600 MPa	Galazka et al. (1999)
Ferrihémoglobine	CPDMDAA	Densité de charge du polyélectrolyte (np)	Xia et al. (1999)
Albumine de sérum humain	Polyéthylène glycol	pH 2 - 9	Azegami et al. (1999)
ASB	CPDMDAA	pH 4 - 10, force ionique 0 - 100mM, ratio Pr : Ps 5, 12 - 84.3, température 0 - 60°C	Kaibara et al. (2000)

np : valeur du paramètre non précisée.

### 4.3 Influence de la densité de charge des macromolécules

La densité de charge des biopolymères peut être définie comme le nombre moyen de charges par unité de longueur. Ce facteur est essentiel dans le phénomène de séparation de phase par coacervation complexe puisque si la densité de charge est trop faible, l'interaction électrostatique n'intervient pas. Il est également à noter que ce paramètre intervient dans les modèles théoriques proposés pour la coacervation complexe (chap. I, § 2.3).

Des résultats intéressants ont été obtenus concernant l'influence de la densité de charge des macromolécules sur la formation des complexes dans le cadre de l'étude de la compatibilité entre l'ASB et le sulfate de l'alcool polyvinylique, un polyélectrolyte anionique dont la densité de charge peut être aisément contrôlée chimiquement (Park et al., 1992). Dans ce système, la formation de complexes macromoléculaires a pu être mise en évidence à des pH supérieurs au  $pH_i$  de la protéine, où les deux macromolécules ont une charge nette négative. Un tel phénomène avait déjà été rapporté par Noguchi (1956, 1959) lors de l'étude de l'interaction entre des polysaccharides anioniques et de l'albumine ( $pH_i = 4.7$ ). La formation de complexes dans ces conditions est attribuée à la présence de zones de la protéine où la densité de charges positives est suffisamment élevée, ces zones sont appelées « patches ». Ces concentrations locales en charges positives sont capables de surmonter la répulsion électrostatique globale entre les deux molécules à des pH supérieurs au  $pH_i$  de la protéine, rendant ainsi possible la formation de complexes macromoléculaires. L'influence de ce paramètre a particulièrement été mise en évidence dans le cadre de l'étude de la complexation électrostatique entre la gélatine et des polyélectrolytes anioniques dans des conditions où les deux macromolécules portent des charges négatives, donc à  $pH > pH_i$  (Bowman et al., 1997). Des mesures de diffusion de la lumière ont permis de montrer qu'en augmentant la densité de charge du polyélectrolyte, le nombre de molécules de gélatine se trouvant impliquées dans le complexe était plus élevé. Le contrôle de la densité de charge des macromolécules permet alors de modifier la stoechiométrie des macromolécules au sein des complexes. L'explication de ce phénomène donnée par les auteurs serait une polarisation de la molécule de gélatine du fait du champ électrique induit par les polyélectrolytes à forte densité de charge.

En 1988, Frugier a examiné l'effet de l'augmentation de la densité de charge sur la compatibilité de deux polymères chargés de façon opposée en suivant la variation de l'aire de la zone biphasique sur un diagramme de phases ternaire. Si les deux polymères ont, au départ, des densités de charge très proches, l'effet de l'augmentation de la densité de charge est très marqué puisque l'on passe d'un système où les deux polymères sont totalement compatibles (1,5% de densité de charge) à un système biphasique occupant la moitié de l'aire du diagramme de phases lorsque cette valeur atteint 10%. Dans le cas d'une très grande différence de densité de charge entre les deux polymères, il est possible d'avoir une parfaite compatibilité. Dans ce cas, le nombre de charges portées par le polymère ayant la plus forte densité de charge ne pouvant être neutralisée par l'autre polymère que pour un ratio de mélange en faveur du polymère le moins chargé.

Dans une étude portant sur la coacervation complexe entre l'ASB et des polyélectrolytes cationiques de densité de charge variable (1,15 à 2,84), Mattison et al. (1998) ont montré qu'à un ratio protéine/polyélectrolyte de 5/1 et une force ionique de 0,04M de NaCl, le polyélectrolyte de faible densité de charge forme des complexes solubles avec l'ASB à pH 3,7 alors que ce n'est pas le cas lorsque l'on mélange l'ASB avec des polyélectrolytes de forte densité de charge. Dans ce cas, aucun complexe n'est formé, du fait des répulsions



électrostatiques entre les macromolécules. En revanche, si l'on augmente la force ionique (0,2M), les complexes sont obtenus plus facilement avec des polyélectrolytes de forte densité de charge. Au contraire, lorsque celle-ci est faible, les complexes ne sont obtenus qu'à pH 7,2, où l'ASB porte beaucoup plus de charges négatives. Ceci s'explique par le fait que les « patches » portés par la protéine réagissent plus facilement avec les polyélectrolytes dont la densité de charge est forte, formant alors des complexes. Cette étude a mis en évidence l'importance du couple rigidité du polyélectrolyte/densité de charge (Eq. 1.12), puisqu'à densité de charge égale la structure du polyélectrolyte peut contrôler la formation des complexes électrostatiques en favorisant par exemple une forte densité de charge locale.

$$\sigma_c \sim [I_0^{0.6} \xi^{0.2} \Lambda] \kappa^{0.5} \quad (1.12)$$

Où  $\sigma_c$  et  $\Lambda$  sont la densité de charge critique nécessaire à l'initiation de l'interaction et le rayon du « patch » de la protéine, respectivement,  $\kappa$  le paramètre de Debye-Hückel,  $I_0$  la rigidité intrinsèque du polymère et  $\xi$  la densité de charge linéaire.

Cette relation a été vérifiée récemment dans le cadre de l'étude de l'interaction électrostatique entre des micelles de caséine et différents types de caraghénanes au dessus et au-dessous de la température de transition structure désordonnée/hélice des caraghénanes  $\kappa$  et  $\iota$  (Langendorff et al., 2000). L'interaction protéine-polysaccharide avec les  $\lambda$ -carraghénanes qui n'ont pas de température de transition n'est pas modifiée par la température alors qu'elle l'est pour les deux autres types de polysaccharides dont la densité de charge est augmentée par le changement de conformation. Des résultats du même ordre ont été obtenus dans des mélanges constitués de micelles anioniques et d'un polycation (Wang et al., 1999). Ainsi, lorsque la densité de charge des micelles est faible, il n'y a pas d'interaction avec le polycation et aucun complexe n'est formé. En revanche, l'augmentation de la densité de charge des micelles induit la formation de complexes macromoléculaires, qui après insolubilisation interagissent pour former des coacervats. L'influence de la densité de charge a été étudiée dans d'autres systèmes qui sont rassemblés dans le tableau 1.3.

#### 4.4 Influence de la masse moléculaire des biopolymères

L'effet de la masse moléculaire des biopolymères sur la coacervation complexe a fait l'objet d'un nombre important d'études pour des systèmes protéine/polyélectrolyte, mais peu d'exemples similaires existent pour des mélanges protéine/polysaccharide (tableau 1.3). Si l'on se réfère au modèle thermodynamique de prédiction de la compatibilité des mélanges biopolymériques, il apparaît que le paramètre critique  $\chi_{23cr}$  qui contrôle la séparation de phase dans un mélange ternaire varie inversement proportionnellement avec la masse des macromolécules. Lorsque la masse moléculaire des biopolymères est grande,  $\chi_{23cr}$  est par conséquent faible et la séparation de phase du système est obtenue facilement (Frugier, 1988).

Si l'on considère le modèle de Voorn et Overbeek (1957), celui-ci prédit une augmentation de la coacervation complexe lorsque la masse moléculaire des biopolymères augmente. Toutefois, Veis et al. (1963) proposent deux cas limites afin de tenir compte de l'influence de ce paramètre. Tout d'abord, si la masse moléculaire des biopolymères est trop faible, l'interaction se fera plutôt par simple pontage ionique plutôt que par formation de complexes électrostatiques intermoléculaires. Au contraire, si les masses moléculaires sont trop élevées, l'interaction conduira à la formation de précipités plutôt que de coacervats. Il faut donc se trouver dans une gamme bien définie de masses moléculaires pour que la coacervation complexe puisse s'opérer (Frugier et Audebert, 1994). Zaitzev et al. (1992) ont

montré que dans le cas de l'interaction entre l'ASB et un polymère de bromure de pyridinium, la masse moléculaire des complexes macromoléculaires variait proportionnellement au degré de polymérisation du polyélectrolyte. Ainsi, d'après ces auteurs, l'augmentation de la masse moléculaire du polyélectrolyte favoriserait l'augmentation du volume occupé par celui-ci et par conséquent la séparation de phase. Une explication similaire a été apportée par Semenova (1996) lors de l'étude de l'interaction entre la globuline 11S du soja et du dextrane ayant des masses moléculaires différentes, l'augmentation du volume occupé par le polysaccharide le rendant plus accessible pour interagir avec la protéine. De même, Bowman et al. (1997) ont montré dans un mélange gélatine-polyélectrolyte que le rayon de giration ainsi que le nombre de molécules de gélatine présentes dans les complexes était proportionnel à la masse moléculaire des polyélectrolytes. Il s'agit ici, comme dans les cas précédents, d'une influence de la densité de sites d'interaction (ou densité de charge) entre les macromolécules.

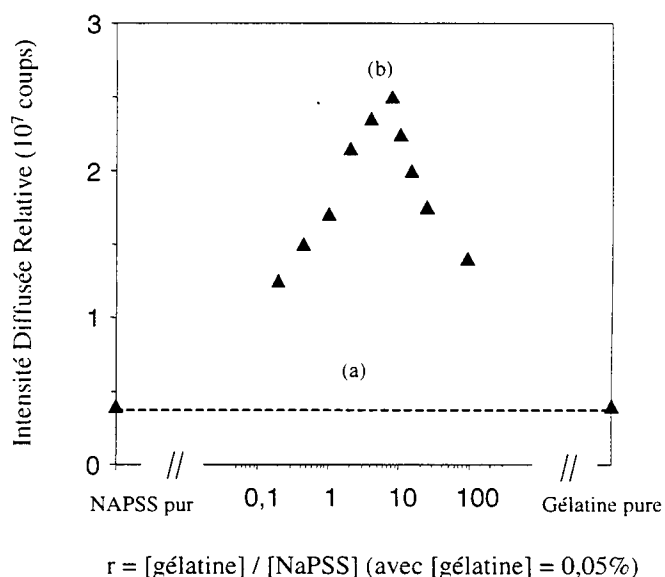
D'autres études menées sur l'influence de la masse moléculaire des macromolécules en situation de coacervation complexe ont montré que dans certains cas l'influence de ce paramètre pouvait être limitée. Ainsi, Shieh et Glatz (1994) ont étudié la complexation du lysozyme avec de l'acide polyacrylique de différentes masses moléculaires ( $5 \times 10^3$  à  $4 \times 10^6$ ) à un pH basique de 7,5 et une faible force ionique (0,07M). Il faut noter qu'aucune influence de la masse moléculaire de l'acide polyacrylique n'était visible sur la densité de charge de celui-ci. Dans ces conditions, les auteurs ont démontré une influence de la masse moléculaire du polyélectrolyte sur la complexation du lysozyme, mais uniquement lorsque celui-ci était en mélange avec d'autres protéines comme de l'ovalbumine. En effet, une forte augmentation de la coacervation complexe a été mise en évidence entre l'ovalbumine et l'acide polyacrylique lorsque la masse de celui-ci augmentait, alors qu'il n'en était rien avec le lysozyme. L'explication de ce phénomène résiderait dans le faible effet de la masse moléculaire lorsque les deux macromolécules ont des densités de charges voisines et élevées, ce qui était le cas pour le lysozyme et l'acide polyacrylique mais pas pour l'ovalbumine. Cet effet a également été mis en évidence par Frugier (1988) sur un mélange de polyélectrolytes synthétiques de signe opposé. En effet, à une densité de charge constante, mais en multipliant la masse moléculaire des polyélectrolytes par 2 ou 4, l'étendue de la zone biphasique ne se trouvait que très faiblement augmentée.

Récemment, Wang et al. (2000) ont étudié l'influence de la masse moléculaire des polyélectrolytes sur la formation des complexes et des coacervats dans un mélange micelles anioniques-polycation. Ces auteurs ont mis en évidence une masse moléculaire critique pour que la coacervation complexe soit initiée et expliquent l'effet de ce paramètre par le rôle joué dans l'établissement de  $\chi_{cr}$ . Plus la masse moléculaire est élevée, plus  $\chi_{cr}$  est faible et la séparation de phase favorisée. De plus, cette étude a mis en évidence l'influence d'un couplage densité de charge-masse moléculaire des polyélectrolyte. Ainsi, la coacervation complexe est favorisée pour de fortes densités de charges et des masses moléculaires élevées.

#### 4.5 Influence du ratio massique protéine : polysaccharide

Le ratio massique protéine : polysaccharide (Pr : Ps) a une très grande importance sur le phénomène de séparation de phase par coacervation complexe. En effet, à un pH et à une force ionique donnés, le ratio massique Pr : Ps va conditionner la neutralisation des charges entre les deux macromolécules (Xia et Dubin, 1994). Si les complexes sont de type stœchiométriques, c'est à dire que la neutralisation est obtenue pour des ratios de 1 : 1, tout ratio supérieur ou inférieur aura pour effet de solubiliser ces complexes et donc de diminuer la formation de coacervats (Kaibara et al., 2000).

Dans l'étude de la coacervation complexe entre la gélatine et la CMC, Koh et Tucker (1988a, b) ont par exemple montré que le volume de la phase constituant le coacervat était maximum pour un ratio de mélange de 1 : 1, pour lequel la neutralisation des charges portées par les deux macromolécules est obtenue. L'influence du ratio de mélange sur la formation de complexes a particulièrement bien été mise en évidence dans le cas d'un mélange entre de la gélatine et du poly(styrènesulfonate) de sodium, à pH 5,65 et à une force ionique de 10mM (Bowman et al., 1997). Le suivi de l'intensité de lumière diffusée à 90°, proportionnelle à l'association entre les macromolécules et donc au nombre de complexes formés, montre une augmentation linéaire à partir de la valeur obtenue pour le polyélectrolyte seul, jusqu'à arriver à une valeur maximale 5 fois supérieure pour un ratio gélatine/polélectrolyte de 12. L'augmentation de l'intensité diffusée correspond à la formation de complexes solubles. Lorsque par la suite, on augmente à nouveau le ratio de mélange, l'intensité diffusée diminue à nouveau linéairement jusqu'à retrouver l'intensité de la gélatine seule en solution. Cette décroissance caractérise la resolubilisation des complexes formés, du fait de l'excès de charges apportées par la gélatine (Figure 1.7). Il est intéressant de noter que dans cette même étude, les auteurs ont montré que la valeur du ratio correspondant au maximum d'intensité diffusée était indépendante de la longueur de la chaîne du polyélectrolyte. Laneuville et al. (2000) ont également montré par analyse d'images qu'il était possible de contrôler la taille des complexes obtenus en contrôlant le ratio initial de mélange. En effet, 40% des complexes protéines de lactosérum/xanthane obtenus après mélange à un ratio Pr : Ps de 5 : 1 à 10 : 1 avaient une taille inférieure à 20  $\mu\text{m}^2$  alors que celle-ci était supérieure à 300  $\mu\text{m}^2$  pour 44% des complexes obtenus pour un ratio initial supérieur à 15 : 1.



**Figure 1.7 :** Variation de l'intensité relative de lumière diffusée à 90° en fonction du ratio de mélange,  $r$ , gélatine/NaPSS dans une solution d'acétate de sodium à 0,01M, à pH 5.65 et 40°C. (a) intensité totale diffusée en absence d'interaction entre les macromolécules ; (b) maximum d'intensité diffusée (D'après Bowman et al., 1997).

D'autres études montrant l'influence du ratio protéine : polysaccharide sur la formation de complexes macromoléculaires et sur l'apparition de la coacervation complexe sont résumés dans le tableau 1.3.

#### 4.6 Influence de la concentration totale en biopolymères

La concentration totale en biopolymères est un paramètre important dans l'apparition du phénomène de coacervation complexe. En effet, en étudiant près de 80 systèmes ternaires eau/protéine/polysaccharide, Tolstoguzov (1986) affirma qu'il n'était pas possible de former des coacervats à des concentrations totales en biopolymères supérieures à 4% (p/p). Ceci avait déjà été suggéré par Veis et al. (1967) qui pensait que le gain entropique ou enthalpique électrostatique résultant de la formation de complexes ne pouvait plus contrebalancer la perte de mobilité des macromolécules ainsi que les phénomènes de compétition avec les molécules de solvant. Autrement dit, il devient thermodynamiquement inutile de former une phase concentrée en biopolymères si cette concentration est déjà obtenue avant séparation de phase. Aussi, une fois cette valeur critique atteinte, le système sera sujet à une séparation de phase ségrégative plutôt qu'associative. C'est ce qui explique que la zone biphasique est fermée dans le cas de la coacervation complexe alors que ce n'est pas le cas pour l'incompatibilité thermodynamique. Egalement, il est alors possible d'obtenir un phénomène de coacervation complexe en diluant un système concentré où les interactions électrostatiques sont fortes (Phares et Sperandio, 1964).

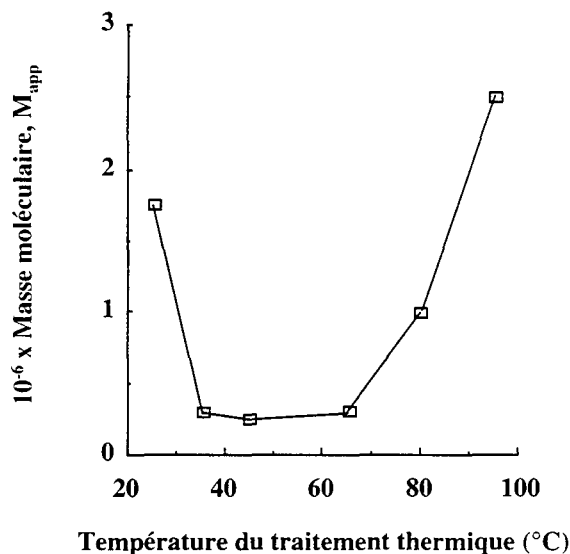
#### 4.7 Influence des paramètres physiques sur la coacervation complexe

Nous venons de décrire les principaux paramètres physico-chimiques influençant la formation des complexes macromoléculaires entre les biopolymères, et par voie de conséquence la coacervation complexe. D'autres paramètres, que nous qualifierons de physiques, peuvent également contrôler la formation des complexes en agissant soit directement sur les macromolécules, soit sur les complexes ou enfin sur les coacervats obtenus. Ces principaux paramètres sont la température et la pression. Nous décrirons ensuite d'autres paramètres, tel que l'agitation ou le temps d'agitation qui relèvent de l'application de traitements mécaniques aux mélanges de biopolymères.

##### 4.7.1 Température

De nombreux effets thermodynamiques dépendent de la température. Lorsque la température baisse, la séparation de phase associative est favorisée car le paramètre d'interaction de Flory-Huggins,  $\chi_{ij}$ , varie inversement proportionnellement à la température (Chap. 1, § 1.1.2). De plus, de nombreuses interactions non-coulombiennes sont influencées par la température. Par exemple, l'établissement de liaisons hydrogènes est favorisé par une diminution de la température alors qu'au contraire les liaisons hydrophobes ou covalentes sont favorisées par une augmentation de celle-ci. L'explication de cet effet repose dans l'exposition de groupements réactifs de la protéine après qu'elle ait subi des modifications conformationnelles induites par des traitements thermiques. Il est à noter que certains polysaccharides comme la gomme xanthane ou les carraghénanes subissent également de telles modifications structurales qui peuvent les faire passer dans des états plus ou moins ordonnés (Bourriot, 1999 ; Zuñiga-López, 1999 ; Langendorff et al., 2000). Comme nous l'avons évoqué lors de la description des différents types d'interactions rencontrés dans les complexes macromoléculaires, un traitement thermique des mélanges macromoléculaires après complexation peut, dans certains cas, permettre de stabiliser les complexes obtenus par

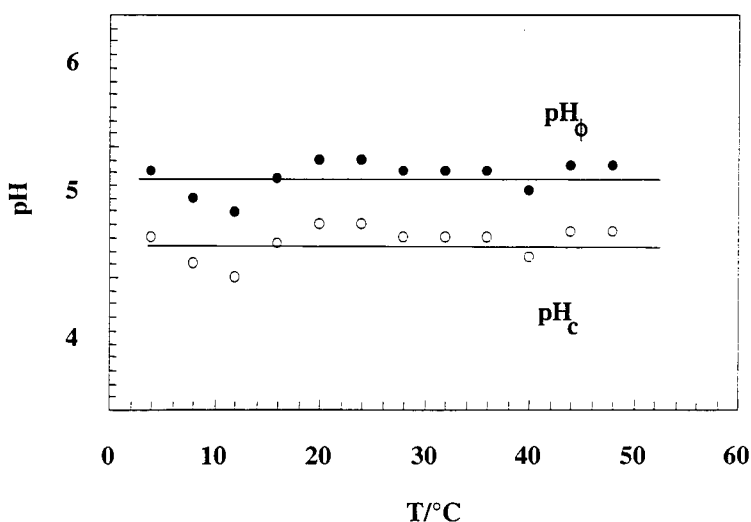
création de nouvelles zones de liaison (Sanchez et Paquin, 1997). Une étude concernant l'effet de la température sur la formation de complexes électrostatiques entre l'ASB et l'alginate a été réalisée par AED et chromatographie d'exclusion (Harding et al., 1993). Des mélanges ASB/alginate (pH 6,8, force ionique 0,1M, ratio Pr : Ps 1 : 1) ont été chauffés de 25 à 90°C et les masses moléculaires apparentes ( $M_{app}$ ) des complexes ont été déterminées en utilisant l'équation de Svedberg (Figure 1.8). Il a été montré que les complexes étaient formés à 25°C ( $M_{app} = 2 \times 10^6$ ), tandis qu'entre 35 et 70°C aucun complexe n'était obtenu ( $M_{app} = 0,2 \times 10^6$  qui correspond à la masse moléculaire de l'alginate libre). Lorsque la température était supérieure à 70°C, la formation de complexes était à nouveau visible. L'explication de ce phénomène tient au fait que la température de dénaturation de l'ASB est de 55°C et qu'une fois dépassée, elle permet d'exposer plus de groupements réactifs et favorise la formation des complexes. La dissociation des complexes dans la zone de température comprise entre 35 et 70°C correspondrait au phénomène de modification conformationnelle de l'ASB durant laquelle l'interaction avec l'alginate est défavorable.



**Figure 1.8 :** Influence de la température sur la masse moléculaire apparente des complexes ASB/alginate (pH 6,8, force ionique 0,1M, ratio Pr : Ps 1 : 1) (d'après Harding et al., 1993).

Dans le même esprit, Le Hénaff et al. (1997) ont montré que le nombre de complexes protéines de lactosérum/gomme xanthane obtenus était supérieur après avoir fait subir un traitement thermique de 20 min à 80°C au mélange (pH 6,0, ratio Pr : Ps de 20 : 1, concentration totale 1% p/p). Ce résultat, comme le précédent, serait expliqué par une dénaturation partielle des protéines et/ou à des changements conformationnels du xanthane favorisant alors les interactions entre les biopolymères. Si l'on considère l'influence de la température sur la cinétique de coacervation complexe, une étude récente a été menée par Sanchez et al. (2000) sur un mélange  $\beta$ -lg /gomme d'acacia (pH 3,6, ratio Pr : Ps de 1 : 1, concentration totale 2%) à des températures de 25 et 50°C. La taille des coacervats obtenus a été suivie pendant 1 heure par granulométrie laser et il a été montré que la séparation de phase semblait plus rapide à 50°C, même si les tailles des coacervats obtenus aux deux températures étaient peu différentes. Toujours concernant la température, Kaibara et al. (2000b) ont étudié

son influence sur l'apparition des  $pH_c$  et  $pH_\phi$  dans le système ASB/CPDMDAA entre 5 et 63°C (Figure 1.9). Il résulte de cette étude qu'aucun des deux paramètres n'est influencé par la température, ce qui tendrait à prouver que ni la formation des complexes macromoléculaires initiaux, ni l'apparition de la séparation de phase macroscopique ne sont affectés par la température. L'influence de la température sur la cinétique de structuration des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia pourrait s'expliquer par la présence d'agrégats protéiques dans la dispersion de  $\beta$ -lg qui pourraient être plus réactifs à haute température et ainsi accélérer la séparation de phase. D'autres exemples de systèmes biopolymériques ayant fait l'objet d'une étude sur l'effet de la température se trouvent dans le tableau 1.3.



**Figure 1.9 :** Influence de la température sur les valeurs des pH de formation des complexes macromoléculaires,  $pH_c$ , et de séparation de phase macroscopique,  $pH_\phi$ , pour un mélange albumine de sérum bovin (ASB)/chlorure de poly(diméthylaldiallammonim) (CPDMDAA) (ratio = 24 ; force ionique 10mM ; concentration totale 0,6 g.l<sup>-1</sup>) (d'après Kaibara et al., 2000b).

#### 4.7.2 Pression

Un certain nombre d'études traite de l'influence de la pression, de plus en plus utilisée dans le traitement des denrées alimentaires, sur la complexation des protéines et des polysaccharides. Lors de l'application d'un traitement de haute pression à un mélange de biopolymères, on distinguera une pression de type hydrostatique, obtenue dans une chambre haute pression, d'une pression mécanique, imposée par des appareils de type homogénéisateurs qui combinent les effets de la pression et du cisaillement (Sanchez et Paquin, 1997).

Dans une étude menée récemment, les propriétés de stabilisation de l'ASB native par complexation avec du dextrane sulfaté dans des émulsions n-tétradécane/eau lors de l'application d'un traitement de haute pression hydrostatique ont été mesurées. Le pH d'étude était de 7,0, soit au-dessus du  $pH_i$  de l'ASB (Dickinson et Pawlowsky, 1996). En appliquant une vitesse de cisaillement de 0,14 s<sup>-1</sup> à des mélanges ASB (4,6% p/p)/DS (0,08 à 0,4% p/p), la viscosité (apparente)  $\eta$  des mélanges avant préparation des émulsions a été mesurée.

Aucune différence significative de viscosité n'a été mise en évidence après un traitement à 300 MPa par rapport au mélange non traité ( $\eta \sim 3\text{-}5$  mPa.s). En revanche, après un traitement à une pression de 500 MPa, la viscosité du mélange se trouve augmentée, surtout lorsque la concentration en dextrane sulfaté augmente de façon concomitante, 45 mPa.s avec 0,24% (p/p) de dextrane sulfaté et 100 mPa.s avec 0,4% (p/p) de dextrane sulfaté. Ces résultats montrent que le traitement de haute pression, s'il est d'intensité suffisante, peut dénaturer partiellement l'ASB. Celle-ci expose alors des groupements réactifs lui permettant d'établir des interactions électrostatiques avec le polysaccharide, entraînant la formation de complexes, ce qui augmente la résistance à l'écoulement des dispersions obtenues. La formation de ceux-ci a par ailleurs été confirmée indirectement par la mesure du module viscoélastique complexe  $G^*$  des émulsions. Il a été montré que les émulsions présentaient une importante viscoélasticité de la phase continue mais également de la surface des gouttelettes constituant l'émulsion. Ce type d'induction de la formation de complexes par dénaturation de la protéine après un traitement haute pression a également été mise en évidence dans le cas de mélanges constitués d'ovalbumine et de polysaccharides sulfatés tels que les carraghénanes (Galazka et al., 1999).

Quelques études font état de l'influence de traitements d'homogénéisation sur des mélanges protéines de lactosérum/gomme xanthane (Le Hénaff, 1996). Dans ce cas, il a été montré qu'un traitement de microfluidisation de 4 passes à 750 bars permettait de réduire considérablement la taille de complexes protéine/polysaccharide. L'action de ce traitement résiderait en fait dans une destruction des agrégats protéiques mais également une meilleure dispersion des molécules de xanthane dans le solvant conduisant à la réduction de la taille des complexes obtenus. Les résultats de ces travaux ont été récemment confortés, il semble cependant que la diminution de la taille de complexes soit contrôlée par la microfluidisation du xanthane (diminution de la taille des molécules) et par le ratio initial de mélange protéine de lactosérum/xanthane (Laneuville et al., 2000).

### 4.7.3 Agitation et temps d'agitation

Ces deux paramètres sont importants si l'on considère leur utilisation dans le domaine industriel. En effet, de nombreux procédés font appel à des traitements d'agitation et d'homogénéisation des mélanges de même qu'à leur pompage, par exemple à des fins de conditionnement ou de transport.

Les études menées sur l'influence de l'agitation ou de la vitesse d'agitation sur la formation de complexes macromoléculaires et de coacervats ont donné lieu à des résultats pour le moins contradictoires. Par exemple, dans le cas de la coacervation complexe entre la gélatine et la gomme d'acacia dans le but de produire des microcapsules à des fins pharmaceutiques, Tirkkonen et al. (1994) ont montré que le diamètre moyen des coacervats obtenus était inversement proportionnel à la vitesse d'agitation, à savoir 2,2  $\mu\text{m}$  de diamètre à 420 tours par minute (tpm) et 3,1  $\mu\text{m}$  à 200 tpm. L'influence de la vitesse d'agitation résiderait ici dans une fragmentation des gouttelettes de coacervats formées. Les conclusions de cette étude confirment les résultats d'une étude antérieure sur des mélanges gélatine/carbopol (polymères vinylique anionique) à pH 6,8, une concentration totale de 1,1% et un ratio gélatine : carbopol de 10 : 1 (Elgindy et Elegakey, 1981). Les auteurs, après avoir testé trois vitesses d'agitation lors du mélange des deux macromolécules (650-600 tpm, 350-300 tpm, 150-100 tpm), ont en effet obtenu des coacervats présentant un diamètre moyen inversement proportionnel à l'agitation.

Dans une autre étude concernant la coacervation complexe entre l'albumine et la gomme d'acacia, des résultats contradictoires ont été obtenus puisque qu'aucune influence significative de l'agitation (0, 450 et 900 tpm pendant 1 heure) sur la taille des coacervats

obtenus n'a pu être mise en évidence (Burgess et Singh, 1993). Övez et al. (1997) ont étudié l'influence combinée de l'agitation et du temps d'agitation sur la coacervation complexe entre la gélatine et la gomme d'acacia (pH 4,0) et ont montré que le temps d'agitation n'avait pas d'effet sur la taille des coacervats. En revanche, il semble que la vitesse d'agitation ait quant à elle un effet puisque pour une gamme de vitesses < 1200 tpm, une augmentation du diamètre des particules a été observée. L'explication en serait une favorisation de la coalescence entre les coacervats induite par l'agitation, ce qui confirme les affirmations de Tirkkonen et al. (1994). Au-dessus de cette vitesse critique, une diminution de la taille des coacervats s'expliquerait par une fragmentation de ceux-ci ou une limitation de leur coalescence.

De toute évidence, la grande variabilité des résultats obtenus sur l'effet de l'agitation réside dans le manque de contrôle du cisaillement imposé réellement dans les différents systèmes. L'étude rigoureuse de l'influence de l'agitation et du temps d'agitation nécessite l'utilisation de dispositifs expérimentaux dans lesquels le cisaillement imposé à l'échantillon est parfaitement contrôlé et exprimé en  $s^{-1}$ . Ce n'est qu'à cette seule condition que les résultats obtenus pourraient alors être comparés.

Dans une étude concernant la coacervation complexe entre la  $\beta$ -Ig et la gomme d'acacia, Schmitt et al. (1998) ont mis en évidence l'influence du temps d'agitation sur la taille des coacervats obtenus. En effet, un mélange  $\beta$ -Ig/gomme d'acacia à pH 4,0, ratio 4 : 1 et une concentration totale de 0,1% a été agité à vitesse constante durant des temps variables. Le diamètre des coacervats obtenus est passé de 1  $\mu$ m après agitation durant 15 s à 10-25  $\mu$ m après 60 s d'agitation. Comme dans le cas précédent, il s'agirait ici d'un effet d'accélération du processus de coalescence (ou floculation) entre les coacervats. Des résultats similaires concernant l'influence du type d'agitation et du temps d'agitation ont été mis en évidence dans le cas de l'étude de la coacervation complexe entre la gélatine et le chitosane (Remuñán-López et Bodmeier, 1996).

Plus récemment encore, une étude menée sur le système  $\beta$ -Ig/gomme d'acacia/eau à pH 3,6 a mis en évidence l'effet combiné de la température, de l'agitation et du temps d'agitation sur la taille des coacervats obtenus (Sanchez et al., 2000). En traitant les mélanges à une concentration totale de 2% (p/p) et un ratio massique Pr : Ps de 1 : 1, il a été montré qu'une faible température (25°C) combinée à une agitation intense (3500 tpm) était équivalente à un traitement thermique à 50°C combiné à une agitation faible (1000 tpm) en termes de variation de la taille des coacervats obtenus (augmentation du diamètre apparent au cours du temps). Plus intéressant encore, la combinaison d'une faible température (25°C) et d'une agitation faible ou d'un cisaillement pur (100  $s^{-1}$ ) permet de stabiliser la taille des coacervats obtenus en minimisant les phénomènes de floculation et de coalescence, puisque par nature, les coacervats formés ont tendance à coalescer du fait de leur état liquide et de leur neutralité électrique (Wen et Dubin, 1997).

## 5 Mécanisme de formation et structure des coacervats

Dans cette partie, nous allons essayer de décrire et de synthétiser brièvement le ou les différents mécanismes cinétiques invoqués pour rendre compte de la séparation de phase par coacervation complexe. Dans un second temps, les différentes études concernant la structure et la morphologie des coacervats seront également analysées.

### 5.1 Mécanisme de formation des coacervats

A l'heure actuelle, peu d'études décrivent en détail le mécanisme cinétique de la séparation de phase par coacervation complexe dans les mélanges protéine-polysaccharide, en partant de la formation des complexes solubles primaires jusqu'à la séparation de phase



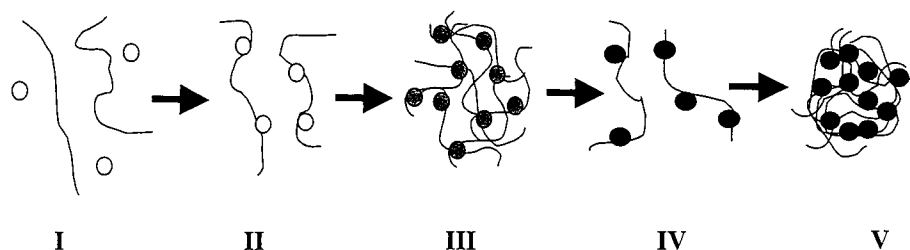
macroscopique (état d'équilibre), en passant par la formation des coacervats. A notre avis, cette constatation repose sur le fait qu'il est très difficile de décrire ce mécanisme en utilisant un nombre limité de techniques, chaque phase de la réaction se déroulant en effet à une échelle d'observation différente. Il convient donc d'utiliser un nombre important de techniques d'investigation complémentaires (Xia et al., 1999). Egalement, le fait que la protéine comme le polysaccharide puissent subir des changements structuraux rend la tâche encore plus ardue. En conséquence, la plupart des études concernant la coacervation complexe ont été réalisées sur des systèmes mixtes protéine-polyélectrolyte synthétique dont il est plus aisé de contrôler les propriétés physico-chimiques.

Les études les plus complètes ont été réalisées par l'équipe du Pr Paul Dubin (Azegami et al., 1999 ; Mattison et al., 1999 ; Wang et al., 1999 ; Kaibara et al., 2000) sur le système ASB/polyélectrolyte. La technique la plus couramment utilisée consiste à suivre la séparation de phase en fonction du pH par une méthode turbidimétrique couplée à de la diffusion quasi-élastique de la lumière en milieu dilué. Les paramètres tels que la force ionique, le ratio protéine/polyélectrolyte ou la concentration totale en macromolécules sont alors étudiés.

En étudiant le mélange ASB/polyélectrolyte, déjà étudié par Park et al. (1992), Mattison et al. (1995) ont mis en évidence trois zones distinctes de pH en fonction de la variation de turbidité avec le pH (Figure 1.5). La région 1 correspond à  $\text{pH} < \text{pH}_c$  (environ 4,6). Dans cette région, les forces coulombiennes répulsives entre les charges positives portées par la protéine et le polycation empêchent la formation de complexes, ce qui se traduit macroscopiquement par une valeur constante de la turbidité. Dans la région 2 ( $4,6 < \text{pH} < 7,4$ ), il y a formation de complexes solubles, dits primaires, entre des chaînes de polyélectrolyte et des molécules d'ASB. La turbidité augmente alors très légèrement. La dernière région correspond à  $\text{pH} > \text{pH}_\phi$ , où l'on note une augmentation très marquée de la turbidité, traduisant la séparation de phase macroscopique du système et donc la présence de coacervats (Figure 1.5).

La valeur de  $\text{pH}_c$  peut être considérée comme une transition du mécanisme de complexation de l'échelle moléculaire à une échelle nano/microscopique. De même, le  $\text{pH}_\phi$  correspond au passage de l'échelle microscopique/mésoscopique à la séparation de phase macroscopique. Les études précédentes ont mis en évidence la dépendance du  $\text{pH}_\phi$  avec le ratio ASB/CPDMDAA alors que ce n'est pas le cas du  $\text{pH}_c$ . Ceci peut s'expliquer par le fait que le  $\text{pH}_c$  constitue le pH à partir duquel la quantité de charges négatives portées par la protéine est suffisante pour l'établissement d'une interaction électrostatique avec le polycation. Ce phénomène met donc en jeu des molécules de protéine libres et des molécules de polycations. L'ASB pouvant porter des zones localement chargées négativement (patches) quel que soit le pH, la valeur de  $\text{pH}_c$  peut être inférieure au  $\text{pH}_i$  de la protéine. La seule variable agissant sur le  $\text{pH}_c$  est la force ionique qui, par écrantage, fait varier le nombre de charges portées par la protéine. La dépendance de  $\text{pH}_\phi$  par rapport au ratio protéine/polyélectrolyte tient au fait qu'il s'agit là d'une interaction entre les complexes solubles déjà formés qui s'agrègent et s'insolubilisent. Cette valeur dépend donc du nombre de complexes formés et par conséquent du ratio. Ceci explique également que  $\text{pH}_\phi$  est toujours supérieur au  $\text{pH}_i$  de la protéine.

Le mécanisme global de la coacervation complexe a été schématiquement élaboré par Wang et al. (1999), en étudiant la coacervation complexe dans un mélange constitué d'un polycation (CPDMDAA) et de micelles anioniques composées de surfactants (Triton X – SDS) par titration turbidimétrique et calcul de la dérivée des courbes obtenues. Comme le montre la Figure 1.10, cinq phases principales ont été définies.

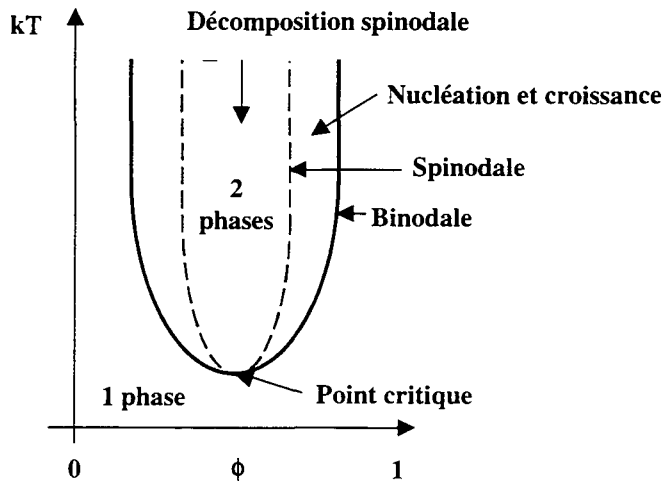


**Figure 1.10 :** Schéma de l'enchaînement des différentes phases du mécanisme de coacervation complexe dans un mélange constitué d'un polycation linéaire (CPDMDAA) et de micelles polyanioniques de surfactants (Triton X – SDS). La densité de charge des micelles (cercles) augmente avec l'intensité de leur couleur noire (d'après Wang et al., 1999).

Dans la phase I, la densité de charge des micelles est insuffisante pour initier la formation de complexes électrostatiques avec le polycation. Le mélange est alors limpide. Lorsque la densité de charge des micelles atteint une valeur critique, les premiers complexes macromoléculaires solubles se forment, ce qui se traduit par une première inflexion de la courbe de turbidité. La neutralisation des complexes formés devenant de plus en plus effective avec l'augmentation du nombre de macromolécules interagissant, les complexes interagissent entre eux, pour former des coacervats liquides. Le maximum de coacervation complexe est généralement obtenu aux alentours de la zone de neutralisation complète de la charge des complexes qui correspond à une forte augmentation de la turbidité du mélange (phase III). Lorsque l'on augmente la charge négative des micelles, les complexes peuvent se dissocier du fait des répulsions entre les micelles, entraînant la disparition des coacervats et une chute de la turbidité (phase IV). Enfin, dans un dernier stade, si les micelles qui possèdent maintenant une très forte densité de charge réagissent à nouveau avec les molécules de polycation, l'interaction peut dans ce cas entraîner la formation de précipités dans lesquels les deux macromolécules se trouvent très intimement liées (phase V). Ceci se traduit par une nouvelle augmentation de la turbidité. Dans ce cas, l'expulsion des molécules de soluté et des contre-ions explique que la séparation de phase passe d'une transition liquide-liquide à une transition liquide-solide (Wang et al., 2000).

Ces études turbidimétriques ont été confirmées récemment par Kaibara et al. (2000) qui ont complété la titration turbidimétrique par de la diffusion dynamique de la lumière à  $90^\circ$  afin de suivre plus en détail la formation des complexes solubles. De plus, la formation des gouttelettes de coacervats a été suivie macroscopiquement par microscopie optique à contraste de phase. Le schéma d'ensemble du mécanisme de séparation de phase a pu être affiné puisque plusieurs zones de pH intermédiaires ont été définies, notamment après  $\text{pH}_0$ , où  $\text{pH}_{\text{morph}}$  (entre les zones III et IV) a été mis en évidence. Il s'agit de la zone de pH à partir de laquelle on obtient des complexes intermoléculaires stables. Également, le  $\text{pH}_{\text{precip}}$  (entre les zones IV et V) représente la valeur de pH à partir de laquelle les complexes précipitent.

Si l'on tente de décrire le mécanisme cinétique de coacervation complexe par l'intermédiaire des deux principaux modèles décrits pour la séparation de phase dans les mélanges polymériques, à savoir la décomposition spinodale et la nucléation et croissance (Binder, 1991), le choix semble délicat. En effet, lorsque l'on trace l'évolution de la variation de l'énergie libre d'un tel système en fonction de la fraction volumique (ce qui équivaut au ratio de mélange), à une concentration totale donnée, le type de mécanisme donnant lieu à la séparation de phase dépendra de l'intensité des fluctuations d'énergie libre (Figure 1.11).



**Figure 1.11 :** Variation de l'énergie libre d'un mélange ternaire caractérisé par une température critique d'incompatibilité basse en fonction de la fraction volumique en polymères (d'après Merfeld et Paul, 2000).

Ainsi, si l'on se trouve dans la zone biphasique, les variations d'énergie libre sont généralement de faible intensité mais d'amplitude élevée. Ces variations sont dues à des fluctuations locales de concentration en macromolécules qui peuvent permettre le rapprochement et l'interaction de celles-ci, donnant lieu à la séparation de phase du système par décomposition spinodale. Dans le cas où le système se trouve dans la région intermédiaire entre la binodale et la spinodale, la séparation de phase nécessite une forte fluctuation de l'énergie libre du mélange afin de vaincre une barrière énergétique, communément appelée énergie d'activation. Le système se sépare alors par nucléation et croissance (Georgalis et Saenger, 1999). Des études récentes ont été réalisées sur des systèmes composés de protéines de lactosérum agrégées et de polysaccharide bactérien dans des conditions de déplétion, et le mécanisme de décomposition spinodale a été mis en évidence (Tuinier et al., 2000). De nombreuses études ont également été réalisées dans des mélanges de biopolymères, pour lesquels les deux phénomènes de séparation de phase sont susceptibles de se produire. Cependant, de telles études n'ont, pour l'instant, pas été menées dans des conditions de coacervation complexe.

## 5.2 Structure des complexes macromoléculaires et des coacervats

La structure des complexes macromoléculaires et des coacervats protéine-polysaccharide a été en général peu étudiée à l'échelle méso et macroscopique (morphologie, distribution des molécules) et moléculaire (structure des molécules au sein du coacervat). Les études ayant été menées sont pour la plupart basées sur des mesures indirectes de la structure obtenues par diffusion de la lumière ou analyse enthalpique différentielle (AED). Les informations obtenues sont globales, comme par exemple la taille des coacervats ou l'état de dénaturation de la protéine. Il serait intéressant d'utiliser des méthodes plus discriminantes vis à vis de chaque molécule dans le coacervat afin d'en obtenir une caractérisation structurale satisfaisante. On peut par exemple penser que des mesures de spectroscopie infrarouge ou de dichroïsme circulaire puissent donner des résultats intéressants. De même, l'utilisation de la

microscopie confocale à balayage laser couplée à un double marquage des molécules serait envisageable.

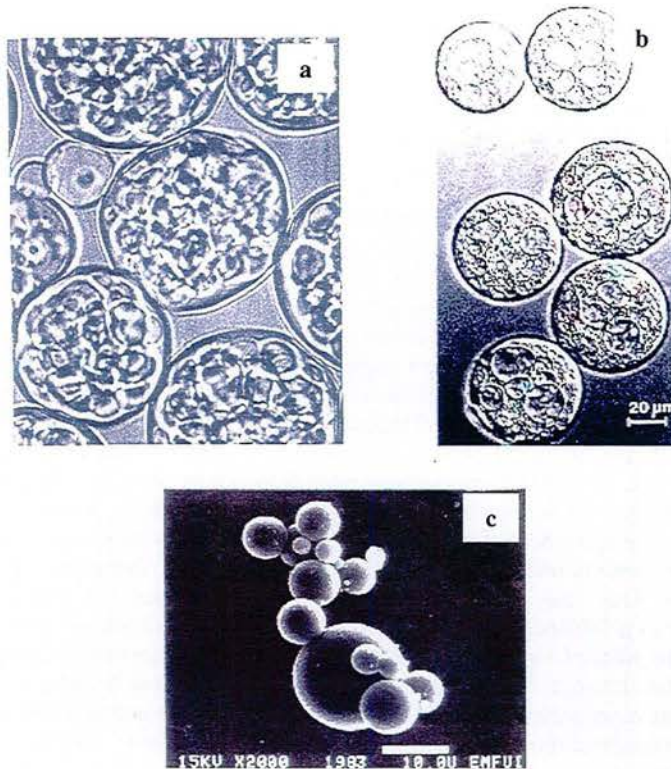
Voyons quelques uns des résultats obtenus par des méthodes indirectes comme par exemple l'AED qui permet d'étudier l'état de dénaturation des protéines. Cette méthode a été utilisée par Imeson et al. (1978), couplée à des analyses spectroscopiques et de chromatographie d'exclusion, pour des mélanges composés d'ASB ou de myoglobine et des polysaccharides tels que l'alginate, la pectine ou la CMC. L'AED a permis de mettre en évidence une interaction entre les polysaccharides et les protéines, induisant un changement de structure de celles-ci puisque les thermogrammes obtenus pour les protéines seules étaient différents de ceux obtenus après mélange. Cependant, le lieu exact de l'interaction restait à définir. Des études plus précises ont été réalisées par Braudo et Antonov (1993) en utilisant le dichroïsme circulaire qui est spécifique de la structure secondaire des protéines, en particulier des structures de type hélice  $\alpha$ . Considérant un mélange (à de fortes forces ioniques) composé de la rubisco (ribulose diphosphate carboxylase) et de pectine près du  $\text{pH}_i$  de la protéine (4.8) afin de limiter les interactions électrostatiques, ces auteurs ont mis en évidence la formation de complexes non électrostatiques. En effet, des mesures d'AED ont montré une diminution de la température de dénaturation de la rubisco, confirmée par les mesures de DC qui ont précisé une diminution de la stabilité conformationnelle de la protéine. De plus, cette étude a mis en évidence une diminution de la teneur en hélice  $\alpha$  de la protéine, ce qui a permis d'invoquer la formation de liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyyles des résidus tyrosine et les résidus amines des résidus tryptophane de la rubisco avec les fonctions esters de la pectine. De plus, la zone d'interaction a pu être précisément localisée sur la protéine.

D'autres études ayant mis en œuvre des mesures de dichroïsme circulaire (DC) ont montré que lors de la coacervation complexe, la structure de la protéine pouvait être conservée comme dans le cas de l'ovalbumine et du glutamate glucane (Stefancich et Delben, 1998) ou du chitosane et du collagène (Taravel et Domard, 1996). Ceci pourrait indiquer que les changements structuraux dépendent de la stabilité de la protéine et du lieu de l'interaction électrostatique ou non.

Des données plus précises ont été obtenues concernant l'agencement des molécules dans le complexe dans le cas d'un système ASB-polyélectrolyte. Ainsi, Kabanov et al. (1977) ont proposé une structure en pelote pour les complexes solubles ASB/polyvinylpyridine à pH 7,0. Le complexe obtenu est caractérisé par un rayon hydrodynamique d'environ 10 nm et sa solubilité a été attribuée à la contribution de la chaîne hydrophile du polyélectrolyte. Les travaux de Tribet et al. (1998) effectués sur un système similaire (ASB/polyacrylate de sodium) sont concordants puisqu'un rayon hydrodynamique de 8 à 10 nm a été mesuré. Un modèle différent a été proposé par Zaitzev et al. (1992) dans le cas de la complexation entre l'ASB et le bromure de N-ethyl-4-vinyle pyridinium. En effet, ils ont proposé une structure composée de la chaîne hydrophobe du polycation au centre du complexe, tandis que la protéine neutralise les charges résultantes à la périphérie. Les modèles les plus récents ont été proposés par l'équipe du Pr Paul Dubin pour les complexes ASB/CPDMDAA étudiés par diffusion dynamique de la lumière à des pH proches du  $\text{pH}_i$  de la protéine (Mattison et al., 1999). Comme cela a déjà été évoqué dans la partie précédente, les complexes solubles se forment par interaction entre une chaîne de polyélectrolyte et des régions chargées de la protéine. Ces complexes intrapolymériques interagissent ensuite pour former des complexes insolubles interpolymériques dont la taille (rayon de giration) varie entre 45 et 70 nm (Bowman et al., 1997 ; Wang et al., 1999 ; Wang et al., 2000). Des coacervats liquides sont ensuite formés. Dans certains cas, lorsque les interactions électrostatiques sont trop intenses des précipités peuvent être obtenus (Wen et Dubin, 1997).

Sur le plan macroscopique, la taille des coacervats peut être comprise entre 300-400 nm comme c'est le cas dans les mélanges alcool-déshydrogénase/CPDMDAA ou

trypsine/CPDMDAA (Xia et al., 1997) ou avoisiner des valeurs proches du micromètre ou de la dizaine de micromètres comme cela a été récemment mis en évidence par microscopie optique à contraste de phase (Kaibara et al., 2000 ; Sanchez et al., 2000). Dans une étude récente sur la coacervation complexe entre des micelles de surfactant (Triton X-SDS) et un polycation (CPDMDAA), Wang et al. (2000) ont mis en évidence une taille critique de 45 nm permettant le passage des complexes solubles aux coacervats insolubles.



**Figure 1.12** : Structure interne et morphologie de coacervats obtenus par interaction électrostatique entre différentes macromolécules. (a) Micrographie obtenue par microscopie optique de coacervats de gélatine/gomme d'acacia obtenus à pH 3,9, un ratio de 1 : 1 et une concentration totale de 3%. Le diamètre des coacervats est de 30 µm (d'après Newton et al., 1977) ; (b) Micrographie obtenue par microscopie optique à contraste de phase interférentiel de coacervats de gélatine B/hydroxyéthylamidon obtenus à pH 7,4 et un ratio de 7 : 1. La barre d'échelle représente 20 µm (d'après Lévy et Andry, 1989) ; (c) Micrographie obtenue par microscopie électronique à transmission de coacervats albumine/gomme d'acacia obtenus à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 2%. La barre d'échelle représente 10 µm (d'après Burgess et Singh, 1993).

La structure interne des coacervats obtenus après interaction des complexes macromoléculaires a été très peu étudiée depuis les travaux très complets de Bungenberg de Jong et al. (1949) réalisés par microscopie optique dans des conditions diverses et variées de force ionique, ratio de mélange Pr : Ps, température. Bungenberg de Jong et al. (1940) avaient mis en évidence la structure sphérique des coacervats composés de gélatine et de

gomme d'acacia, la comparant à celle de cellules du fait de leur compartimentation. Cette caractéristique structurale a également été observée dans le cas d'autres systèmes tels que chitosane/gélatine (Remuñán-López et Bodmeier, 1996), gélatine/pectine (Chilvers et Morris, 1987), gélatine/CMC (Lévy et Andry, 1989, 1991) ou gélatine/gomme d'acacia (Becker et al. 1977) (Figure 1.12). Cette caractéristique de compartimentation n'a cependant pas encore été élucidée.

## 6 Conclusion

Cette revue bibliographique nous a permis d'acquérir une vue d'ensemble de l'état des connaissances sur l'étude des interactions protéine-polysaccharide dans le domaine alimentaire principalement, et sur le phénomène de séparation de phase qui résulte de ces interactions (coacervation complexe).

La coacervation complexe est avant tout un phénomène cinétique de séparation de phase macroscopique liquide-liquide, caractérisé par une compatibilité entre deux macromolécules au détriment des molécules de solvant. Celle-ci est obtenue le plus souvent par le biais d'interactions électrostatiques qui tendent à associer les macromolécules. En fonction des modifications éventuelles de la structure de celles-ci, induites par l'interaction électrostatique. D'autres types d'interactions peuvent cependant être mis en jeu dans la formation des complexes, comme par exemple les liaisons hydrophobes, covalentes ou hydrogènes.

Plusieurs paramètres physico-chimiques et physiques influencent la formation des complexes macromoléculaires puis le phénomène de coacervation complexe. Il s'agit en particulier du pH, de la force ionique, du ratio de mélange protéine : polysaccharide, de la densité de charge, de la masse des macromolécules ou de la concentration totale en biopolymères qui agissent directement sur la formation des complexes macromoléculaires primaires qui conditionne l'apparition de la coacervation complexe. Il est cependant intéressant de noter que, à notre connaissance, peu d'études ont pris en considération l'influence de la polydispersité des macromolécules sur la coacervation complexe, paramètre qui ne peut être négligé lorsque l'on considère des biopolymères comme les protéines ou les polysaccharides. Lorsque les complexes macromoléculaires sont formés, ils s'insolubilisent par neutralisation progressive des charges qu'ils portent, puis interagissent pour former des agrégats intermoléculaires et enfin des coacervats. Tout comme les complexes macromoléculaires, il semble que les coacervats soient sensibles à des paramètres physiques comme la température, la pression, l'agitation et la vitesse d'agitation qui n'ont fait l'objet, pour l'instant, que d'un nombre réduit d'études.

Un autre point qui semble ne pas avoir fait l'objet de recherches importantes concerne le mécanisme cinétique donnant lieu à la séparation de phase. En effet la plupart des études ont été réalisées soit après mélange des macromolécules soit à l'équilibre thermodynamique du système. La question de savoir comment l'on passe tout d'abord des complexes macromoléculaires aux coacervats, puis comment ceux-ci évoluent au cours du temps afin d'arriver à la séparation de phase macroscopique reste donc encore à élucider. De même, l'étude de la structure des coacervats afin de déterminer la répartition des différents biopolymères qui les composent ou la mise en évidence d'éventuelles modifications de la structure des biopolymères après complexation demeurent des questions sans réponses.

Le but de notre étude est de tenter de répondre à ces interrogations dans le cas d'un mélange  $\beta$ -lg/gomme d'acacia en milieu aqueux. Une meilleure connaissance de ce type de système multiphasique paraît en effet indispensable si l'on veut comprendre et espérer

contrôler de façon précise les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des complexes protéine-polysaccharide qui pourront être obtenus.

## Chapitre 2 Caractérisation préliminaire de la $\beta$ -lactoglobuline et de la gomme d'acacia utilisés dans cette étude

### 1 Présentation des biopolymères utilisés

Nous allons brièvement rappeler les principales caractéristiques de la  $\beta$ -lactoglobuline et de la gomme d'acacia qui ont été utilisées au cours de cette étude.

#### 1.1 La $\beta$ -lactoglobuline

Il serait ici illusoire de tenter de faire une revue bibliographique exhaustive concernant la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) tant cette protéine a fait l'objet d'un nombre considérable d'études depuis sa découverte par Palmer en 1934. A titre indicatif, plus de 500 articles sont disponibles sur la base de données Current Contents pour les seuls douze derniers mois lorsque l'on utilise  $\beta$ -lactoglobuline comme mot clé. Dans le cadre de notre étude, nous nous limiterons à décrire les principales caractéristiques structurales de cette protéine et l'influence de paramètres tels que le pH, la force ionique et la température sur celles-ci. Nous décrirons ensuite les propriétés physico-chimiques de la  $\beta$ -lactoglobuline en solution, puis nous terminerons en évoquant les principales hypothèses proposées quant à son rôle biologique.

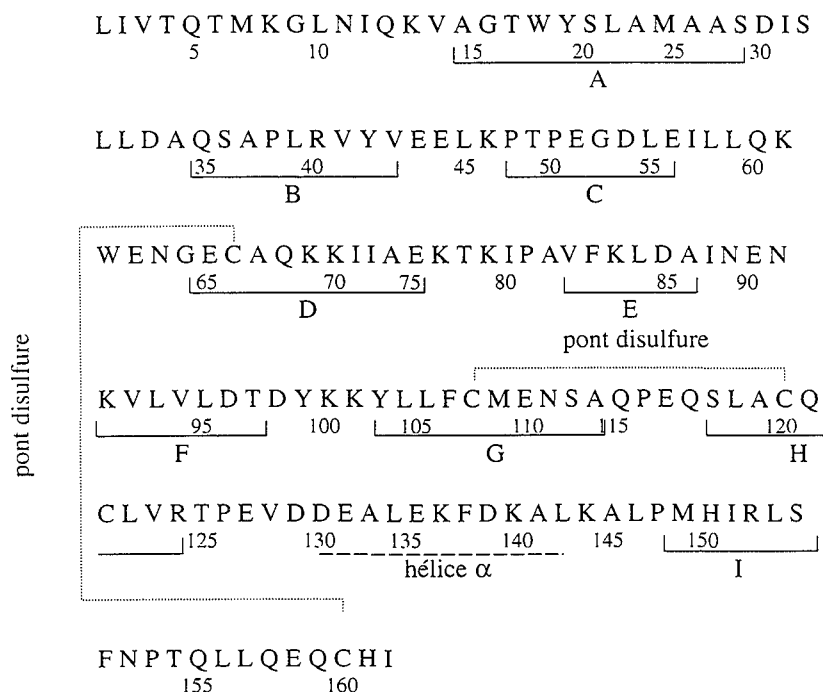
La  $\beta$ -lactoglobuline constitue la protéine majeure du lactosérum puisqu'elle représente environ 50% de la masse des protéines contenues dans celui-ci. Sa concentration moyenne dans le lait de vache est de l'ordre de 3,2 g.l<sup>-1</sup> (Cayot et Lorient, 1998). La fonction biologique exacte de la  $\beta$ -lg est encore inconnue à l'heure actuelle, mais il semblerait qu'elle possède un rôle de transporteur. L'étude intensive caractérisant la  $\beta$ -lg est sans doute liée à sa facilité d'obtention à grande échelle et à des degrés de pureté élevés sous forme cristalline. La grande stabilité de la  $\beta$ -lg en solution aqueuse dans une gamme de pH variant de 2 à 9 pour des températures inférieures à 50°C est également à l'origine de son utilisation comme protéine globulaire de référence.

De manière générale, la  $\beta$ -lg est présente dans les laits de nombreux ruminants et dans les laits de quelques monogastriques (truie, jument, chienne, ânesse). Elle serait, selon certains auteurs, également présente dans le lait humain en de très faibles quantités (Brignon et al., 1985). La  $\beta$ -lg appartient à la fraction albumine du lactosérum. Après cristallisation, on obtient en effet une protéine possédant les caractéristiques d'une globuline, c'est à dire une très faible solubilité près de son point isoélectrique (pH<sub>i</sub> = 5,1) à très faible force ionique (Palmer, 1934 ; Treece et al., 1964). Après ultracentrifugation analytique du lait écrémé, plusieurs fractions nommées alors  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  par ordre croissant de vitesse de sédimentation avaient été obtenues par Palmer (1934). La fraction cristallisée par Palmer appartenant à la fraction  $\beta$ , la protéine fut baptisée  $\beta$ -lactalbume par Svedberg (1938), puis  $\beta$ -lactoglobuline quatre ans plus tard (Cannan et al., 1942). Plusieurs variants génétiques ont été mis en évidence (7 au total), cependant les plus couramment présents dans le lait de vache sont les variants A et B, qui se trouvent en proportions égales dans le lait (Kinsella, 1984 ; Wong et al., 1996).



### 1.1.1 Structures primaire, secondaire et tertiaire de la $\beta$ -lactoglobuline

La séquence primaire de la  $\beta$ -lg comporte 162 acides aminés, pour une masse moléculaire de 18 400 g.mol<sup>-1</sup> (Dupont, 1965 ; Préaux et al., 1979). Elle contient deux ponts disulfures localisés entre les résidus Cys<sub>66</sub> et Cys<sub>160</sub>, Cys<sub>106</sub> et Cys<sub>119</sub> ou Cys<sub>121</sub> (Hambling et al., 1992). Un groupement thiol libre (-SH) se trouve positionné sur le résidu Cys<sub>119</sub> ou Cys<sub>121</sub>. Il est à noter que ce groupement n'est pas toujours présent en fonction de l'espèce considérée, comme par exemple chez la truie. Les deux principaux variants, A et B, diffèrent par la substitution de deux résidus, l'acide aspartique 64 étant dans le variant B remplacé par une glycine dans le variant A tandis que la valine 118 est substituée par un résidu alanine (Figure 2.1).



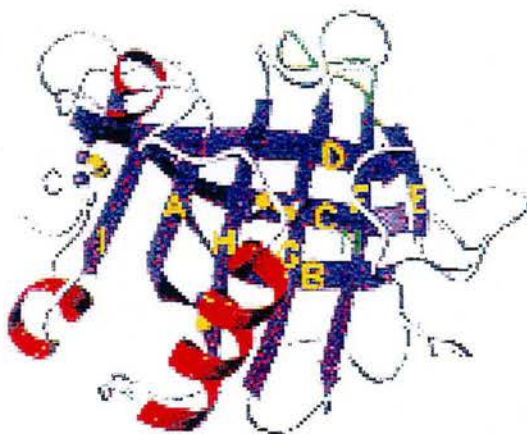
**Figure 2.1 :** Structures primaire et secondaire du monomère de  $\beta$ -lg A (d'après Molinari et al., 1996).

La structure secondaire de la  $\beta$ -lg a été déterminée par dispersion optique rotatoire (DOR) et dichroïsme circulaire (DC). Les proportions des différents types de structure secondaire obtenus sont de l'ordre de 10 à 15% d'hélice  $\alpha$ , 43% de feuillets  $\beta$  et 47% de structures désordonnées (Timasheff et al., 1966a ; Townend et al., 1967 ; Dong et al., 1996 ; Molinari et al., 1996). Ces résultats concordent avec les valeurs obtenues par cristallographie, à savoir 15% d'hélice  $\alpha$ , 50% de feuillets  $\beta$  et 15 à 28% de coudes  $\beta$  (Creamer et al., 1983 ; Monaco et al., 1987 ; Brownlow et al., 1997).

Des études cristallographiques aux rayons X à haute résolution (1.8 et 2.5 Å) ont permis de mettre en évidence la structure majoritairement en feuillets  $\beta$  anti-parallèles de la  $\beta$ -lg. Les 9 brins présents forment une cavité centrale hydrophobe en forme de calice (Sawyer et al.,

1985 ; Papiz et al., 1986 ; Molinari et al., 1996). Les brins A à I comprennent les résidus 16-27, 35-44, 47-58, 62-76, 80-84, 89-97, 102-109, 115-124 et 145-150 (Figure 2.1). La structure en hélice  $\alpha$  se compose de trois tours d'environ 3,5 acides aminés au niveau des résidus 130-140. Elle se trouve à l'extérieur du calice hydrophobe et donc directement exposée au solvant (Figure 2.2). Les coudes  $\beta$  sont localisés au niveau des résidus aminés 44-47, 78-81 et 84-85, de plus, des pseudo coudes  $\beta$  ont été mis en évidence en position 98-102 et 111-115 (Kuwata et al., 1999). Le brin I est impliqué dans la formation du dimère de  $\beta$ -lg par des interactions avec son homologue de la molécule voisine.

De par sa séquence et sa structure, la  $\beta$ -lg appartient à la super famille des lipocalines (Sawyer et Richardson, 1991 ; Turula et al., 1997). La principale caractéristique des protéines appartenant à cette famille réside dans leur masse moléculaire, proche de  $18\ 000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , mais également dans leur capacité à transporter de nombreux ligands hydrophobes, labiles et insolubles, d'où les hypothèses formulées quant à son rôle biologique (Brownlow et al., 1997 ; Sawyer et al., 1999).



**Figure 2.2 :** Structure tridimensionnelle du monomère de  $\beta$ -lg A en solution aqueuse. Feuillet  $\beta$  (annotés de A à I) en violet, hélice  $\alpha$  en rouge, structure désordonnée en vert (d'après Kuwata et al., 1999).

### 1.1.2 Structure quaternaire de la $\beta$ -lactoglobuline

La  $\beta$ -lg présente la particularité de posséder une large gamme d'états d'association, et donc de structures quaternaires, en fonction de différents paramètres environnementaux dont les plus importants sont le pH, la force ionique du milieu et la température, qui agissent de manière concomitante (Iametti et al., 1998). De plus, la structure quaternaire de la  $\beta$ -lactoglobuline influence certaines de ses propriétés physico-chimiques.

#### 1.1.2.1 Influence du pH

A température ambiante, faible force ionique et dans une gamme de pH inférieurs à 4 ou supérieurs à 7, la  $\beta$ -lg existe sous forme d'un équilibre monomère/dimère (Verheul, 1999). Pour des pH intermédiaires, lorsque l'on fait varier la force ionique et la température, les

monomères de  $\beta$ -lg peuvent s'associer pour former des structures oligomériques (dimères, tétramères, octamères).

Aux pH inférieurs à 3,5 ou supérieurs à 7,5, la  $\beta$ -lg se monomérise. Ce phénomène d'association/dissociation est d'autant plus marqué que la concentration en protéine et la force ionique sont faibles. Il faut en revanche que la température soit élevée et corresponde à une valeur de l'énergie libre d'association d'environ  $-25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Renard, 1994 ; Aymard et al., 1996). La capacité de dimérisation de la protéine serait due principalement à des interactions électrostatiques entre les résidus Asp<sub>130</sub> et Glu<sub>134</sub> d'un monomère et les résidus Lys d'un second monomère (Green et Aschaffenburg, 1959 ; Timasheff et Townend, 1961, 1964). Des interactions hydrophobes entre les résidus Ile<sub>29</sub> et Ile<sub>147</sub> ainsi qu'un empilement des groupements imidazoles des résidus His<sub>146</sub> reliés symétriquement pourraient également être mis en jeu (Papiz et al., 1986). Par voie de conséquence, la dissociation des dimères de  $\beta$ -lg serait due à l'augmentation importante de la charge nette de la protéine aux pH extrêmes puisque la charge nette,  $Z_p$ , de la  $\beta$ -lg B est de  $+13,1$  à pH 3,5 et  $-9$  à pH 8 (Swaisgood, 1982). Les analyses cristallographiques ont montré que le dimère de  $\beta$ -lg s'apparente à un ellipsoïde de longueur  $69,3 \text{ \AA}$  et de largeur  $34,6 \text{ \AA}$  composé de deux sphères de rayon  $17,9 \text{ \AA}$  légèrement écrasées au niveau de leur surface de contact. Le rayon de giration calculé par diffusion des rayons X aux petits angles pour le dimère est de  $21,6 \text{ \AA}$  à pH 5,7 et  $25^\circ\text{C}$  (force ionique de  $0,1\text{M}$  ; Witz et al., 1964), ce qui sous-entend que le modèle de Green et Aschaffenburg est également valide en solution. Dans cette zone de pH et pour des forces ioniques élevées ( $0,1\text{M}$ ), le rayon hydrodynamique de la  $\beta$ -lg en solution varie entre  $1,8$  et  $2,9 \text{ nm}$  en fonction des proportions respectives entre monomères et dimères (Renard, 1994 ; Verheul, 1999).

Entre pH 3,7 et 5,1, pour une température comprise entre  $0$  et  $4^\circ\text{C}$  et une concentration supérieure à  $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , le dimère se tétramérise pour former un octamère d'environ  $147\ 000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Le maximum d'octamérisation est obtenu à pH 4,6 et  $0^\circ\text{C}$ . L'implication de liaisons hydrogènes entre les groupements carboxyles des résidus Asp<sub>64</sub> localisés à l'interface d'association des dimères paraît probable puisque le phénomène d'octamérisation est plus important pour le variant A que pour le variant B (Townend et al., 1960). L'octamère formé entre pH 3,7 et 5,1 est un anneau formé de 4 dimères associés selon une symétrie 422. Le rayon de giration de cet assemblage compact est de  $34$  à  $36 \text{ \AA}$  (McKenzie, 1971). Dans cette gamme de pH, la dissociation monomère/dimère s'accompagne de changements conformationnels réversibles et de faible ampleur.

Un premier changement conformationnel réversible survient entre pH 4 et 6 (Timasheff et al., 1966b). L'augmentation du coefficient de sédimentation avec l'augmentation du pH est corrélée avec la contraction de la protéine. La  $\beta$ -lg A subit une ionisation sur deux groupes fonctionnels alors que la  $\beta$ -lg B subit une ionisation mono-protonique, ce qui suggère l'implication du groupement carboxylique supplémentaire présent sur le variant A dans l'ionisation. Aucun résidu aromatique ne semble être impliqué dans cette transition et aucun changement structural n'a été observé par spectroscopie infrarouge (Timasheff et al., 1966a ; Casal et al., 1988 ; Qin et al., 1999). Un deuxième changement conformationnel se produit entre pH 6,5 et 7,8, également réversible et connu sous le nom de transition de Tanford. Pour des pH supérieurs à 8, un troisième changement conformationnel irréversible aboutit à la dissociation de la  $\beta$ -lg, puis une dénaturation irréversible de celle-ci, conduisant à la formation d'agrégats à des pH supérieurs (Hambling et al., 1992).

### 1.1.2.2 Influence de la force ionique

Le pH isoélectrique de la  $\beta$ -lg est influencé par la force ionique du milieu. Ainsi, le pH<sub>i</sub> diminue lorsque la concentration en KCl ou CaCl<sub>2</sub> augmente (Nozaki et al., 1959 ; Tanford et

al., 1959). Cette observation pourrait avoir pour origine une fixation des cations calcium et potassium sur la protéine isoionique. On observe également une interaction préférentielle avec le chlorure de sodium, qui augmente significativement lorsque le pH se rapproche du  $pH_i$  de la protéine en raison d'une distribution de charges singulière à la surface de la protéine autour de celui-ci, conduisant à un moment dipolaire élevé (Arakawa et Timasheff, 1987 ; de Wit et van Kessel, 1996). La fixation des ions sodium sur la  $\beta$ -lg semble également être très dépendante du niveau d'hydratation de la protéine puisque le ratio de la quantité de molécules d'eau liée et de la quantité de molécules de sodium liées à la  $\beta$ -lg passe de 3,5 pour une activité de l'eau ( $a_w$ ) de 0,8 à plus de 20 pour une  $a_w$  de 0,97 (Fanni et al., 1989). Pour des pH supérieurs au  $pH_i$ , le sodium est capable de se fixer aux groupements carboxyliques et imidazoles, le nombre d'ions fixés par monomère passe alors de 0 à 2 lorsque l'on augmente le pH de 6 à 9 (Baker et Saroff, 1965). Enfin, l'influence de la force ionique sur l'association de la  $\beta$ -lg a été récemment mise en évidence à pH 2,3 à des concentrations de 10 g.l<sup>-1</sup>. Il s'avère que l'augmentation de la force ionique de 7 à 507 mM induit une dimérisation de la  $\beta$ -lg du fait d'un masquage de deux charges par monomère par les ions (Baldini et al., 1999).

### 1.1.2.3 Influence de la température

Comme la plupart des protéines globulaires, la  $\beta$ -lg possède de très bonnes propriétés d'agrégation et de gélification thermique. L'origine des propriétés d'agrégation des protéines globulaires, et de la  $\beta$ -lg en particulier, réside dans le changement de conformation de la protéine induite par la modification thermique des interactions maintenant sa structure native (Mulvihill et Donovan, 1987 ; Mulvihill et Kinsella, 1988). Il y a alors formation d'intermédiaires moléculaires réactifs plus ou moins dénaturés. On qualifie cet état structural de « molten globule state » (Doi 1993 ; Petsyn, 1994 ; Ikeguchi et al., 1997 ; García-Hernández et al., 1998). Ces espèces protéiques possédant des structures intermédiaires entre la forme native et la forme dénaturée sont capables d'interagir par l'intermédiaire de zones nouvellement exposées (Arai et al., 1998). Il peut par exemple y avoir établissement d'interactions hydrophobes et de ponts disulfures qui rendent alors irréversible le processus d'agrégation thermique (Shimada et Cheftel, 1989 ; McSwiney et al., 1994 ; Matsuura et Manning, 1994).

En tenant compte de ces types de réarrangements, l'agrégation thermique de la  $\beta$ -lg a été modélisée par Roefs et de Kruif (1996) en appliquant un modèle de polymérisation résultant de l'interaction de formes activées de la  $\beta$ -lg. Les agrégats formés par les protéines dénaturées croissent en taille et interagissent jusqu'à former un gel si la concentration en protéine est suffisante. De nombreuses études ont récemment mis en évidence la formation d'une multitude d'intermédiaires supramoléculaires dans le processus d'agrégation de la  $\beta$ -lg ainsi que l'importance du pH, de la force ionique et de la concentration totale en protéines sur les propriétés des gels obtenus (Hoffmann et al., 1997 ; Bauer et al., 1998 ; Verheul et al., 1998a, b). Enfin, il faut noter que certaines études ont mis en évidence la présence d'agrégats solubles (dans les conditions expérimentales utilisées) dans les poudres industrielles de  $\beta$ -lg dont la formation résulterait d'une dénaturation partielle de celle-ci lors de son traitement d'extraction (Sharma et Haque, 1996 ; Verheul, 1999). Il a été montré que la présence de tels agrégats pouvait également favoriser l'initiation de l'agrégation thermique (Sanchez et al., 1997).

### 1.1.2.4 Rôle biologique et autres propriétés physico-chimiques de la $\beta$ -lactoglobuline

La fonction biologique exacte de la  $\beta$ -lg n'est pas clairement établie, cependant les travaux en cours ont permis d'affiner un certain nombre d'hypothèses. Tout d'abord, on lui a

attribué un rôle régulateur du métabolisme du phosphore de la glande mammaire (Farell et Thompson, 1971). Une seconde hypothèse concernerait son rôle de transporteur des acides gras impliqués dans le métabolisme lipidique de la glande mammaire (Diaz de Villegas et al., 1987). En fait, de nombreuses études *in vitro* ont montré que la  $\beta$ -lg interagissait fortement et spécifiquement avec un grand nombre d'acides gras. Par ailleurs, la  $\beta$ -lg augmenterait de 190% l'activité d'une lipase prégastrique chez le ruminant et participerait de ce fait à la digestion des lipides du lait durant la phase néonatale (Perez et al., 1992). Une dernière hypothèse concernant le rôle de la  $\beta$ -lg serait qu'elle constitue un transporteur spécifique du rétinol issu du lait de vache chez le veau (Pervaiz et Brew, 1985 ; Papiz et al., 1986). En outre, son homologie de structure avec la protéine du plasma liant le rétinol, de même que l'existence d'interactions spécifiques entre le précurseur de la vitamine A, laissent supposer qu'elle pourrait jouer un rôle dans le transport de la vitamine A (Li et al., 1990).

Parmi les propriétés de la  $\beta$ -lg, il est intéressant de noter que son hydratation varie entre 35-40 et 60 g d'eau pour 100 g de protéine pour les formes dimériques et octamériques, respectivement (Swaisgood, 1982). Il semblerait que la cavité présente dans l'octamère pourrait être responsable de cette variation. En effet, elle pourrait permettre la fixation d'un nombre plus important de molécules d'eau. L'étude des temps de relaxation des protons par RMN a mis en évidence la présence de 5 à 6 molécules d'eau en plus par dimère, soit 20 à 24 molécules d'eau par octamère (Pessen et al., 1985).

Des études de la fixation de molécules sur la  $\beta$ -lg ont également montré que cette protéine pouvait fixer des composés hydrophobes ou amphiphiles sur deux sites distincts (Wang et al., 1997, 1998, 1999 ; Qin et al., 1998 ; Curley et al., 1999). Aucun de ces sites n'est affecté par l'état dimérique de la protéine, cependant ils le sont pour des états d'association plus élevés (Hambling et al., 1992). La fixation sur l'un des deux sites implique des changements dans l'environnement sulfhydryle susceptibles de conduire à la dissociation du dimère alors que la fixation sur l'autre site semblant impliquer un résidu Trp<sub>19</sub> se trouvant à la base du calice hydrophobe n'a pas d'effet sur le dimère. Il est également à noter que, du fait de sa structure globulaire, la  $\beta$ -lg constitue le principal allergène du lait. En effet plusieurs sites allergènes ont récemment été mis en évidence dans la structure de la protéine, principalement dans la zone correspondant à la structure en hélice  $\alpha$  (Sélo et al., 1999).

## 1.2 La gomme d'acacia

Un grand nombre de polysaccharides sont utilisés dans l'industrie alimentaire, principalement pour leurs propriétés épaississantes ou stabilisantes, et dans certains cas gélifiantes. Parmi ceux-ci, la gomme d'acacia occupe une place particulière puisqu'elle arbore des propriétés de surface et de stabilisation remarquables (Snowden et al., 1987 ; Ray et al., 1995). Nous allons dans ce chapitre nous intéresser à la composition et à la structure de ce polysaccharide, puis nous décrirons de façon plus détaillée les principales propriétés fonctionnelles que celle-ci lui confère. Nous finirons par discuter du rôle biologique de la gomme d'acacia et quelques-unes de ses utilisations potentielles.

La gomme d'acacia, également appelée gomme arabique, est en fait un polysaccharide complexe de type arabinogalactane. Elle est exsudée par des arbres du genre *Acacia*, principalement localisés dans les pays des régions du Nord-Nord/Est de l'Afrique comme le Soudan, le Sénégal et le Tchad. Deux espèces d'*Acacia* seulement produisent la gomme d'acacia officiellement reconnue comme telle, l'*Acacia senegal* et l'*Acacia seyal* (Dione, 1996 ; Baldwin et al., 1999). L'utilisation de la gomme d'acacia remonte à l'Égypte ancienne. En effet, les Égyptiens en faisaient usage pour enduire les bandelettes utilisées dans les techniques de momification plus de 3000 ans avant J.C. La production annuelle mondiale de

ce polysaccharide est de l'ordre de 60 000 à 100 000 tonnes, en fonction des conditions climatiques, ce qui représente somme toute une faible quantité (Chikamay et al., 1995, 1996). Du fait de ses propriétés interfaciales et nutritionnelles, puisqu'il s'agit d'une fibre alimentaire soluble, la gomme d'acacia est très utilisée dans l'industrie alimentaire (Whistler, 1993 ; Phillips, 1998). De plus, la gomme d'acacia est historiquement le premier polysaccharide qui fut utilisé dans l'étude de la coacervation complexe avec une protéine, en l'occurrence la gélatine (Tiebackx, 1911). Elle est aussi très utilisée dans tous les procédés de microencapsulation par coacervation complexe entre protéine et polysaccharide, ou est utilisée seule comme agent émulsifiant et stabilisant (Vaziri, 1976 ; Snowden et al., 1987 ; Dickinson et al., 1989 ; Dickinson et Galazka, 1991b, c ; Dash, 1997 ; Jayme et al., 1999 ; Trindade et Grosso, 2000).

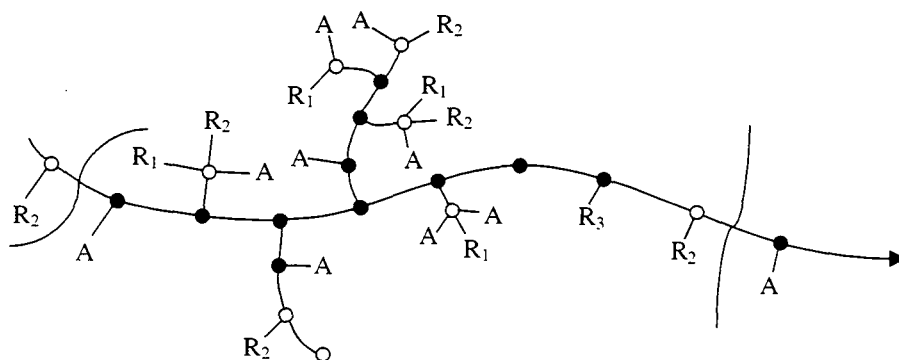
### 1.2.1 Composition chimique de la gomme d'acacia

La gomme d'acacia possède la particularité de n'être pas uniquement composée de résidus glucidiques comme cela est classiquement le cas pour les autres polysaccharides. Elle contient en effet une partie protéique, plus exactement polypeptidique (~ 1600 acides aminés), qui représente environ 2% de la masse totale de la gomme (Anderson et al., 1983). L'hydrolyse acide de la gomme d'acacia par de l'acide sulfurique concentré conduit à la libération de cinq types de résidus glucidiques différents. Le composé majoritairement obtenu est le D-galactose (Gal) qui représente 40% des résidus glucidiques, vient ensuite le L-arabinose (Ara) dont la proportion dans la gomme d'acacia se situe aux alentours de 24%. La présence majoritaire de ces deux sucres font que la gomme d'acacia est qualifiée d'arabinogalactane. Les autres sucres minoritaires composant la gomme d'acacia sont tout d'abord un troisième sucre neutre, le L-rhamnose (Rha), présent à 13%, puis deux acides uroniques, responsable du caractère anionique de la gomme d'acacia, l'acide D-glucuronique (GlcA) présent à 21%, et enfin, l'acide 4-O-méthyl-D-glucuronique que l'on retrouve à de très faibles proportions, environ 2%. Il est important de noter que ces proportions sont des valeurs moyennes et que par conséquent elles peuvent différer en fonction de l'espèce d'*Acacia* considérée. La composition de la fraction peptidique de la gomme d'acacia a été étudiée par chromatographie. Les acides aminés les plus abondants sont l'hydroxyproline (27,4%), la sérine (13,7%), l'acide aspartique (6%) et la thréonine (7,7%). Enfin, la gomme d'acacia est très souvent associée à des ions divalents comme le  $Cr^{2+}$ , le  $Ca^{2+}$  ou le  $Mn^{2+}$ , mais également le  $K^+$  connu pour ses fortes propriétés d'hydratation.

### 1.2.2 Structure de la gomme d'acacia

La structure de la gomme d'acacia est complexe et encore mal connue, si bien qu'elle fait toujours l'objet de recherches intensives. Il semble cependant établi que cette structure particulière soit responsable des propriétés physico-chimiques remarquables de ce polysaccharide. Si, à l'origine, les études ont porté principalement sur la partie polysaccharidique de la gomme, un modèle plus global incluant à la fois les parties peptidiques et polysaccharidiques a été élaboré depuis une quinzaine d'années (Vandeveldt et Fenyo, 1989). Concernant l'enchaînement des résidus glucidiques et la structure des chaînes, le modèle le plus communément admis pour la gomme d'acacia a été proposé par Street et Anderson (1983). Dans cette structure, la chaîne principale est composée de résidus de galactose liés en 1 → 3. Sur cette chaîne principale se trouvent greffées, en position 1 → 6, des chaînes latérales composées d'α - L - arabinofuranose, α - L - rhamnopyranose, β - D - glucuronopyranose et 4 - O - methyl - β - D - glucuronopyranose (Figure 2. 3). Les unités de D - galactose sont liées en 3 ou en 6 avec le L - Rha<sub>p</sub>, L - Ara<sub>p</sub>, GlcA, D - Gal<sub>p</sub> ou

MeGlcA à la périphérie (Figure 2.3). En revanche, le L - arabinofuranose est toujours lié en 1 → 3 à l'intérieur de la chaîne principale tandis que les acides uroniques sont généralement présents en fin de chaîne. Le polysaccharide serait composé de 64 blocs ramifiés d'homogalactanes  $\beta$  (1 → 3) d'une masse moléculaire unitaire de 8000. L'analyse de la composition totale en carbone par RMN  $^{13}\text{C}$  a mis en évidence la présence de 27 pics caractéristiques qui correspondent aux 27 types d'atomes de carbone composant la structure du polysaccharide (Anderson et al., 1991).



**Figure 2.3 :** Structure hypothétique de la gomme d'acacia.

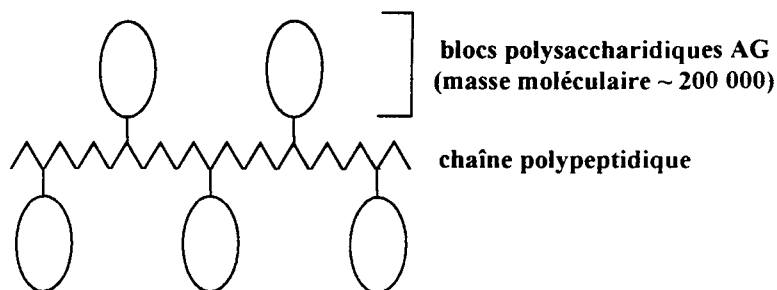
A = arabinosyl ; (●) = Gal<sub>p</sub> 1 → 3 ; (○) = Gal<sub>p</sub> 1 → 6 ou groupement terminal ; R<sub>1</sub> = Rha 1 → 4 GlcA (Rha occasionnellement absent ou remplacé par Me ou Ara<sub>f</sub>) ; R<sub>2</sub> = Gal 1 → 3 Ara ; R<sub>3</sub> = Ara 1 → 3 Ara 1 → 3 Ara 1 → 3 (d'après Stephen et Churms, 1995).

La structure complexe de la gomme d'acacia a par la suite été mise en évidence par le fractionnement d'échantillons de gomme et la mesure de la masse moléculaire des fractions obtenues par chromatographie d'exclusion (Randall et al., 1989). Ces études ont permis d'isoler trois fractions distinctes, présentant des teneurs en protéines et des masses moléculaires très différentes. Ces trois fractions ont été respectivement nommées AG pour la fraction arabinogalactane, AGP pour la fraction arabinogalactane-protéique et GP pour la fraction glycoprotéique.

La fraction AG représente à elle seule 80 à 85% de la masse totale de la gomme, son poids moléculaire est de l'ordre de 200 000 à 300 000. Sa teneur en protéines ne représente que 0,35% du total de la gomme. Il s'agit de la fraction polysaccharidique très ramifiée en blocs compacts. Cette structure explique la faible taille de la fraction AG au regard de sa masse moléculaire, puisque son rayon hydrodynamique varie entre 7 et 10 nm (Idris et al., 1998 ; Picton et al., 2000 ; Sanchez, 2000, résultats non publiés).

La fraction AGP représente moins de 15% de la masse totale de la gomme d'acacia, cependant son poids moléculaire est très élevé, de l'ordre de 1,5 à 2 millions (Duvall et al., 1989). Elle contient 12% de la teneur totale en protéines. Chaque molécule contient plus de 1600 acides aminés qui forment une chaîne polypeptidique à laquelle sont reliés 5 résidus glucidiques ayant une masse de 180 000 - 280 000. Une structure dite « wattle-blossom » a été proposée pour cette fraction (Figure 2.4). Il s'agirait en fait d'un assemblage de blocs polysaccharidiques autour de la chaîne peptidique (Connolly et al., 1988). Le traitement enzymatique par la pronase entraînerait une hydrolyse de la chaîne peptidique reliant ces différents blocs polysaccharidiques pour former la fraction AG. Du fait de cette structure compacte, mais flexible, le rayon hydrodynamique caractérisant la fraction AGP de la gomme

d'acacia se situe aux alentours de 30 nm. Par conséquent, le rayon hydrodynamique moyen de la gomme d'acacia est compris entre 12 et 20 nm lorsque l'on tient compte des fractions AGP et AG (Islam et al., 1997). Il semblerait que la structure polysaccharidique soit liée de manière covalente aux résidus proline et sérine.



**Figure 2.4 :** Représentation schématique du modèle « wattle-blossom » proposé pour la structure de la fraction AGP de la gomme d'acacia (d'après Connolly et al., 1988).

La dernière fraction, GP, composant la gomme d'acacia représente moins de 1% de la masse totale de la gomme d'acacia, elle contient cependant près de 50% de la teneur en protéines. Dans cette fraction, les résidus galactose sont liés à la sérine. Du fait de la faible proportion de cette fraction dans la gomme d'acacia, celle-ci n'a pratiquement pas été caractérisée en ce qui concerne sa taille et sa masse moléculaire.

### 1.2.3 Principales propriétés physico-chimiques de la gomme d'acacia

Les propriétés fonctionnelles de la gomme d'acacia en solution ont fait l'objet d'un nombre important de travaux de recherche. La présence des résidus d'acides uroniques dans la structure de la gomme d'acacia lui confère un potentiel  $\zeta$  négatif dès pH 2 (Vandevelde et Fenyo, 1989 ; Kravtchenko, 1997). La gomme d'acacia possède donc un caractère anionique marqué. Ceci induit des répulsions électrostatiques entre les chaînes chargées tendant à augmenter légèrement le rayon hydrodynamique de la gomme à des pH élevés (Burgess et Carless, 1983). La présence de charges et la structure compacte de la gomme sont à l'origine de sa grande solubilité à froid. Ainsi, des solutions à 40% (p/p) de gomme d'acacia peuvent être obtenues à température ambiante. Ceci n'est généralement pas le cas d'autres polysaccharides possédant des structures plus ramifiées (carraghénanes, gomme caroube) et qu'il est nécessaire de dissoudre à chaud afin d'en diminuer la viscosité (Whistler, 1993). En outre, la viscosité des solutions de gomme d'acacia est très faible comparée à d'autres polysaccharides à des concentrations identiques, toujours du fait de sa structure compacte. L'écoulement des solutions de gomme d'acacia est généralement considéré comme étant newtonien (Anderson et Rahman, 1967 ; Warner et Araujo, 1971 ; Whistler, 1993). Cependant, il est à noter que toutes les études rhéologiques ont été réalisées à de fortes vitesses de cisaillement et que, par conséquent, les propriétés d'écoulement sous faible cisaillement restent à l'heure actuelle mal connues. Des études récentes réalisées à de faibles vitesses de cisaillement devraient encourager de nouvelles investigations puisqu'un caractère légèrement rhéofluidifiant a pu être mis en évidence (Goycoolea et al., 1995 ; Mothé et Rao, 1999).

La structure particulière de la gomme d'acacia lui confère également des propriétés émulsifiantes et stabilisantes remarquables. La présence simultanée des résidus glucidiques



hydrophiles combinée à celle des résidus aminés hydrophobes contribue à l'amphiphilicité de la gomme d'acacia. De plus, la grande flexibilité de sa structure permet aux molécules de se déformer facilement au niveau des interfaces liquide/liquide ou liquide/gaz (Jayme et al., 1999 ; Fauconnier et al., 2000). De ce fait, la gomme d'acacia est largement utilisée en tant qu'agent émulsifiant tant dans le domaine alimentaire que dans le domaine chimique, puisque son utilisation comme stabilisant de peintures ou d'explosifs est courante.

### 1.2.4 Rôle biologique et autres propriétés de la gomme d'acacia

Le rôle physiologique de la production de gomme d'acacia par l'*Acacia senegal* reste encore partiellement ignoré. Cependant, il semble que l'hypothèse la plus plausible réside dans un phénomène de défense de l'arbre contre un stress qui pourrait être d'ordre climatique ou plus couramment dû à des activités anthropiques ou à des blessures occasionnées par des animaux (Joseleau et Ullmann, 1990 ; Servant-Duvallet, 1994).

Les études concernant les effets de la gomme d'acacia sur l'alimentation humaine et sur la physiologie en général font état d'une action bénéfique. Des études toxicologiques ont tout d'abord montré que son ingestion ne présentait aucun risque pour la santé humaine et qu'il était donc possible de l'utiliser comme ingrédient alimentaire (Collins et al., 1987). En effet, outre le fait que la gomme d'acacia soit un polysaccharide, et donc une source potentielle d'énergie pour l'organisme, il s'agit également d'une fibre alimentaire soluble favorisant le transit intestinal (Anderson, 1986 ; Anderson et Eastwood, 1989 ; Assimon et Stein, 1994 ; Phillips, 1998). De plus, il a été montré que la gomme d'acacia possédait des propriétés acariogènes importantes, ce qui explique son utilisation dans un grand nombre de formules de pâtes dentaires (Roberts et Steinke, 1978 ; Gazi, 1990 ; Clark et al., 1993). Plus intéressantes encore pourraient être les récentes découvertes concernant les propriétés physiologiques de la gomme d'acacia qui, en formant des complexes avec les lipides plasmatiques, permettrait de limiter les problèmes de cholestérolémie et les risques de maladies cardiovasculaires (McLean Ross et al., 1983 ; Mee et Gee, 1997 ; Jensen et al., 1997). Pour finir, la gomme d'acacia peut être efficacement utilisée pour lutter contre les problèmes de diarrhées chez les jeunes nourrissons (Wapnir et al., 1996 ; Wapnir et al., 1997).

## 2 Matériels et méthodes de caractérisation des biopolymères

La  $\beta$ -lactoglobuline et la gomme d'acacia utilisées dans le cadre de cette étude ont été préalablement caractérisées par différentes méthodes physico-chimiques afin de vérifier leur degré de pureté et également comparer les données obtenues avec celles de la littérature.

### 2.1 Matériels

La  $\beta$ -lactoglobuline utilisée nous a été gracieusement fournie par le centre de recherche de la société Lactalis (Retiers, France). Il s'agit d'une poudre de  $\beta$ -lg acide (lot n°838) obtenue par traitement du lactosérum acide par précipitation, filtration et dialyse. La gomme d'acacia en poudre (lot 97J716) a été obtenue auprès de la société CNI (Rouen, France). Il s'agit de gomme obtenue par dissolution des sphères d'exsudation, filtration et atomisation.

Afin de minimiser l'apparition de variations dans la composition et les propriétés physico-chimiques des poudres au cours de l'étude, les lots de poudre de  $\beta$ -lg et de gomme d'acacia ont été divisés en échantillons de 2 kg et scellés sous vide dans des sacs plastiques hermétiques. Ces sacs ont ensuite été stockés à 20°C. Un nouveau sac a été utilisé lors de chaque nouvelle étude physico-chimique effectuée sur les macromolécules.

Les réactifs utilisés lors de cette étude étaient de qualité analytique et ont été utilisés tels que reçus par le fournisseur (Prolabo, France).

## 2.2 Méthodes

### 2.2.1 Analyses physico-chimiques et contrôle de la pureté des poudres de $\beta$ -lactoglobuline et de gomme d'acacia

Nous avons dans un premier temps vérifié les compositions et la pureté des poudres de  $\beta$ -lg et de gomme d'acacia.

#### 2.2.1.1 Analyses physico-chimiques

La teneur en protéines des deux poudres a été déterminée par la méthode standard de dosage Kjeldahl (AOAC, 1984). Le calcul de la teneur en protéines à partir de la teneur en azote a été réalisé en multipliant la teneur en azote par un facteur de conversion de 6,38 pour la  $\beta$ -lg et de 6,66 pour la gomme d'acacia. Il faut noter que dans cette conversion, nous n'avons pas tenu compte de la présence d'azote non protéique probablement contenu dans les poudres.

La teneur en polysaccharide a été évaluée par la méthode colorimétrique de Dubois et al. (1956) qui présente l'avantage d'être peu sensible à la présence de protéines. Elle consiste en une hydrolyse acide des polysaccharides par de l'acide sulfurique en présence de phénol. La réaction des sucres libérés avec le phénol conduit à la formation d'un composé orange dont l'absorption est mesurée à 470 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Ultrospec III UV-Visible (Pharmacia, LKB).

L'humidité des poudres a été mesurée par pesée et étuvage à 103°C jusqu'à obtention d'une masse de poudre constante. Le taux de cendres a été obtenu par calcination des poudres dans des creusets de porcelaine placés au four à moufles durant une nuit à 550°C.

Les teneurs en cations ont été déterminées sur les cendres après traitement avec de l'acide chlorhydrique concentré et dilution dans du chlorure de lanthane. L'appareil utilisé était un spectromètre d'absorption atomique AAS 1100 (Perkin-Elmer) alimenté par une flamme air-acétylène ( $C_2H_2$ ). Les gammes étalons étaient constituées de solutions contenant les différents cations à des concentrations croissantes se situant dans le domaine de linéarité concentration/absorbance.

Les chlorures ont été dosés directement sur les poudres en utilisant une méthode potentiométrique basée sur l'oxydo-réduction d'électrodes d'argent en milieu acide (Potentiomètre Subra S100, Grosseron, France). La solution étalon était constituée d'une solution de NaCl à 1 g.l<sup>-1</sup>.

#### 2.2.1.2 Contrôle de la pureté des poudres de $\beta$ -lactoglobuline et de gomme d'acacia

Après avoir caractérisé nos poudres par des analyses physico-chimiques classiques, nous avons vérifié la pureté de celles-ci en ce qui concerne la teneur exacte en  $\beta$ -lg et en gomme d'acacia afin de détecter d'éventuelles contaminations par d'autres protéines ou polysaccharides.

##### 2.2.1.2.1 Chromatographie haute performance en phase inverse de la $\beta$ -lactoglobuline

La pureté de l'échantillon de  $\beta$ -lg a été mise en évidence par chromatographie haute performance en phase inverse. La technique et le protocole utilisés ont été mis au point pour

le dosage en routine des différentes fractions protéiques du lait écrémé (Visser et al., 1991). Le dispositif expérimental se composait d'une colonne Hi-Pore C18 RP de 4,6 mm de diamètre interne et de 250 mm de longueur (Biorad), d'un injecteur Perkin Elmer ISS-100 et de deux pompes de type M6000-A (Waters) fonctionnant en gradient isocratique à une vitesse d'élution de 0,8 ml.min<sup>-1</sup>. L'éluant était composé d'un mélange acétonitrile/eau. La détection a été réalisée à 220 nm à l'aide d'un détecteur Kratos 783. Les solutions protéiques analysées (tampon urée 6M/TFA) avaient une concentration de 0,5% (p/p).

#### 2.2.1.2.2 Spectre RMN C<sup>13</sup> de la gomme d'acacia

La pureté de notre échantillon de gomme d'acacia a été vérifiée par RMN du carbone 13. Une solution de gomme d'acacia à 20% (p/p) a été préparée dans du D<sub>2</sub>O selon la méthode préconisée par Anderson et al. (1991). Cette concentration a été utilisée afin d'obtenir un rapport signal/bruit optimum, ce qui permet également de diminuer le nombre de spectres nécessaires. L'appareil utilisé était un spectromètre haute résolution Bruker AM400 équipé d'une interface informatique Aspect 3000 disponible à la faculté des sciences de Nijmegen (Pays-Bas). Le spectre RMN obtenu résulte de l'accumulation de 16 800 spectres réalisés avec découplage des protons à 100,13 MHz. La séquence de mesure était constituée d'une série d'impulsions à 90° espacées de 2,5 s. La référence externe était constituée par un sel sodique de l'acide (3-(triméthylsilyl)-2, 2, 3, 3, -d4) propionique, la résonance du méthyle se trouvant à un déplacement chimique de 0 ppm.

### 2.2.2 Structure et caractéristiques physico-chimiques des dispersions de β-lactoglobuline et de gomme d'acacia

#### 2.2.2.1 Préparation des dispersions de β-lactoglobuline et de gomme d'acacia

Sur la base des teneurs en protéine et en polysaccharide déterminées précédemment dans les poudres humides, les dispersions utilisées dans cette étude ont été préparées en introduisant dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 g d'eau distillée la quantité de poudre de β-Ig ou de gomme d'acacia nécessaire pour obtenir la concentration désirée en protéine ou en polysaccharide. Les concentrations des dispersions obtenues à 20°C sont donc exprimées en g de protéine ou de polysaccharide pour 100 g d'eau distillée (% p/p). Afin de tenir compte des problèmes d'évaporation lors de la dispersion, les erlenmeyers ont été bouchés entre chaque ajout de poudre. De plus, afin de tenir compte de l'ajustement ultérieur du pH des dispersions, la quantité d'eau initialement présente dans l'erlenmeyer était légèrement inférieure à la quantité requise (4 ml de moins par fraction de 100 ml qui correspondent à la plus grande variation de volume induite par l'ajustement du pH). La dispersion des poudres s'est faite durant au moins deux heures en maintenant une agitation modérée afin d'éviter la formation de bulles d'air pouvant entraîner soit une dénaturation des protéines à l'interface soit une adsorption de la gomme d'acacia à l'interface air/eau. Les dispersions obtenues ont alors été placées à 4°C durant une nuit afin de permettre une parfaite hydratation des macromolécules. Ces dispersions ont ensuite été centrifugées durant 30 min à 3100g afin d'éliminer les bulles d'air et les éventuelles matières insolubles pouvant se trouver dans les poudres.

Les concentrations finales en biopolymères dans les dispersions réalisées au cours de cette étude étaient comprises entre 0,1 et 20%. Les pH ont été ajustés entre 3,6 et 5,0 par addition de HCl ou NaOH 1M, 0,1M ou 0,01M avec une précision de 0,1 unité pH (pHmètre Hanna Instruments 8520, Grosseron SA, Nantes). Il faut noter qu'un traitement particulier a

été appliqué à la dispersion de  $\beta$ -lg afin de préparer une solution exempte de tout agrégat insoluble, mais nous détaillerons cette procédure dans le paragraphe suivant.

### 2.2.2.2 Solubilité des dispersions de $\beta$ -lactoglobuline et de gomme d'acacia

La solubilité de la  $\beta$ -lg a été déterminée à différents pH par la mesure de la quantité d'azote soluble après centrifugation d'une dispersion de  $\beta$ -lg à 1% pendant 30 minutes à 3100 g (FIL, 1995). La teneur en azote présente dans le surnageant après centrifugation a été mesurée par la méthode Kjeldahl et la teneur en protéine calculée comme indiqué dans le paragraphe 3.2.1.1. La solubilité de la  $\beta$ -lg a été définie comme étant le rapport de la quantité de protéines après centrifugation sur la quantité initialement introduite. De la même façon, la solubilité de la gomme d'acacia a été déterminée en utilisant la méthode de Dubois et al. (1956) pour le dosage.

Afin de tester l'influence de la polydispersité de la protéine sur le phénomène de coacervation complexe entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia, une solution exempte d'agrégats (dans les conditions expérimentales de l'étude), appelée BLG, a été préparée de la manière suivante. Le pH d'une solution de  $\beta$ -lg préparée comme précédemment a été ajusté au pH correspondant au minimum de solubilité de la protéine. Cette dispersion a ensuite été centrifugée à 10 000g durant 1 heure afin d'éliminer tous les agrégats initialement présents dans la poudre, et provenant certainement d'une dénaturation partielle de la protéine lors du traitement d'extraction et de purification effectué sur le lactosérum. La concentration en protéine obtenue après ce traitement a été mesurée par la méthode colorimétrique de Bradford (1976) et par mesure de l'absorption des solutions à 278 nm.

**Il est à noter que nous emploierons dans le reste du document le terme BLG pour les dispersions de  $\beta$ -lg ayant subi ce traitement et BLG<sub>agr</sub> pour les dispersions contenant des agrégats.**

La solubilité des macromolécules a également été évaluée par mesure de l'absorbance des dispersions aux différents pH et aux différentes concentrations utilisées pour cette étude. L'absorbance a été mesurée à 650 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible Ultrospec III (Pharmacia LKB). A cette longueur d'onde, la variation d'absorbance est uniquement due à la présence de particules dans les dispersions.

### 2.2.2.3 Mesure de la taille et de la distribution de taille des agrégats de $\beta$ -lactoglobuline

La taille et la distribution de taille des agrégats de  $\beta$ -lg ont été mesurées dans les dispersions de BLG<sub>agr</sub> à pH 4,2 par diffusion statique de la lumière. Le granulomètre utilisé était un Malvern Mastersizer S équipé d'un laser rouge d'une puissance de 5 mW émettant à une longueur d'onde de 632,8 nm. La configuration du système optique se composait d'une cellule d'échantillonnage de 2,4 mm d'épaisseur placée après une lentille convergente ayant une distance focale de 45 mm et référencée 300 RF. L'intensité lumineuse diffusée au travers de l'échantillon est recueillie par des photodiodes placées à différents angles. De plus, la lentille était équipée de capteurs en rétro-diffusion permettant de recueillir des intensités lumineuses diffusées par de très petites particules. En appliquant la théorie mathématique de Mie qui corrèle les intensités diffusées et les angles de diffusion, et en les comparant avec des abaques présentes dans le logiciel de traitement installé sur le granulomètre (Sizer S v2.17, Malvern), il est possible d'obtenir des distributions de taille de particules comprises entre 0,05 et 880  $\mu$ m. Afin de calculer ces distributions de taille, il est nécessaire de connaître l'indice de réfraction des particules que nous avons assimilé à des protéines de lait dans de l'eau ( $n =$

1,529). Le modèle d'analyse des résultats retenu était polydisperse afin de ne faire aucune hypothèse quant à la distribution initiale des particules.

Les concentrations des dispersions  $BLG_{agr}$  étudiées variaient de 0,5 à 5%. Les dispersions concentrées ont été introduites dans le module d'agitation, contenant de l'eau distillée ajustée au même pH et connecté à la cellule d'échantillonnage, à une vitesse de 1000 tours par minute (tpm), vitesse minimale permettant une bonne circulation de la dispersion. La quantité de dispersion introduite a été déterminée sur la base d'une diminution de l'intensité initiale du laser de 15%, valeur pour laquelle la contribution de la diffusion multiple de la lumière peut être négligée.

#### 2.2.2.4 Mesure de la masse moléculaire de la $\beta$ -lactoglobuline et de la gomme d'acacia

Les masses moléculaires de la  $\beta$ -lg et de la gomme d'acacia ont été déterminées aux pH des dispersions initiales et à pH 4,2 en utilisant la chromatographie d'exclusion. La colonne utilisée était une Shodex KW 802.5 (Showa Denko, Allemagne) constituée de silice fondue, de diamètre interne 7,8 mm et de 300 mm de longueur, précédée d'une pré-colonne Shodex KW-G. Le système de chromatographie était constitué d'une pompe isocratique Waters HPLC 510 couplée à un échantillonneur automatique Waters 717+. La détection à 280 nm (protéine et polysaccharide) et 214 nm (polysaccharide) était assurée par un détecteur Waters 996 constitué de photodiodes. La calibration de la colonne a été réalisée avant chaque injection des solutions de  $\beta$ -lg et de gomme d'acacia en utilisant les marqueurs moléculaires suivants (ICN Biomedicals, USA) : bacitracine ( $1450 \text{ g.mol}^{-1}$ ), cytochrome C ( $13\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), myoglobine ( $18\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), chymotrypsinogène ( $24\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), ovalbumine ( $45\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), albumine de sérum bovin ( $67\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ),  $\gamma$ -globuline ( $160\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) et apoferritine ( $480\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). L'échantillon était constitué de 100  $\mu\text{l}$  d'une dispersion de biopolymère à 0,5% ayant été préalablement filtré sur des filtres de 0,2  $\mu\text{m}$  (Lida Manufacturing, USA). La température a été maintenue à  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Le tampon d'élution était constitué d'une solution de NaCl à 30 mM afin de limiter les interactions électrostatiques entre les protéines et la colonne et permettre ainsi une séparation des molécules par leur masse moléculaire. La vitesse d'élution a été maintenue constante à  $1 \text{ ml.min}^{-1}$ . Les pH initiaux des dispersions étaient de 3,18 pour la dispersion de  $BLG_{agr}$  et de 5,18 pour la dispersion de gomme d'acacia.

#### 2.2.2.5 Détermination des rayons hydrodynamiques de la $\beta$ -lactoglobuline et de la gomme d'acacia

Afin de comparer les valeurs des rayons hydrodynamiques ( $R_h$ ) des molécules utilisées dans notre étude, nous avons utilisé la technique de diffusion dynamique de la lumière (DDL) en solution diluée. Le principe de cette technique réside dans l'interprétation des variations d'intensité de la lumière diffusée lors de son interaction avec les molécules, elles-mêmes soumises au mouvement Brownien (Berne et Pecora, 1976). L'équipement de mesure disponible au Laboratoire de Physico-Chimie des Macromolécules de l'INRA de Nantes était constitué d'un corrélateur multi-tau, multi-bit de type ALV-5000 combiné à un goniomètre 4700 Malvern et un laser Spectra-Physics d'une puissance variable de 1W émettant une lumière polarisée verticalement à 514,5 nm. La température de mesure a été maintenue à  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Les fonctions d'autocorrélation,  $g_2(t)$ , relatant la variation d'intensité diffusée au cours du temps, ont été enregistrées à quatre angles d'observation, 30, 45, 90 et  $150^\circ$ . Ces fonctions d'autocorrélation ont ensuite été analysées en utilisant le traitement mathématique d'inversion de Laplace REPES développé par Teplov et al. (1993). De cette façon, il est possible d'obtenir la distribution des temps de relaxation des particules dans les solutions (d'autant plus grand

que la particule est de grande dimension), puis celle des coefficients de diffusion des particules. En utilisant la formule de Stokes-Einstein (Eq. 2.1), les distributions des rayons hydrodynamiques ont été obtenues :

$$R_h = k_B T / 6\pi \eta D \quad (2.1)$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion des particules dans le solvant,  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température absolue (en K) et  $\eta$  la viscosité du solvant (en Pa.s).

La technique de diffusion quasi-élastique de la lumière nécessitant des solutions limpides, afin d'éviter la diffusion multiple de la lumière, seules les dispersions à 1% de BLG et de gomme d'acacia à pH 4,2 ont été étudiées. Au préalable, la dispersion de BLG a été filtrée sur des filtres de 0,02  $\mu\text{m}$ , des filtres de 0,1  $\mu\text{m}$  étant utilisés pour la dispersion de gomme d'acacia (Anotop, Alltech, France). Enfin, afin de vérifier la nature polyélectrolytique de la gomme d'acacia, des mesures en condition d'écrantage dans une solution de 0,1M de NaCl ont été réalisées.

#### 2.2.2.6 Détermination de la mobilité électrophorétique des dispersions de $\beta$ -lg et de gomme d'acacia

La nature polyélectrolytique des macromolécules utilisées dans cette étude entraîne la formation d'une double couche ionique autour de celles-ci, mais également une structuration des molécules de solvant à leur voisinage (Hunter, 1986). Il est alors possible d'estimer les interactions macromolécule-macromolécule et macromolécule-solvant par le biais de la mesure de la mobilité électrophorétique des particules en solution (Douglas et al., 1995). Les mesures ont été réalisées sur les dispersions de BLG, BLG<sub>agr</sub> et de gomme d'acacia ainsi que sur les agrégats de la dispersion BLG<sub>agr</sub> récupérés après centrifugation. La concentration des dispersions était de 0,1% et la gamme de pH variait de 3,6 à 5,0.

Le système de mesure disponible au Laboratoire Environnement Minéralurgie de l'INPL était constitué d'un appareil de type Zétaphorémètre II équipé d'une caméra CCD de type Oscar OS-45D (Sephy Technology, France). Le principe de la mesure consiste à injecter la dispersion dans une cellule de mesure en quartz contenant deux électrodes de cuivre et placée sous l'objectif d'un microscope optique. Les particules sont alors illuminées par un laser rouge de 632,8 nm de longueur d'onde (puissance : 5 mW). Les « spots » de diffusion de chaque particule sont alors visualisés par la caméra CCD montée sur le microscope optique. Un courant alternatif de 100V est alors appliqué durant 5 fois 1 seconde dans chaque direction. La trajectoire des particules et la distance parcourue sont ensuite calculées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Image Analysis 1.9, Sephy Technology, France). La mobilité électrophorétique est calculée en appliquant la théorie de von Smoluchowski modifiée par Henry (Hunter, 1986) selon l'équation 2.2 :

$$v = \mu_E \times E \quad (2.2)$$

où  $v$  est la vitesse des particules ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $E$  le champ électrique appliqué par unité de longueur ( $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et  $\mu_E$  la mobilité électrophorétique ( $\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}$  que nous abrègerons par u.m.e : unité de mesure électrophorétique dans la suite du texte). La conductivité de la cellule de mesure a été étalonnée à l'aide d'une solution de KCl 1M et la température maintenue constante à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Afin de tenir compte de l'effet électro-osmotique résultant de la polarisation des atomes de quartz de la cellule de mesure lors de l'application du champ électrique, la position des plans stationnaires de la cellule de mesure a été déterminée en utilisant une solution d'oxyde de titane dans KCl 0,1M. Cette solution nous a également

permis de tester la répétabilité des mesures puisque la  $\mu_E$  de cette solution est de l'ordre de  $-1,99 \pm 0,03$  u.m.e.

### 3 Résultats et discussion

#### 3.1 Analyses physico-chimiques et pureté des macromolécules

La caractérisation physico-chimique et la vérification de la pureté des poudres nous a permis de comparer les propriétés de nos échantillons avec celles que l'on peut trouver dans la littérature.

**Tableau 2.1** : Analyses physico-chimiques des poudres de  $\beta$ -lg et de gomme d'acacia (en g/100 g de poudre).

	Humidité	Protéine	Polysaccharide	Lactose	Cendres
$\beta$ -lactoglobuline	4,75	91	/	3,85	0,40
gomme d'acacia	6,65	0,3	89,95*	/	3,10

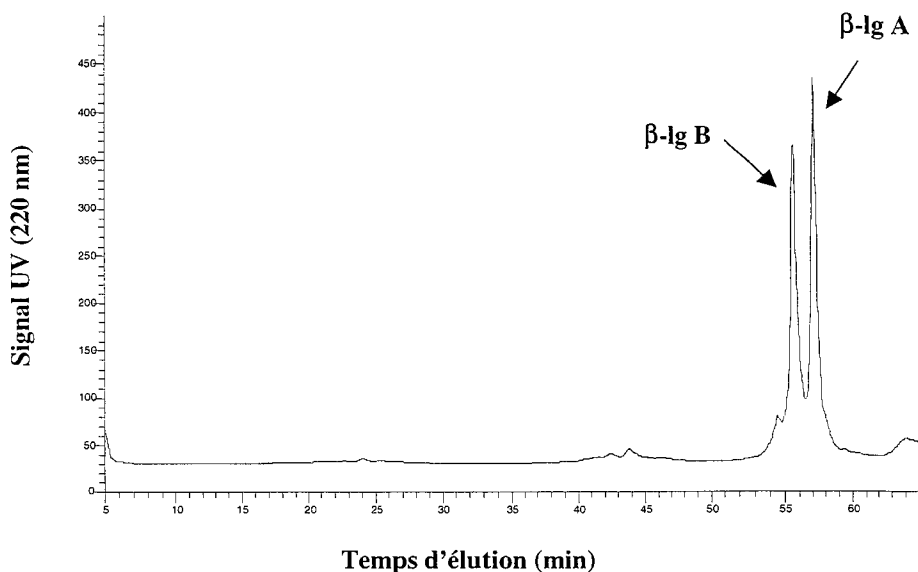
\*: dont 15% d'acide glucuronique et 58% de sucres neutres (rhamnose, arabinose, galactose).

Concernant la gomme d'acacia, les compositions présentées dans le tableau 2.1 sont en accord avec celles qui ont été rapportées par des études antérieures, mais également celles que l'on retrouve dans la caractérisation de l'échantillon officiel de gomme d'acacia reconnu par l'Union Européenne, UE, et le Comité conjoint de la FAO pour les additifs alimentaires, JECFA (Anderson et al., 1991). On pourra noter en particulier la présence d'une faible teneur en protéine, la présence de 15% de résidus d'acide glucuronique mais également la teneur élevée en minéraux qui se trouvent en partie complexés avec la gomme. Pour l'échantillon de poudre de  $\beta$ -lactoglobuline, on pourra noter la teneur élevée en protéine, la présence de lactose puisqu'il est issu de lactosérum, mais également la présence d'une teneur élevée en chlorures car il s'agit de lactosérum de fromagerie (Tableau 2.2).

**Tableau 2.2** : Composition minérale des deux échantillons de poudre (en g/100 g poudre).

	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
$\beta$ -lactoglobuline	0,0008	0,012	0,027	0,008	2
gomme d'acacia	0,2	0,61	0,032	0,9	/

L'analyse de la pureté des deux macromolécules fait état pour la  $\beta$ -lactoglobuline de la présence de quelques traces de contamination par de l' $\alpha$ -lactalbumine qu'il est toujours difficile d'éliminer totalement, principalement du fait de sa masse moléculaire très proche de celle de la  $\beta$ -lactoglobuline. L'analyse RP-HPLC de notre échantillon révèle également la présence en proportions voisines des deux variants A et B de la protéine (Fig. 2.5). Des résultats très similaires ont été obtenus par Renard et al. (1999) sur un échantillon de poudre de  $\beta$ -lg obtenu par le même mode de traitement auprès du même fournisseur, ce qui tant à prouver la fiabilité du procédé d'obtention.



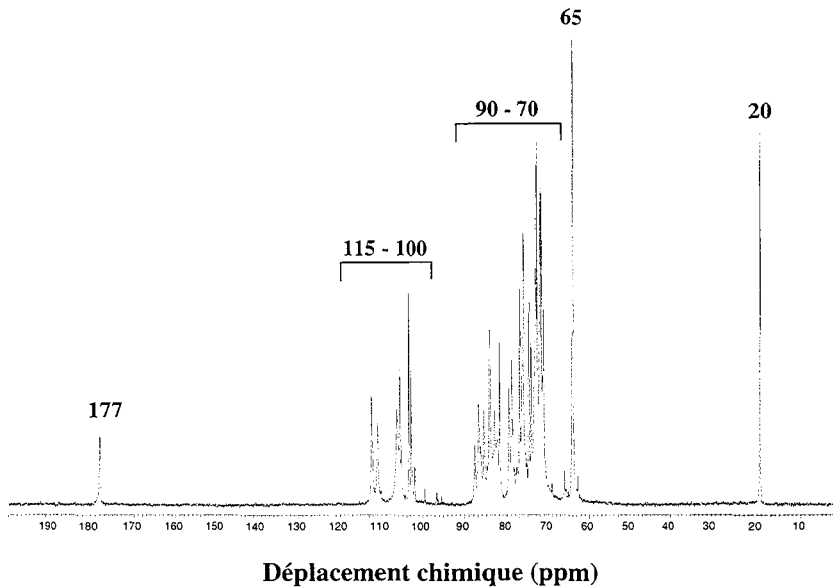
**Figure 2.5 :** Profil de chromatographie haute performance en phase inverse obtenu pour la poudre de  $\beta$ -lactoglobuline (Lactalis lot 838) à 30°C pour une concentration totale de 0,5%.

L'analyse de la pureté de la gomme d'acacia a été vérifiée par l'obtention d'un spectre de spectroscopie RMN du  $C^{13}$  très proche de celui obtenu par Anderson et al. (1991) lors de la caractérisation de l'échantillon standard de gomme d'acacia (Figure 2.6). Les différents pics obtenus correspondent respectivement aux déplacements chimiques des carbones décrits dans l'étude de Servant-Duvallet (1994), à savoir :

- 177 ppm : résonance du groupement carbonyle porté en  $C_6$  par les acides uroniques.
- 115 – 100 ppm : résonance des groupements – CH placés en  $C_1$ .
- 90 – 70 ppm : résonance des groupements – CH des carbones placés en position  $C_2$  et  $C_5$  dans les cycles des hexoses.
- 65 ppm : résonance des groupements –  $CH_2$  des carbones  $C_6$  des hexoses.
- 20 ppm : résonance du groupement  $CH_3$  contenu dans les résidus de rhamnose.

Des résultats similaires ont été obtenus par RMN  $C^{13}$  à 25 ou 50 MHz, ainsi que par l'étude des temps de relaxation  $T_1$  des atomes de carbone (Defaye et Wong, 1986 ; Williams et al., 1990). Ces mesures ont d'ailleurs permis de confirmer la composition des résidus formant le squelette hydrocarboné de la gomme d'acacia. Il est également intéressant de noter l'excellent rapport signal sur bruit obtenu dans le cadre de cette mesure du fait de la concentration en gomme d'acacia (20%) ayant été utilisée.

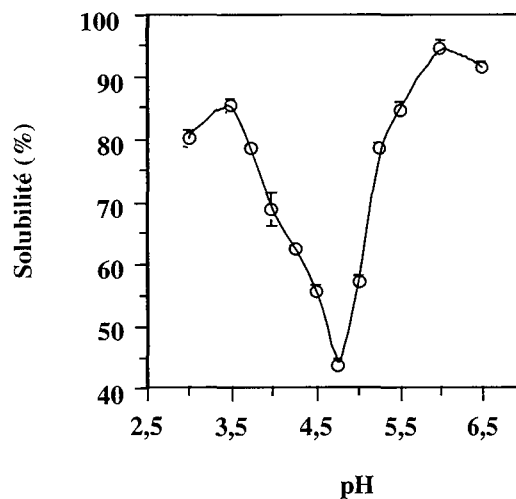




**Figure 2.6 :** Spectre RMN  $C^{13}$  obtenu à 100,13 MHz pour une solution de gomme d'acacia à 20% et 25°C dans  $D_2O$ .

### 3.2 Solubilité des macromolécules

Les mesures de solubilité de la gomme d'acacia obtenues par dosage selon la méthode de Dubois ont montré que celle-ci est proche de 100% sur toute la gamme des pH testés (résultats non montrés). Ceci est en accord avec les études précédemment menées sur ce polysaccharide et montre donc bien que la structure particulière de la gomme d'acacia lui confère une grande solubilité à froid (Phillips et al., 1996).



**Figure 2.7 :** Solubilité d'une dispersion de  $BLG_{agr}$  à 1% en fonction du pH à 20°C.

Si l'on considère l'évolution de la solubilité de la  $\beta$ -lg en fonction du pH, on observe que celle-ci est d'environ 83% au pH initial des dispersions, soit environ 3,2 (Figure 2.7). Ceci indique clairement que notre échantillon de poudre contient initialement 17% de  $\beta$ -lg insoluble. Nous expliquons cette insolubilité par le procédé d'obtention de la  $\beta$ -lg, qui a subi un traitement thermique lors de la pasteurisation du lait destiné à la production fromagère avant la précipitation acide des caséines. Ce traitement conduit à une dénaturation thermique totale ou partielle d'une fraction des protéines natives, diminuant alors leur solubilité (Cayot et Lorient, 1998). Si l'on poursuit l'étude de la variation de la solubilité, il est à noter qu'un minimum de 43,7% est obtenu à pH 4,75 (Figure 2.7). En considérant les résultats obtenus au pH initial, on peut donc conclure qu'une fraction des 83% de  $\beta$ -lg soluble à pH 3,2 ne l'est plus à pH 4,75, ce qui correspond à 39,2% de la  $\beta$ -lg. En raisonnant sur l'état de dénaturation de la  $\beta$ -lg après son traitement thermique, nous pouvons raisonnablement estimer que, dans les conditions de centrifugation retenues pour notre étude, la  $\beta$ -lg se trouve initialement présente sous forme de trois fractions distinctes (Sanchez et al., 1997) :

- une première fraction de  $\beta$ -lg que nous qualifierons de native (notée PNS pour protéine native soluble), principalement constituée de monomères et de dimères.
- une deuxième fraction de  $\beta$ -lg partiellement dénaturée, se trouvant sous forme d'intermédiaires réactifs que nous qualifierons d'agrégats solubles (notée PAS pour protéine agrégée soluble). La taille de ces espèces est de l'ordre de la dizaine ou de la centaine de nm et leur solubilité diminue lorsque l'on se rapproche du point isoélectrique des protéines, où les interactions protéine-protéine sont favorisées. La capacité d'association de la  $\beta$ -lg dans cette gamme de pH a récemment été mise en évidence par diffusion des neutrons aux petits angles (Verheul et al., 1999). En effet, le suivi du ratio entre la masse moléculaire des oligomères et celle du monomère a montré une augmentation de 1 à plus de 4 dans des conditions de pH de 4,7 et 0,1M de NaCl. Très récemment, van Dijk et Smit (2000) ont confirmé ces observations en étudiant la stabilité de dispersions de  $\beta$ -lg à 2,5% et pH 5,2. Des espèces agrégées (jusqu'à des octamères) de protéines ont en effet été mises en évidence par chromatographie d'exclusion. Il faut noter que la quantité de protéine formant la fraction PAS dépend donc de la valeur du pH et devient minimale à pH 4,75, où l'on peut considérer que la totalité des protéines solubles se trouve sous forme native (de Wit et al., 1988).
- une troisième fraction, constituée de la protéine insoluble initialement mais également de la fraction PAS qui s'insolubilise lorsque le pH s'approche de 4,75. Elle est majoritairement constituée d'agrégats insolubles de  $\beta$ -lg caractérisés par une taille de plusieurs microns. Nous la noterons PAI en référence à une fraction de protéine agrégée insoluble.

Dans ces conditions, la dispersion de BLG précédemment définie sera essentiellement constituée de la fraction PNS (sans exclure la présence de quelques agrégats solubles n'ayant pas été éliminés par la centrifugation) alors que la dispersion BLG<sub>agr</sub> sera principalement constituée des deux autres fractions, en plus de la fraction PNS.

Les pourcentages de  $\beta$ -lg composant ces différentes fractions aux différents pH sont présentés dans le tableau 2.3. Il est ici très intéressant de noter que nos valeurs de solubilité sont très proches de celles obtenues pour des poudres de concentrés de protéines de lactosérum préparées selon un procédé identique à notre échantillon de  $\beta$ -lg (précipitation acide puis diafiltration). En effet, de Wit et al. (1988) ont mis en évidence un minimum de solubilité de 42% à pH 4,6, ce qui correspond à un pourcentage de protéines dénaturées de

56% déterminé par AED, valeur très proche des 56,3% que nous obtenons à pH 4,75. Dans une autre étude, de Wit et van Kessel (1996) ont également mis en évidence un minimum de solubilité de 45% à pH 4,7 pour un isolat de  $\beta$ -lg, du fait de la favorisation des interactions entre les différentes espèces protéiques dénaturées.

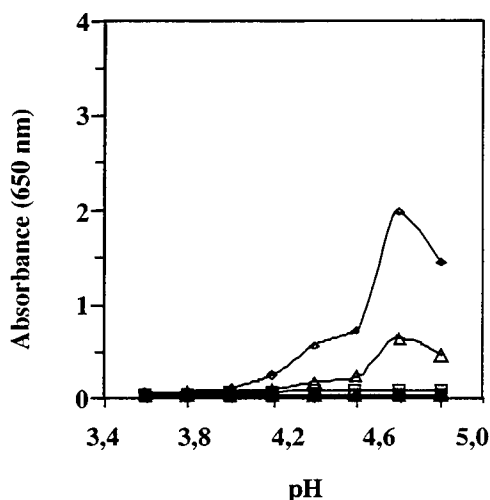
**Tableau 2.3** : Contribution des différentes fractions protéiques à la solubilité à 20°C d'une dispersion de  $\beta$ -lg à 1% en fonction du pH.

pH	PNS (%)	PAS (%)	PAI (%)
3.2	43.7	39.2	17.1
3.75	43.7	34.8	21.5
4.0	43.7	25.0	31.3
4.25	43.7	18.7	37.6
4.50	43.7	12	44.3
4.75	43.7	traces	56.3
5.0	43.7	13.6	42.7

PNS : protéine native soluble ; PAS : protéine agrégée soluble ; PAI : protéine agrégée insoluble.

Lorsque l'on considère l'évolution de l'absorbance à 650 nm des dispersions de gomme d'acacia et de  $\beta$ -lg, les résultats obtenus confirment les hypothèses formulées lors de l'étude de la solubilité des macromolécules. En effet, quelle que soit sa concentration, la gomme d'acacia n'affecte pas l'absorbance mesurée à 650 nm, ce qui confirme sa bonne solubilité et probablement l'absence de particules de grande taille (Figure 2.8).

Des résultats similaires ont été obtenus avec la dispersion de BLG. En effet l'absorbance à 650 nm atteint un maximum de 0,025 pour des pH proches de 4,8 – 5,0 pour une concentration totale de 4,5% (résultats non montrés). Ceci indique que les espèces protéiques présentes dans la dispersion BLG ont une taille largement inférieure à 650 nm. Ce résultat est en accord avec les résultats de solubilité puisque la fraction PNS de la  $\beta$ -lg est *a priori* caractérisée par la présence de monomères et de dimères. Si l'on considère la variation de l'absorbance en fonction du pH pour la dispersion BLG<sub>agr</sub>, il est intéressant de noter que l'allure de la courbe est inversée par rapport à celle obtenue pour la courbe de solubilité de ce même type de dispersion (Figures 2.7 et 2.8). La conséquence logique de cette observation est donc de penser que la variation de l'absorbance est corrélée avec la diminution de la solubilité de la  $\beta$ -lg. Cette hypothèse paraît la plus probable si l'on considère que la dispersion de BLG<sub>agr</sub> contient les trois fractions protéiques précédemment décrites. Lorsque l'on augmente le pH, la contribution de la fraction PAI augmente donc, puisque dans le même temps, celle de la fraction PNS reste constante (Tableau 2.3). La diminution de la charge portée par les espèces protéiques partiellement ou totalement dénaturées permet alors l'établissement de nouvelles liaisons entre les molécules (hydrogènes, hydrophobes) et la formation d'oligomères de  $\beta$ -lg ou d'agrégats de moins en moins solubles. La formation de telles structures agrégées présentant des tailles de plusieurs microns est certainement la cause des variations d'absorbance mesurée (Stading et Hermansson, 1990). Un autre résultat intéressant repose dans la proportionnalité entre la variation d'absorbance à 650 nm au voisinage de pH 4,7 et l'augmentation de la concentration totale en biopolymère, ceci du fait de l'application de la loi d'action de masse en vertu de laquelle l'augmentation du nombre de molécules présentes initialement dans la dispersion augmente la probabilité que celles-ci interagissent.



**Figure 2.8 :** Evolution de l'absorbance à 650 nm de dispersions de BLG<sub>agr</sub> et de gomme d'acacia en fonction du pH et à 20°C. BLG<sub>agr</sub> : (○) 0,1%, (□) 0,5%, (△) 1% et (◇) 5%; Gomme d'acacia : (●) 0,1%, (■) 0,5%, (▲) 1% et (◆) 5%.

Ces premières mesures de caractérisation de la solubilité des macromolécules ont mis en évidence la nécessité de faire subir un traitement d'élimination des agrégats de  $\beta$ -lg afin d'obtenir une dispersion ne contenant majoritairement que des espèces natives de  $\beta$ -lg. Nous avons donc choisi de faire subir un traitement de centrifugation d'une heure à 10 000g à pH 4,75 à notre dispersion initiale de  $\beta$ -lg contenant des agrégats.

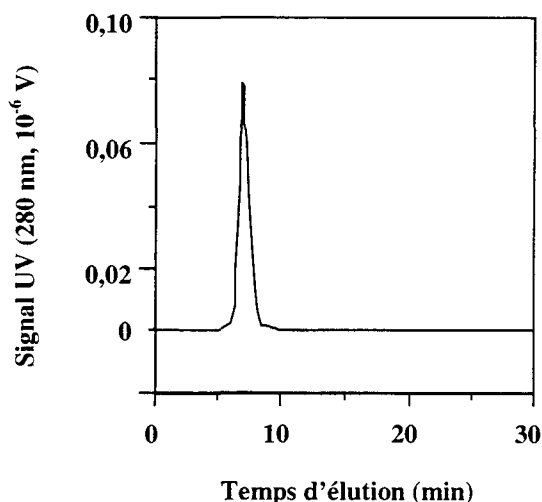
### 3.3 Caractérisation des différentes dispersions obtenues : détermination des masses moléculaires, rayons hydrodynamiques et diamètre des agrégats protéiques

Les masses moléculaires des macromolécules ont été déterminées dans les dispersions à 0,5% de BLG, BLG<sub>agr</sub> et gomme d'acacia aux pH initiaux, c'est à dire 3,18 pour la BLG et 5,18 pour la gomme d'acacia. Ces masses ont ensuite été déterminées à pH 4,2, qui sera notre pH de référence dans le reste de cette étude, puisqu'une étude préliminaire a montré qu'il était favorable à la coacervation entre les deux macromolécules. De même, les rayons hydrodynamiques de la gomme d'acacia et de la BLG, ainsi que la distribution de taille des agrégats (fractions PAS et PAI) de  $\beta$ -lg ont été déterminés à pH 4,2.

#### 3.3.1 Gomme d'acacia

L'élution de la dispersion de gomme d'acacia aux deux pH testés a permis de mettre en évidence la présence d'un seul pic à un temps d'élution correspondant à une masse moléculaire de 180 000 g.mol<sup>-1</sup> (Figure 2.9 ; Tableau 2.4). Afin de vérifier si ce résultat correspond bien à la détection d'une fraction de gomme d'acacia, nous avons également procédé à une détection à une longueur d'onde de 214 nm qui est plus spécifique des sucres. Le même résultat a été obtenu, faisant état de la présence majoritaire de cette espèce moléculaire dans notre échantillon. Ce résultat est en accord avec les valeurs déterminées par Duvallet et al. (1989) ou Randall et al. (1989). Cependant si l'on considère que la gomme d'acacia est constituée de plusieurs fractions, et donc polydisperse, ce résultat nécessite quelques commentaires.

Comme nous l'avons précisé dans la partie bibliographique concernant la gomme d'acacia, sa polydispersité rend difficile la détermination exacte de sa masse moléculaire, comme cela a été récemment mis en évidence par une étude de Idris et al. (1998). Ces auteurs ont mis en évidence 3 fractions ayant des masses moléculaires de  $4 \times 10^6$ ,  $1,5$  à  $3 \times 10^5$  et  $1,8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ . De plus, l'intensité du signal obtenu à 280 nm fait état d'une teneur élevée en protéines dans les fractions 1 et 3. Compte tenu de ces informations il semble que notre échantillon soit principalement composé de la fraction 3, qui se trouverait être la fraction AG de la gomme d'acacia. Ce résultat a été confirmé récemment par l'utilisation de la chromatographie d'exclusion couplée à de la diffusion de la lumière qui a mis en évidence la présence majoritaire (80%) d'une fraction ayant une masse moléculaire de  $200\,000 \text{ g.mol}^{-1}$  (Sanchez, 2000, résultats non publiés).



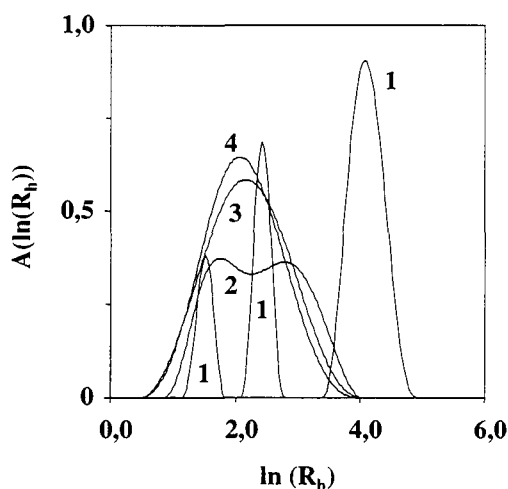
**Figure 2.9 :** Profil d'élution en chromatographie d'exclusion d'une dispersion de gomme d'acacia à 0,5% à pH 5,18 et 20°C.

Ces résultats obtenus par chromatographie d'exclusion méritent également un commentaire quant aux limitations de notre méthode pour la détermination de la masse moléculaire de la gomme d'acacia. En effet, si notre échantillon peut à première vue sembler monodisperse en masse moléculaire, il faut signaler que la masse moléculaire des 20% de gomme d'acacia restants n'a pu être déterminée. Comme nous l'avons décrit dans la partie bibliographique (chap. 2, § 2.2), ces 20% constituent majoritairement la fraction AGP de la gomme d'acacia qui est caractérisée par une masse moléculaire de l'ordre de 1,5 à 2 millions. L'absence de cette fraction sur nos profils d'élution, et ceci même dans le volume mort de la colonne, s'explique d'une part par la limite d'exclusion de notre colonne qui se trouve être de 250 000 mais également par la présence d'une pré-colonne ayant pour but d'empêcher le passage des molécules ayant des masses moléculaires trop importantes, risquant de provoquer un colmatage de la colonne. Aussi, il faudra considérer la polydispersité de notre échantillon de gomme d'acacia dans l'interprétation des résultats obtenus par les autres techniques que nous avons mises en œuvre.

**Tableau 2.4** : Détermination des masses moléculaires dans les dispersions BLG<sub>agr</sub> et AG par chromatographie d'exclusion à 20°C.

Biopolymère(s)	pH	Masse moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Aire du pic (x 10 <sup>-6</sup> μV.s)
β-lactoglobuline	3,18	17 500 ± 1200	0.91
		36 100 ± 1500	14.1
		60 500 ± 1700	0.72
		85 000 ± 2000	0.04
	4,20	19 500 ± 1200	4.1
		38 400 ± 1500	8.9
		55 000 ± 1600	1.7
		73 500 ± 2000	0.4
Gomme d'acacia	5,18	181 000 ± 15 000	4.0
	4,20	179 400 ± 15 000	3.9

Le rayon hydrodynamique de la gomme d'acacia a été déterminé à pH 4,2 par DDL sur une dispersion à 1%. Plusieurs angles de détection (30, 45, 90 et 150°) ont mis en évidence une valeur moyenne de 13 nm (Figure 2.10).



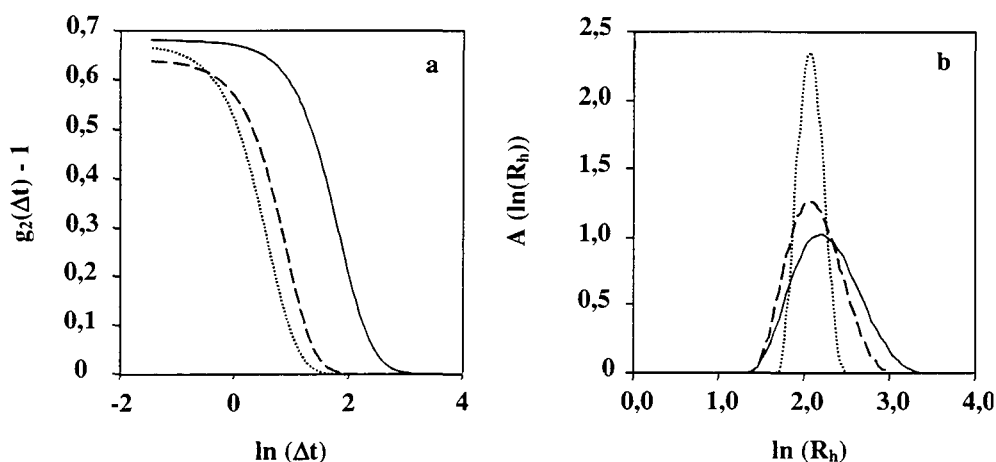
**Figure 2.10** : Distributions des rayons hydrodynamiques d'une dispersion de gomme d'acacia à 1% dans l'eau à pH 4,2 et une température de 20°C. Angles d'observation : (1) 30° ; (2) 45° ; (3) 90° ; (4) 150°.

Cependant, il faut remarquer ici que les plus petits angles de détection (en particulier à 30°) laissent entrevoir la présence d'une fraction ayant un  $R_h$  de l'ordre de plus de 30 nm, comme cela a été récemment mis en évidence par Picton et al. (2000). Même si le traitement de la fonction de corrélation obtenue à 30° laissant apparaître trois pics peut prêter à caution,

le traitement des deux pics ayant les intensités les plus élevées conduit à l'obtention de  $R_h$  de 23 nm et 208 nm respectivement. Si la première valeur est proche de celle de la fraction AGP de la gomme d'acacia, il paraît indiscutable que la seconde appartient à une fraction de la gomme d'acacia se trouvant sous forme agrégée en solution aqueuse. Une taille de 200 nm a d'ailleurs été mesurée par microscopie électronique pour un même type d'arabinogalactane en solution (Baldwin et al., 1993). Les valeurs déterminées aux autres angles sont du même ordre de grandeur que celles proposées précédemment en utilisant la même technique expérimentale, à savoir 10 nm pour Swenson et al. (1968) et 10 à 40 nm pour le rayon de giration (Acharya et Chattoraj, 1975). Plus récemment des valeurs comprises entre 10 et 21 nm ont été rapportées lors d'une étude concernant des échantillons de gomme de huit provenances différentes (Idris et al., 1998). Il s'agit alors de la valeur moyenne tenant compte du  $R_h$  des fractions AGP et AG de la gomme d'acacia.

Afin de vérifier l'influence de la nature polyélectrolytique sur l'expansion des chaînes latérales de la gomme d'acacia, nous avons réalisé la même expérience de DDL mais en solution saline (NaCl 0,1M). Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure 2.11 qui présente les fonctions d'autocorrélation correspondantes aux trois angles de diffusion testés (a) ainsi que les distributions des  $R_h$  correspondants (b).

On remarque tout d'abord que la décroissance des fonctions d'autocorrélation n'est pas identique en fonction de l'angle d'observation, ce qui prouve que la distribution des rayons hydrodynamiques diffère. En particulier, à 30°, le temps de décorrélation ( $\Delta t$ ) est beaucoup plus long ce qui implique une taille de particules observées plus grande. Cette différence a tendance à s'estomper lorsque l'angle d'observation augmente, ce qui s'explique par la diffusion de la lumière par des particules ayant des tailles plus petites, et donc des temps de relaxation plus courts.



**Figure 2.11 :** Fonctions d'autocorrélation (a) et distributions des rayons hydrodynamiques (b) d'une dispersion de gomme d'acacia à 1% dans NaCl 0,1M à pH 4,2 et 20°C. Angles d'observation : (—) 30°, (-·-) 90°, (.....) 150°.

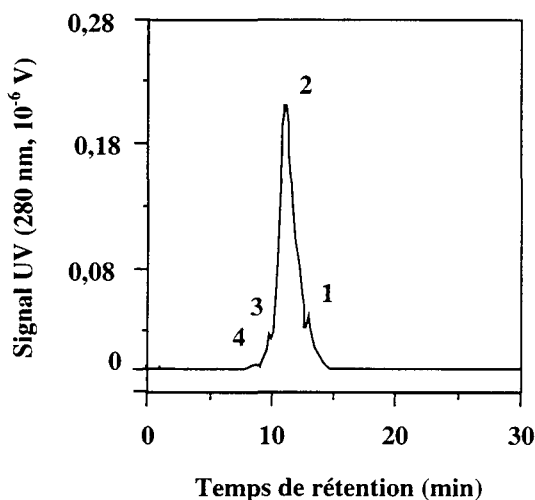
Les valeurs de  $R_h$  déterminées dans NaCl 0,1M sont de 12 nm à 90 et 150° et 16 nm à 30°, ce qui est très proche de la valeur déterminée dans l'eau. Un résultat similaire a été obtenu par Servant-Duvallet (1994) pour de la gomme native et de la gomme modifiée chimiquement. La structure compacte de la gomme d'acacia est donc confirmée, puisqu'en conditions d'écrantage par des sels son rayon hydrodynamique ne se trouve pratiquement pas

modifié par rapport au  $R_h$  mesuré dans l'eau. Un autre résultat intéressant obtenu en conditions salines est la disparition du pic obtenu en solution aqueuse et correspondant à un  $R_h$  de 208 nm. Il semblerait donc qu'il soit possible de limiter la formation d'agrégats de gomme d'acacia par ajout de sel dans la solution. Ceci implique également que la nature des liaisons entre les molécules de gomme d'acacia formant les agrégats soit essentiellement électrostatique.

### 3.3.2 $\beta$ -lactoglobuline

Si l'on s'intéresse à la distribution des masses moléculaires de la  $\beta$ -lactoglobuline dans les dispersions de  $BLG_{agr}$ , la chromatographie d'exclusion réalisée au pH initial a mis en évidence la présence de quatre pics (Figure 2.12). Si l'on divise les masses moléculaires correspondantes à ces quatre temps de rétention par la masse moléculaire du monomère de  $\beta$ -lg ( $18\,400\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), les quatre espèces retrouvées correspondent respectivement aux formes monomérique, dimérique, trimérique et tétramérique de la protéine (Tableau 2.4).

Il est intéressant de noter que l'intensité du pic correspondant au dimère de  $\beta$ -lg est de très loin la plus importante, cette espèce étant donc la plus représentée à pH acide (3,18), comme cela a déjà été mis en évidence par d'autres auteurs (Renard, 1994 ; Gimel et al., 1994). Après ajustement du pH à 4,2, le nombre de pics obtenus dans la dispersion de  $BLG_{agr}$  augmente (Tableau 2.3). Il y a apparition d'autres oligomères de  $\beta$ -lg, en particulier des pentamères et des octamères. Il est cependant nécessaire de relativiser la contribution de ces espèces agrégées de  $\beta$ -lg, la majeure partie des espèces étant constituée de protéine sous forme dimérique (57%). Ces résultats confirment la présence de formes protéiques agrégées solubles constituant la fraction PAS de la  $\beta$ -lg et dont une partie seulement a été éliminée par filtration des échantillons sur  $0,2\ \mu\text{m}$  (Bauer et al., 1998 ; Hoffmann et al., 1998 ; Spiegel, 2000).

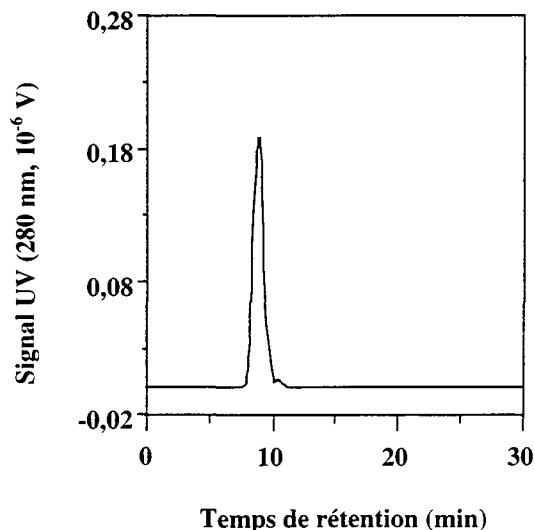


**Figure 2.12 :** Profil d'élution en chromatographie d'exclusion d'une dispersion de  $BLG_{agr}$  à 0,5% à pH 3,18 et  $20^\circ\text{C}$ . 1 : monomère, 2 : dimère, 3 : trimère, 4 : tétramère.

Si l'on considère maintenant la dispersion  $BLG$  obtenue après centrifugation des dispersions  $BLG_{agr}$  à pH 4,75 puis ajustement du pH à pH 4,2, la principale différence réside



dans la réduction du nombre de pics d'éluion obtenus. Dans ce cas, seuls les pics sont visibles, correspondants au dimère (pic majoritaire) et trimère de  $\beta$ -lg (Figure 2.13). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les espèces composant la dispersion de  $\beta$ -lg au pH de solubilité minimale sont essentiellement des protéines solubles et natives, en l'occurrence des dimères de  $\beta$ -lg dans notre cas.

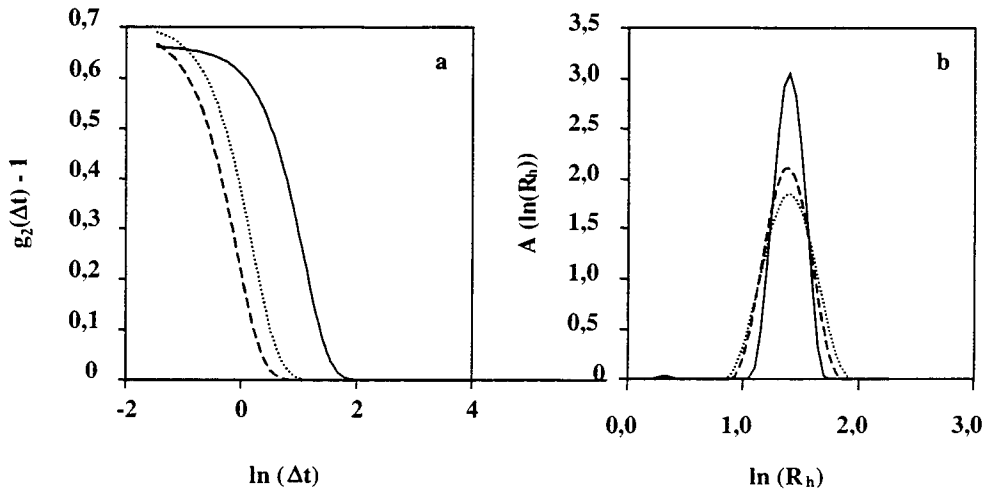


**Figure 2.13 :** Profil d'éluion en chromatographie d'exclusion d'une dispersion de BLG à 0,5% à pH 4,2 et 20°C.

La mesure de l'intensité de lumière diffusée au cours du temps par la dispersion de BLG à pH 4,2 nous a permis de calculer les fonctions de corrélation correspondantes aux trois angles d'observation utilisés (30, 90 et 150° ; Figure 2.14a). On pourra noter que celles-ci sont proches et que leur allure en forme de fonction mono-exponentielle décroissante traduit une relative monodispersité des particules présentes. La détermination de la distribution de taille des rayons hydrodynamiques des espèces protéiques présentes conduit à l'obtention d'une valeur moyenne de 2,51 nm aux trois angles d'observation (Figure 2.14b). Cette valeur indique que l'on se trouve en présence d'un équilibre entre les formes monomériques et dimériques de la  $\beta$ -lg, la différence de rayon hydrodynamique entre ces deux espèces étant trop faible pour permettre de les discriminer par cette méthode. Des valeurs de  $R_h$  très voisines de 2,14 et 3,19 nm ont été rapportées par Aymard et al. (1996) pour le dimère de  $\beta$ -lg à pH 2,0.

Dans le cas de notre dispersion, l'espèce majoritaire se trouverait être la forme dimérique de la protéine comme cela a été démontré dans des conditions de pH variant de 2 à 7, les rayons hydrodynamiques étant alors de 1,73 à 2,81 nm (Renard, 1994). L'augmentation du  $R_h$  est attribuée aux propriétés d'association de la  $\beta$ -lg avec l'augmentation du pH. Ces mesures de diffusion de la lumière confirment les résultats obtenus par chromatographie d'exclusion pour la dispersion de BLG à pH 4,2, à savoir quelle est principalement composé de  $\beta$ -lg native. Il faut toutefois noter que l'on ne peut exclure la présence d'une faible proportion d'agrégats solubles de la fraction PAS dans cette dispersion. En effet, une faible fraction de particules ayant un  $R_h$  voisin de 100 nm a été mise en évidence lors d'une

répétition des expériences de diffusion dynamique de la lumière, et ce malgré la filtration préalable des échantillons sur des filtres de très faible porosité (0,02  $\mu\text{m}$ ).



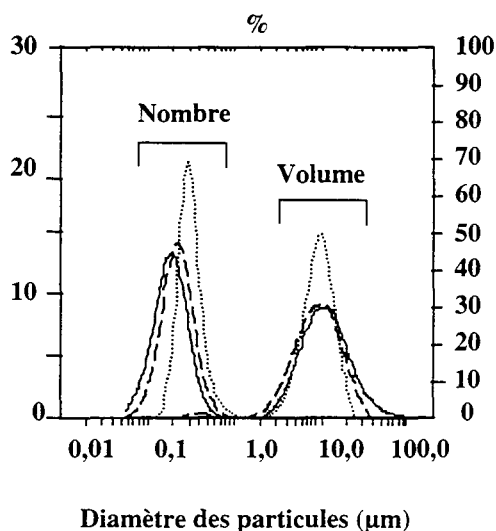
**Figure 2.14 :** Fonctions d'autocorrélation (a) et distributions des rayons hydrodynamiques (b) d'une dispersion de BLG à 1% à pH 4,2 et 20°C. Angles d'observation : (—) 30°, (---) 90°, (.....) 150°.

La distribution des  $R_h$  des espèces protéiques dans la dispersion de  $\text{BLG}_{\text{agr}}$  n'a pu être effectuée en utilisant la technique de DDL comme cela a été réalisé pour la dispersion de BLG. L'explication réside dans la taille trop importante des agrégats présents qui diffusent alors une quantité de lumière dépassant la sensibilité du photomultiplicateur utilisé lors des mesures. Les fonctions d'autocorrélation obtenues sont alors très difficilement exploitables et généralement entâchées par des phénomènes de diffusion multiple de la lumière. La caractérisation de la distribution de taille des agrégats a donc été réalisée par granulométrie laser. Les résultats obtenus à pH 4,2 pour différentes concentrations totales en protéine sont présentés sur la figure 2.15.

Si l'on considère la distribution de taille des agrégats sur la base de l'intensité diffusée exprimée en volume, le diamètre moyen des particules varie de 1 à 60  $\mu\text{m}$ , ce qui constitue une taille conséquente par rapport à celle des espèces colloïdales précédemment décrites. La valeur moyenne du diamètre se situe aux alentours de 8  $\mu\text{m}$ , puisque le diamètre de Sauter ( $d_{32}$ ) est respectivement de  $8,1 \pm 1 \mu\text{m}$  à 0,5%,  $7,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$  à 1% et  $7,1 \pm 1,2 \mu\text{m}$  à 5%. Il ne semble pas y avoir ici d'influence marquée de la concentration totale en biopolymère sur la taille de ces agrégats, même s'il faut garder en mémoire que la mesure est faite sous agitation à 1000 rpm et que, par conséquent, on ne peut exclure une homogénéisation de la taille induite par le cisaillement. En raisonnant sur les différentes fractions protéiques présentes dans la dispersion de  $\text{BLG}_{\text{agr}}$ , les tailles mesurées ici correspondent probablement à la fraction PAI, donc à des agrégats de  $\beta\text{-lg}$  fortement dénaturée.

L'étude des distributions de taille exprimées en nombre pour les trois concentrations étudiées à pH 4,2 fait état d'un diamètre de particules beaucoup plus faible que précédemment, en effet celui-ci varie entre 50 et 800 nm, la valeur moyenne se situant autour

de 200 nm. Plus de 90% des particules de cette fraction ont une taille inférieure à  $180 \pm 10$  nm à 0,5%,  $210 \pm 11$  nm à 1% et  $290 \pm 10$  nm à 5% (Figure 2.15).



**Figure 2.15 :** Distribution de taille en volume et en nombre d'agrégats de  $\beta$ -Ig dans une dispersion à pH 4,2 et 20°C. Concentrations protéiques : (—) 0,5%, (---) 1%, (.....) 5%.

La figure 2.15 montre également clairement que la concentration totale initiale en  $\beta$ -Ig a un effet sur la taille de ces espèces agrégées. Ces résultats nous amènent à penser que cette fraction protéique est constituée d'agrégats solubles formés par de la  $\beta$ -Ig partiellement dénaturée (fraction PAS définie précédemment). La présence de cette population d'agrégats centrée sur 200 nm a déjà été rapportée dans d'autres études concernant de la  $\beta$ -Ig non purifiée en solution aqueuse à pH 3,5 et 25°C (Haque et Sharma, 1997). Ces agrégats solubles ont également été retrouvés dans des dispersions d'isolat de protéines de lactosérum à 14% à pH 6,0 (Sanchez et al., 1999). Il est intéressant de noter que, dans le cas où la dispersion de  $\beta$ -Ig a subi un traitement de purification (par chromatographie d'exclusion par exemple), cette fraction d'agrégats disparaît laissant la place aux espèces monomériques et dimériques de  $\beta$ -Ig (Sharma et al., 1996), résultat que nous avons également démontré dans le cas de notre système.

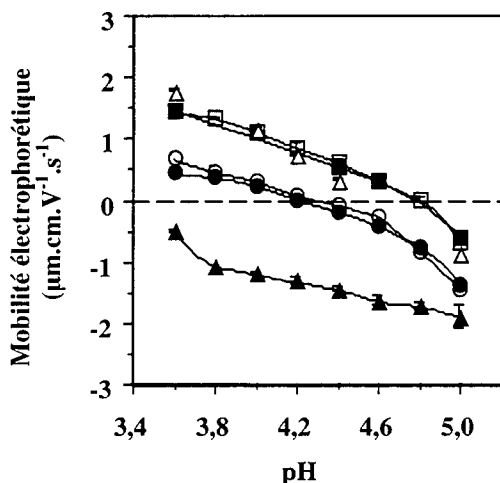
A la lumière des résultats obtenus en utilisant différentes techniques, nous pouvons affirmer que, tout comme l'échantillon de gomme d'acacia, l'échantillon de  $\beta$ -Ig est initialement polydispersé. Les différentes tailles et masses moléculaires mesurées par les différentes méthodes caractérisent les différentes fractions de  $\beta$ -Ig présentes dans les dispersions. Il n'est en effet pas toujours possible de caractériser toutes les fractions par la même méthode compte tenu des limites expérimentales de chacune d'elles, mais également des conditions de préparation des échantillons. Ainsi, la fraction PAI n'a pas été détectée par chromatographie d'exclusion du fait des masses moléculaires trop importantes des agrégats. On peut également expliquer l'impossibilité de déterminer les  $R_h$  des fractions PAS et PAI par diffusion dynamique de la lumière du fait de la filtration des échantillons et de la sensibilité du dispositif expérimental. Pour finir, le fait que nous n'ayons pas retrouvé les masses moléculaires exactes du monomère et du dimère de  $\beta$ -Ig dans la dispersion BLG peut être en partie expliqué par la méthode utilisée, qui compare les temps de rétention obtenus pour des

protéines dont les masses moléculaires sont connues avec les temps de rétention des protéines à analyser. La limitation de cette technique est qu'elle ne considère pas la conformation des molécules qui peut également influencer sur son temps de rétention dans la colonne. Pour des études ultérieures, il serait judicieux d'utiliser un couplage entre la chromatographie d'exclusion, en utilisant plusieurs colonnes en série, et la diffusion de la lumière multi-angle. L'analyse de l'intensité de lumière diffusée et traitement du signal par l'analyse de Zimm (1946) permettent ensuite d'obtenir à la fois les différentes valeurs de masses moléculaires (en poids et en nombre) ainsi que les rayons de giration des particules.

### 3.4 Mobilité électrophorétique des dispersions de BLG<sub>agr</sub>, BLG et gomme d'acacia

La mesure de la mobilité électrophorétique des colloïdes permet d'obtenir des informations quant à l'interaction entre la surface de ceux-ci et les molécules de solvant (Hunter, 1986). Elle permet également d'évaluer, dans des conditions données de pH et de force ionique, la charge effective ou apparente entourant la molécule ou l'agrégat, en mesurant sa vitesse de déplacement dans un champ électrique. La coacervation complexe étant majoritairement gouvernée par des interactions électrostatiques entre les macromolécules, la mesure de la mobilité électrophorétique doit nous permettre de définir les conditions optimales d'interaction entre les deux molécules en termes de pH.

Les limitations de la méthode sont d'une part la taille des macromolécules, puisque la limite de taille des particules détectables se situe aux alentours de 100 nm, et d'autre part leur solubilité. De plus, il paraît envisageable que la transmission du courant électrique puisse, dans le cas des agrégats, ne pas être uniquement réalisée à la surface de ceux-ci, mais également au travers de ceux-ci, puisqu'ils présentent généralement une structure poreuse.



**Figure 2.16 :** Variation de la mobilité électrophorétique ( $\mu_E$ ) en fonction du pH dans des dispersions macromoléculaires à 0,1% et 25°C. (○), (●) : BLG ; (□), (■) : BLG<sub>agr</sub> ; (△) : agrégats de  $\beta$ -Ig ; (▲) : gomme d'acacia. Les deux types de symbole pour chaque dispersion de  $\beta$ -Ig correspondent à deux expériences réalisées à 1 mois d'intervalle afin de vérifier la répétabilité de la méthode.

Si l'on considère tout d'abord l'évolution de la mobilité électrophorétique ( $\mu_E$ ) de la gomme d'acacia en fonction du pH, on peut noter que celle-ci est négative sur la plage de pH

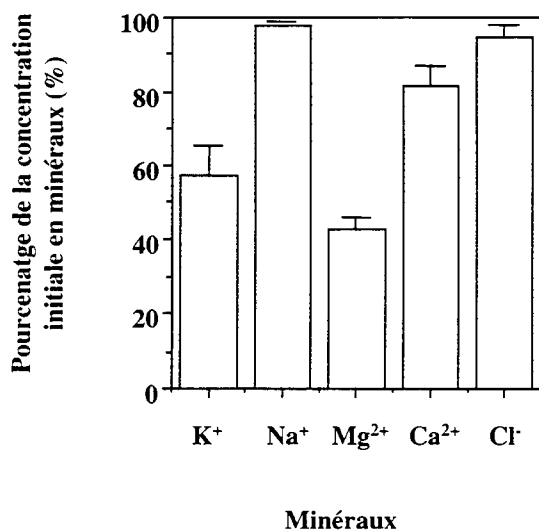
allant de 3,6 à 5,0 (Figure 2.16). En particulier, la gomme acacia présente une diminution de  $\mu_E$  dans la zone de pH de 3,6 - 3,8, passant de - 0,5 à - 1,25 u.m.e. Par la suite, la diminution de  $\mu_E$  est plus progressive et se stabilise autour de - 1,9 u.m.e à pH 5,0. L'évolution de la mobilité électrophorétique de la gomme d'acacia est liée à sa structure, qui renferme 14% d'acide glucuronique, portant un groupement carboxylique dont le  $pK_a$  est proche de 3,6 (Kravtchenko, 1997). La variation de mobilité électrophorétique est donc importante sur une gamme d'environ 1 unité pH autour du  $pK_a$  de l'acide glucuronique. Elle se stabilise ensuite car tous les groupements carboxyliques présents sur la gomme d'acacia sont dissociés. Ces résultats sont en accord avec des mesures réalisées dans d'autres études concernant la gomme d'acacia sur une gamme de pH de 3,5 à 5,0 (Peters et al., 1992). Burgess et Carless (1984) ont également trouvé des valeurs comprises entre - 0,5 et - 2 e.m.u. sur la même gamme de pH en mesurant la mobilité de particules de silice (Aerosil 200) recouvertes de gomme d'acacia. Récemment, Jayme et al. (1999) ont mesuré la mobilité électrophorétique de gouttelettes de D-limonène stabilisées par de la gomme d'acacia et ont trouvé une variation de  $\mu_E$  quasi identique à la notre lorsque la force ionique du système est de l'ordre de  $10^{-3}M$  NaCl. L'explication résulte de l'adsorption de la fraction AGP de la gomme d'acacia à la surface des gouttelettes lipidiques du fait de ses propriétés amphiphiles.

Même si nos observations sont en accord avec les valeurs rapportées dans la littérature, il semble important de mentionner le fait que les mesures ont été ici réalisées à des pH où la solubilité de la gomme acacia est voisine de 100%, ce qui permet de s'interroger sur la possibilité de distinguer les molécules de gomme d'acacia ( $R_h$  moyen : 13 nm) à l'aide du microscope et de la caméra CCD. L'explication la plus probable repose sur la présence d'agrégats de gomme d'acacia que nous avons caractérisé par diffusion de la lumière dans la dispersion. Leur rayon hydrodynamique étant supérieur à la limite de sensibilité de l'appareil utilisé, ils pourraient être responsables du signal de  $\mu_E$  mesuré. Cette hypothèse permet également d'expliquer la bonne correspondance entre nos valeurs et celles déterminées lorsque la gomme d'acacia est adsorbée sur de la silice ou des gouttelettes d'émulsion, puisque les propriétés de surfaces des agrégats sont certainement proches de celles de la fraction AGP.

Pour la dispersion BLG, la  $\mu_E$  est tout d'abord positive (+ 0,5 u.m.e.) aux alentours de pH 3,6 puis diminue ensuite avec l'augmentation du pH pour atteindre - 1,5 u.m.e. à pH 5,0 (Figure 2.16). Il est intéressant de noter que, dans ce cas, une mobilité électrophorétique nulle est obtenue aux alentours de pH 4,3. De plus, la décroissance de  $\mu_E$  semble être liée linéairement à l'augmentation du pH jusqu'à 4,6, ce qui indique que ce paramètre est bien la résultante de la déprotonation des groupements carboxyliques et aminés des chaînes latérales portées par la  $\beta$ -lg. Lorsque les agrégats sont présents dans la dispersion, l'évolution de la  $\mu_E$  est similaire (Figure 2.16). En effet, on note une diminution progressive de  $\mu_E$  avec l'augmentation du pH. La différence majeure par rapport à la courbe obtenue dans le cas de la dispersion BLG réside dans le décalage des valeurs de mobilité électrophorétique plus élevées de l'ordre d'1 e.m.u., puisque l'on part de + 1,5 e.m.u. à pH 3,6, pour finir à - 0,5 e.m.u. à pH 5,0. La différence en valeur absolue de la  $\mu_E$  entre les deux dispersions reste constante à 1 e.m.u. Il faut noter que dans la dispersion  $BLG_{agr}$ , la mobilité électrophorétique atteint une valeur nulle à pH 4,8, soit au minimum de solubilité déterminé par dosage et également au maximum d'absorbance déterminée à 650 nm (Chap. 2, § 4.2). L'interprétation fine des résultats obtenus par cette méthode sur les deux types de dispersions de  $\beta$ -lg nécessite à nouveau de considérer les différentes fractions protéiques présentes dans ces dispersions. La dispersion de BLG contient essentiellement la fraction PNS ainsi qu'un faible pourcentage de PAS qu'il n'a pas été possible d'éliminer par centrifugation. Si l'on considère la taille des

espèces monomériques et dimériques ( $R_h$  : 2,51 nm), il paraît difficilement concevable que la mobilité électrophorétique mesurée puisse leur être attribuée. Celle-ci doit donc essentiellement être due aux agrégats solubles présents dans la dispersion. La neutralisation des charges sur ces espèces partiellement dénaturées est plus rapide que pour la  $\beta$ -lg native, ce qui expliquerait la valeur très faible du pH isoélectrique qui se trouve à plus de 0.8 unité pH de la valeur proposée pour la  $\beta$ -lg dimérique ( $pH_i = 5,1$ ). Dans le cas de la solution de  $BLG_{agr}$ , la  $\mu_E$  mesurée est la résultante des  $\mu_E$  des fractions PAS et PAI. Comme nous l'avons vu lors de la mesure de la solubilité de cette dispersion, l'augmentation du pH favorise les interactions entre les espèces protéiques partiellement dénaturées. Un minimum de solubilité, correspondant à l'insolubilisation de la fraction PAS, est obtenu à pH 4,75, ce qui signifie que la charge globale des agrégats est alors nulle. Ceci correspond à la mesure de  $\mu_E$  que nous avons réalisée. Afin de vérifier l'influence de la présence d'agrégats sur la mesure de la  $\mu_E$  de la dispersion de  $BLG_{agr}$ , les agrégats récupérés après centrifugation à 10 000g ont été redispersés dans de l'eau distillée à une concentration de 0,1% et leur mobilité électrophorétique mesurée (Figure 2.16). De façon intéressante, les valeurs obtenues se superposent sur celles obtenues pour les dispersions  $BLG_{agr}$ , confortant ainsi notre hypothèse.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'origine de la diminution de la  $\mu_E$  de la dispersion BLG après élimination des agrégats, en supposant que l'explication pouvait résider dans une diminution de la teneur en cations dans cette dispersion. Aussi, le dosage des cations et du chlorure dans les dispersions  $BLG_{agr}$  et BLG a été réalisé à pH 4,2 (Figure 2.17).



**Figure 2.17** : Variation de la teneur en minéraux entre les dispersions  $BLG_{agr}$  et BLG à pH 4,2 après élimination des agrégats protéiques.

Les résultats du dosage après élimination des agrégats montrent que la proportion de certains ions présents dans la dispersion de BLG varie sensiblement (20% pour le  $Ca^{2+}$ ) ou de façon plus importante (40% pour le  $K^+$  et 60% pour le  $Mg^{2+}$ ) par rapport à la dispersion de  $BLG_{agr}$ . En revanche, les concentrations en  $Na^+$  et  $Cl^-$  restent quasiment inchangées. Cette variation s'explique si l'on considère l'influence des cations, en particulier divalents, sur l'interaction et l'agrégation des protéines de lactosérum partiellement ou totalement dénaturées (fractions PAS et PAI). Il a été clairement démontré que les protéines de

lactosérum dénaturées, et la  $\beta$ -lg en particulier, interagissaient spécifiquement avec les cations divalents, favorisant la formation d'agrégats insolubles (Varunsatian et al., 1983 ; de Rham et Chanton, 1984 ; Xiong et al., 1993). L'interaction de ces agrégats avec le potassium est également compréhensible, puisque du fait de sa forte hydratation, ce cation monovalent possède des propriétés proches de celles des cations divalents. De manière surprenante, le sodium, dont l'interaction avec la  $\beta$ -lg native a déjà été mise en évidence, ne subit aucune variation dans le cadre de notre étude (Arakawa et Timasheff, 1988 ; Fanni et al., 1989). L'explication réside peut être justement dans le fait que l'on ne considère ici que les interactions avec des agrégats protéiques et non avec les formes natives de la  $\beta$ -lg. Finalement, afin de confirmer de manière irréfutable que la diminution de la  $\mu_E$  était bien due à une interaction spécifique entre les cations et les agrégats protéiques, nous avons compensé, à pH 4,2, la perte de cations dans la dispersion de BLG par ajout de  $\text{CaCl}_2$ . Après équilibration du système durant 18 heures à 4°C, la mobilité électrophorétique de la dispersion de BLG a été mesurée. Les résultats obtenus sont en tout point identiques à ceux obtenus dans la dispersion BLG présentée en figure 2.16. L'influence de la présence des agrégats sur la valeur de la mobilité électrophorétique des dispersions de  $\text{BLG}_{\text{agr}}$  est donc bien due à une interaction spécifique de certains cations avec les agrégats de  $\beta$ -lg.

#### 4 Conclusion

L'étude préliminaire des propriétés physico-chimiques de la  $\beta$ -lg et de la gomme d'acacia a permis de caractériser les poudres de  $\beta$ -lg et de gomme d'acacia utilisées dans le cadre de ce travail. Les propriétés en solution de ces deux biopolymères ont ensuite été étudiées.

Concernant la gomme d'acacia, les résultats des analyses de chromatographie d'exclusion ont mis en évidence la présence d'une fraction majoritaire, AG, dont la proportion dans l'échantillon est de l'ordre de 80%. Celle-ci est caractérisée par une masse moléculaire se situant aux alentours de  $180\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Le rayon hydrodynamique moyen de la gomme d'acacia est de l'ordre de 13 nm, car une seconde fraction (20%), AGP, possédant un rayon hydrodynamique voisin de 30 nm a également été mise en évidence. De plus, les solutions aqueuses de gomme d'acacia à pH 4,2 contiennent une faible fraction constituée d'agrégats ayant un  $R_h$  de 208 nm. La structure polyélectrolytique globulaire de la gomme a été confirmée par des mesures de diffusion de la lumière en solution 0,1M NaCl (conditions d'écrantage des charges de la gomme d'acacia). L'échantillon de gomme d'acacia se trouve donc clairement être polydispersé.

La caractérisation de la dispersion initiale de  $\beta$ -lg a permis de mettre en évidence trois fractions protéiques constituées par des protéines natives (PNS, 43,7%), des agrégats solubles (PAS, 17,1%) et des agrégats insolubles (PAI, 39,2%). Deux types de dispersions ont alors été préparés selon qu'elles contiennent ou pas des agrégats de  $\beta$ -lg. La dispersion notée BLG est caractérisée par une faible polydispersité de masse moléculaire (monomères et dimères principalement), et un rayon hydrodynamique de 2,51 nm. En revanche, la dispersion notée  $\text{BLG}_{\text{agr}}$  contenant les agrégats de  $\beta$ -lg présente une forte polydispersité, puisqu'elle contient des espèces protéiques natives, des agrégats solubles ayant un diamètre en nombre de l'ordre de 200 nm et des agrégats insolubles caractérisés par un diamètre de Sauter de 8  $\mu\text{m}$ .

L'étude de la variation de  $\mu_E$  caractérisant les deux dispersions protéiques a mise en évidence une interaction spécifique entre les cations présents dans la dispersion  $\text{BLG}_{\text{agr}}$  et les agrégats de  $\beta$ -lg. Ainsi, l'élimination des agrégats entraîne non seulement une diminution de la polydispersité de la dispersion de BLG, mais également une diminution de sa mobilité électrophorétique.

Les mesures électrophorétiques indiquent clairement que c'est dans la zone de pH allant de 3,6 à 4,2 que l'intensité de l'interaction électrostatique doit être la plus élevée entre la  $\beta$ -lg

et la gomme d'acacia. Dans ces conditions, l'écart entre les courbes de  $\mu_E$  correspondantes aux deux macromolécules est le plus important, et les valeurs de  $\mu_E$  de signes opposés.

Ayant caractérisé de façon approfondie les deux macromolécules utilisées dans cette étude, nous nous proposons d'étudier dans le prochain chapitre l'interaction électrostatique entre celles-ci, en nous intéressant particulièrement aux effets du pH, du ratio protéine : polysaccharide, de la concentration totale en biopolymères et de la polydispersité des deux macromolécules. Nous avons choisi d'étudier la stabilité et la structure du mélange à différentes échelles d'observation, du niveau macroscopique à l'échelle moléculaire en passant par un niveau mésoscopique.

De plus, le système a été caractérisé juste après mélange des deux macromolécules puis après avoir atteint son équilibre thermodynamique.



## Chapitre 3 Etude de la stabilité et de la structure des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau : influence du pH, du ratio Pr : Ps, de la concentration totale et de la polydispersité

### 1 Introduction

La coacervation complexe est un phénomène cinétique résultant de l'interaction électrostatique entre des macromolécules en solution (Chap. 1). Les résultats et les théories proposés pour décrire ce type de séparation de phase font état d'un mécanisme général constitué de plusieurs étapes. Dans un premier temps, il y a formation de complexes macromoléculaires solubles, puis l'insolubilisation progressive de ceux-ci avec l'augmentation de la neutralisation des charges portées par les macromolécules. Lorsque tous ces complexes sont insolubles, ils interagissent entre eux pour former des coacervats qui, par des phénomènes de coalescence ou de floculation croissent en taille, donnant lieu à des intermédiaires structuraux ayant des tailles variant de quelques micromètres à plusieurs centaines de micromètres. Lorsque le système atteint l'équilibre thermodynamique, on observe une séparation de phase macroscopique caractérisée par l'obtention d'une phase concentrée en macromolécules et d'une phase diluée.

Cette description succincte de la coacervation complexe permet de comprendre la nécessité d'adopter une approche à plusieurs niveaux d'observation si l'on veut caractériser les différentes phases de ce mécanisme.

Nous avons choisi d'étudier l'influence de paramètres comme le pH et le ratio de mélange protéine : polysaccharide (Pr : Ps) sur la stabilité et la structure des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau. Ces paramètres sont classiquement étudiés dans le cadre de la coacervation complexe. En revanche, nous avons également considéré l'influence de paramètres beaucoup plus rarement étudiés comme la concentration totale en biopolymères et la polydispersité de la protéine.

### 2 Matériels et méthodes

#### 2.1 Matériels

Les dispersions BLG, BLG<sub>agr</sub> et de gomme d'acacia ont été préparées comme indiqué dans le chapitre 2, § 3.2.3.1. La nécessité d'une préparation spécifique inhérente à chaque méthode physico-chimique ou spectroscopique utilisée sera décrite lors de la description de cette technique. Pour la technique de microscopie confocale à balayage laser, les marqueurs fluorescents (rhodamine B isothiocyanate et fluorescéine isothiocyanate) ont été obtenus auprès de la société Fluka (Deisenhofen, Allemagne). Le diméthylsulfoxyde (DMSO) ayant servi à les dissoudre a été fourni par Sigma (Deisenhofen, Allemagne).

#### 2.2 Méthodes

L'approche choisie consiste en une étude de la stabilité des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau quelques instants après interaction entre les deux composants (1 à 60 min) puis à l'équilibre thermodynamique du système (après 2 jours). Des dosages préliminaires de la

concentration en biopolymères dans la phase supérieure obtenue après centrifugation des mélanges ont en effet montrés qu'un équilibre était atteint au bout de 2 jours.

### 2.2.1 Etude macroscopique des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

Cette étude a été réalisée en construisant des diagrammes de phases ternaires à pH 4,2 dans les mélanges BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau et BLG/gomme d'acacia/eau. L'observation macroscopique de la séparation de phase ainsi que le dosage des phases à l'équilibre ont également permis de caractériser les systèmes d'un point de vue macroscopique. La stabilité initiale des mélanges a été évaluée par la mesure de leur absorbance à 650 nm.

#### 2.2.1.1 Construction des diagrammes de phases ternaires

Comme nous l'avons décrit dans la revue bibliographique, il est classique de construire des diagrammes de phases afin de rendre compte de la stabilité de mélanges de macromolécules. Dans le cas particulier de la coacervation complexe, l'utilisation de diagrammes ternaires triangulaires est la plus répandue.

Pour des raisons pratiques, liées à la durée nécessaire pour la construction d'un diagramme de phases complet (2 mois), seuls les diagrammes de phases obtenus pour les mélanges à pH 4,2 ont été réalisés. La température des dispersions a été maintenue constante à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  et les mélanges ont été réalisés dans une salle thermostatée. Des diagrammes de phases partiels à une concentration totale maximale de 5% ont été réalisés sur le système BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau à pH 3,6, 4,2 et 5,0. Les mélanges nécessaires à la construction des diagrammes de phases ont été réalisés sans ajustement de la force ionique, dont nous n'avons pas étudié l'effet, afin d'éviter des problèmes d'effet tampon du pH par les protéines à des valeurs élevées de concentration totale en biopolymères. Ainsi, seuls les ions présents initialement dans les poudres ont contribué à la force ionique, qui sera par conséquent proportionnelle à l'augmentation de la concentration en biopolymères.

La procédure utilisée pour construire les diagrammes de phases repose sur la méthode visuelle de détermination du « point de trouble ». Celle-ci considère que la séparation de phase est obtenue lorsqu'une dispersion initialement limpide se trouble lors de l'ajout du second biopolymère (Reisman, 1970). On obtient dans ces conditions la courbe spinodale de notre système qui, pour de très faibles concentrations en biopolymères, est souvent confondue avec la courbe binodale. Cette méthode visuelle de détermination de la séparation de phase présente l'inconvénient d'être dépendante de l'acuité visuelle de l'expérimentateur.

Afin de permettre une meilleure répétabilité de la méthode, nous avons décidé de déterminer le point de séparation de phase par mesure de la variation de l'absorbance des mélanges à 650 nm. Pratiquement, nous avons préparé différentes dispersions de BLG, BLG<sub>agr</sub> et gomme d'acacia dont le pH a été ajusté à la valeur désirée. Nous avons ensuite titré une dispersion de protéine avec une dispersion de gomme d'acacia à la même concentration totale, jusqu'à apparition d'un trouble persistant, auquel cas le ratio du mélange se trouve être au voisinage de la spinodale. Nous avons considéré que la séparation de phase était effective pour une variation supérieure à 10% de l'absorbance initiale de la solution titrée. Après avoir déterminé par pesée le ratio en macromolécules correspondant à ce point, nous avons poursuivi la titration jusqu'à disparition du trouble. A cet instant, le système se trouve au voisinage de la spinodale avant de repasser dans la zone macroscopiquement monophasique.

Une nouvelle pesée nous a permis, en complément de la pesée précédente, de déterminer à une concentration totale en biopolymères donnée les deux points de la spinodale. Le dosage a été répété en titrant une dispersion de gomme d'acacia avec une dispersion de  $\beta$ -lg afin de vérifier l'emplacement des points précédents. Il est notable qu'aucune hystérésis n'a été mise en évidence. En faisant varier la concentration totale en biopolymère, la spinodale expérimentale a été obtenue.

Les droites de conjugaison, et par conséquent les compositions des points de la binodale ont été déterminées sur le diagramme de phases complet en mélangeant des dispersions de  $\beta$ -lg et de gomme d'acacia à pH 4,2 dans des tubes de plexiglas. Le ratio de mélange se trouvait dans la zone biphasique déterminée précédemment. Dans le cas de notre expérience, le ratio était de 2 : 1 dans le système BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau et 1 : 1 dans le système BLG/gomme d'acacia/eau. Les tubes contenant les mélanges ont été ensuite bouchés afin d'éviter une évaporation du solvant et laissés au repos à 20°C afin que l'équilibre thermodynamique s'établisse au sein du mélange. Après 2 jours, les tubes ont été centrifugés à 10 000g durant 1 heure afin de séparer les deux phases en présence. Les concentrations en  $\beta$ -lg, gomme d'acacia et eau ont ensuite été déterminées dans la phase supérieure. La teneur en  $\beta$ -lg a été mesurée par la méthode colorimétrique de Bradford (1976), la méthode de Dubois et al. (1956) ayant été utilisée pour le dosage de la gomme d'acacia ; enfin la quantité d'eau a été déterminée par étuvage à 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant. Un bilan de matière a permis ensuite de calculer les teneurs des différents composants dans la phase inférieure. Dix essais issus de 2 expériences indépendantes ont été effectués pour la détermination de chaque droite de conjugaison.

Les coordonnées des points correspondants à la spinodale et à la binodale ont été calculées en pourcentage puis placées sur un diagramme de phases ternaire en utilisant le logiciel TContour 4.1 (John Pilling, Université Technologique du Michigan, USA, URL : <http://callisto.my.mtu.edu/soft/tcon/manual.html>).

### 2.2.1.2 Suivi de l'absorbance à 650 nm dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

L'influence du pH, du ratio de mélange et de la concentration totale en biopolymères a été étudiée en suivant la variation de l'absorbance des mélanges à 650 nm. Cette méthode est couramment utilisée afin de prédire les zones de pH d'interaction maximum entre les macromolécules (Koh et Tucker, 1988a). La longueur d'onde de 650 nm a été choisie car elle se situe hors de la zone d'absorption des acides aminés aromatiques constituant la protéine. La variation d'absorbance est équivalente à la densité optique du mélange et pourra donc spécifiquement être attribuée à la formation de particules (complexes macromoléculaires, coacervats ou précipités) après interaction électrostatique entre les deux macromolécules.

La gamme de pH retenue a été choisie en fonction des résultats obtenus précédemment lors de la mesure de la  $\mu_E$  des macromolécules. Elle varie de 3,6 à 5,0, soit en dessous du p*H*<sub>i</sub> de la  $\beta$ -lg, afin de permettre une interaction maximale avec la gomme d'acacia anionique. Le ratio de mélange protéine : polysaccharide (Pr : Ps) varie quant à lui de 50 : 1 à 20 : 1, les concentrations totales de 0,1 à 5%.

Le mode opératoire consiste en un mélange des dispersions de biopolymères (concentration totale et pH identiques) à un ratio massique déterminé par pesée à l'aide d'une balance de précision (Sauter RE 1614, Ebingen, Allemagne). Après retournement rapide du

tube afin de l'homogénéiser, l'absorbance est lue à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible décrit précédemment. Afin de vérifier l'influence de la différence de force ionique entre les deux poudres initiales, un ajustement de celle-ci a été réalisé par ajout de NaCl à pH 4,2 pour la concentration totale de 5% et le ratio 50 : 1. Aucune différence significative d'absorbance n'a été obtenue par rapport à l'expérience réalisée sans ajustement de la force ionique. La suite des mesures a donc été réalisée sans ajustement de cette dernière. Dix essais ont été réalisés pour chacune des 2 expériences indépendantes.

### 2.2.1.3 Détermination de la composition des phases après deux jours

Les compositions des deux phases obtenues après deux jours ont été déterminées à 0,1, 0,5, 1 et 5% dans les mélanges BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau obtenus à pH 3,6, 4,2 et 5,0, et dans le mélange BLG/gomme d'acacia/eau à pH 4,2. La détermination des compositions a été réalisée par les mêmes méthodes d'analyse que celles utilisées pour la construction des diagrammes de phases.

### 2.2.1.4 Observation visuelle des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

La séparation de phase macroscopique obtenue dans les systèmes BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau et BLG/gomme d'acacia/eau a été suivie visuellement à 5% et 4,5% respectivement, pour des mélanges obtenus à pH 3,6, 4,2 et 5,0. Ces concentrations totales ont été choisies car elles permettent d'obtenir des phases ayant des volumes suffisamment importants pour pouvoir être précisément observés. Après 2 jours, les tubes contenant les mélanges à des ratios variant de 1 : 8 à 8 : 1 ont été photographiés à l'aide d'un appareil photo numérique MVC-FD91 (Sony).

## 2.2.2 Etude mésoscopique des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

Nous avons étudié spécifiquement les mélanges à l'échelle mésoscopique, comprise entre la dizaine de nm et le  $\mu$ m, car les propriétés macroscopiques des systèmes colloïdaux sont souvent liées à ce niveau d'organisation de la matière.

L'étude mésoscopique est basée sur la caractérisation des propriétés électriques de surface des particules mesurées par mobilité électrophorétique. Nous avons également déterminé les distributions de taille des particules, puis observé la structure des mélanges par microscopie optique à contraste de phase (MOCP) et microscopie confocale à balayage laser (MCBL) en utilisant des sondes fluorescentes liées de façon covalente avec les macromolécules.

### 2.2.2.1 Mobilité électrophorétique des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

Les mobilités électrophorétiques des particules obtenues dans les mélanges BLG/gomme d'acacia/eau et BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau ont été caractérisées selon le principe décrit pour les deux macromolécules seules (Chap. 2, § 3.2.8). Dans ce cas, les mobilités électrophorétiques ont été mesurées sur des mélanges obtenus à une concentration totale de 0,1%, 30 min après que le mélange eut été réalisé. Les ratios testés étaient de 8 : 1, 4 : 1, 2 : 1 et 1 : 1, sur la gamme de pH allant de 3,6 à 5,0. Trois essais ont été réalisés pour chaque pH et l'expérience a été répétée à 2 mois d'intervalle.

### 2.2.2.2 Taille et distribution de taille des particules

Les tailles et distributions de taille des particules ont été étudiées à pH 4,2, en fonction du ratio Pr : Ps et de la concentration totale en biopolymères, en utilisant le granulomètre laser Mastersizer S (Malvern Instruments, Orsay) décrit pour la caractérisation des agrégats de  $\beta$ -lg (Chap. 2, § 3.2.5).

L'alignement du faisceau laser et du centre optique de la lentille a été réalisé sur de l'eau distillée dont le pH a été préalablement ajusté au pH du mélange à analyser. Le bruit de fond électronique et optique a également été enregistré sur cette solution, sous agitation à 1000 tpm. Les mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau ont été introduits dans la cellule d'échantillonnage quelques secondes après mélange jusqu'à obtenir une obscuration du signal de l'ordre de 15%. Les distributions de taille et tailles des particules obtenues ont été calculées en utilisant le logiciel Malvern Sizer v2.17 (Malvern, Orsay), un modèle de distribution de taille polydisperse et un indice de réfraction des particules égal à celui des protéines de lait dans l'eau (1,529). Le diamètre moyen en volume  $d_{43}$  a ensuite été calculé selon :

$$d_{43} = \frac{\sum_i^n n_i d_i^4}{\sum_i^n n_i d_i^3} \quad (3.1)$$

où  $n_i$  est le nombre de particules ayant un diamètre  $d_i$ .

Chaque valeur de  $d_{43}$  correspond à la moyenne de 15 essais réalisés lors de 3 expériences indépendantes.

### 2.2.2.3 Morphologie et structure des particules dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

#### 2.2.2.3.1 Microscopie optique à contraste de phase

La structure des mélanges BLG/gomme d'acacia/eau et BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau a été étudiée par microscopie optique à contraste de phase. Cette technique est basée sur la différence d'indice de réfraction entre le solvant et les particules. L'observation des dispersions a été réalisée en plaçant 50  $\mu$ l de mélange entre lame et lamelle et en utilisant un microscope optique Olympus BH2 (Olympus, Japon) muni d'un dispositif à contraste de phase et d'un appareil photo équipé de films Kodak Ektachrome™ 320T spécialement adaptés à la lumière artificielle. Trois clichés ont été réalisés sur chaque mélange à un grossissement de x 500. De même, trois essais ont été réalisés pour chaque mélange.

#### 2.2.2.3.2 Microscopie confocale à balayage laser

Basée sur le principe de la microscopie optique classique, la microscopie confocale à balayage laser permet, grâce à un diaphragme, de concentrer la lumière en un point précis dans un plan focal (Heertje et al., 1987 ; Brooker, 1991). Ceci à pour avantage d'améliorer la résolution de l'observation puisque les effets de superposition des plans focaux rencontrés en microscopie classique se trouvent réduits (Brooker, 1995).

Afin de permettre une localisation des deux macromolécules ainsi qu'une définition améliorée de l'image, les deux macromolécules ont été marquées de manière covalente avec des sondes fluorescentes pouvant être excitées spécifiquement par un laser couplé au microscope. Les structures moléculaires des deux marqueurs, la fluorescéine isothiocyanate (FITC) et la rhodamine B isothiocyanate (RITC), ainsi que leurs spectres d'excitation/émission ont été présentés en détail par Lamprecht et al. (2000).

La  $\beta$ -lg (BLG et BLG<sub>agr</sub>) a été marquée par la FITC dont les longueurs d'onde d'excitation/émission sont de 485/530 nm tandis que la gomme d'acacia a été marquée par la RITC dont les longueurs d'onde d'excitation/émission sont de 530/590 nm. On remarquera donc que la fluorescence de la FITC excite en partie la RITC. Notre étude restant principalement qualitative, ce recouvrement d'une partie des spectres de fluorescence des marqueurs peut être négligé. La réaction de liaison covalente entre les macromolécules et les marqueurs a été réalisée par agitation des mélanges durant 1 heure 30 à température ambiante après avoir ajouté 25  $\mu$ l d'une dispersion de FITC ou RITC préparée à 2% dans du DMSO avec 100 ml d'une dispersion à 1% de BLG (ou BLG<sub>agr</sub>) ou de gomme d'acacia. En utilisant ces concentrations en marqueurs, et si l'on tient compte du pourcentage de fixation entre ceux-ci et les macromolécules (environ 10%), le ratio final biopolymère/marqueur est de l'ordre de 1/4. Dans ces conditions, les biopolymères sont en large excès et il est possible de négliger la contribution des marqueurs non liés dans la fluorescence des mélanges. De plus, ceci permet d'utiliser les dispersions marquées sans avoir à leur faire subir de post-traitement de filtration ou de séchage, qui pourrait modifier l'interaction entre les macromolécules. Toutefois, afin de vérifier l'effet du marquage, nous avons systématiquement réalisé des mélanges composés d'une molécule marquée et d'une molécule non marquée, puis comparé la structure des coacervats obtenus avec celle obtenue lors du double marquage. Aucune différence significative n'a été mise en évidence.

Les mélanges ont été placés entre lame et lamelle scellées par de l'adhésif double face afin d'éviter une déshydratation de l'échantillon. L'observation des échantillons a été réalisée au Département de Biopharmacie et Pharmacie Galénique de l'Université de Saarbrücken. Le dispositif expérimental était constitué d'un microscope inversé Axiovert 1000 (Carl Zeiss, Allemagne), d'un système d'imagerie Bio-Rad MRC 1024 (Hemel Hempstead, Royaume-Uni) et d'un laser à ionisation d'argon émettant à 488 et 514 nm (American Laser Corp., USA). Ce système permet une observation à des grossissements variant de 40 à 400 fois (immersion dans l'huile, objectif numérique 1,30). Les images obtenues ont ensuite été numérisées à l'aide du logiciel Laser Sharp MRC-1024 version 3.2 (Bio-Rad, Allemagne). La localisation des deux macromolécules dans les particules a été déterminée qualitativement en établissant les profils d'intensité de fluorescence des deux sondes. Après binarisation des images en coupe des particules, recueillies après double-excitation des fluorochromes, les profils d'intensité ont été obtenus par traitement des images au moyen de la version  $\beta$  3b du logiciel Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA ; URL: <http://www.scioncorp.com>).

### 2.2.3 Etude moléculaire des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

La conformation et la structure de la  $\beta$ -lg ont été étudiées en utilisant différentes techniques biophysiques afin de déceler une éventuelle modification moléculaire due à la complexation avec la gomme d'acacia. Les pH et ratios d'étude ont été choisis en fonction des résultats des études macro- et mésoscopiques. Pratiquement, l'influence de l'interaction entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia sur la structure secondaire de la  $\beta$ -lg a été déterminée en utilisant

la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (SIRTF), afin de caractériser la structure en feuillets  $\beta$ , le dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (DC), afin de quantifier la teneur en hélice  $\alpha$ , et finalement la spectroscopie de fluorescence frontale (SFF), particulièrement sensible à l'environnement hydrophobe, afin d'examiner l'exposition des résidus aromatiques au solvant.

### 2.2.3.1 Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

Cette méthode analytique est basée sur la vibration des atomes autour des liaisons chimiques covalentes. Chaque type de vibration est spécifique de certaines liaisons chimiques qu'il est alors possible de repérer dans la structure d'une molécule (Sun, 1994). En effet, si la radiation utilisée pour analyser la molécule possède une vibration identique à celle d'une des liaisons qui la constitue, un phénomène d'absorption d'une partie de la radiation va se produire, conduisant à l'apparition d'une bande d'absorption spécifique sur le spectre infra-rouge de cette molécule. De plus, cette technique spectroscopique obéit à la loi de Beer-Lambert, si bien que l'intensité du signal infra-rouge est directement proportionnelle au nombre de liaisons considérées. Le principe de la Transformée de Fourier consiste à transformer mathématiquement l'interférogramme obtenu après la mesure en le décomposant en une somme de fonctions périodiques de type sinusoidales ou cosinusoidales, ce qui permet d'éliminer une grande partie du bruit de fond du signal (Sun, 1994). Généralement, le spectre infra-rouge est obtenu dans la gamme de nombre d'onde comprise entre 4000 et 800  $\text{cm}^{-1}$  (Wilson, 1995). Cependant, dans le cas des protéines, le domaine expérimental se borne essentiellement à la partie du spectre comprise entre 1900 et 800  $\text{cm}^{-1}$  car elle contient les deux bandes amide I (1690  $\text{cm}^{-1}$ ) et amide II (1700  $\text{cm}^{-1}$ ), caractéristiques des liaisons de type peptidiques présentes dans les protéines (Bandekar, 1992). De plus, la spectroscopie infra-rouge est très sensible à l'arrangement spatial de ce type de liaison. Elle permet donc de distinguer une structure en hélice  $\alpha$  d'une structure en feuillets  $\beta$ , qui est le type de structure secondaire pour laquelle cette méthode est la plus sensible (Byler et Susi, 1986 ; Surewicz et Mantsch, 1988).

Notre étude a été réalisée au Laboratoire de Physico-Chimie des Macromolécules de l'INRA de Nantes. L'appareil utilisé était un spectromètre à transformée de Fourier de type Bruker IFS 25, utilisé dans la configuration d'atténuation totale de réflectance (ATR) qui est la plus adaptée aux échantillons liquides. Le spectre de longueur d'onde étudié variait de 1700 à 800  $\text{cm}^{-1}$ , le pas d'incrémentement du nombre d'onde étant de 2  $\text{cm}^{-1}$ . La cellule de mesure horizontale était constituée d'un cristal de ZnSe permettant 6 réflexions internes du signal. Une accumulation de 200 mesures a été réalisée pour chacun des spectres obtenus, que ce soit pour l'échantillon ou le solvant, constitué d'eau distillée.

Les mesures ont été réalisées sur les dispersions à 1% de BLG, BLG<sub>agr</sub> ou gomme d'acacia ainsi que sur les mélanges correspondant aux ratios 8 : 1, 2 : 1 et 1 : 1, à des pH de 3,6, 4,2 et 5,0. Pour chaque spectre, une correction de la ligne de base a été effectuée ainsi que la soustraction du spectre du solvant en utilisant le logiciel SPECTRAFILE (Heyden & Son, GmbH, Allemagne). La déconvolution des spectres a été réalisée en calculant la dérivée seconde puis en appliquant la méthode des différences finies (Dufour et al., 1994). Le spectre de dérivée seconde obtenu a ensuite été normalisé en le multipliant par - 1 et en normalisant l'aire sous la courbe à des fins de comparaison entre les différents résultats (Renard et al., 1999). Les mesures ont été réalisées en duplicata pour chaque dispersion testée.

### 2.2.3.2 Dichroïsme circulaire

La technique du dichroïsme circulaire est basée sur les propriétés de dispersion de la lumière par les macromolécules (Kuwanjima, 1995). En effet, si dans le domaine de l'UV lointain, typiquement entre 180 et 260 nm, on envoie un faisceau lumineux polarisé sur une molécule optiquement active, celui-ci va être totalement ou en partie absorbé. Le principe du dichroïsme circulaire est de diviser un faisceau monochromatique en deux ondes d'intensité strictement identique, mais de polarités opposées, en utilisant un polariseur. La technique consiste ensuite à mesurer la différence entre l'absorbance respective de chacun des deux faisceaux après avoir traversé l'échantillon. Si le produit est optiquement inactif, la variation d'absorbance,  $\Delta A$ , est nulle. En revanche, s'il possède des structures optiquement actives (hélice  $\alpha$ , feuilletts  $\beta$ , coudes), elle pourra être soit positive soit négative (Johnson, 1988). Pour des raisons historiques,  $\Delta A$  est souvent exprimée en ellipticité,  $\Delta \epsilon$  (en deg), en tenant compte d'un terme multiplicatif de 32,98. Finalement,  $\Delta \epsilon$  est transformée en ellipticité molaire,  $[\theta]$  (en deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>), en la divisant par la masse moléculaire par résidu du biopolymère (g.mol<sup>-1</sup>), en tenant compte de la longueur du trajet optique de la cuve (cm) et de la concentration en biopolymère (mol.l<sup>-1</sup>). La variation de  $[\theta]$  dans la région comprise entre 208 à 222 nm est particulièrement significative de la structure en hélice  $\alpha$  que l'on peut rencontrer dans les protéines (Greenfield, 1996).

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été réalisées au Laboratoire « Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire » de la Faculté des Sciences de Nancy. Les spectres correspondant aux différentes dispersions ont été enregistrés à l'aide d'un dicrographe Jobin-Yvon CD6 Spex, placé sous flux d'azote à  $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$  et équipé d'une source monochromatique d'argon. La plage de longueur d'onde étudiée variait de 180 à 260 nm, le pas d'incrémentement de longueur d'onde étant fixé à 0,5 nm. L'appareil a été calibré avec de l'acide (+) 10 - camphrosulphonique dont l'ellipticité vaut  $+ 2,36^\circ$  à 290,5 nm et  $- 4,9^\circ$  à 192,5 nm. Les différents échantillons ont été placés dans une cellule de mesure dont le trajet optique était de 0,01 cm, la concentration totale en biopolymère étant quant à elle fixée à 0,05%. Chaque spectre a été obtenu en faisant la moyenne de huit balayages de longueur d'onde entre 180 et 260 nm. Après soustraction du spectre du solvant, les spectres obtenus pour les mélanges ont été normalisés par soustraction du spectre de la gomme d'acacia à la concentration effective de celle-ci dans le mélange. L'ellipticité molaire de la  $\beta$ -Ig a été déterminée après mesure de la quantité effective de protéine présente dans l'échantillon par mesure de l'absorbance à 278 nm ( $\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%} = 9,6$ ). Le pourcentage d'hélice  $\alpha$ ,  $f_H$ , a ensuite été calculé en utilisant la formule proposée par Chen et al. (1972) pour des longueurs d'onde de 208 et 222 nm :

$$f_H = - [\theta]_\lambda - 2340 / 30\ 300 \quad (3.2)$$

Seuls les pH de 3,6 et 4,2 ont été étudiés. En effet, la turbidité des mélanges obtenus à pH 5,0 était trop élevée, conduisant à une erreur importante sur  $\Delta A$  et par conséquent sur  $[\theta]$ .

### 2.2.3.3 Spectroscopie de fluorescence frontale

La spectroscopie de fluorescence frontale, comme la spectroscopie de fluorescence classique, repose sur l'émission d'énergie (sous forme d'un photon) à une longueur d'onde spécifique ( $\lambda_{em}$ ) par une molécule, après excitation de celle-ci à une autre longueur d'onde



spécifique ( $\lambda_{ex}$ ). Ce type de phénomène est très fréquemment rencontré avec les molécules possédant des doubles liaisons conjuguées, comme c'est par exemple le cas pour les acides aminés aromatiques tels que le Trp ou la Tyr (Strasburg et Ludescher, 1995).

La différence principale entre la fluorescence frontale et la fluorescence classique réside dans le fait que la première est peu sensible à la turbidité du milieu. Il est donc possible de travailler avec des échantillons dont l'absorbance est comprise entre 0,05 et 2, voire supérieure à 2 (Renard, 1994). C'est par exemple le cas d'échantillons protéiques que l'on traite thermiquement (Renard et al., 1998). Les acides aminés de type hydrophobes se trouvent peu exposés au solvant lorsque les protéines sont dans leur état natif. Aussi, le suivi de l'intensité de fluorescence et de la variation de la longueur d'onde d'émission de fluorescence spécifique de ces résidus permet-elle d'obtenir des informations sur l'état de dénaturation des régions hydrophobes contenues dans les protéines (Yuan et al., 1998).

Les mesures de fluorescence frontale ont été effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre Aminco SLM 4800C disponible au Laboratoire d'Etude des Interactions entre les Macromolécules Alimentaires de l'INRA de Nantes, fonctionnant en mode ratio et illumination frontale. La cellule de référence contenait de la rhodamine 6G à 20°C. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été ajustées à 287 et 330 nm, respectivement. Les fentes d'excitation et d'émission étaient de 4 nm. La cellule de quartz contenant l'échantillon était inclinée de 56° (angle de Brewster) par rapport à la source lumineuse afin de minimiser les phénomènes de réflexion. Les concentrations totales des échantillons étaient de 3% afin de se trouver sur le plateau d'intensité de fluorescence déterminé pour la  $\beta$ -lg par Renard et al. (1998) en fonction de la concentration totale en protéine. Afin de tenir compte de la concentration effective en  $\beta$ -lg dans les mélanges et les dispersions protéiques, le maximum d'intensité de fluorescence ( $I_{max}$ ) a été normalisé par la densité optique mesurée à 278 nm ( $DO_{278}$ ), corrigée par la turbidité des dispersions (Leach et Scheraga, 1960). Pour cela, un balayage de longueur d'onde a été réalisé sur les dispersions de BLG, BLG<sub>agr</sub>, gomme d'acacia et les mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau entre 320 et 350 nm. Les densités optiques (DO) correspondantes ont été mesurées. Une double régression logarithmique  $\log(DO) = f[\log(\lambda)]$  a ensuite été calculée. La DO correspondant à une longueur d'onde de 278 nm a été extrapolée à l'aide de l'équation de cette droite. Cette valeur, correspondant uniquement à la contribution de la turbidité de la dispersion, a ensuite été retranchée de la valeur de DO effectivement lue à 278 nm pour chaque mélange. La valeur résultante ne se trouve plus être alors que la contribution de l'absorbance effective de la protéine à 278 nm, permettant alors de calculer précisément la concentration protéique.

#### 2.2.4 Analyse statistique

Les moyennes obtenues pour les différents essais correspondants à différentes expériences ont été comparées, au seuil de confiance de 0,05% (test de Student-Fischer), en utilisant une analyse de variance de type ANOVA disponible sur le logiciel StatView II<sup>TM</sup> (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA).

### 3 Résultats et Discussion

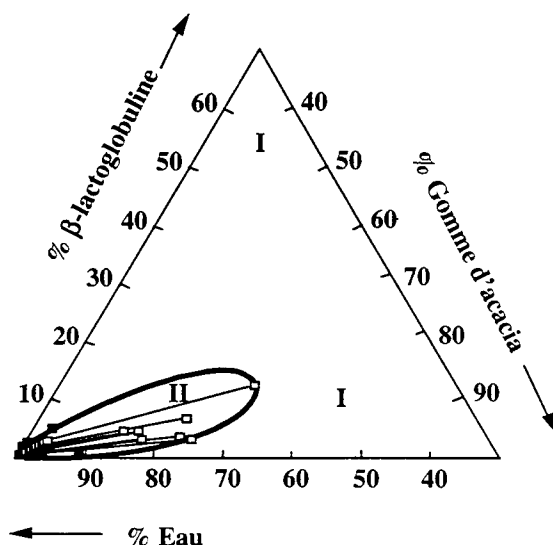
Nous présentons dans cette partie les résultats obtenus lors de l'étude des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau à différentes échelles d'observation.

### 3.1 Etude macroscopique des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme acacia/eau

Avant d'analyser les diagrammes de phases ternaires obtenus pour nos mélanges, il semble intéressant de considérer quelques points d'ordre expérimental liés à la construction de ces diagrammes de phases et à la définition de la zone biphasique. En effet, il faut tout d'abord remarquer que, compte tenu de la présence d'agrégats protéiques et de minéraux dans nos poudres de départ, on ne peut parler rigoureusement que de pseudo-diagrammes de phases dans le cas de notre étude. De plus, la méthode de détermination de la spinodale, basée sur une mesure de variation d'absorbance, présente l'inconvénient de négliger la présence de complexes macromoléculaires dans la zone monophasique, ceux-ci ayant une taille suffisamment faible (quelques dizaines de nm) pour ne pas être détectés par cette méthode. Il est donc fortement envisageable qu'une séparation de phase microscopique (hétérogénéités structurales, fluctuations locales de concentration) ait déjà eu lieu dans la zone monophasique, comme cela a très clairement été mis en évidence par Renard et al. (1997) dans le cas d'un mélange ASB-hydroxyéthylcellulose en utilisant la diffusion des neutrons. D'autres études concernant la détermination de la binodale dans des systèmes macromoléculaires préconisent par exemple l'utilisation de la spectroscopie infra-rouge pour détecter la présence de complexes macromoléculaires (Durrani et al., 1993). Si ces méthodes sont en effet beaucoup plus sensibles que la mesure de la variation d'absorbance, il faut cependant noter qu'elles utilisent souvent de l'eau deutérée comme solvant, ce qui peut poser des problèmes quant à la transposition des résultats au même système réalisé dans de l'eau. Nous considérerons dans la suite de notre étude que la séparation de phase par coacervation complexe est, en première approximation, majoritairement un phénomène mésoscopique puis macroscopique en gardant toutefois à l'esprit la présence probable de complexes macromoléculaires dans la zone monophasique (Wang et al., 1999).

#### 3.1.1 Diagrammes de phases ternaires à pH 4,2

Lorsque l'on observe les deux diagrammes de phases obtenus à pH 4.2 pour le système BLG/gomme d'acacia/eau et BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau, la forme typique de la zone biphasique en goutte d'eau indique qu'il s'agit d'une séparation de phase de type associative (Figures 3.1 et 3.2). La zone biphasique se trouve en effet localisée près du sommet correspondant au solvant, ce qui indique que l'une des phases contient majoritairement du solvant tandis que l'autre contient préférentiellement les macromolécules (Piculell et al., 1995 ; Tolstoguzov, 1995). Egalement, l'orientation des droites de conjugaison, dont l'une des extrémités se trouve être proche de l'angle correspondant au solvant, confirme que nous sommes en présence d'une phase concentrée en équilibre avec une phase diluée. Dans le cas d'une séparation de phase ségrégative, les droites de conjugaisons auraient été parallèles au coté  $\beta$ -lg-gomme d'acacia (Piculell et Lindman, 1992). D'autre part, il est également intéressant de noter que dans les deux cas, les droites de conjugaison ne sont pas parallèles entre elles, ce qui indique que la charge portée par les deux macromolécules n'est pas de même intensité et que par conséquent les complexes macromoléculaires ne peuvent pas être strictement stœchiométriques (Figures 3.1 et 3.2).



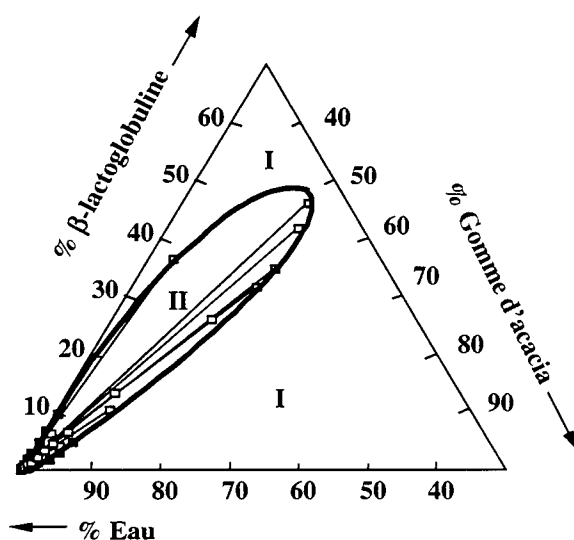
**Figure 3.1 :** Diagramme de phases obtenu à pH 4,2 et 20°C dans le cas d'un mélange BLG/gomme d'acacia/eau. ( ■ ) : points de la spinodale ; ( □ ) : points de la binodale et composition du mélange avant séparation de phase ; ( — ) : binodale ; ( — ) : droite de conjugaison ; I : zone monophasique ; II : zone biphasique. La concentration totale maximale en biopolymères donnant lieu à une séparation de phase est de 4,5%.

Une information importante est également apportée par ces deux diagrammes de phases si l'on considère la concentration totale maximale pour laquelle la séparation de phase se produit. En effet, dans le cas du mélange BLG/gomme d'acacia/eau, celle-ci est de l'ordre de 4,5%, corroborant la valeur de 4% proposée par Tolstoguzov (1986). En revanche, dans le mélange BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau, cette concentration atteint 20%, soit près de cinq fois la valeur proposée par Tolstoguzov (1986) et définie par Veis (1963) comme étant la concentration de suppression de la coacervation complexe. Il y a donc une variation considérable de la surface de la zone biphasique entre les mélanges BLG/gomme d'acacia/eau et BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau. Ce résultat laisse à penser que lorsque des agrégats sont présents dans le système, des phénomènes autres que la coacervation complexe classiquement décrite pourraient être mis en jeu, en particulier des phénomènes de floculation.

Il est notable que la position de la zone biphasique obtenue diffère dans les deux systèmes. Dans le cas du mélange BLG/gomme d'acacia/eau (Figure 3.1), elle se trouve sous la bissectrice de l'angle correspondant au ratio 1 : 1, alors que dans le cas où les agrégats sont présents elle se trouve au-dessus (Figure 3.2). En fait, c'est lorsque la concentration totale augmente, et donc le nombre d'agrégats protéiques, que le déplacement de la zone biphasique devient visible. Ceci indique, comme pour la concentration totale, une influence de la présence des agrégats de  $\beta$ -lg dont l'effet peut être de nature entropique (modification de la polydispersité des dispersions) ou d'ordre enthalpique (modification des propriétés de surface des particules).

La contribution entropique ne peut expliquer à elle seule les modifications obtenues au niveau de la zone biphasique. En effet, une diminution de polydispersité n'entraîne généralement pas un déplacement de la zone biphasique mais plutôt une diminution de l'aire de la zone métastable comprise entre la binodale et la spinodale (Albertsson, 1976 ; Frugier et

Audebert, 1994). Il nous faut donc considérer une contribution enthalpique significative. Lorsque le système ne contient pas d'agrégats protéiques, la charge de surface des espèces protéiques restantes est plus faible (Chap. 2, § 4.4). Le nombre de molécules de  $\beta$ -lg nécessaire pour neutraliser une molécule de gomme d'acacia est plus important, à pH égal, dans le système BLG/gomme d'acacia/eau. Par conséquent, la binodale s'éloigne de l'axe eau- $\beta$ -lg dans le cas du système BLG/gomme d'acacia/eau (Figure 3.1). Le raisonnement est identique en ce qui concerne la binodale inférieure où, cette fois, il faut moins de gomme d'acacia pour neutraliser la BLG du fait de sa plus faible charge, mais beaucoup plus pour neutraliser celle de la  $BLG_{agr}$ .



**Figure 3.2 :** Diagramme de phases obtenu à pH 4,2 et 20°C dans le cas d'un mélange  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau. (■) : points de la spinodale ; (□) : points de la binodale et composition du mélange avant séparation de phase ; (—) : binodale ; (—) : droite de conjugaison ; I : zone monophasique ; II : zone biphasique. La concentration totale maximale en biopolymères donnant lieu à une séparation de phase est de 20%.

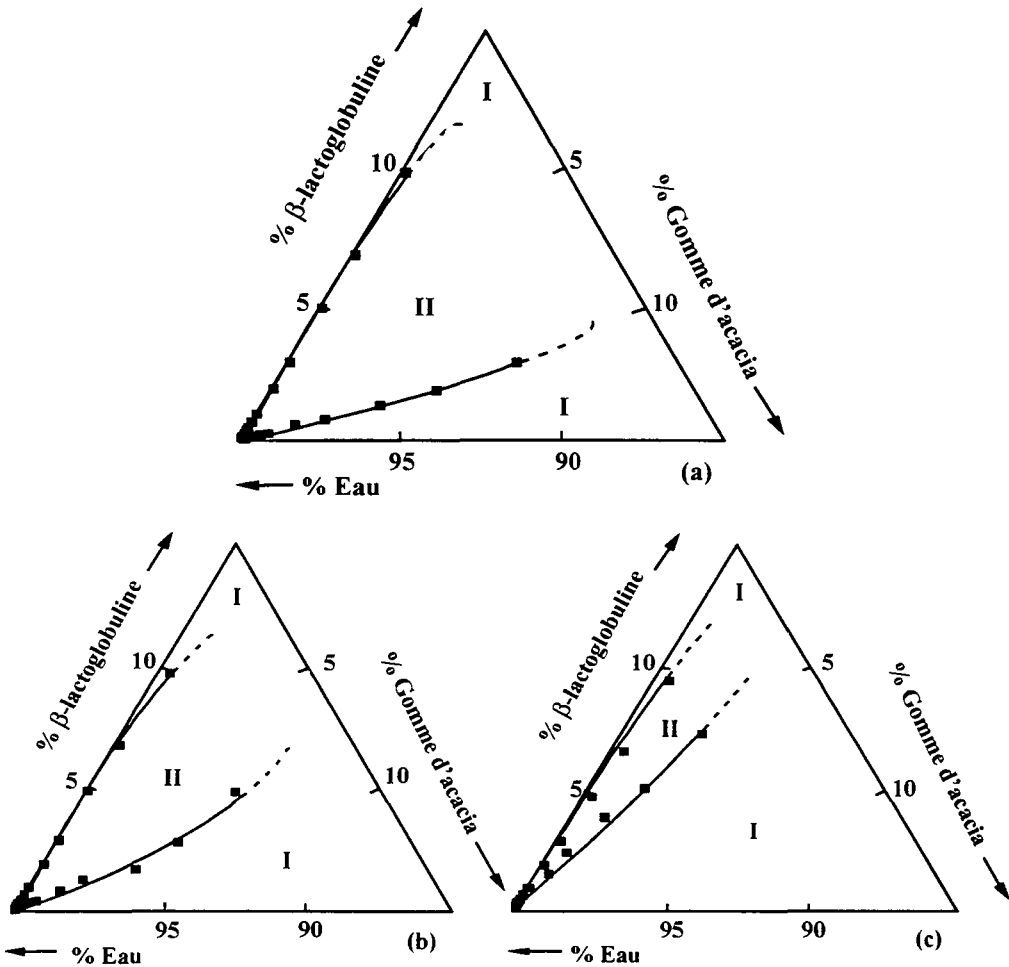
### 3.1.2 Influence du pH et du ratio protéine : polysaccharide (Pr : Ps)

L'influence du pH sur la coacervation complexe a d'abord été étudiée par l'établissement de diagrammes de phases partiels (concentration totale en biopolymère de 5%) dans le cas du mélange  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau à pH 3,6, 4,2 et 5,0 (Figure 3.3).

#### 3.1.2.1 Diagrammes de phases partiels

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, la variation du pH conduit à des modifications de la charge de surface des macromolécules et influe donc directement sur la formation des complexes macromoléculaires responsables de la coacervation complexe à l'échelle macroscopique.

Lorsque l'on observe les diagrammes de phases partiels présentés sur la figure 3.3, il est intéressant de noter que l'augmentation du pH induit une forte diminution de l'aire de la zone biphasique. De plus, il est remarquable que la position de la limite supérieure de la zone II reste inchangée, alors que ce n'est pas le cas de la limite inférieure qui se déplace vers l'axe  $\beta$ -lg-eau, réduisant ainsi l'aire de la zone biphasique. Le mélange est donc plus stable avec l'augmentation du pH. Ceci montre de manière indéniable que le principal effet du pH se produit sur la  $\beta$ -lg dont la charge de surface se trouve fortement diminuée avec l'augmentation du pH (contrairement à la gomme d'acacia). Rappelons ici les résultats obtenus lors des mesures de la mobilité électrophorétique puisque l'on passe de + 1,75 e.m.u. à pH 3,6 à - 0,5 e.m.u. à pH 5,0 pour les dispersions de  $BLG_{agr}$  alors que l'on passe de - 0,5 à - 1,9 e.m.u. pour la gomme d'acacia sur la même gamme de pH.



**Figure 3.3 :** Diagrammes de phases partiels obtenus à 20°C pour des mélanges  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau. I : région monophasique ; II : région biphasique. ( — ) : spinodale. (a) : pH 3,6 ; (b) : pH 4,2 ; (c) : pH 5,0.

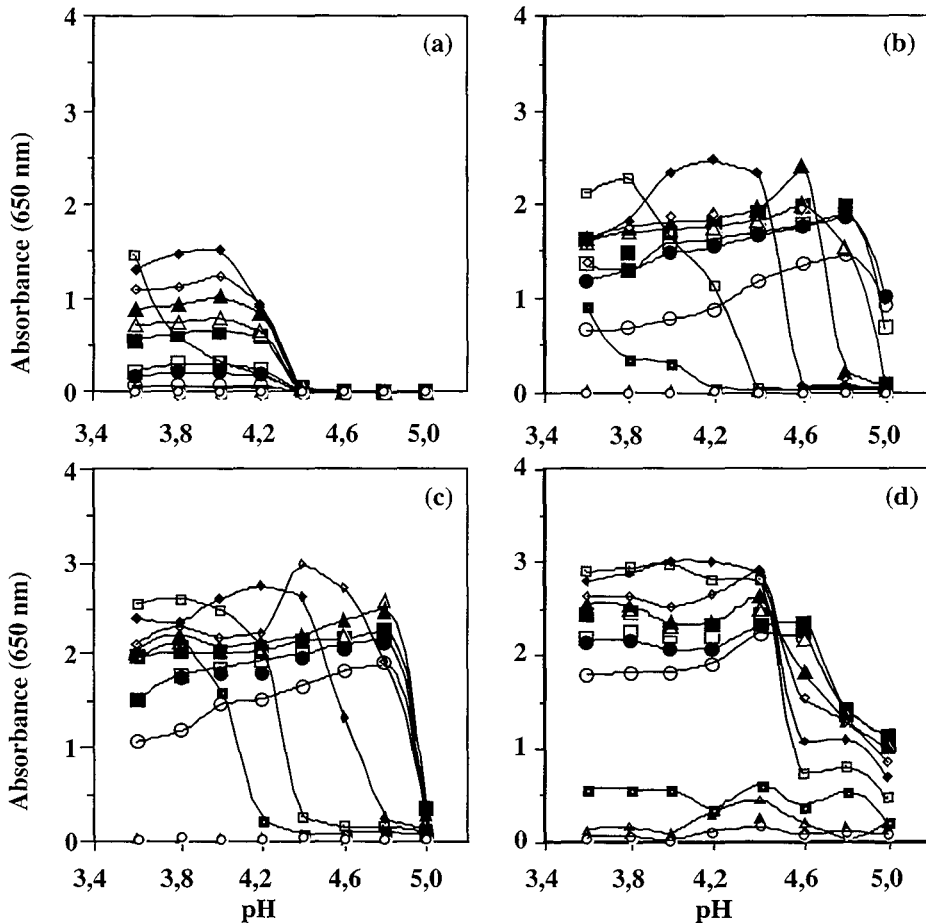
D'autre part, si l'on considère la symétrie de la zone biphasique obtenue aux différents pH par rapport à la bissectrice du sommet formé par le solvant, il est intéressant de noter que la symétrie est pratiquement obtenue à pH 3,6. Ceci prouve qu'à cette valeur de pH, les charges portées par les deux macromolécules se compensent exactement, ce qui est en accord avec les mesures de mobilité électrophorétique réalisées sur ce système. Cette observation n'est plus vraie à pH 4,2 et 5,0, puisque la charge de la protéine dans la dispersion BLG<sub>agr</sub> diminue alors que celle de la gomme d'acacia augmente négativement.

### 3.1.2.2 Variation de l'absorbance des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau à 650 nm

L'influence du pH et du ratio Pr : Ps sur l'interaction entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia a également été étudiée à différentes concentrations totales en biopolymères, en suivant la variation de l'absorbance des mélanges à 650 nm, où aucun des deux biopolymères n'absorbe une partie de la radiation. La variation d'absorbance peut donc être uniquement corrélée à l'apparition de particules. Nous considérerons également que pour une valeur de pH donnée, une variation maximale de l'absorbance du mélange est corrélée avec un nombre maximum de particules formées et donc un maximum d'interaction entre les deux macromolécules (Koh et Tucker, 1988a).

Avant de décrire en détail les résultats obtenus, il nous paraît nécessaire de rappeler brièvement l'influence du pH et du ratio Pr : Ps sur la séparation de phase, en se basant sur l'article de synthèse de Mattisson et al. (1999). Lorsque l'on suit, en fonction du pH, la variation de turbidité d'un mélange protéine/polyélectrolyte/eau à un ratio Pr : Ps donné, deux pH remarquables peuvent être mis en évidence. Tout d'abord le  $pH_c$ , qui correspond à une légère variation de turbidité du mélange et qui traduit l'apparition de complexes macromoléculaires solubles. Il est essentiellement influencé par la force ionique. Lorsque l'on augmente le pH, on observe ensuite une forte variation de turbidité correspondant à  $pH_\phi$ . A cet instant précis, des coacervats insolubles se sont formés et la séparation de phase devient macroscopique. La valeur de  $pH_\phi$  est quant à elle dépendante du ratio Pr : Ps.

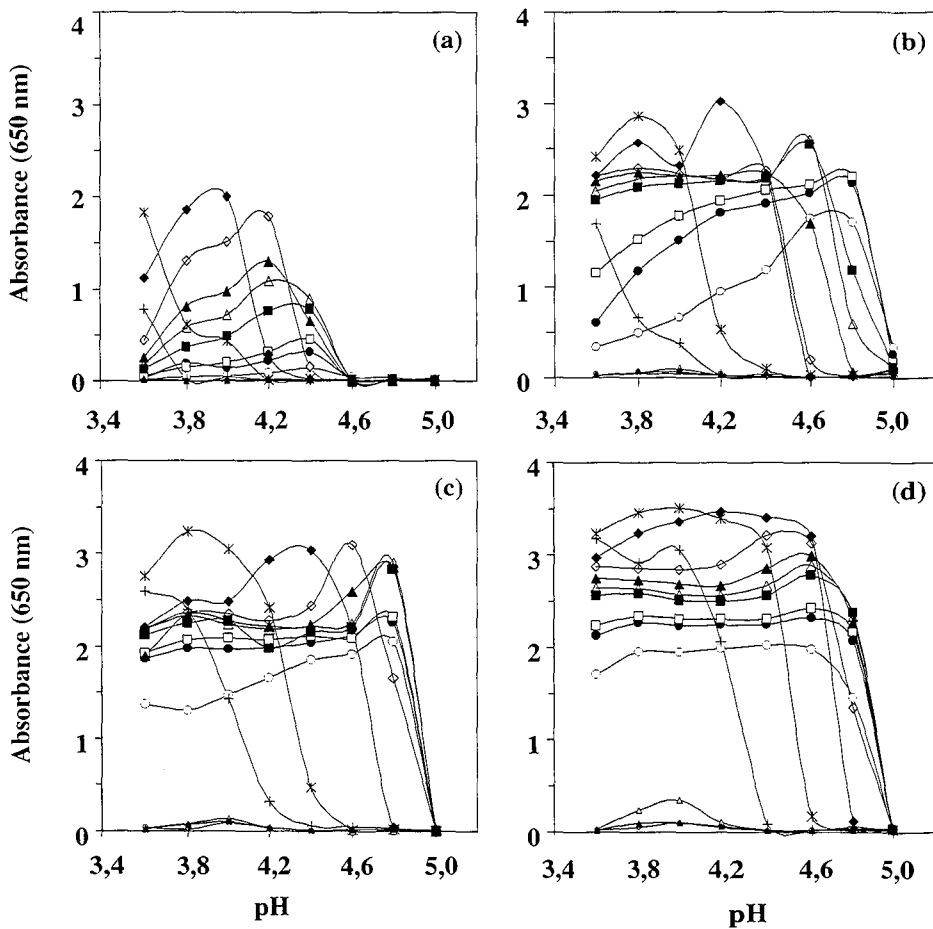
Les résultats de variation d'absorbance à 650 nm obtenus pour le mélange BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau à une concentration totale de 0,1% montrent qu'il n'y a pas d'interaction décelable par cette technique pour des pH supérieurs à 4,4, et ce indépendamment du ratio Pr : Ps considéré (Figure 3.4a). De plus, pour des ratios Pr : Ps compris entre 50 : 1 et 1 : 1, toutes les courbes présentent un maximum d'absorbance à pH 4,0 sauf le mélange obtenu pour le ratio Pr : Ps de 1 : 1 pour lequel le maximum semble se situer à un pH inférieur à 3,6. (Figure 3.4a). Le maximum de variation d'absorbance à pH 4,0 est obtenu pour le ratio Pr : Ps de 2 : 1. Ce maximum d'absorbance décroît ensuite inversement proportionnellement avec l'augmentation du ratio. Si l'on raisonne en terme d'apparition du  $pH_\phi$ , les résultats que nous avons obtenus diffèrent quelque peu des études classiques. Dans notre système, le  $pH_\phi$  est en effet indépendant du ratio Pr : Ps à une concentration totale en biopolymères de 0,1%.



**Figure 3.4 :** Evolution de l'absorbance à 650 nm des mélanges BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau à 20°C en fonction du pH à différentes concentrations totales en biopolymères : (a) 0,1% ; (b) 0,5% ; (c) 1,0% ; (d) 5%. Ratio Pr : Ps : (○) 50 : 1 ; (●) 25 : 1 ; (□) 20 : 1 ; (■) 10 : 1 ; (△) 8 : 1 ; (▲) 6 : 1 ; (◇) 4 : 1 ; (◆) 2 : 1 ; (◻) 1 : 1 ; (◼) 1 : 2 ; (◃) 1 : 6 ; (▲) 1 : 10 ; (◊) 1 : 20.

Lorsque la concentration totale en biopolymères est de 0,5%, la première différence marquante par rapport au cas précédent réside dans les niveaux plus élevés d'absorbance (Figure 3.4b). Ceci indique que l'augmentation de la concentration totale en biopolymères permet d'accroître le nombre de particules formées. L'évolution de  $\text{pH}_\phi$  diffère du cas précédent puisqu'il dépend du ratio Pr : Ps, avec cependant des valeurs limites. En effet, la valeur du pH de séparation de phase est d'autant plus faible que le ratio Pr : Ps est faible, mais ceci uniquement dans la gamme de ratios Pr : Ps comprise entre 1 : 1 et 8 : 1 (Figure 3.4b). Pour les ratios Pr : Ps inférieurs à 1 : 1, le  $\text{pH}_\phi$  n'est pas visible. En revanche pour des ratios supérieurs à 8 : 1, il se situe hors de notre gamme de pH. Cette évolution peut s'expliquer si l'on considère la neutralisation des complexes macromoléculaires formés. En effet, celle-ci ne nécessite pas une grande quantité de protéine si le pH est bas puisque la charge de la  $\beta$ -lg est alors largement positive. Par conséquent le  $\text{pH}_\phi$  est faible. En revanche, lorsque la protéine est

faiblement chargée, la neutralisation des complexes macromoléculaires nécessite un excès de  $\beta$ -lg, ce qui implique que le  $pH_0$  est élevé pour des ratios Pr : Ps élevés. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par d'autres auteurs si l'on considère la gamme de ratios Pr : Ps comprise entre 1 : 1 et 8 : 1. Le maximum d'absorbance obtenu dépend aussi du ratio Pr : Ps dans la gamme 1 : 1 à 8 : 1. Pour des ratios inférieurs, cette valeur n'a pas pu être déterminée. Lorsque les ratios Pr : Ps sont supérieurs à 8 : 1, le maximum d'absorbance est indépendant du pH et du ratio Pr : Ps, ce qui n'avait pour l'heure jamais été rapporté. Nous expliquons ce résultat par le fait qu'une fois atteint le pH de séparation de phase macroscopique, la neutralisation des complexes macromoléculaires n'est plus le facteur limitant de la séparation de phase, qui est alors essentiellement contrôlée par les interactions entre les particules formées.



**Figure 3.5 :** Evolution de l'absorbance à 650 nm des mélanges BLG/gomme d'acacia/eau à 20°C en fonction du pH à différentes concentrations totales en biopolymères : (a) 0,1% ; (b) 0,5% ; (c) 1,0% ; (d) 4,5%. Ratio Pr : Ps : (○) 50 : 1 ; (●) 25 : 1 ; (□) 20 : 1 ; (■) 10 : 1 ; (△) 8 : 1 ; (▲) 6 : 1 ; (◇) 4 : 1 ; (◆) 2 : 1 ; (\* ) 1 : 1 ; (+ ) 1 : 2 ; (△) 1 : 6 ; (▲) 1 : 10 ; (○) 1 : 20.



Pour une concentration totale en biopolymères de 1%, les résultats sont très similaires à ceux obtenus à 0,5% (Figure 3.4c). Cependant, l'apparition du  $pH_0$  n'est plus dépendante du ratio Pr : Ps que dans la gamme 1 : 1 à 4 : 1. Pour des ratios supérieurs, il est obtenu à des pH égaux ou supérieurs à 5,0. Comme précédemment, le maximum d'absorbance est indépendant du pH et du ratio pour des ratios Pr : Ps supérieurs à 6 : 1. Ces résultats, couplés aux résultats obtenus à 0,5% montrent clairement que l'augmentation de la concentration totale permet de contrôler l'influence du pH et du ratio Pr : Ps sur la séparation de phase.

Pour la dernière concentration totale en biopolymères testée, 5%, les évolutions de l'absorbance obtenues sont tout à fait différentes de celles observées à 0,5 et 1% (Figure 3.4d). En effet, dans ces conditions, il n'y a plus de maximum d'absorbance quel que soit le pH ou le ratio Pr : Ps.

La variation d'absorbance en fonction du pH a également été suivie dans les mélanges BLG/gomme d'acacia/eau (Figure 3.5). De façon surprenante, peu de différences sont obtenues par rapport au système quasiment monodisperse. Les principales variations entre les deux systèmes sont obtenues pour une concentration totale de 0,1%, pour laquelle le pH limite donnant lieu à une variation d'absorbance se trouve être de 4,6 au lieu de 4,4 précédemment (Figure 3.5a). Par la suite, l'augmentation de la concentration totale jusqu'à 4,5% produit les mêmes effets que dans le mélange  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau, à savoir, l'augmentation de l'absorbance ainsi que l'invariance de celle-ci pour des ratios compris entre 20 : 1 et 6 : 1 (Figure 3.5b, c, d). Ces résultats montrent que la polydispersité de la protéine n'influe pas sur la stabilité initiale du système mesurée au travers de son absorbance à 650 nm.

### 3.1.3 Observation de la séparation de phase après deux jours et étude de la composition des deux phases obtenues

Nous avons observé la séparation de phase après deux jours dans des tubes contenant les mélanges BLG/gomme d'acacia/eau à 4,5% et  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau à 5% à pH 3,6, 4,2 et 5,0.

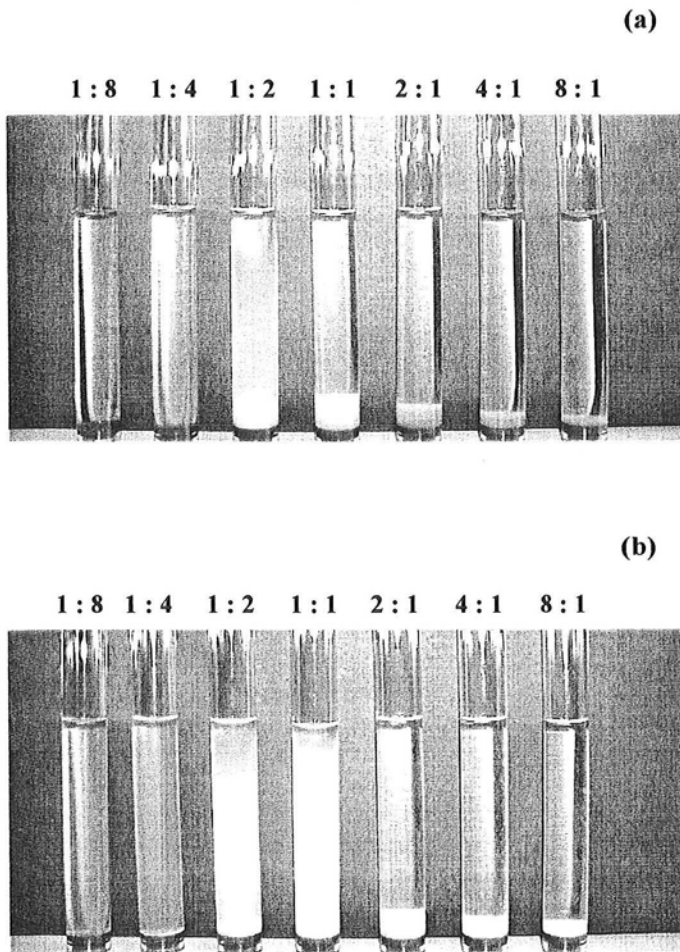
A partir des résultats d'absorbance présentés précédemment, les ratios Pr : Ps des mélanges étaient compris entre 1 : 8 et 8 : 1. De plus, nous avons déterminé les compositions relatives en protéine et en gomme d'acacia dans les différentes phases en fonction de la concentration totale en biopolymères. Dans le cas du mélange sans agrégats protéiques, seule la composition à pH 4,2 a été déterminée.

#### 3.1.3.1 Observation macroscopique de la séparation de phase

L'examen visuel des tubes après deux jours à pH 3,6 atteste de la présence de deux phases dont les volumes varient en fonction du ratio Pr : Ps (Figure 3.6a et b). Nous avons pu clairement différencier le système BLG/gomme d'acacia/eau (Figure 3.6a) du système  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau (Figure 3.6b) en étudiant le caractère solide ou liquide de la phase inférieure. Pour cela, les tubes ont été inclinés afin de vérifier la présence d'un ménisque. Dans le cas du mélange BLG/gomme d'acacia/eau, la phase inférieure est liquide, alors qu'il s'agit d'un semi-solide blanchâtre dans le mélange  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau. Ces observations confirment celles de Wang et al. (1999) qui précisent que lorsque l'interaction électrostatique est faible, la séparation de phase est de type liquide-liquide (BLG/gomme d'acacia/eau), alors qu'elle est plutôt de type liquide-solide si les interactions électrostatiques sont fortes ( $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau). Dans le cas de notre étude, la charge de surface des espèces protéiques présentes est supérieure dans la dispersion  $BLG_{agr}$  par rapport à la dispersion BLG. L'interaction électrostatique avec la gomme d'acacia sera

donc toujours plus intense dans le premier mélange. En plus de cet effet de la charge, la présence d'agrégats dans la dispersion  $BLG_{agr}$  est sans doute également à l'origine du caractère semi-solide de la phase inférieure.

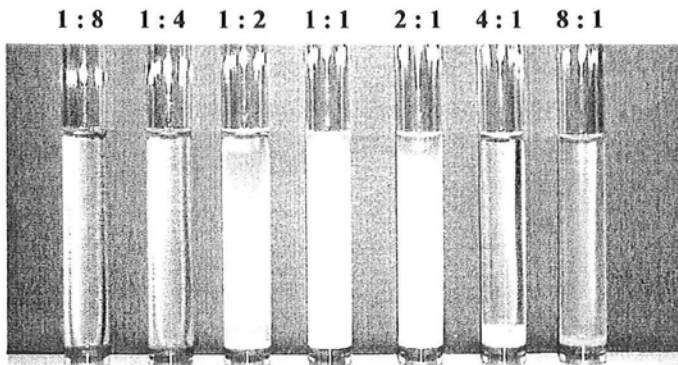
L'influence du ratio Pr : Ps a également été mise en évidence. Globalement, le volume de la phase inférieure diminue lorsque l'un des deux biopolymères est en excès (ratio 1 : 8 ou 8 : 1). Ces résultats à l'équilibre sont en accord avec les résultats de variation de l'absorbance des mélanges à 650 nm, puisque nous avons vu que pour les faibles pH, la variation d'absorbance était la plus importante dans la gamme de ratios Pr : Ps comprise entre 1 : 1 et 4 : 1. Certains ratios Pr : Ps (1 : 2 et 1 : 1) sont également caractérisés par un trouble persistant de la phase supérieure après deux jours (Figure 3.6a et b). Ceci indique la présence de particules solubles pour lesquelles les charges des deux biopolymères ne sont pas totalement neutralisées ou de particules de petite taille.



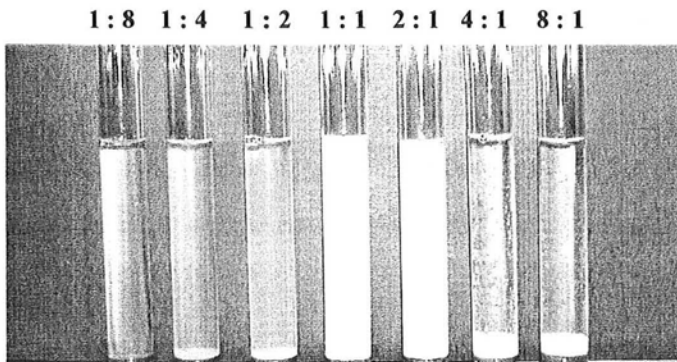
**Figure 3.6 :** Séparation de phase obtenue à différents ratios Pr : Ps de mélange, après 2 jours à pH 3,6 et 20°C. (a) mélange BLG/gomme d'acacia/eau à 4,5% ; (b) mélange  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau à 5%.

Le phénomène de séparation de phase présente quelques variations à pH 4,2 par rapport à pH 3,6 (Figure 3.7a et b). La phase inférieure obtenue est toujours liquide dans les mélanges BLG/gomme d'acacia/eau et semi-solide dans les mélanges BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau. En revanche, la zone de persistance du trouble de la phase supérieure se trouve déplacée vers des ratios Pr : Ps plus élevés (1 : 1 et 2 : 1) dans les deux types de mélanges. Ceci implique que la neutralisation complète des charges portées par les deux macromolécules n'est plus obtenue pour les mêmes ratios Pr : Ps qu'auparavant. Evidemment, l'explication de ce phénomène réside dans la diminution du nombre de charges portées par les molécules de  $\beta$ -lg à mesure que l'on augmente le pH. Le nombre de molécules de  $\beta$ -lg devant neutraliser une molécule de gomme d'acacia devient donc plus élevé, ce qui explique le déplacement constaté. Les tubes précédemment troubles se retrouvent donc clairs du fait de la solubilité des particules formées ou de la diminution de leur taille. Ces résultats sont en accord avec les mesures d'absorbance des mélanges à 650 nm, ce qui indique que la mesure de celle-ci juste après mélange peut permettre de prédire l'intensité de l'interaction entre les macromolécules après deux jours.

(a)

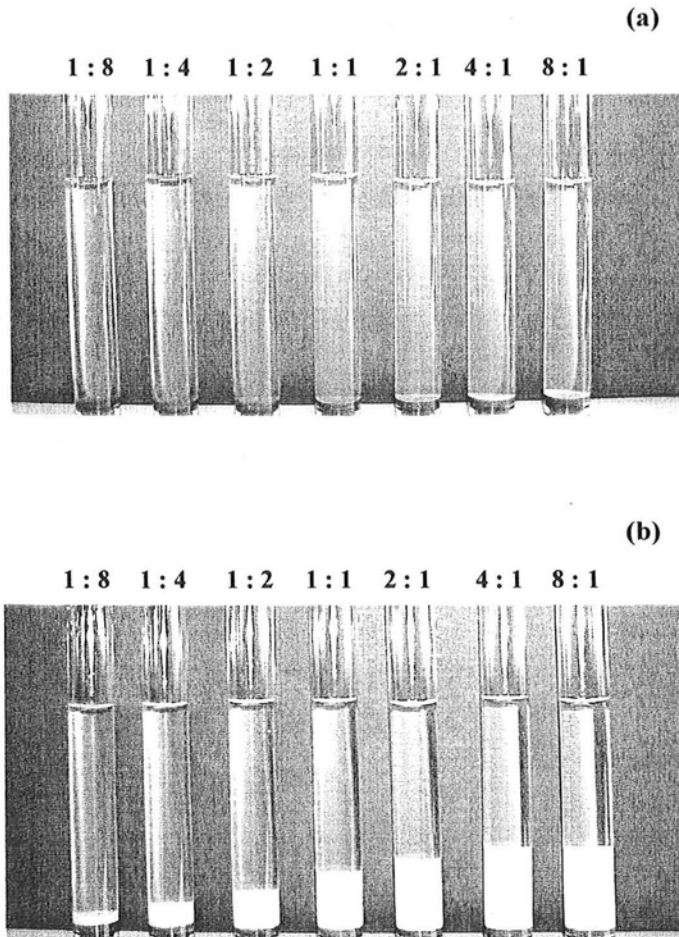


(b)



**Figure 3.7 :** Séparation de phase obtenue à différents ratios Pr : Ps de mélange, après 2 jours à pH 4,2 et 20°C. (a) mélange BLG/gomme d'acacia/eau à 4,5% ; (b) mélange BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau à 5%.

La Figure 3.8 présente les résultats obtenus lorsque le pH du mélange est de 5,0, soit près du  $pH_i$  de la  $\beta$ -lg. Dans ces conditions, le volume de la phase inférieure obtenue dans le mélange BLG/gomme d'acacia/eau est très faible et augmente avec le ratio Pr : Ps (Figure 3.8a). La phase supérieure est transparente à tous les ratios Pr : Ps, indiquant une neutralisation partielle des charges des deux macromolécules (complexes macromoléculaires solubles) ou une faible interaction entre les deux biopolymères. La valeur élevée de la concentration totale en biopolymères pourrait également avoir une influence puisqu'elle est supérieure à la concentration de suppression de la coacervation complexe déterminée à pH 4,2.



**Figure 3.8 :** Séparation de phase obtenue à différents ratios Pr : Ps de mélange, après 2 jours à pH 5,0 et 20°C. (a) mélange BLG/gomme d'acacia/eau à 4,5% ; (b) mélange BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau à 5%.

Le comportement de phase du mélange est totalement modifié lorsque des agrégats sont initialement présents dans la dispersion de  $\beta$ -lg (Figure 3.8b). Ainsi, une phase supérieure parfaitement translucide coexiste avec une phase inférieure semi-solide de couleur blanche.

Le volume de cette phase augmente proportionnellement avec l'augmentation du ratio de mélange Pr : Ps. L'explication de cette observation réside dans la précipitation des agrégats de  $\beta$ -lg présents dans la dispersion initiale de BLG<sub>agr.</sub>, après interaction avec la gomme d'acacia. Le nombre d'agrégats de  $\beta$ -lg augmentant avec l'augmentation du ratio, il est normal d'observer une phase inférieure ayant un volume plus élevé lorsque l'on considère des ratios Pr : Ps élevés.

### 3.1.3.2 Etude de la composition en $\beta$ -lactoglobuline et en gomme d'acacia des deux phases à l'équilibre thermodynamique

Les compositions des deux phases obtenues à l'équilibre thermodynamique ont été déterminées dans des mélanges BLG<sub>agr.</sub>/gomme d'acacia/eau à différents pH (3,6, 4,2 et 5,0), concentrations totales en biopolymères (0,1, 0,5, 1,0 et 5,0%) et ratios Pr : Ps (8 : 1, 2 : 1 et 1 : 1). Afin de considérer également l'influence de la polydispersité de la  $\beta$ -lg sur la composition des deux phases à l'équilibre, le mélange BLG/gomme d'acacia/eau a également été étudié à pH 4,2.

Il est tout d'abord notable que la solubilité de la  $\beta$ -lg seule varie entre 65 et 70% en fonction de la concentration totale (Tableau 3.1). Après interaction avec la gomme d'acacia à pH 3,6, 35 à 95% de la quantité initiale de protéine se retrouve dans la phase inférieure, selon le ratio Pr : Ps ou la concentration totale en biopolymères. On remarquera également que les compositions des mélanges à l'équilibre thermodynamique font apparaître une diminution de la teneur en protéine dans la phase inférieure lorsque la concentration totale en biopolymères augmente. Cette évolution se traduit par une augmentation globale du ratio Pr : Ps dans la phase supérieure. L'évolution la plus significative est obtenue à partir d'un ratio initial de mélange de 8 : 1. Dans ce cas, le ratio Pr : Ps dans la phase supérieure passe de 11 (à 0,1%) à 117 (à 5%) (Tableau 3.1).

On constate donc qu'à pH 3,6, où l'interaction électrostatique entre les deux macromolécules est favorisée, la concentration totale et le ratio de mélange ont une influence plus ou moins marquée sur la composition des deux phases en  $\beta$ -lg. En revanche, il est difficile d'imputer un effet de ces deux paramètres sur la composition des deux phases en gomme d'acacia.

**Tableau 3.1 :** Compositions des deux phases obtenues à 20°C après 2 jours pour des mélanges BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau à pH 3,6 et différentes concentrations totales en biopolymères.

Concentration totale en biopolymères (%)	Proportions de mélange de [gomme d'acacia]/([gomme d'acacia] + [β-Ig])	Répartition de la β-Ig dans les deux phases (%)		Répartition de la gomme d'acacia dans les deux phases (%)		Ratio protéine : polysaccharide dans les deux phases	
		Phase inférieure	Phase supérieure	Phase inférieure	Phase supérieure	Phase inférieure	Phase supérieure
		0.1	0	32 <sup>a</sup>	68 <sup>a</sup>	-	-
	11	88 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	91 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	7.00 <sup>a</sup>	11.00 <sup>a</sup>
	33	95 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup>	88 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>	2.20 <sup>b</sup>	0.87 <sup>b</sup>
	50	86 <sup>bg</sup>	14 <sup>b</sup>	92 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	0.93 <sup>c</sup>	1.75 <sup>c</sup>
	100	-	-	0 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	-	-
0.5	0	34 <sup>a</sup>	66 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11	79 <sup>dg</sup>	21 <sup>dg</sup>	67 <sup>c</sup>	33 <sup>d</sup>	8.50 <sup>d</sup>	5.00 <sup>d</sup>
	33	88 <sup>b</sup>	12 <sup>b</sup>	92 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	1.93 <sup>e</sup>	2.81 <sup>e</sup>
	50	76 <sup>d</sup>	24 <sup>d</sup>	68 <sup>c</sup>	32 <sup>d</sup>	1.11 <sup>f</sup>	0.75 <sup>f</sup>
	100	-	-	0 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	-	-
1.0	0	35 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11	42 <sup>c</sup>	58 <sup>c</sup>	91 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	3.36 <sup>e</sup>	51.00 <sup>e</sup>
	33	58 <sup>f</sup>	42 <sup>f</sup>	64 <sup>c</sup>	36 <sup>d</sup>	1.85 <sup>e</sup>	2.33 <sup>h</sup>
	50	82 <sup>e</sup>	18 <sup>e</sup>	76 <sup>d</sup>	24 <sup>e</sup>	1.07 <sup>f</sup>	0.75 <sup>f</sup>
	100	-	-	0 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	-	-
5.0	0	30 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11	47 <sup>c</sup>	53 <sup>c</sup>	96 <sup>a</sup>	4 <sup>f</sup>	3.56 <sup>e</sup>	116.50 <sup>i</sup>
	33	62 <sup>f</sup>	38 <sup>hf</sup>	64 <sup>c</sup>	36 <sup>d</sup>	1.96 <sup>e</sup>	2.15 <sup>j</sup>
	50	64 <sup>f</sup>	36 <sup>h</sup>	96 <sup>a</sup>	4 <sup>f</sup>	0.66 <sup>h</sup>	9.00 <sup>k</sup>
	100	-	-	0 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	-	-

a-k : des indices identiques affectés aux valeurs d'une même colonne n'indiquent aucune différence significative selon le test de Student-Fischer à un seuil de confiance de 0,05%.

A pH 4,2, l'influence de la concentration totale et du ratio de mélange sur la composition en β-Ig dans les phases obtenues après deux jours n'est visible qu'à 0,1% (Tableau 3.2). En revanche, le ratio Pr : Ps a une influence sur la composition des phases en gomme d'acacia, la teneur en gomme est toujours plus élevée dans la phase supérieure pour un ratio Pr : Ps de 1 : 1 quelle que soit la concentration totale en biopolymères, ce qui peut être corrélé avec la persistance d'un trouble dans les tubes observés précédemment.

**Tableau 3.2 :** Compositions des deux phases obtenues à 20°C après 2 jours pour des mélanges BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau à pH 4,2 et différentes concentrations totales en biopolymères.

Concentration totale en biopolymères (%)	Proportions de mélange (%)	Répartition de la $\beta$ -lg dans les deux phases (%)		Répartition de la gomme d'acacia dans les deux phases (%)		Ratio protéine : polysaccharide dans les deux phases	
		Phase inférieure	Phase supérieure	Phase inférieure	Phase supérieure	Phase inférieure	Phase supérieure
	[gomme d'acacia]/([gomme d'acacia] + [ $\beta$ -lg])						
0.1	0	62 <sup>a</sup>	38 <sup>ad</sup>	-	-	-	-
	11	85 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	54 <sup>a</sup>	46 <sup>a</sup>	11.53 <sup>a</sup>	2.36 <sup>a</sup>
	33	83 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	81 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	2.03 <sup>b</sup>	2.00 <sup>b</sup>
	50	76 <sup>c</sup>	24 <sup>c</sup>	8 <sup>c</sup>	92 <sup>c</sup>	9.50 <sup>c</sup>	0.26 <sup>c</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	-	-
0.5	0	60 <sup>a</sup>	40 <sup>d</sup>	-	-	-	-
	11	65 <sup>ac</sup>	35 <sup>ad</sup>	82 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	5.91 <sup>d</sup>	13.63 <sup>d</sup>
	33	73 <sup>c</sup>	27 <sup>c</sup>	73 <sup>c</sup>	27 <sup>c</sup>	2.00 <sup>b</sup>	2.11 <sup>b</sup>
	50	76 <sup>c</sup>	26 <sup>c</sup>	6 <sup>c</sup>	94 <sup>c</sup>	12.67 <sup>e</sup>	0.25 <sup>c</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	-	-
1.0	0	57 <sup>d</sup>	43 <sup>d</sup>	-	-	-	-
	11	59 <sup>d</sup>	41 <sup>d</sup>	81 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	5.36 <sup>f</sup>	15.65 <sup>e</sup>
	33	66 <sup>ac</sup>	34 <sup>a</sup>	71 <sup>c</sup>	29 <sup>c</sup>	1.91 <sup>b</sup>	2.30 <sup>f</sup>
	50	64 <sup>ac</sup>	36 <sup>a</sup>	9 <sup>c</sup>	91 <sup>c</sup>	7.11 <sup>g</sup>	0.39 <sup>g</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	-	-
5.0	0	67 <sup>ac</sup>	33 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11	59 <sup>d</sup>	41 <sup>d</sup>	79 <sup>b</sup>	21 <sup>b</sup>	5.48 <sup>f</sup>	14.28 <sup>h</sup>
	33	69 <sup>e</sup>	31 <sup>a</sup>	68 <sup>f</sup>	32 <sup>c</sup>	2.06 <sup>b</sup>	1.96 <sup>b</sup>
	50	64 <sup>ac</sup>	39 <sup>d</sup>	20 <sup>g</sup>	80 <sup>f</sup>	3.04 <sup>h</sup>	0.49 <sup>i</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	-	-

a-i : des indices identiques affectés aux valeurs d'une même colonne n'indiquent aucune différence significative selon le test de Student-Fischer à un seuil de confiance de 0,05%.

On notera que pour un ratio de mélange initial de 2 : 1 et quelle que soit la concentration totale en biopolymères, on retrouve un ratio Pr : Ps voisin de 2 : 1 dans les phases après deux jours. Des résultats similaires ont été obtenus pour le système gélatine/gomme d'acacia/eau par Bungenberg de Jong (1949). Ce dernier a estimé que ce résultat constitue une preuve tangible que le système se trouve alors dans les conditions où l'interaction entre les deux biopolymères est d'intensité maximale.

Considérons à présent les résultats obtenus à pH 5,0, où l'insolubilisation de la  $\beta$ -lg est proche de 65%. Comme cela a déjà été noté à pH 4,2, il est difficile de conclure à quelque effet que ce soit de la concentration totale en biopolymères ou du ratio initial de mélange (Tableau 3.3). On notera cependant ici que 15 à 45% de gomme d'acacia se retrouvent tout de même dans la phase inférieure, alors qu'*a priori* le pH n'est pas favorable à l'interaction entre les deux biopolymères.

**Tableau 3.3 :** Compositions des deux phases obtenues à 20°C après 2 jours pour des mélanges BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau à pH 5,0 et différentes concentrations totales en biopolymères.

Concentration totale en biopolymères (%)	Proportions de mélange (%)	Répartition de la $\beta$ -lg dans les deux phases (%)		Répartition de la gomme d'acacia dans les deux phases (%)		Ratio protéine : polysaccharide dans les deux phases	
		Phase inférieure	Phase supérieure	Phase inférieure	Phase supérieure	Phase inférieure	Phase supérieure
		[gomme d'acacia]/([gomme d'acacia] + [ $\beta$ -lg])					
0.1	0	65 <sup>ad</sup>	35 <sup>ai</sup>	-	-	-	-
	11	82 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>	45 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>	13.30 <sup>a</sup>	2.42 <sup>a</sup>
	33	76 <sup>c</sup>	24 <sup>c</sup>	15 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	10.20 <sup>b</sup>	0.57 <sup>b</sup>
	50	68 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>	28 <sup>c</sup>	72 <sup>c</sup>	2.42 <sup>c</sup>	0.44 <sup>c</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	-	-
0.5	0	63 <sup>ad</sup>	37 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11	60 <sup>de</sup>	40 <sup>df</sup>	27 <sup>c</sup>	73 <sup>c</sup>	16.30 <sup>d</sup>	4.02 <sup>d</sup>
	33	65 <sup>ad</sup>	35 <sup>a</sup>	19 <sup>eg</sup>	81 <sup>b</sup>	6.93 <sup>e</sup>	0.88 <sup>e</sup>
	50	64 <sup>ad</sup>	36 <sup>a</sup>	28 <sup>c</sup>	72 <sup>c</sup>	2.28 <sup>c</sup>	0.50 <sup>f</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	-	-
1.0	0	60 <sup>de</sup>	40 <sup>df</sup>	-	-	-	-
	11	56 <sup>c</sup>	44 <sup>dg</sup>	24 <sup>c</sup>	76 <sup>c</sup>	17.12 <sup>f</sup>	4.62 <sup>e</sup>
	33	60 <sup>d</sup>	40 <sup>df</sup>	46 <sup>a</sup>	54 <sup>c</sup>	2.65 <sup>g</sup>	1.50 <sup>h</sup>
	50	57 <sup>c</sup>	43 <sup>d</sup>	35 <sup>f</sup>	65 <sup>f</sup>	1.62 <sup>h</sup>	0.66 <sup>i</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	-	-
5.0	0	61 <sup>de</sup>	39 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11	57 <sup>c</sup>	43 <sup>dg</sup>	26 <sup>c</sup>	74 <sup>c</sup>	16.07 <sup>d</sup>	4.26 <sup>f</sup>
	33	52 <sup>c</sup>	48 <sup>eg</sup>	15 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>	7.05 <sup>i</sup>	1.14 <sup>h</sup>
	50	54 <sup>c</sup>	46 <sup>dg</sup>	22 <sup>cg</sup>	78 <sup>c</sup>	2.46 <sup>g</sup>	0.58 <sup>h</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	-	-

a-k : des indices identiques affectés aux valeurs d'une même colonne n'indiquent aucune différence significative selon le test de Student-Fischer à un seuil de confiance de 0.05%.



En résumé, les résultats précédents, en particulier à pH 3,6, ont mis en évidence l'influence des paramètres classiques comme le pH, le ratio Pr : Ps et la concentration totale en biopolymères sur la coacervation complexe entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia. Cependant, ces effets sont nettement moins marqués au fur et à mesure que l'insolubilisation de la  $\beta$ -lg augmente. On peut donc émettre l'hypothèse que la composition du système après 2 jours est contrôlée par la polydispersité de la protéine à des pH où l'interaction entre les deux biopolymères est limitée.

**Tableau 3.4 :** Compositions des deux phases obtenues à 20°C après 2 jours pour des mélanges BLG/gomme d'acacia/eau à pH 4,2 et différentes concentrations totales en biopolymères.

Concentration totale en biopolymères (%)	Proportions de mélange (%)	Répartition de la $\beta$ -lg dans les deux phases (%)		Répartition de la gomme d'acacia dans les deux phases (%)		Ratio protéine : polysaccharide dans les deux phases	
		Phase inférieure	Phase supérieure	Phase inférieure	Phase supérieure	Phase inférieure	Phase supérieure
	[gomme d'acacia]/ ([gomme d'acacia] + [ $\beta$ -lg])						
0.1	0	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11	9 <sup>b</sup>	91 <sup>bf</sup>	9 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	5.30 <sup>a</sup>	10.44 <sup>a</sup>
	33	14 <sup>cd</sup>	86 <sup>cd</sup>	67 <sup>b</sup>	33 <sup>bc</sup>	0.52 <sup>b</sup>	6.29 <sup>b</sup>
	50	18 <sup>ce</sup>	82 <sup>ce</sup>	80 <sup>c</sup>	20 <sup>d</sup>	0.09 <sup>c</sup>	4.68 <sup>c</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	-	-
0.5	0	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11	5 <sup>f</sup>	95 <sup>f</sup>	67 <sup>b</sup>	33 <sup>bc</sup>	2.63 <sup>d</sup>	18.70 <sup>d</sup>
	33	10 <sup>b</sup>	90 <sup>b</sup>	82 <sup>c</sup>	18 <sup>d</sup>	0.43 <sup>e</sup>	10.11 <sup>ac</sup>
	50	20 <sup>eg</sup>	80 <sup>c</sup>	81 <sup>c</sup>	19 <sup>d</sup>	0.45 <sup>e</sup>	3.87 <sup>f</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	-	-
1.0	0	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11	12 <sup>bc</sup>	88 <sup>bd</sup>	9 <sup>a</sup>	91 <sup>a</sup>	18.28 <sup>f</sup>	7.75 <sup>e</sup>
	33	22 <sup>e</sup>	78 <sup>c</sup>	55 <sup>c</sup>	45 <sup>f</sup>	0.81 <sup>e</sup>	3.56 <sup>h</sup>
	50	32 <sup>h</sup>	68 <sup>g</sup>	64 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>	0.37 <sup>h</sup>	2.14 <sup>i</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	-	-
3.0	0	0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11	9 <sup>b</sup>	91 <sup>b</sup>	27 <sup>f</sup>	73 <sup>e</sup>	2.89 <sup>j</sup>	9.97 <sup>e</sup>
	33	16 <sup>de</sup>	84 <sup>c</sup>	70 <sup>g</sup>	30 <sup>c</sup>	0.58 <sup>bk</sup>	5.36 <sup>j</sup>
	50	40 <sup>i</sup>	60 <sup>h</sup>	55 <sup>e</sup>	45 <sup>f</sup>	0.61 <sup>k</sup>	2.14 <sup>i</sup>
	100	-	-	0 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	-	-

a-k : des indices identiques affectés aux valeurs d'une même colonne n'indiquent aucune différence significative selon le test de Student-Fischer à un seuil de confiance de 0.05%.

Nous avons donc étudié l'influence de la diminution de la polydispersité de la  $\beta$ -lg sur la composition des deux phases obtenues à l'équilibre thermodynamique à pH 4,2 afin de tester cette hypothèse (Tableau 3.4). La première constatation qui peut être faite est que la phase supérieure est globalement enrichie en protéine alors que la phase inférieure contient plus de gomme d'acacia. Ces observations sont tout à fait à l'inverse de ce que nous avons trouvé pour la dispersion de  $\beta$ -lg contenant des agrégats, ce qui constitue une preuve supplémentaire de l'influence de la polydispersité sur la séparation de phase. En détaillant plus spécifiquement les résultats, il apparaît que la concentration totale ou le ratio Pr : Ps n'ont pas d'effet marqué sur la composition des deux phases obtenues à l'équilibre. Cependant, il convient de noter les résultats particuliers obtenus pour le ratio 1 : 1, pour lequel la teneur en  $\beta$ -lg augmente dans la phase inférieure avec l'augmentation de la concentration totale, et inversement pour la gomme d'acacia (Tableau 3.4). Ce résultat est intéressant, car il peut être rapproché des mesures d'absorbance ou d'observation de la séparation de phase pour lesquelles nous avons noté un maximum d'interaction entre les macromolécules à ce ratio spécifique. Cette ségrégation préférentielle des deux biopolymères dans des phases différentes peut également indiquer que le système passe d'une séparation de phase associative à une séparation de phase ségrégative.

### 3.1.4 Conclusion de l'étude macroscopique de la séparation de phase dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

L'étude macroscopique de la compatibilité entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia en solution aqueuse a permis de mettre en évidence un phénomène de séparation de phase par coacervation complexe.

La construction de diagrammes de phases partiels ainsi que le suivi de l'absorbance à 650 nm des mélanges aux différents pH, ratios et concentrations totales en biopolymères ont mis en évidence l'influence de ces paramètres sur le processus d'interaction électrostatique entre les deux macromolécules. Les effets les plus classiques concernant le pH et le ratio Pr : Ps résident dans le degré de neutralisation des charges portées par les deux biopolymères, ce qui permet de moduler l'intensité de la séparation de phase. On peut d'ailleurs noter que les différentes mesures d'absorbance à 650 nm, observation macroscopique de la séparation de phase et mesures des compositions des deux phases à l'équilibre donnent des résultats très proches concernant les valeurs des pH et ratios pour lesquels l'interaction entre les deux macromolécules est maximale. Ainsi, le ratio de mélange de 2 : 1 constitue l'optimum d'interaction à pH 4,2 dans le mélange BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau, puisque le même ratio Pr : Ps est obtenu dans les deux phases après deux jours. Si l'on excepte les résultats obtenus à une concentration totale en biopolymères de 0,1%, ce ratio correspond également à la variation maximale d'absorbance à 650 nm à pH 4,2 et à la présence d'une phase inférieure présentant un volume important dans le tube contenant le mélange après 2 jours.

Il apparaît cependant que l'effet classiquement observé du pH et du ratio Pr : Ps dépend fortement de la concentration totale en biopolymères et surtout de la polydispersité de la  $\beta$ -lg. En particulier, nous avons clairement montré que :

- une augmentation de la concentration totale en biopolymères permet de diminuer l'effet du ratio Pr : Ps sur l'apparition du pH de séparation de phase macroscopique du système pH $\phi$ .

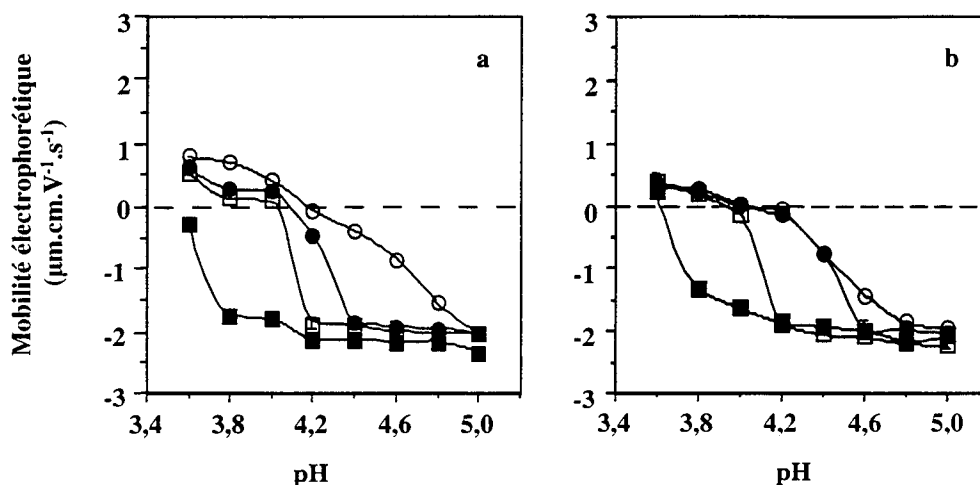
- une augmentation de la polydispersité de la  $\beta$ -lg permet d'augmenter de façon importante la concentration limite de suppression de la coacervation complexe (20% par rapport à 4,5% sans agrégats à pH 4,2). De plus, couplée aux effets du pH et du ratio Pr : Ps, la polydispersité est un moyen de contrôler l'état physique (liquide ou semi-solide) de la phase concentrée en biopolymères obtenue après deux jours. Enfin, en présence d'agrégats protéiques, l'analyse de la composition des 2 phases obtenues après deux jours montre que des proportions importantes de gomme d'acacia sont retrouvées dans la phase inférieure à des pH proches du  $pH_i$  de la  $\beta$ -lg. Comme l'interaction électrostatique entre les deux biopolymères est limitée, ce résultat peut refléter un phénomène d'interaction entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia pouvant ne pas être directement lié à la coacervation complexe (adsorption de la gomme par exemple).

### 3.2 Etude mésoscopique de la séparation de phase dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

Après cette étude macroscopique, nous avons caractérisé l'échelle mésoscopique de la séparation de phase (0,1  $\mu\text{m}$  à 1000  $\mu\text{m}$ ). Les propriétés de surface des particules obtenues ont été déterminées par la mesure de leur mobilité électrophorétique. Nous avons ensuite déterminé à pH 4,2 les tailles et les distributions de taille des particules par granulométrie laser, ainsi que leur morphologie et leur structure en utilisant la microscopie optique à contraste de phase (MOCP) et la microscopie confocale à balayage laser (MCBL).

#### 3.2.1 Mobilité électrophorétique des particules obtenues dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

Lorsque l'on suit l'évolution de la mobilité électrophorétique des particules obtenues en fonction du pH dans la dispersion  $\text{BLG}_{\text{agr}}/\text{gomme d'acacia/eau}$ , on note une influence du ratio Pr : Ps sur l'allure des courbes obtenues (Figure 3.9). Lorsque le ratio Pr : Ps est élevé (8 : 1), l'évolution de  $\mu_E$  est quasiment linéaire et décroissante en fonction du pH, ce qui rappelle les résultats obtenus pour la protéine seule (Chap. 2, § 4.4). Cette évolution de  $\mu_E$  réside dans la diminution du nombre de charges positives portées par la protéine lorsque l'on se rapproche de son  $pH_i$ . Si l'on excepte ce ratio particulier, c'est globalement la gomme d'acacia qui contrôle la  $\mu_E$  des particules obtenues, puisque l'on se rapproche de la  $\mu_E$  de la gomme d'acacia lorsque le pH augmente (Figure 3.9a). Dans ces conditions, le nombre de molécules de  $\beta$ -lg nécessaire pour neutraliser la charge de la gomme d'acacia n'est pas suffisant. Ceci explique en particulier, lorsque le ratio Pr : Ps est défavorable à la  $\beta$ -lg, la chute d'autant plus rapide de  $\mu_E$  pour atteindre une valeur constante de - 2 e.m.u. (valeur obtenue pour la gomme d'acacia seule). On notera que pour les ratios Pr : Ps de 8 : 1, 4 : 1 et 2 : 1, la mobilité électrophorétique des particules est nulle autour de pH 4,0 - 4,2, ce qui implique que la neutralisation des charges est totale dans ces conditions.



**Figure 3.9 :** Mobilité électrophorétique en fonction du pH mesurée à 20°C sur des mélanges BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau (a) et BLG/gomme d'acacia/eau (b) obtenus à une concentration totale de 0,1%. Ratio Pr : Ps (○) 8 : 1 ; (●) 4 : 1 ; (□) 2 : 1 ; (■) 1 : 1.

Dans le cas des mélanges BLG/gomme d'acacia/eau, l'évolution de  $\mu_E$  est très proche de celle obtenue précédemment. Quel que soit le ratio Pr : Ps de départ, la  $\mu_E$  diminue au fur et à mesure que l'on se rapproche du  $pH_i$  de la  $\beta$ -lg. Elle atteint comme dans le mélange précédent une valeur proche de celle de la gomme seule, environ - 2 e.m.u. à pH 5.0. Ceci traduit une diminution de la contribution de la mobilité de la protéine dans la mobilité globale des particules, et ceci même pour des ratios très favorables à la protéine (Figure 3.9b). On distingue ici clairement l'effet de la réduction de la charge des espèces protéiques présentes après élimination des agrégats puisque la valeur de  $\mu_E$  obtenue à pH 3,6 au ratio 8 : 1 est de + 0,4 e.m.u. alors qu'elle était de + 0,8 e.m.u. en présence d'agrégats.

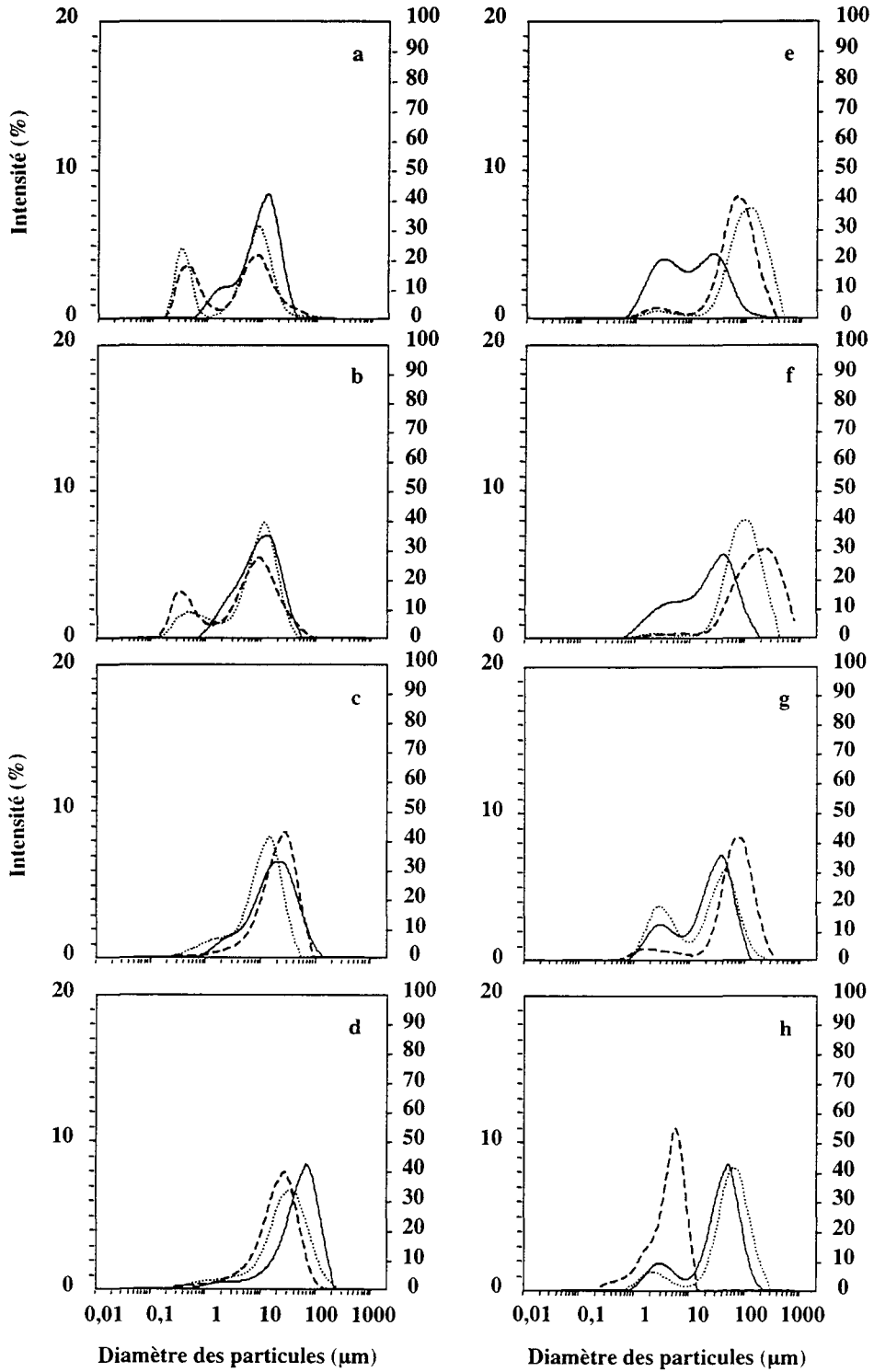
L'obtention d'une valeur de  $\mu_E$  proche de celle de la gomme d'acacia lorsque le ratio est défavorable à la protéine ou lorsque l'on se rapproche du  $pH_i$  de la  $\beta$ -lg indique que la gomme d'acacia est directement en contact avec le solvant. Celle-ci se trouve à la surface des particules formées, indépendamment de la polydispersité de la dispersion de  $\beta$ -lg. En combinant ces résultats avec les compositions des phases à l'équilibre thermodynamique dans le mélange BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau pour des pH élevés, où nous avons remarqué la présence de gomme d'acacia dans la phase inférieure, on peut envisager une interaction spécifique de la gomme d'acacia à la surface des agrégats protéiques.

### 3.2.2 Tailles et distributions de taille des particules obtenues après séparation de phase dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

Après avoir mesuré les propriétés de surface des particules obtenues, nous nous sommes intéressés à leur taille et à leur structure afin de mettre en évidence une éventuelle différence entre les deux types de mélanges, liée à la polydispersité de la  $\beta$ -lg. Les tailles et distributions de taille des particules obtenues à pH 4,2 dans les mélanges BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau et BLG/gomme d'acacia/eau ont été caractérisées par granulométrie laser.

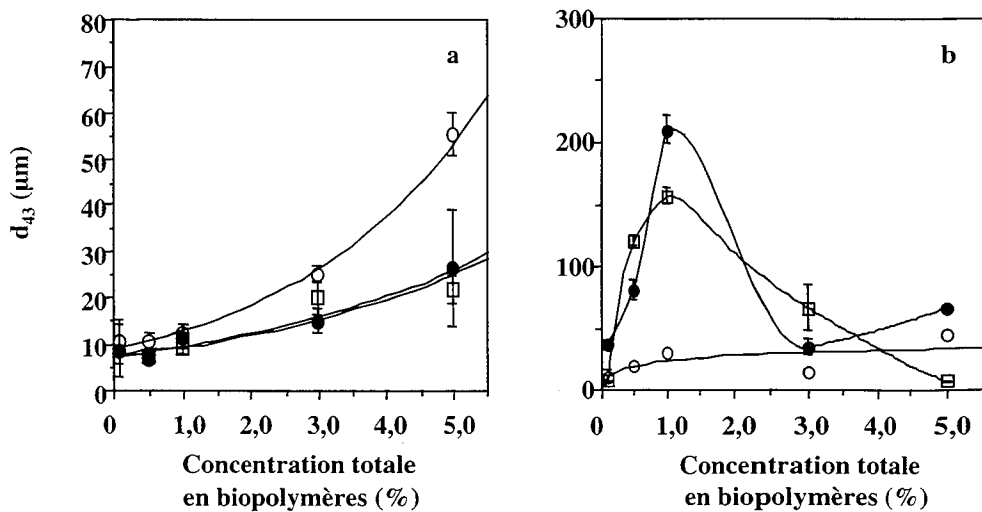
L'évolution de la distribution de taille en volume des particules obtenues dans les dispersions BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau en fonction de la concentration totale en biopolymères, est présentée sur la figure 3.10a-d. La distribution de taille des particules est bimodale indépendamment du ratio de mélange et de la concentration totale en biopolymères. Le pic principal regroupe des particules dont la taille varie entre 5 et 200  $\mu\text{m}$  alors que le pic d'intensité la plus basse comprend des particules dont la taille varie entre 100 nm et 1  $\mu\text{m}$  (Figure 3.10a-d). Ce type de distribution de taille rappelle celle obtenue pour les agrégats de  $\beta$ -lg décrite dans le chapitre 2, § 4.3.2. L'intensité maximale du pic regroupant les grandes particules évolue peu (intensité relative entre 30 et 40%) avec l'augmentation de la concentration totale en biopolymères. Par contre, ce pic se déplace vers des tailles de particules plus importantes au ratio Pr : Ps de 8 : 1 lorsque la concentration totale en biopolymères augmente. Les distributions de taille obtenues pour les ratios Pr : Ps de 2 : 1 et 1 : 1 sont quasiment identiques. La distribution en nombre des particules (résultats non montrés) fait état d'une faible augmentation de la taille lorsque la concentration totale augmente. Celle-ci est indépendante du ratio Pr : Ps et varie de 0,31  $\mu\text{m}$  à 2,72  $\mu\text{m}$  pour des concentrations totales en biopolymères variant de 0,5 à 5%, respectivement. Si l'on considère l'évolution du diamètre moyen volumique  $d_{4,3}$  des particules, il existe une relation de type exponentielle entre la concentration totale en biopolymères et le  $d_{4,3}$  mesuré des particules (Figure 3.11a). Celui-ci est d'autant plus élevé que la concentration totale en biopolymères est élevée, mais également que le ratio Pr : Ps de mélange est favorable à la protéine. Si le  $d_{4,3}$  mesuré à 0,1% est de 8-10  $\mu\text{m}$  dans tous les mélanges (ce qui correspond au  $d_{3,2}$  des agrégats de  $\beta$ -lg déterminé dans le chap. 2, § 4.3.2), le diamètre final obtenu pour le ratio 8 : 1 est de 50  $\mu\text{m}$  à 5%, alors qu'il n'est que de 20  $\mu\text{m}$  pour les deux autres ratios. Il semble ici évident que l'état d'agrégation, mais également le nombre d'agrégats présents dans le mélange initial, permettent de contrôler la taille des particules obtenues après interaction entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia en milieu aqueux.

**Figure 3.10 :** Distributions de taille en volume des particules obtenues après mélange de dispersions BLG/gomme d'acacia/eau et BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau à pH 4,2 et 20°C. BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia (a) 0,5% ; (b) 1,0% ; (c) 3,0% ; (d) 5,0%. BLG/gomme d'acacia (e) 0,5% ; (f) 1,0% ; (g) 3,0% ; (h) 5,0%. Ratio Pr : Ps (—) 8 : 1 ; (.....) 2 : 1 ; (---) 1 : 1.



Les distributions de taille en volume des particules obtenues dans le système BLG/gomme d'acacia/eau sont également bimodales, quels que soient la concentration initiale en biopolymères ou le ratio de mélange (Figure 3.10e-h). En revanche, il semble que contrairement aux mélanges précédents, il y ait une influence spécifique de la concentration totale en biopolymères et du ratio Pr : Ps de mélange sur la taille des particules obtenues.

Si l'on s'intéresse à l'influence du ratio Pr : Ps, une augmentation de l'intensité du pic correspondant aux particules de plus grand diamètre (diamètre moyen de l'ordre de 25  $\mu\text{m}$ ) est visible pour le ratio 8 : 1, puisque celui-ci passe de 20% d'intensité relative à une concentration de 0,5% à une intensité relative proche de 45% à une concentration de 5%. Le diamètre moyen des particules reste cependant constant autour de 25  $\mu\text{m}$ . L'intensité du second pic tend à diminuer lorsque la concentration totale augmente, ce qui pourrait laisser penser que les deux phénomènes sont liés.



**Figure 3.11 :** Variation du diamètre  $d_{43}$  des particules en fonction de la concentration totale en biopolymères dans les systèmes BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau (a) et BLG/gomme d'acacia/eau (b) à pH 4,2 et 20°C. Ratio Pr : Ps (○) 8:1 ; (●) 2:1 ; (□) 1:1. Les barres d'erreur représentent l'écart type correspondant à la détermination de la valeur moyenne du  $d_{43}$ .

Pour le ratio 2 : 1, l'intensité du pic des particules de plus grande taille (environ 100  $\mu\text{m}$ ) reste stable lorsque la concentration augmente (environ 40%). En revanche, celle du pic secondaire (1  $\mu\text{m}$ ) est sujette à des variations plus importantes, en particulier pour une concentration totale de 3% où l'intensité se trouve doublée par rapport à 5% et quintuplée par rapport à 0,5 et 1%. La stabilité et la polydispersité en taille des particules obtenues à ce ratio sont donc très variables.

Pour le ratio Pr : Ps de 1 : 1, la variation de l'intensité et de la position du pic d'intensité maximale est très aléatoire (Figure 3.10e-h). Celui-ci se déplace en effet vers des particules de grande taille (200  $\mu\text{m}$ ) à 1%, puis se situe à 90  $\mu\text{m}$  à 3%, et en dessous de 10  $\mu\text{m}$  à 5%, avec toutefois une intensité beaucoup plus élevée. Ces différentes variations de taille sont aisément visibles si l'on considère l'évolution du  $d_{43}$  des particules en fonction de la concentration totale en biopolymères (Figure 3.11b). En particulier, pour les ratios Pr : Ps où les interactions

sont maximales, la taille des particules est contrôlée par la concentration totale en biopolymères, puisqu'elle est faible pour des concentrations de 0,1%, augmente considérablement entre 0,5 et 2%, puis redevient faible à forte concentration en biopolymères. La distribution en nombre des mêmes particules (résultats non montrés) est caractérisée par une augmentation de leur taille avec l'augmentation de la concentration totale, 90% des particules ayant un diamètre compris entre 0,54 et 2,74  $\mu\text{m}$  pour des concentrations totales en biopolymères de 0,1 et 5%, respectivement (indépendamment du ratio Pr : Ps). Ces résultats sont très proches de ceux obtenus dans le mélange  $\text{BLG}_{\text{agr}}/\text{gomme d'acacia/eau}$ .

### 3.2.3 Structure et morphologie des particules obtenues après séparation de phase dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

Nous avons tout d'abord étudié la structure et la morphologie des particules par microscopie optique à contraste de phase (MOCP). Ces observations ont été ensuite complétées par des micrographies obtenues par microscopie confocale à balayage laser (MCBL) après marquage des deux biopolymères à l'aide de sondes fluorescentes. Ceci permet d'obtenir une meilleure résolution de l'image et, *a priori*, la localisation des deux macromolécules.

#### 3.2.3.1 Microscopie optique à contraste de phase

Lorsque l'on observe les mélanges contenant ou non des agrégats de  $\beta$ -lg, la première différence réside dans la présence de deux types de particules dans le mélange  $\text{BLG}_{\text{agr}}/\text{gomme d'acacia/eau}$  alors qu'un seul type de particules caractérise le système  $\text{BLG}/\text{gomme d'acacia/eau}$  (Figure 3.12).

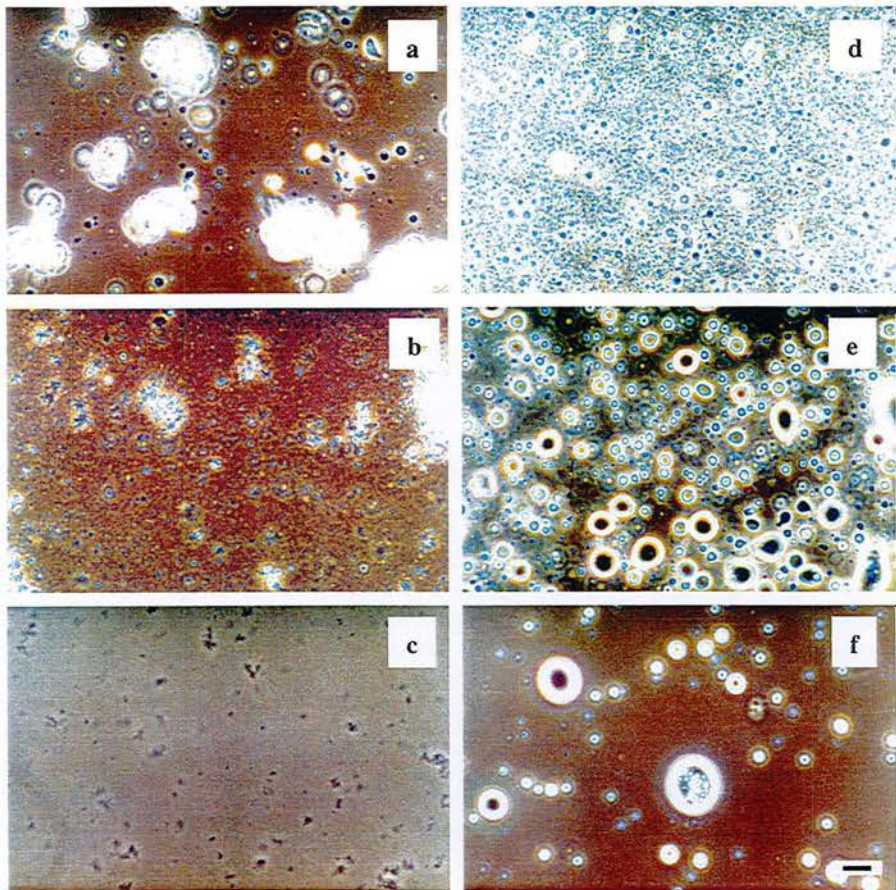
#### *Structure des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau*

Dans le mélange  $\text{BLG}_{\text{agr}}(8)/\text{gomme d'acacia}(1)/\text{eau}$ , on distingue des particules dont le diamètre apparent ( $d_{\text{app}}$ ) varie de 5 à 60  $\mu\text{m}$ , caractérisées par une structure agrégée. D'autres particules ayant des  $d_{\text{app}}$  de l'ordre du  $\mu\text{m}$  et de forme sphérique sont également visibles. Lorsque le ratio de mélange est de 2 : 1, le nombre de particules obtenu est beaucoup plus important qu'au ratio précédent, ce qui indique à nouveau que l'interaction entre les biopolymères est plus importante dans ces conditions (Figure 3.12b). On observe également ici des particules ayant une structure agrégée et dont le  $d_{\text{app}}$  est de l'ordre de 20 à 30  $\mu\text{m}$ . Des particules de petite taille et de forme sphérique sont présentes en plus grand nombre. Dans le mélange  $\text{BLG}_{\text{agr}}(1)/\text{gomme d'acacia}(1)/\text{eau}$ , on ne distingue plus que des particules agrégées dont le  $d_{\text{app}}$  varie entre 5 et 10  $\mu\text{m}$  (Figure 3.12c). Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus par granulométrie laser dans les mêmes mélanges, la concordance entre les deux techniques expérimentales est bonne. En effet, la taille des particules est semblable ( $d_{\text{app}} \sim d_{43}$ ) et augmente avec le ratio Pr : Ps. Ces résultats sont également une indication du faible effet de la dilution des échantillons sur la taille des particules lors des mesures granulométriques.

Dans le système  $\text{BLG}/\text{gomme d'acacia/eau}$ , la différence majeure avec les mélanges précédents réside dans le fait que toutes les particules sont sphériques, rappelant les coacervats présentés dans le chapitre 1 (Figure 3.12d-f). Tous les ratios testés sont également caractérisés par une grande polydispersité de taille des particules obtenues. Dans le système  $\text{BLG}(8)/\text{gomme d'acacia}(1)/\text{eau}$ , le diamètre apparent des particules varie de 1  $\mu\text{m}$  à 20  $\mu\text{m}$ , un grand nombre de particules ayant des tailles intermédiaires (Figure 3.12d). Pour le ratio Pr : Ps de 2 : 1, le  $d_{\text{app}}$  des particules varie entre 1 et 20  $\mu\text{m}$ , la majorité des particules ayant



cependant un  $d_{app}$  voisin de  $5 \mu\text{m}$  (Figure 3.12e). Dans ce système, nous pouvons également noter des phénomènes de coalescence entre certaines particules.



**Figure 3.12 :** Micrographies obtenues par MOCP à  $20^{\circ}\text{C}$  de la structure des mélanges  $\text{BLG}_{agr}/\text{gomme d'acacia}/\text{eau}$  (a-c) et  $\text{BLG}/\text{gomme d'acacia}/\text{eau}$  (d-f) à pH 4,2 à une concentration totale en biopolymères de 1%. Ratio Pr : Ps : 8 : 1 (a-d) ; 2 : 1 (b-e) ; 1 : 1 (c-f). La barre d'échelle représente  $20 \mu\text{m}$ .

Dans le dernier mélange testé,  $\text{BLG}(1)/\text{gomme d'acacia}(1)/\text{eau}$ , la polydispersité en taille des particules est faible puisque celles-ci possèdent majoritairement une taille de  $5 \mu\text{m}$  (Figure 3.12f). En revanche, un faible nombre de particules ayant un  $d_{app}$  supérieur à  $20 \mu\text{m}$  sont présentes. Dans ce mélange, une particule possédant un  $d_{app}$  de l'ordre de  $40 \mu\text{m}$  est caractérisée par une structure interne composée de particules de plus petite taille,  $1$  à  $2 \mu\text{m}$  (Figure 3.12f). Cette structuration particulière peut indiquer que les particules les plus grosses sont issues de l'interaction entre les plus petites. Ce type de mécanisme ressemble fortement à celui qui est généralement proposé pour expliquer la coacervation complexe, ce qui nous permet d'affirmer que les particules sphériques sont des coacervats. Le mélange  $\text{BLG}_{agr}/\text{gomme d'acacia}/\text{eau}$  est donc quant à lui constitué de coacervats et de précipités qui pourraient être majoritairement formés par les agrégats de  $\beta\text{-Ig}$ .

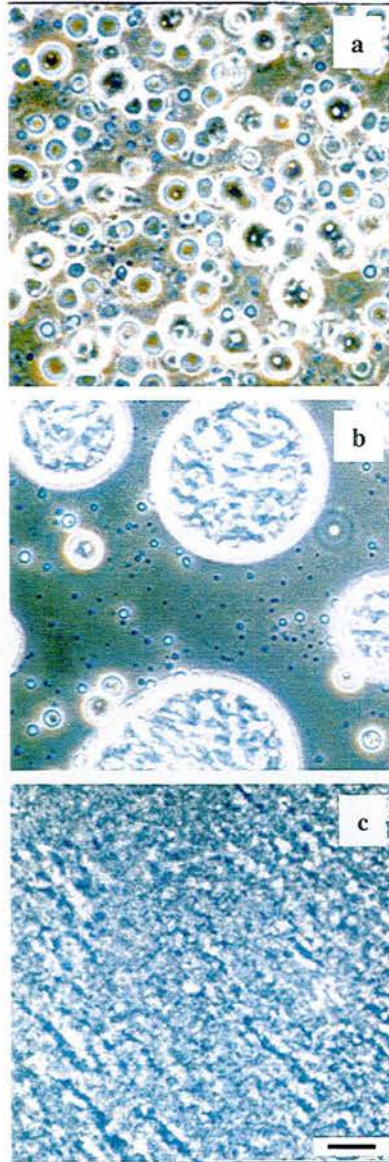
Un bref commentaire mérite d'être fait ici sur la correspondance des tailles mesurées par MOCP et granulométrie laser. En effet, si pour les mélanges BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau celle-ci paraît bonne, dans le cas des mélanges BLG/gomme d'acacia/eau, quelques différences sont notables, surtout pour les systèmes où la taille des particules est sujette à des variations importantes (ratios Pr : Ps de 2 : 1 et 1 : 1). Cette différence peut s'expliquer par le fait que nous avons considéré les distributions des particules en volume, traitement qui tend à surestimer la contribution des particules volumineuses au détriment de celles ayant une plus faible taille. De plus, nous pouvons imaginer que le nombre de micrographies correspondant à chaque mélange ne permet sans doute pas d'observer tous les types de particules présentes, ce qui est possible en granulométrie laser où le volume de l'échantillon est plus conséquent.

### *Structure des coacervats*

Compte tenu des interrogations suscitées par l'observation de la structure des particules obtenues dans le mélange ne contenant pas d'agrégats, nous avons essayé de caractériser celle-ci plus précisément en suivant son évolution au cours du temps, partant du mélange jusqu'à l'équilibre thermodynamique (2 jours après mélange). Nous avons également tenté de vérifier l'hypothèse selon laquelle les coacervats de grande taille seraient formés par l'interaction des coacervats les plus petits.

L'étude de la structure du mélange BLG(2)/gomme d'acacia(1)/eau à une concentration totale de 1% montre tout d'abord une grande polydispersité de taille des coacervats. Ceux-ci présentent en effet des  $d_{app}$  allant de 1  $\mu\text{m}$  à plus de 20  $\mu\text{m}$  (Figure 3.13a). Il est ici clair que les particules les plus grosses présentent une structuration interne constituée de granulations dont la taille est de l'ordre de 1 à 2  $\mu\text{m}$ . Ces observations sont similaires à celles que nous avons présentées dans la revue bibliographique dans le cas de mélanges entre de la gélatine et de la gomme d'acacia (Newton et al., 1977) ou de la gélatine et de l'hydroxyéthylamidon (Levy et Andry, 1989), si bien que nous pouvons affirmer que nous sommes bien en présence de coacervats. Cette affirmation est d'ailleurs confortée par certains phénomènes de coalescence entre particules de petite taille, qui sont à l'origine de la formation de coacervats plus gros (Figure 3.13a).

L'observation du même mélange après 24 heures, en conservant le même grossissement, permet de saisir l'augmentation très importante de la polydispersité du mélange. En effet, si des coacervats ayant un  $d_{app}$  compris entre 1  $\mu\text{m}$  et 15  $\mu\text{m}$  sont visibles comme précédemment, de très grosses structures dont le  $d_{app}$  atteint plus de 80  $\mu\text{m}$  sont également visibles (Figure 3.13b). Le nombre de coacervats de petite taille ayant diminué fortement par rapport au système initial, il paraît logique de penser que les coacervats les plus gros sont issus de la fusion de ceux-ci puisque des phénomènes de coalescence partielle sont observables entre coacervats de petite taille et coacervats de taille plus importante (Figure 3.13b). Il ne nous est pas possible de conclure quant à l'origine des coacervats les plus petits, à savoir s'ils sont encore issus du mélange initial ou s'ils se sont formés par la suite, ce qui conforte la nécessité de mener une étude cinétique sur ce type de phénomène.



**Figure 3.13 :** Micrographies obtenues à 20°C par MOCP pour un mélange BLG(2)/gomme d'acacia(1)/eau à une concentration totale en biopolymères de 3% et à pH 4,2. (a) mélange après 5 minutes ; (b) mélange après 24 heures ; (c) phase inférieure après 48 heures. La barre d'échelle représente 20  $\mu\text{m}$ .

Après deux jours, le système n'est plus composé que d'une phase diluée ne contenant plus aucun coacervat visible par MOCP et d'une phase concentrée. Lorsque l'on observe celle-ci, aucun coacervat clairement différencié n'est visible. A la place, nous retrouvons une

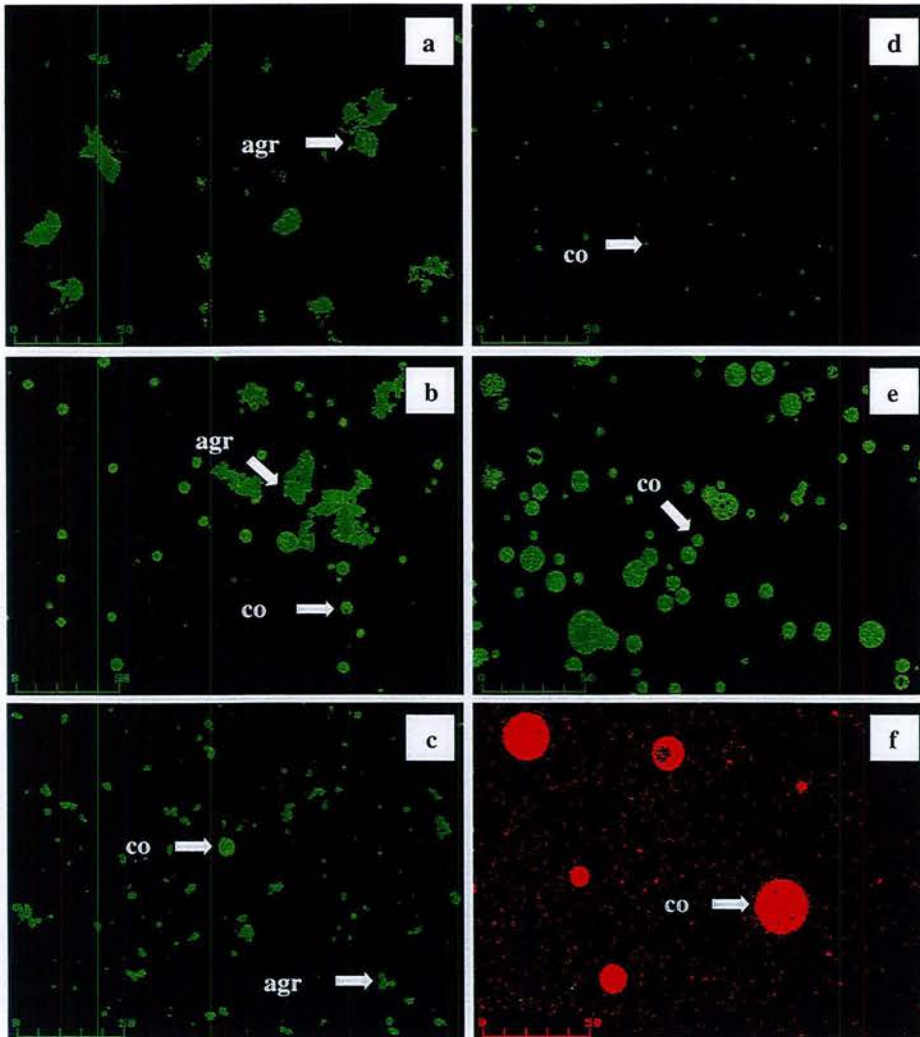
phase très concentrée dont la structure semble être identique à la structure interne des coacervats (Figure 3.13c).

### 3.2.3.2 Microscopie confocale à balayage laser

Afin de s'affranchir des problèmes d'interférence lumineuse pouvant donner lieu à des artefacts lors des observations en microscopie optique, mais également dans le but de préciser plus finement la structure interne des coacervats, les mêmes systèmes ont été observés par MCBL après marquage covalent de la  $\beta$ -lg par la FITC et de la gomme d'acacia par la RITC.

#### *Structure des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau*

La figure 3.14 présente la structure des différents systèmes obtenus après mélange d'un biopolymère marqué et d'un autre non marqué. Le mélange BLG<sub>agr</sub>(8)/gomme d'acacia(1)/eau est essentiellement composé de structures agrégées de couleur verte. La taille de ces particules varie de 15 à 40  $\mu\text{m}$  (Figure 3.14a). En plus des particules précédemment décrites, de très petites particules assimilables à un point fluorescent ( $d_{\text{app}} \sim 1 \mu\text{m}$ ) pourraient constituer des coacervats. Dans le cas du système mixte obtenu pour un ratio de 2 : 1, deux types de particules sont également visibles (Figure 3.14b). Certaines sont d'aspect irrégulier, basées sur des agrégats protéiques (notés agr) et d'autres sont de forme sphérique, caractéristique structurale des coacervats (notés co). Le  $d_{\text{app}}$  des particules agrégées est de l'ordre de 10 à 40  $\mu\text{m}$  (Figure 3.14b). En revanche, les coacervats les plus gros ont une taille de 5 à 10  $\mu\text{m}$ , les plus petits ayant un  $d_{\text{app}}$  inférieur à 5  $\mu\text{m}$ . Certains d'entre eux présentent une structuration interne composée de zones appauvries en biopolymères (couleur noire). Nous sommes donc en présence de vésicules si l'on raisonne en 3D. Dans le dernier mélange testé, obtenu à un ratio de mélange de 1 : 1, les particules visibles se trouvent être principalement composées d'agrégats protéiques dont le  $d_{\text{app}}$  est plus faible que celui obtenu dans les deux cas précédents. En effet, ces particules ont une taille comprise entre 5 et 10  $\mu\text{m}$ , ce qui pourrait s'expliquer par un effet de dilution de la dispersion protéique lors du mélange avec la gomme d'acacia (Figure 3.14c). De rares coacervats présentant également une structure vacuolisée sont visibles ( $d_{\text{app}} \sim 10 \mu\text{m}$ ).



**Figure 3.14 :** Micrographies obtenues par microscopie confocale à balayage laser sur des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia à 1%, pH 4,2 et 20°C. FITC-BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau (a) ratio 8 : 1 ; (b) ratio 2 : 1 ; (c) ratio 1 : 1. FITC-BLG/gomme d'acacia/eau (d) ratio 8 : 1 ; (e) ratio 2 : 1 ; BLG/RITC-gomme d'acacia/eau (f) ratio 1 : 1. agr : particule formée de protéine agrégée ; co : coacervat. La barre d'échelle représente 50  $\mu$ m.

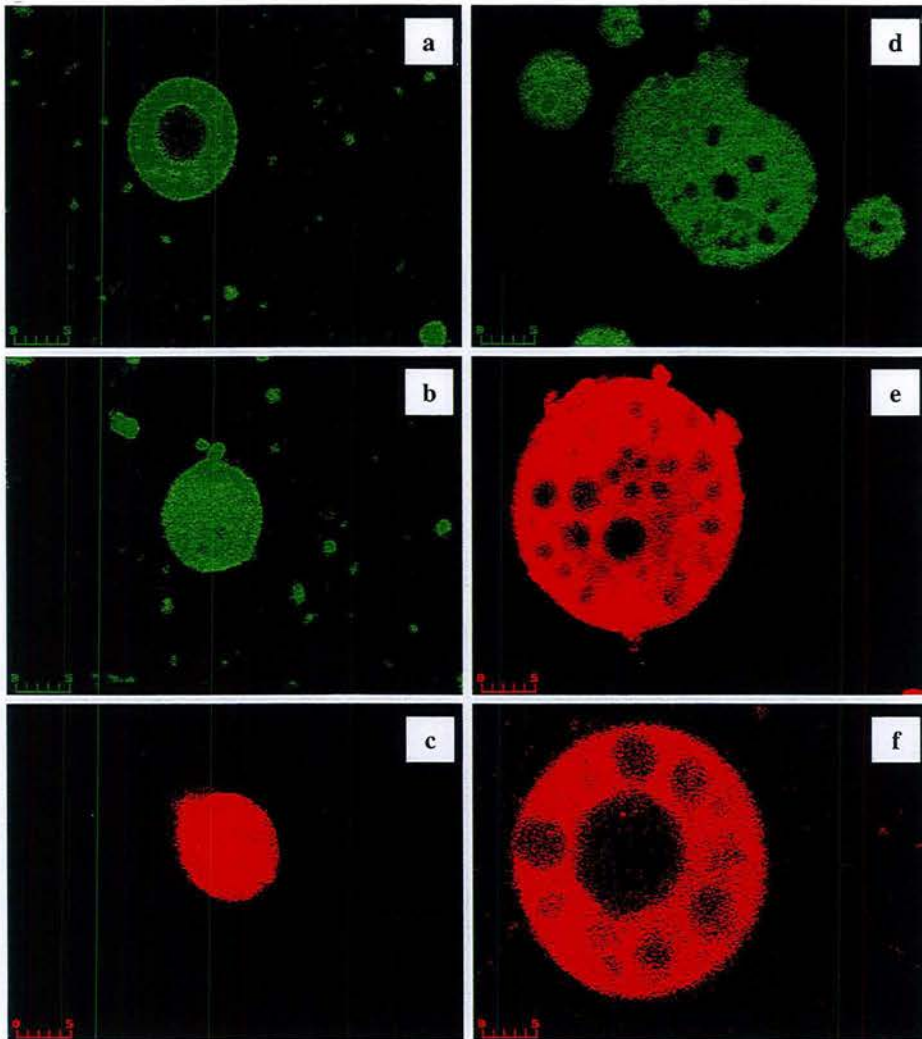
Dans le mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau où la protéine marquée apparaît en vert, seules des structures sphériques d'une taille voisine de 1  $\mu$ m sont visibles (Figure 3.14d). Celles-ci correspondent à des coacervats, dont il n'est malheureusement pas possible de distinguer la structure interne. On peut remarquer ici une légère différence entre la taille des coacervats obtenue par MCBL et MOCP. Ainsi, en MCBL, le  $d_{app}$  est plus petit (environ 5 fois), ce qui peut s'expliquer d'une part par la meilleure résolution obtenue en microscopie confocale, mais surtout par l'élimination des interférences rayonnement-matière autour des particules (Brooker, 1995). La diminution du ratio de mélange à 2 : 1 se traduit par une

augmentation de la taille des coacervats obtenus, ce qui va dans le sens des résultats granulométriques. La polydispersité des coacervats obtenus est grande puisque les plus petits, pouvant correspondre à un unique point fluorescent, ont une taille de l'ordre du micromètre, les plus grands ayant un  $d_{app}$  de l'ordre de 15 à 25  $\mu\text{m}$  (Figure 3.14e). Dans ce mélange, il est très intéressant de noter des phénomènes de coalescence entre certains coacervats. De plus, un certain nombre de coacervats, indépendamment de leur taille, présentent des inclusions noires qui se trouvent être des zones appauvries en biopolymères. Il s'agit par conséquent de vacuoles de solvant pouvant résulter de la coalescence des coacervats de petite taille, constitués eux-mêmes d'une vacuole de solvant (Burgess, 1990). Dans le dernier mélange considéré à pH 4,2, la gomme d'acacia a été marquée, ce qui explique la couleur rouge des coacervats obtenus. Ceux-ci présentent un  $d_{app}$  compris entre 20 à 25  $\mu\text{m}$  pour les plus gros, 1 à 10  $\mu\text{m}$  pour les autres. Des particules ayant des tailles inférieures à 1  $\mu\text{m}$  sont également présentes sous la forme de points fluorescents (Figure 3.14f). Comme dans le cas précédent, la présence de vacuoles, dont certaines de très grande dimension, est notable à l'intérieur des coacervats.

### **Structure des coacervats**

Afin de préciser les observations précédentes, la structure interne des coacervats obtenus dans les mélanges BLG/gomme d'acacia/eau et  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau a été observée par MCBL à un grossissement supérieur. Nous avons alors pu comparer la structure interne des coacervats obtenus dans les deux types de mélanges (Figure 3.15).

Les micrographies présentées sur la figure 3.15 correspondent à des coacervats pour lesquels le plan focal d'observation passe exactement par le centre de ceux-ci. Dans ces conditions, les artefacts d'observation qui pourraient être dus à des effets de bord sont négligeables. Dans le système  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau, on notera que pour une taille quasiment identique (environ 10  $\mu\text{m}$  de diamètre), le phénomène de vacuolisation peut différer. En effet, certains coacervats présentent une vacuole centrale de volume important, puisque son diamètre interne est de l'ordre de 7  $\mu\text{m}$ , entourée de vacuoles de plus petite taille, 2 à 3  $\mu\text{m}$  (Figure 3.15a). Dans d'autres cas, les vacuoles sont réparties de manière homogène dans tout le volume du coacervat et présentent une faible variation de taille (Figure 3.15b). Dans le cas des mélanges ne contenant pas d'agrégats protéiques, la polydispersité des coacervats est beaucoup plus importante (Figure 3.15c-f). Certains résultent de la coalescence de coacervats vacuolisés de petite taille comme cela est clairement visible sur la figure 3.15d. L'absence de vacuole dans les coacervats est également possible (Figure 3.15c). Des structures internes comparables peuvent être obtenues pour des coacervats dont la taille est près de 4 fois supérieure (40  $\mu\text{m}$ ), si bien qu'une invariance d'échelle pourrait caractériser la structure des coacervats. Pour finir, la vacuole centrale et les vacuoles annulaires ou la répartition homogène des vacuoles peuvent être obtenues pour des coacervats d'un même mélange (Figure 3.15e et f).



**Figure 3.15 :** Micrographies de la structure des coacervats obtenus par MCBL dans les mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau à pH 4,2. (a)  $BLG_{agr}(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau ; (b)  $BLG_{agr}(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau ; (c)  $BLG(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau ; (d)  $BLG(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau ; (e et f)  $BLG(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau. La barre d'échelle représente 5  $\mu$ m.

Le mécanisme de formation des vacuoles n'est pas réellement compris à l'heure actuelle. Selon Bungenberg de Jong (1949), la formation des vacuoles serait due à un réarrangement des coacervats après une perturbation externe comme par exemple un ajout de sel. Notre système n'ayant pas été perturbé de la sorte, l'explication réside ailleurs. On peut d'ailleurs souligner que d'autres auteurs ont observé ces vacuoles dans des mélanges de biopolymères sujets à la coacervation complexe, sans que ceux-ci aient subi de perturbation (McMullen et al., 1977 ; Chilvers et Morris, 1987 ; Levy et Andry ; 1989 ; Renuñán-López et Bodmeier, 1996). Ce type de structure multi-vésiculaire a également été obtenue dans le cas

de mélanges de polymères associatifs caractérisés par la formation de liaisons hydrogènes (Ilhan et al., 2000) ou hydrophobes (Tsuda et al., 2000).

Une hypothèse pouvant être formulée quant à l'apparition des structures multi-vésiculaires dans le cas de nos mélanges est liée à la coalescence limitée des coacervats, du fait des propriétés viscoélastiques importantes de leur surface, comme cela a été mis en évidence à plusieurs reprises, notamment dans la stabilisation d'émulsions par des complexes électrostatiques protéine-polysaccharide (Dickinson et Pawlowsky, 1998 ; Dickinson et al., 1998). Dans ce cas, l'intensité des forces de drainage du film interfacial formé au point de contact entre deux coacervats pourrait être contrebalancée par les forces viscoélastiques interfaciales (Fortelny et al., 1998, 1999 ; Bazhlekov et al., 2000). Cet équilibre des forces pourrait alors limiter la coalescence des coacervats.

### ***Comparaison MOCP-MCBL***

Si l'on compare les résultats obtenus par MOCP et MCBL, ces deux techniques produisent des résultats semblables et conduisent à l'obtention de tailles de particules très voisines. L'information supplémentaire apportée par la MCBL réside dans la caractérisation fine de la structure interne des coacervats.

### ***Effet de la polydispersité sur la stabilisation de la taille des coacervats***

La caractérisation des mélanges par mesure de la distribution de taille des particules, ainsi que les observations microscopiques, ont mis en évidence une stabilisation de la taille des coacervats avec l'augmentation de la polydispersité de la dispersion de  $\beta$ -lg. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce phénomène.

Par exemple l'adsorption de la gomme d'acacia sur la surface des agrégats protéiques peut être envisagée. En effet, les agrégats de  $\beta$ -lg sont hydrophobes (Gao et Dubin, 1999) alors que la gomme d'acacia possède des propriétés de surface importante. Afin de diminuer l'énergie libre de surface des agrégats, la gomme d'acacia peut s'adsorber sur ceux-ci, ce qui limite alors la quantité de gomme d'acacia susceptible d'interagir avec de la  $\beta$ -lg native.

Il est également possible que grâce à leurs propriétés de surface, une partie des coacervats formés se trouve impliquée dans un phénomène d'encapsulation des agrégats, ce qui limite alors le nombre de coacervats susceptibles d'interagir. Ce type de mécanisme est envisageable et des études menées sur les propriétés d'encapsulation d'ASB agrégée (surface hydrophobe) par des polyesters ou des mélanges poly(lactide)/poly(lactide-co-glycolide) l'ont clairement mis en évidence dans des conditions thermodynamiquement favorables (équilibre entre les tensions interfaciales des différentes phases, *i. e.* coacervats, liquide d'équilibre et agrégats protéiques) (Thomasin et al., 1997 ; 1998). Ceci avait déjà été suggéré par Torza et Mason (1970) lors de l'étude de mécanisme d'encapsulation sous cisaillement ou en présence de champs électriques. Des mesures de tension interfaciale des différentes phases que nous n'avons pas entreprises ici seraient nécessaires afin de vérifier cette dernière hypothèse.

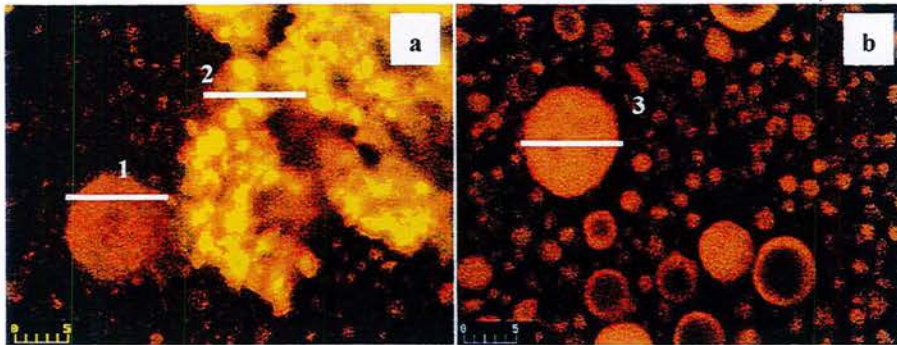
### ***Etude de la localisation de la gomme d'acacia par MCBL***

Dans le but de tester l'hypothèse de la présence de gomme d'acacia à la surface des différentes particules, nous avons étudié qualitativement sa localisation par MCBL dans des systèmes contenant des agrégats protéiques et en faisant varier l'intensité de l'interaction électrostatique (pH 4,2 et 5,0). Les images de MCBL ont été obtenues dans des plans focaux



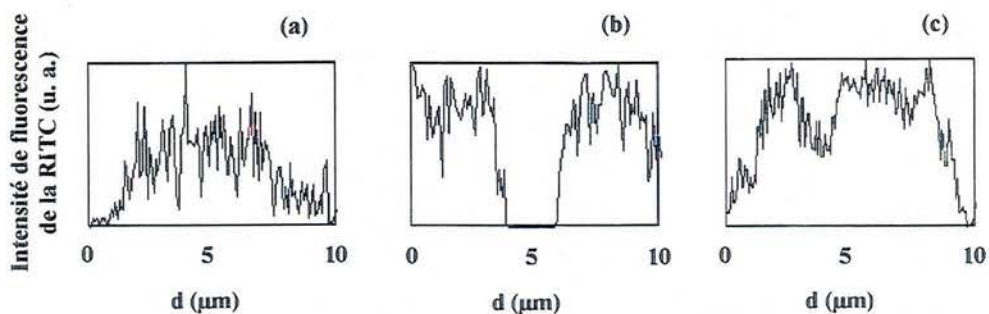
passant par le plan médian des particules, si bien que l'on obtient une vue en coupe 2D de celles-ci, le périmètre représentant leur surface.

Les particules obtenues après double excitation des biopolymères en présence d'agrégats à pH 4,2 laissent apparaître des zones de fluorescence de couleurs différentes (Figure 3.16a). Ceci indique que la contribution respective des deux sondes dans la fluorescence globale varie en fonction de l'endroit étudié. Comme l'indique le profil de variation d'intensité de la RITC dans la région 1 (Figure 3.17a), le coacervat sphérique présente une distribution homogène de la fluorescence rouge, ce qui indique une répartition homogène de la gomme d'acacia dans celui-ci. En revanche, si l'on examine la répartition de la fluorescence de la RITC dans la région 2, l'intensité de celle-ci est beaucoup plus importante à la surface qu'au centre des particules agrégées (Figure 3.17b). Nous avons procédé au même traitement dans le mélange BLG(1)/gomme d'acacia(1)/eau. L'analyse du profil d'intensité de fluorescence confirme la distribution homogène de la gomme d'acacia dans les coacervats (Figures 3.17a et 3.17c). Il est également très intéressant de noter que l'intensité de fluorescence diminue lorsque l'on passe au travers des vacuoles qui caractérisent la structure interne du coacervat sélectionné, ce qui indique que cette zone est peu concentrée en gomme d'acacia.



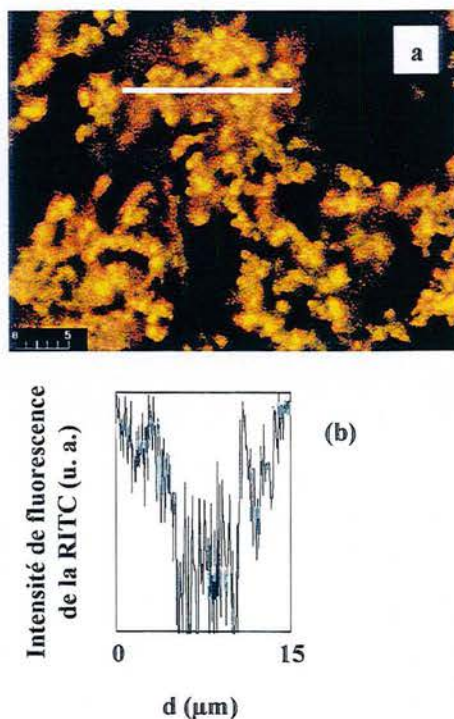
**Figure 3.16 :** Micrographies obtenues à 20°C par MCBL (double marquage) sur les mélanges (a) BLG<sub>agr</sub>(2)/gomme d'acacia(1)/eau et (b) BLG(1)/gomme d'acacia(1)/eau à une concentration totale en biopolymères de 1% et pH 4,2. Les zones repérées par les chiffres de 1 à 3 correspondent aux profils de fluorescence de RITC présentés figure 3.17. La barre d'échelle représente 5 µm.

Nous avons montré dans le chapitre 2, § 4.4, que les agrégats de  $\beta$ -lg étaient caractérisés par une forte charge positive de surface. La présence de gomme d'acacia à la surface de ceux-ci pourrait donc avoir pour origine une interaction électrostatique (Buchhammer et al., 1993). Pour tenter d'estimer la contribution de ce phénomène, nous avons étudié la localisation de la gomme d'acacia dans un mélange BLG<sub>agr</sub>(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 5,0 afin de minimiser l'interaction électrostatique, puisque la mobilité électrophorétique des agrégats est légèrement négative à ce pH (Chap. 2, § 4.4).



**Figure 3.17 :** Profils d'intensité de fluorescence de la RITC dans les régions 1, 2 et 3 indiquées sur la figure 3.16. (a) région 1 ; (b) région 2 ; (c) région 3.

Les résultats obtenus à pH 5,0 sont présentés sur la figure 3.18.



**Figure 3.18 :** (a) Micrographie obtenue à 20°C par MCBL (double marquage) sur un mélange  $BLG_{agr}(8)/gomme\ d'acacia(1)/eau$  à une concentration totale en biopolymères de 1% à pH 5,0. La barre d'échelle représente 5 µm. (b) Profil d'intensité de la fluorescence de la RITC dans la région sélectionnée sur la figure 3.18a.

L'observation de la micrographie obtenue en MCBL fait apparaître une hétérogénéité de la distribution de la fluorescence rouge correspondant à la RITC. Celle-ci se situe plutôt à la surface des agrégats ou dans les pores de ceux-ci (Figure 3.18a). L'analyse du profil

d'intensité de fluorescence confirme cette première impression visuelle, puisque celle-ci est plus élevée à la surface des particules (Figure 3.18b). Si l'on combine les résultats d'analyse de la fluorescence de la RITC obtenus à pH 4,2 et 5,0, et même si celle-ci est purement qualitative, la localisation de la gomme d'acacia à la surface des agrégats de  $\beta$ -lg est manifeste. En revanche, le doute subsiste sur le mécanisme qui est à l'origine de cette répartition particulière. Nous pensons cependant qu'à des pH où la charge de surface des agrégats est positive, les phénomènes d'interaction électrostatique jouent un rôle non négligeable dans la présence de la gomme d'acacia à la surface des agrégats. En revanche, lorsque le pH s'approche du  $pH_i$  de la  $\beta$ -lg, la contribution des interactions électrostatiques est plus faible, si bien qu'il faut alors considérer une adsorption de la gomme d'acacia sur les agrégats par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes, comme cela a été par exemple montré dans des mélanges contenant des agrégats de lysozyme et des polyanions à des pH supérieurs au  $pH_i$  du lysozyme (Sato et al., 1998).

### 3.2.4 Conclusion de l'étude mésoscopique de la séparation de phase dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

L'étude mésoscopique des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau en fonction du pH, du ratio Pr : Ps de mélange et de la polydispersité de la  $\beta$ -lg nous a permis de caractériser les propriétés de surface des particules obtenues, leur taille, mais également leur structure.

La mobilité électrophorétique ( $\mu_E$ ) des particules obtenues est contrôlée par la présence d'agrégats protéiques pour des ratios où la protéine est majoritaire (8 : 1) et pour des pH inférieurs à 4,2. Dans ce cas, la variation de  $\mu_E$  des particules obtenues en fonction du pH est proche de celle de la dispersion de  $BLG_{agr}$ . En revanche, lorsque le ratio Pr : Ps est en faveur de la gomme d'acacia (2 : 1 et 1 : 1) ou que le pH est supérieur à 4,2, la  $\mu_E$  des particules est proche de celle de la gomme d'acacia seule. Ce résultat indique que la gomme d'acacia se trouve donc à la surface des particules formées. Lorsque la polydispersité de la  $\beta$ -lg est réduite, l'influence de la gomme acacia sur la  $\mu_E$  des particules formées devient prépondérante puisque la  $\beta$ -lg est alors moins chargée. Cet effet est d'autant plus marqué que les ratios de mélange sont faibles (2 : 1 ou 1 : 1) et que l'on est proche du  $pH_i$  de la  $\beta$ -lg.

La caractérisation granulométrique effectuée sur les mélanges à pH 4,2 a mis en évidence la possibilité de contrôler la taille des coacervats formés par l'interaction entre les macromolécules par la présence des agrégats de  $\beta$ -lg. Ainsi, les tailles des précipités obtenus dans les mélanges contenant des agrégats sont contrôlées par la taille initiale des agrégats de  $\beta$ -lg alors que celle des coacervats varie peu. Ceci n'est pas le cas en absence d'agrégats où les tailles des coacervats peuvent atteindre plusieurs centaines de micromètres pour les ratios Pr : Ps où l'interaction entre les deux biopolymères est maximale (2 : 1 et 1 : 1). Dans ce cas, la taille des coacervats peut être contrôlée par la concentration totale en biopolymères (inférieure à 0,5% ou supérieure à 2%).

L'influence exacte de la présence d'agrégats sur la stabilisation de la taille des coacervats n'a pas pu être démontrée. Cependant, les observations microscopiques des mélanges ont permis d'émettre des hypothèses de travail. Ainsi, les particules obtenues en absence d'agrégats sont principalement des coacervats dont la taille dépend des phénomènes de coalescence entre les coacervats les plus petits. Dans le cas des mélanges contenant des agrégats protéiques, seuls des coacervats de petite taille sont présents, la majorité des particules obtenues étant constituée d'agrégats protéiques ayant interagi avec la gomme d'acacia pour former des précipités. La limitation de la coalescence des coacervats dans ce cas

peut être liée à une diminution de la quantité de gomme d'acacia libre pouvant interagir avec la  $\beta$ -lg native ou à une diminution du nombre de coacervats initialement formés.

Une localisation de la gomme d'acacia à la surface des agrégats protéiques a été mise en évidence par MCBL. Elle peut s'expliquer par une adsorption de la gomme d'acacia ou par une encapsulation des agrégats par les coacervats formés. Nous avons essayé de déterminer la nature de l'interaction entre la gomme d'acacia et la surface des agrégats par MCBL à différents pH afin de minimiser les interactions électrostatiques. Les résultats montrent que la présence de la gomme d'acacia résulte d'un équilibre entre des interactions électrostatiques (pH où la  $\beta$ -lg est chargé positivement) et d'autres types d'interactions, hydrogènes ou hydrophobes (pH où la charge de la  $\beta$ -lg est négative).

### 3.3 Etude moléculaire de la séparation de phase

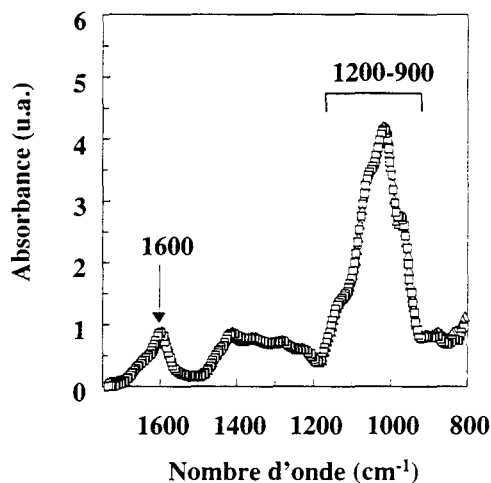
Après avoir étudié la séparation de phase induite par l'interaction électrostatique entre la gomme d'acacia et la  $\beta$ -lg aux échelles macroscopique et mésoscopique, nous nous sommes intéressés à l'influence de cette interaction sur la structure moléculaire de la  $\beta$ -lg. Nous avons pour ce faire utilisé des techniques spectroscopiques spécifiques de chaque type de structure secondaire. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (SIRTF) nous a permis d'étudier la structure en feuillets  $\beta$  de la  $\beta$ -lg. Cette technique est cependant moins spécifique de la structure en hélices  $\alpha$  ou en coudes  $\beta$ . Nous avons pour cela utilisé la spectroscopie de dichroïsme circulaire (DC), spécifique des structures en hélices  $\alpha$ . Enfin, la variation de l'exposition au solvant des résidus hydrophobes a été étudiée par spectroscopie de fluorescence frontale (SFF).

#### 3.3.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La SIRTF est particulièrement sensible aux variations de structure secondaire des protéines impliquant les feuillets  $\beta$ . Elle convient donc parfaitement à l'étude de la  $\beta$ -lg qui contient 50 à 55% de structures en feuillets  $\beta$  (Creamer et al., 1983 ; Hambling et al., 1992 ; Boye et al., 1996 ; Dong et al., 1996). Les polysaccharides contenant des groupements carboxyliques comme la gomme d'acacia peuvent également être étudiés par spectroscopie infrarouge. Dans ce cas, des variations de l'intensité des liaisons entre les atomes peuvent être mises en évidence en suivant l'absorbance spécifique de ces groupements (Wilson, 1995).

Si l'on étudie le spectre infrarouge de la gomme d'acacia en solution aqueuse, deux bandes caractéristiques d'absorbance peuvent être distinguées. La première est une bande large dans la gamme de nombre d'onde 900-1200  $\text{cm}^{-1}$ . Cette bande est d'intensité élevée, ce qui signifie que ce type de liaison est présent en grande quantité dans la molécule. Il s'agit en effet de la vibration spécifique des liaisons simples de type C – O – C qui composent les cycles des résidus glucidiques de la chaîne principale. La bande de plus faible intensité localisée à 1600  $\text{cm}^{-1}$  est caractéristique de la vibration asymétrique des groupements carboxyliques ( $\text{COO}^-$ ) portés par les résidus d'acide glucuronique. Etant donné que ce type de résidu ne constitue que 15% environ de la composition de la gomme, l'intensité de cette bande est donc plus faible (Figure 3.19).

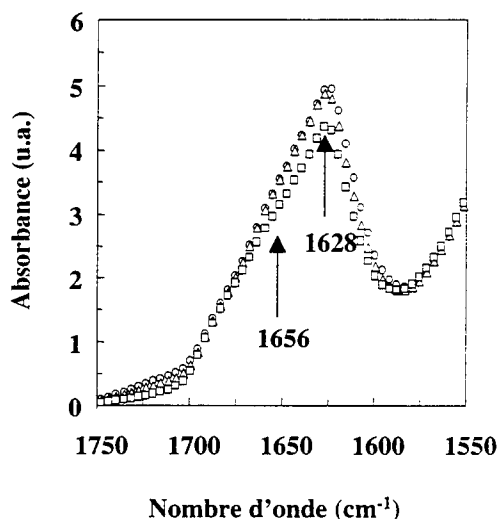
La quantification de l'effet du pH sur la structure de la gomme d'acacia par spectroscopie infrarouge montre qu'il n'y a aucune modification significative de l'absorbance ou de la position de la bande 900-1200  $\text{cm}^{-1}$ . En revanche, une très faible augmentation de l'absorbance de la bande située à 1600  $\text{cm}^{-1}$  avec l'augmentation du pH de 3,6 à 5,0 révèle une déprotonation des groupements carboxyliques de la gomme d'acacia.



**Figure 3.19 :** Spectres infrarouges à transformée de Fourier à 20°C d'une dispersion de gomme d'acacia à une concentration totale en biopolymères de 1%. (  $\circ$  ) pH 3,6 ; (  $\Delta$  ) pH 4,2 ; (  $\square$  ) pH 5,0.

Avant de considérer les résultats obtenus pour la  $\beta$ -lg, nous devons rappeler que les mesures réalisées sur les dispersions de BLG, BLG<sub>agr</sub> ou les mélanges avec la gomme d'acacia ne se sont pas avérées significativement différentes. Pour cette raison, nous avons choisi de ne présenter que les résultats obtenus pour la BLG et les mélanges BLG/gomme d'acacia/eau aux différents pH et ratios testés.

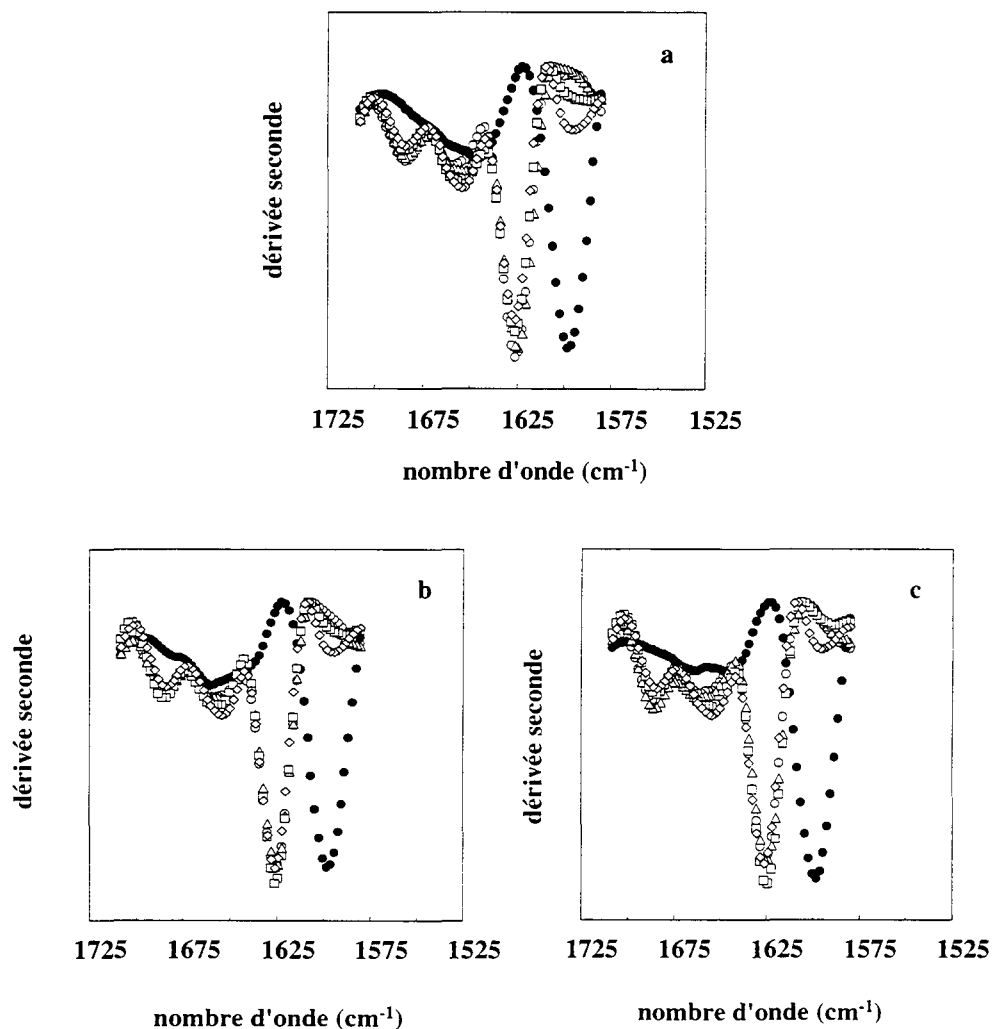
L'analyse de la région amide primaire du spectre de la  $\beta$ -lg fait apparaître un large pic caractérisé par un maximum à 1628  $\text{cm}^{-1}$  et un léger épaulement à 1656  $\text{cm}^{-1}$  (asymétrie du pic) (Figure 3.20). Ces caractéristiques spectrales sont indicatives d'une structure secondaire composée principalement de feuillettes  $\beta$  conjugués à la présence d'hélices  $\alpha$  (Bandekar, 1992 ; Dong et al., 1998 ; Hamada et al. 1995 ; Molinari et al., 1996 ; Fujiwara et al., 1999). Le suivi de l'influence du pH sur la structure en feuillettes  $\beta$  de la  $\beta$ -lg montre que sur la gamme de pH étudiée (3,6 – 5,0) aucun changement structural significatif n'est visible. En effet, aucun déplacement des nombres d'ondes caractéristiques de ce type de structure secondaire n'a été détecté (Figure 3.20). Ces résultats sont en accord avec les observations déjà effectuées sur la  $\beta$ -lg dans cette gamme de pH, où la stabilité de la protéine, et celle des globulines en général, est importante (Casal et al., 1988 ; Boye et al., 1996 ; Blanch et al., 1999 ; Allain et al., 1999).



**Figure 3.20 :** Spectre infrarouge à transformée de Fourier à 20°C de la région amide I d'une dispersion de BLG à une concentration totale en biopolymères de 1%. Les flèches représentent les nombres d'onde caractéristiques des types de structure secondaire présents dans la  $\beta$ -lg, hélice  $\alpha$  (1656  $\text{cm}^{-1}$ ) et feuillet  $\beta$  (1628  $\text{cm}^{-1}$ ). (○) pH 3,6 ; (△) pH 4,2 ; (□) pH 5,0.

Après avoir caractérisé les biopolymères seuls, nous avons entrepris d'étudier l'influence de la complexation de la  $\beta$ -lg avec la gomme d'acacia sur la structure secondaire de la protéine en étudiant les variations d'absorbance de la bande amide I. Pour cela, les spectres ont été déconvolués par calcul de la dérivée seconde du signal d'absorbance (Dong et al., 1995). Les résultats obtenus pour les différents pH et ratios Pr : Ps testés sont présentés sur la figure 3.21a-c.

Concernant la gomme d'acacia, aucune influence de la complexation avec la  $\beta$ -lg n'est visible sur le spectre, la bande située à 1600  $\text{cm}^{-1}$  demeurant inchangée. Il en est de même pour la  $\beta$ -lg à tous les pH et ratios étudiés. En effet, la déconvolution de la bande amide I fait apparaître des bandes à 1650  $\text{cm}^{-1}$  (structure en hélice  $\alpha$ , structure désordonnée) ainsi qu'à 1684  $\text{cm}^{-1}$  (feuillets  $\beta$ , coudes  $\beta$ ) dont la position et l'intensité ne varient pas en fonction du pH ou du ratio (Dong et al., 1996). L'étude de la structure en feuillets  $\beta$  de la  $\beta$ -lg par spectroscopie infrarouge ne révèle donc aucune modification de la structure secondaire en feuillets  $\beta$  lors de la complexation électrostatique avec la gomme d'acacia, et ce avec ou sans agrégats protéiques insolubles dans le mélange.



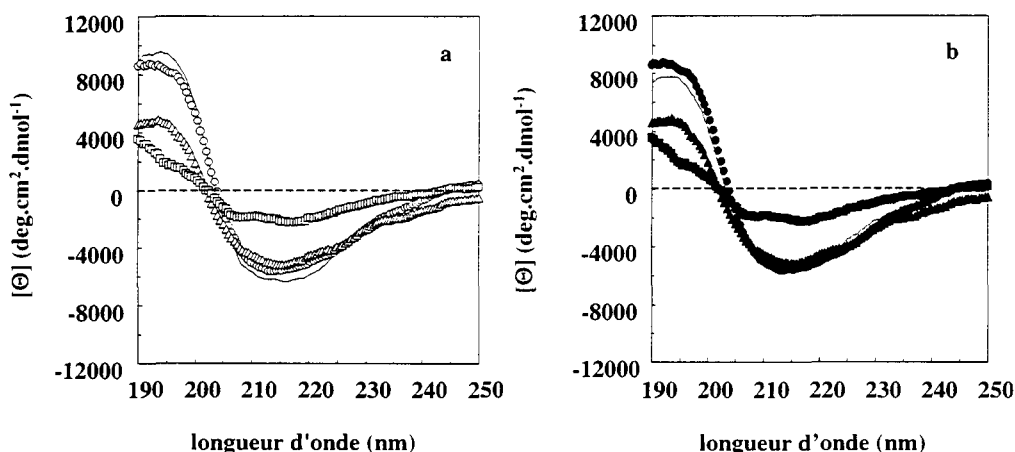
**Figure 3.21 :** Dérivée seconde de la bande amide I à 20°C correspondant à la BLG, la gomme d'acacia et les mélanges BLG/gomme d'acacia/eau à une concentration totale en biopolymères de 1%. (a) pH 3,6 ; (b) pH 4,2 ; (c) pH 5,0. (○ ) BLG ; (● ) gomme d'acacia ; mélange BLG/gomme d'acacia/eau ( Δ ) ratio 8 : 1 ; ( □ ) ratio 2 : 1 ; ( ◇ ) ratio 1 : 1.

La SIRTf n'ayant pas révélée de changements structuraux des zones en feuillets  $\beta$  de la  $\beta$ -lg, nous avons poursuivi l'étude de la structure secondaire de la protéine en utilisant la spectroscopie de dichroïsme circulaire, très sensible aux hélices  $\alpha$ . Cette technique spectroscopique dans l'UV lointain est souvent utilisée en combinaison avec la spectroscopie infrarouge afin d'obtenir des résultats fiables quant à la structure secondaire des protéines (Qi et al., 1995).

### 3.3.2 Dichroïsme circulaire

L'étude de la variation de l'ellipticité molaire,  $[\theta]$ , des dispersions de BLG ou  $BLG_{agr}$  à pH 3,6 et 4,2 en fonction de la longueur d'onde permet de mettre en évidence deux bandes dichroïques principales (Figures 3.22 et 3.23).

Tout d'abord, une bande positive de forte intensité située aux alentours de 190-200 nm, suivie d'une bande négative très large entre 210 et 220 nm. Ces deux bandes spectrales sont la signature caractéristique d'une protéine possédant une structure secondaire constituée de feuilletts  $\beta$  conjugués à la présence d'hélices  $\alpha$  comme c'est le cas pour la  $\beta$ -lg (Townend et al., 1967 ; Hamada et al., 1995 ; Molinari et al., 1996). En effet, on peut rappeler que celle-ci possède une structure secondaire formée de 9 feuilletts  $\beta$  anti-parallèles formant un calice hydrophobe ainsi qu'une hélice  $\alpha$  externe située entre les résidus 130 et 140, soit en partie terminale de la molécule (Brownlow et al., 1997 ; Ragona et al., 1999). La présence d'agrégats de  $\beta$ -lg n'influence pas le spectre obtenu en dichroïsme circulaire, si ce n'est que l'on peut noter une faible diminution du signal. Ceci pourrait être expliqué par une incertitude dans le calcul de  $[\Theta]$  pour les dispersions de  $BLG_{agr}$ , la valeur du coefficient d'extinction molaire utilisée étant celle du monomère de  $\beta$ -lg. Les valeurs de  $f_H$ , correspondant au pourcentage de structure en hélice  $\alpha$ , calculées pour les dispersions de BLG et  $BLG_{agr}$  à pH 3,6 et 4,2 varient entre 10 et 14%, ce qui est en accord avec les valeurs communément rapportées dans la littérature (Qi et al., 1997 ; Manderson et al., 1999a ; Hamada et Goto ; 1996, 1997).

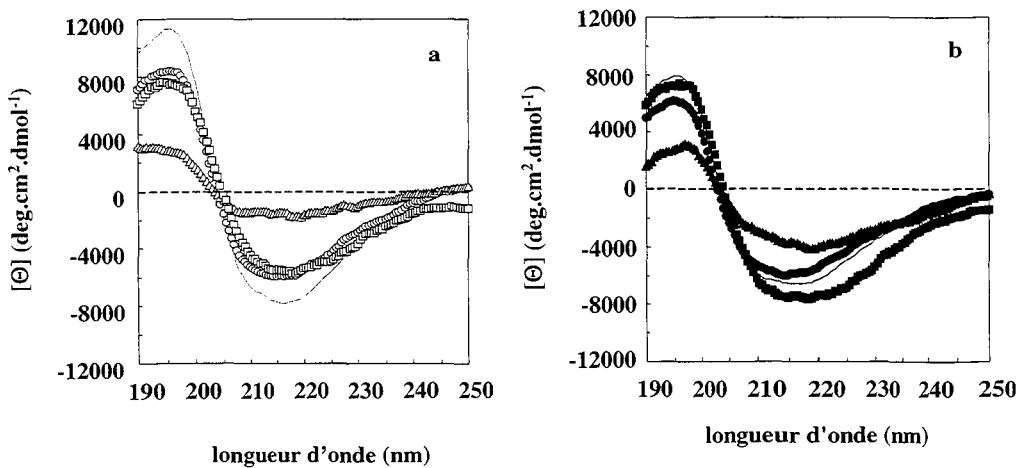


**Figure 3.22 :** Spectres UV obtenus par DC à 20°C pour des dispersions protéiques et des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau à une concentration totale en biopolymères de 0,05% et pH 3,6. (a) BLG (—) ; BLG/gomme d'acacia/eau, ratio Pr : Ps (○) 8 : 1 ; (△) 2 : 1 ; (□) 1 : 1. (b)  $BLG_{agr}$  (—) ;  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau, ratio Pr : Ps (●) 8 : 1 ; (▲) 2 : 1 ; (■) 1 : 1.

Les spectres de DC de la protéine obtenus pour les mélanges BLG/gomme d'acacia/eau et  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau présentent des différences importantes si on les compare avec les témoins protéiques dans les mêmes conditions. Si pour le ratio 8 : 1 à pH 3,6, avec ou sans agrégats, les spectres obtenus sont proches de ceux des témoins protéiques, il n'en va pas de même pour les ratios 2 : 1 et 1 : 1 (Figure 3.22a et b). En effet, pour ces deux ratios Pr : Ps,



une diminution de l'intensité de la bande positive est visible entre 190 et 200 nm. De plus, cette diminution s'accompagne d'une variation de l'intensité de la bande négative aux alentours de 210-220 nm, ce qui est caractéristique d'une modification de la structure de l'hélice  $\alpha$ , en particulier, une diminution de la longueur de l'hélice. Des résultats de DC montrant une augmentation du pourcentage d'hélice  $\alpha$  ont été rapportés lors de l'agrégation de la  $\beta$ -lg en milieu alcoolique (Chobert et al., 1997; Uversky et al., 1997) ou après traitement thermique (Lapanje et Poklar, 1989; Qi et al., 1997; Fujiwara et al., 1999). Dans le cas de l'interaction avec la gomme d'acacia, le phénomène est différent puisque l'on assiste à une diminution de l'intensité de cette bande (Venjaminov et Yang, 1996). Le ratio de mélange joue ici un rôle important. En effet, que ce soit en absence ou en présence d'agrégats protéiques, la plus grande déstabilisation de l'hélice  $\alpha$  à pH 3,6 est obtenue pour le ratio de mélange 1 : 1. Les valeurs de  $f_H$  correspondantes sont de 4% et 3% pour les mélanges BLG/gomme d'acacia/eau et BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau, respectivement. Pour le ratio 2 : 1, la chute de la teneur en hélice  $\alpha$  est plus faible, de l'ordre de 7% (Figure 3.22).



**Figure 3.23 :** Spectres UV obtenus par dichroïsme circulaire à 20°C pour des dispersions protéiques et des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau à une concentration totale en biopolymères de 0,05% et pH 4,2 et 20°C. (a) BLG (—) ; BLG/gomme d'acacia/eau, ratio Pr : Ps ( $\circ$ ) 8 : 1 ; ( $\triangle$ ) 2 : 1 ; ( $\square$ ) 1 : 1. (b) BLG<sub>agr</sub> (—) ; BLG<sub>agr</sub> /gomme d'acacia/eau, ratio Pr : Ps ( $\bullet$ ) 8 : 1 ; ( $\blacktriangle$ ) 2 : 1 ; ( $\blacksquare$ ) 1 : 1.

Lorsque l'on augmente le pH à 4,2, la diminution du pourcentage d'hélice  $\alpha$  est également observable sur les spectres obtenus par dichroïsme circulaire. Cependant, le ratio Pr : Ps pour lequel la variation la plus significative est observée diffère du cas précédent puisque c'est pour le ratio 2 : 1 que la diminution d'intensité de la bande dichroïque négative est la plus importante (Figure 3.23). La structure en hélice  $\alpha$  est complètement perdue dans le mélange BLG/gomme d'acacia/eau puisque  $f_H$  est nul, une valeur de 2% étant obtenue pour le mélange contenant les agrégats. La diminution de la teneur en structure hélicoïdale est plus faible pour le ratio de mélange de 1 : 1, une légère augmentation est même visible en présence d'agrégats.

A la lumière de ces résultats, il apparaît que l'interaction entre la  $\beta$ -lg native, ou en partie agrégée, et la gomme d'acacia induit une modification de la structure en hélice  $\alpha$  de la

$\beta$ -lg. Lorsque l'on compare les ratios pour lesquels le maximum de variation est obtenu, ceux-ci correspondent aux ratios pour lesquels le maximum de variation d'absorbance à 650 nm a été obtenu. Ainsi, le maximum de variation de structure de la protéine au niveau moléculaire apparaît lorsque l'interaction entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia est maximale.

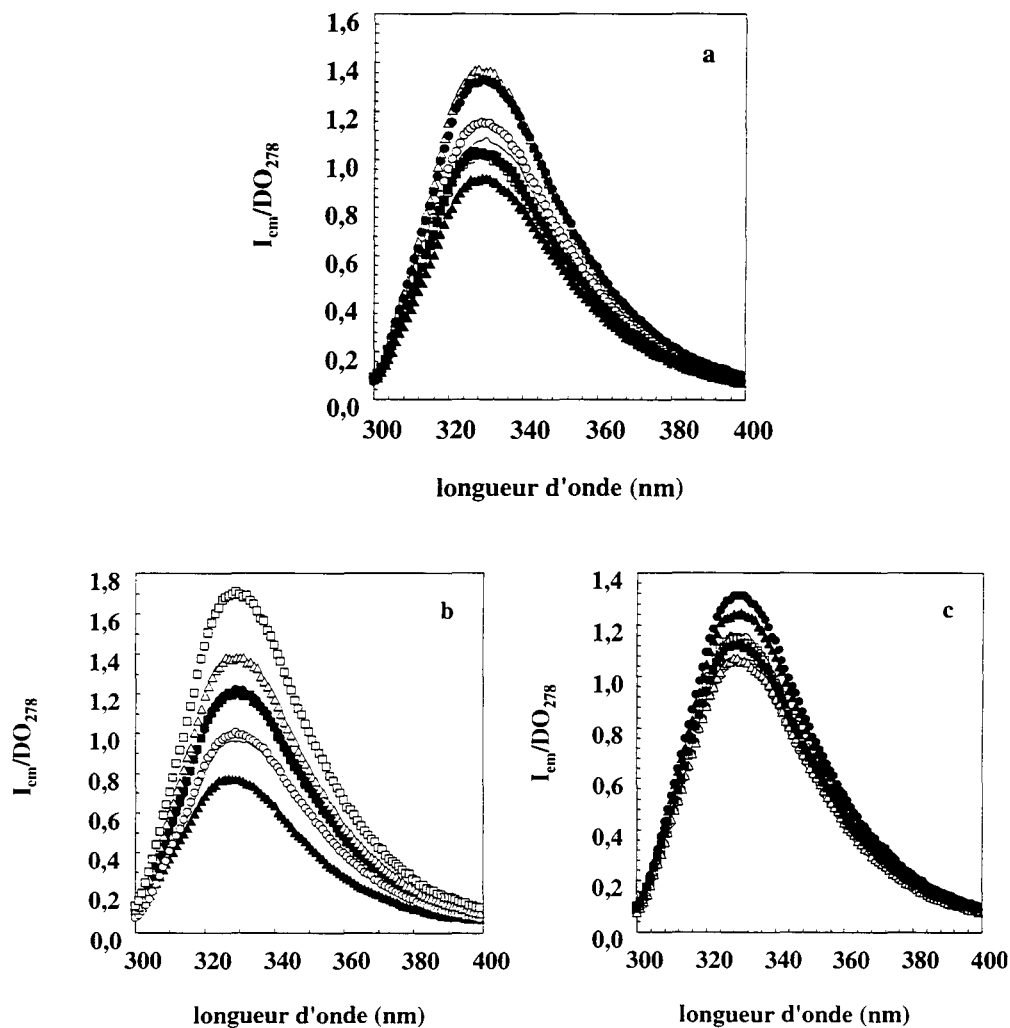
L'explication la plus probable de ces résultats réside dans la localisation et la composition de l'hélice  $\alpha$  de la  $\beta$ -lg. Celle-ci se trouve en effet à l'extérieur du calice hydrophobe, et donc totalement exposée au solvant (Hambling et al., 1992; Brownlow et al., 1997; Kuwata et al., 1999; Sawyer et al., 1999). De plus, cette hélice est majoritairement composée d'acides aminés basiques puisqu'elle contient trois résidus lysine (135, 138 et 141) ainsi que deux autres acides aminés basiques à proximité (His<sub>146</sub> et Arg<sub>148</sub>) (Molinari et al., 1996). Comme le pK<sub>a</sub> le plus faible caractérisant ces résidus aminés est celui de l'arginine (6,0), tous ces acides aminés sont chargés positivement dans la gamme de pH étudiée (3,6-5,0). La déprotonation des résidus basiques contenus dans l'hélice  $\alpha$  entraîne la formation d'une zone de forte densité de charge positive, comme cela a été confirmé très récemment par titration des protons du dimère de  $\beta$ -lg par spectroscopie RMN (Fogolari et al., 2000). Comme cette région structurale est située en périphérie de la protéine, elle est facilement accessible à la gomme d'acacia, et par conséquent, l'interaction électrostatique est favorisée. Des résultats semblables ont été mis en évidence dans le cas de l'interaction électrostatique d'une phospholipase de pancréas de porc avec les lipides membranaires d'*E. coli*. En effet, une modification enzymatique de la structure en hélice  $\alpha$  de la phospholipase permettant d'y incorporer des résidus basiques permet d'augmenter de 25% son taux de liaison à la surface des bactéries lorsque le pH est favorable à une protonation de ces résidus (Weiss et al., 1991). Les auteurs expliquent ce phénomène par la formation d'une zone à forte densité de charges positive à la surface de la protéine.

La variation de l'intensité du signal obtenu par dichroïsme circulaire en fonction du ratio pourrait s'expliquer par la proportion de  $\beta$ -lg modifiée dans le mélange par rapport à la  $\beta$ -lg ayant une structure native, le signal de l'une pouvant masquer celui de l'autre. Ainsi, la variation du pourcentage de structure en hélice  $\alpha$  n'est clairement décelable que pour des ratios où l'intensité de l'interaction électrostatique est très importante.

### 3.3.3 Fluorescence frontale

L'utilisation de la spectrométrie en fluorescence frontale doit nous permettre de mettre en évidence des modifications de l'environnement moléculaire, en particulier une exposition au solvant des résidus aromatiques de la  $\beta$ -lg (Strasburg et Ludescher, 1995). En effet, la  $\beta$ -lg possède deux résidus tryptophane (19 et 61) qui ont la particularité d'émettre une radiation fluorescente lorsqu'ils sont exposés au solvant et excités spécifiquement (Joseph et Nagaraj, 1998; Yuan et al., 1998). Cette technique a par exemple permis de mettre en évidence la perte de structure en calice hydrophobe de la  $\beta$ -lg après traitement thermique (Mills, 1976; Cairoli et al., 1994; Renard et al., 1998; Marin et Relkin, 1999; Manderson et al., 1999b), ou lors d'une dénaturation par un traitement à haute pression hydrostatique (Dufour et al., 1994; Stapenfeldt et Skibsted, 1999).

Dans nos dispersions témoins de BLG et BLG<sub>agr</sub>, on peut noter que la longueur d'onde maximum d'émission est de l'ordre de 328 nm, quelle que soit la valeur du pH (Figure 3.24a-c). La valeur de l'intensité maximale correspondante est de l'ordre de 0,9 à 1,1.



**Figure 3.24 :** Spectres de SFF à 20°C, normalisés par la concentration protéique ( $DO_{278}$ ), des dispersions de BLG, BLG<sub>agr</sub> et des mélanges BLG/gomme d'acacia/eau et BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau à une concentration totale en biopolymères de 3%. BLG et BLG<sub>agr</sub> (—). BLG/gomme d'acacia/eau, ratio Pr : Ps (○) 8 : 1; (△) 2 : 1; (□) 1 : 1. BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau, ratio Pr : Ps (●) 8 : 1; (▲) 2 : 1; (■) 1 : 1. (a) pH 3,6; (b) pH 4,2; (c) pH 5,0.

Après mélange et interaction avec la gomme d'acacia, le spectre d'émission de la  $\beta$ -Ig présente toujours un maximum d'intensité à 328 nm, quels que soient le pH ou le ratio de mélange. Ceci prouve de manière formelle que, ni dans le cas du mélange BLG/gomme d'acacia/eau, ni dans le cas du mélange BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau, il n'y a modification de l'exposition au solvant des résidus tryptophanes, en particulier le Trp<sub>19</sub> qui se trouve à la base du calice hydrophobe. En effet, une modification de l'environnement de ces acides aminés se serait traduite par un déplacement de la longueur d'onde d'émission vers des longueurs d'ondes supérieures ("red-shift"), ce qui n'est pas le cas ici. Ces résultats sont en accord avec

les mesures de SIRTf quant à la stabilité de la structure en feuillets  $\beta$  de la  $\beta$ -lg lors de l'interaction avec la gomme d'acacia.

Nous n'avons pas réussi à tirer une tendance générale quant à la variation de l'intensité de fluorescence dans les différents mélanges. Cependant, celle-ci n'est pas liée aux variations de turbidité des mélanges du fait de la correction que nous avons apportée.

#### **4 Conclusion de l'étude moléculaire de la séparation de phase dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia eau**

L'étude moléculaire des mélanges BLG ou BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau nous a permis d'émettre une hypothèse quant à la localisation de l'interaction entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia. En effet, le suivi de la variation de la structure secondaire de la  $\beta$ -lg par DC montre que la région composant l'hélice  $\alpha$  externe de la protéine est spécifiquement modifiée lors de l'interaction avec la gomme d'acacia. Cette région possède la particularité de regrouper un nombre important de résidus basiques, (Lys, Arg, His), chargés positivement dans la gamme de pH étudiée. Cette zone à forte densité de charge réagit donc certainement avec les groupements carboxyliques anioniques de la gomme d'acacia. De façon intéressante, les conditions pour lesquelles les modifications de structure secondaire de la protéine sont les plus importantes correspondent aux pH et aux ratios Pr : Ps pour lesquels la coacervation complexe est macroscopiquement favorisée (pH 3,6, ratio Pr : Ps 1 : 1 et pH 4,2, ratio Pr : Ps 2 : 1). Il est également intéressant de noter que la présence d'agrégats de  $\beta$ -lg n'influence pas l'interaction spécifique au niveau de l'hélice  $\alpha$ , puisque les mêmes résultats sont obtenus avec et sans agrégats.

Comme nous avons noté des différences macroscopiques et mésoscopiques sur la structure et la stabilité des mélanges en présence ou en absence d'agrégats, la similitude de modification de la structure moléculaire de la  $\beta$ -lg dans ces systèmes peut indiquer qu'il s'agit ici de la formation des complexes macromoléculaires. La formation de ceux-ci pourrait donc être identique dans les deux systèmes, et c'est seulement leur interaction ultérieure (coalescence ou interaction avec les agrégats protéiques) qui pourrait engendrer les différences macroscopiques et mésoscopiques observées en fonction de la polydispersité de la  $\beta$ -lg.

Sur le plan de la structure en feuillets  $\beta$  et du maintien de la structure en calice hydrophobe de la  $\beta$ -lg, les mesures de spectroscopie infrarouge et de fluorescence frontale indiquent que celle-ci demeure intacte lors de l'interaction, ce qui laisse à penser que les propriétés de liaison des molécules hydrophobes par la  $\beta$ -lg peuvent ne pas être modifiées.

## Chapitre 4 Approche cinétique de la stabilité et de la structure des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

### 1 Introduction

Les différentes mesures effectuées sur les mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau ont été réalisées soit dans les instants qui ont suivi le mélange des deux dispersions macromoléculaires, soit à l'équilibre thermodynamique du système (cf Chap. 3). Or la coacervation complexe est avant tout un phénomène cinétique de structuration. Nous avons donc décidé d'utiliser des techniques expérimentales permettant de suivre la stabilité au cours du temps des mélanges à des concentrations totales en biopolymères différentes, afin de donner une dimension cinétique à notre étude et faire ainsi le lien entre les observations et mesures initiales et à l'équilibre.

Dans un premier temps, la séparation de phase a été étudiée dans des solutions concentrées à 1, 4,5 et 5% afin d'obtenir des informations sur la cinétique de coacervation complexe dans des conditions où l'interaction entre les biopolymères est importante et le nombre de particules formées élevé. Nous avons pour cela utilisé la technique de diffusion dynamique de la lumière en milieu turbide (DLMT). Cette technique permet de suivre l'évolution de la mobilité des particules obtenues, et donc le suivi des phénomènes de coalescence et de floculation entre celles-ci. Cette technique de diffusion de la lumière a été complétée par des observations réalisées par microscopie confocale à balayage laser sur des dispersions à 1%. Ainsi, la structuration du système et la morphologie des particules ont été suivies après marquage des deux macromolécules à l'aide de sondes fluorescentes.

Pour finir, une étude cinétique plus fondamentale de la séparation de phase a été réalisée par diffusion statique de la lumière aux petits angles sur des dispersions diluées à 0,1%. Cette technique permet de caractériser le type de mécanisme mis en jeu, à savoir décomposition spinodale ou nucléation et croissance en appliquant les modèles cinétiques qui ont été décrits dans le cas de la séparation de phase de mélanges polymériques ou colloïdaux.

### 2 Matériels et méthodes

#### 2.1 Matériels

Les dispersions de BLG, BLG<sub>agr</sub> et gomme d'acacia ont été préparées comme indiqué précédemment (Chap. 2, § 3.2.3). De même, le marquage des macromolécules par la FITC et la RITC a été réalisé suivant le protocole utilisé pour la microscopie confocale à balayage laser (Chapitre 3, § 2.2.2.3.2).

## 2.2 Méthodes

### 2.2.1 Suivi de la cinétique de séparation de phase par diffusion dynamique de la lumière en milieu turbide

#### 2.2.1.1 Principe de la diffusion de la lumière en milieu turbide

Cette technique de diffusion dynamique de la lumière a été développée il y a une dizaine d'années sous le nom de « diffusing wave spectroscopy » (Pine et al., 1988 ; Weitz et Pine, 1993). Son principe est proche de celui de la diffusion dynamique de la lumière classique où l'on considère les variations temporelles de l'intensité de lumière diffusée par les particules contenues dans une solution diluée (Berne et Pecora, 1976). Dans ce cas, la variation d'intensité de lumière diffusée dépend de la taille des particules et de leur mouvement Brownien. Seuls les phénomènes de diffusion simple sont alors considérés, ce qui explique l'utilisation de solutions diluées. Le principal désavantage de cette méthode, lorsque l'on tente d'étudier des milieux turbides, réside dans l'apparition de phénomènes de diffusion multiple de la lumière, ce qui rend difficile le traitement des résultats par les méthodes d'analyse classiques du signal.

Pour palier à ce problème, Weitz et al. (1993) proposent de tirer avantage du phénomène de diffusion multiple en ne considérant alors, non plus le trajet d'un seul photon dans la dispersion, mais le trajet d'un faisceau de lumière constitué de photons pouvant être diffusés plusieurs fois de façon aléatoire. Pour que cette théorie soit applicable, il convient de définir une valeur caractéristique  $l^*$  qui représente la plus petite distance de transport de la lumière avant que celle-ci ne soit rétro-diffusée. Cette valeur est d'autant plus petite que la turbidité de la solution sera grande. Lorsque  $l^*$  est atteinte, la diffusion de la lumière devient totalement aléatoire et ne dépend plus que du mouvement brownien des particules (Maret, 1997). Lorsque l'on calcule la fonction de corrélation de l'intensité du champ électrique,  $g_1(t)$ , obtenue en multipliant l'intensité mesurée à un temps  $t$  avec l'intensité mesurée à  $t + \tau$ , l'équation classique d'une exponentielle décroissante obtenue en diffusion simple se trouve modifiée pour inclure un terme de diffusion multiple,  $s/l^*$  (Eq. 4.1) :

$$g_1(t) = \int_0^\infty P(s) \exp -2(t/\tau_0)(s/l^*) ds \quad (4.1)$$

où  $\tau_0 = 1 / k_0^2 D_0$  est le temps de corrélation correspondant à la diffusion simple, avec  $k_0 = 2\pi n/l$ .  $D_0$  est le coefficient de diffusion des particules dans le milieu,  $n$  l'indice de réfraction du solvant,  $l$  la longueur de corrélation dans la dispersion et  $s$  le nombre de trajets optiques dans la dispersion.  $P(s)$  représente la probabilité pour que la lumière suive le trajet  $s$ , si bien que l'intégrale de cette expression donne l'ensemble des trajets optiques possibles. Si l'on considère que la distribution de la variation d'intensité de champ électrique est gaussienne autour de la valeur moyenne, la fonction de corrélation d'intensité lumineuse,  $g_2(t)$ , peut être calculée en appliquant la relation de Siegert (Eq. 4.2) :

$$g_2(t) = \langle I \rangle^2 + \beta |g_1(t)|^2 \quad (4.2)$$

où  $I$  est la valeur moyenne d'intensité diffusée et  $\beta$  une constante instrumentale qui dépend de la géométrie du dispositif d'émission/détection de la lumière. Lorsque l'on considère l'équation 4.1, il est remarquable que tant que la valeur de  $l^*$  n'est pas atteinte, les phénomènes de diffusion simple prédominent. En revanche une fois  $l^*$  atteinte, la diffusion

multiple et, par conséquent, le transport aléatoire de la lumière dans la dispersion deviennent effectifs (Wang et Miller, 1992). Comme l'amortissement de la fonction de corrélation représente le temps nécessaire pour que la somme des trajets optiques suivis par la lumière diffusée soit égale à la longueur d'onde de la lumière incidente, la décroissance de  $g_2(t)$  sera d'autant plus rapide que le système étudié sera turbide. En effet, la somme des distances parcourues par un photon du fait de sa diffusion multiple sera rapidement égale à la longueur d'onde si le nombre des phénomènes de rétro-diffusion est élevé.

### 2.2.1.2 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour réaliser nos mesures a été mis au point au NIZO food research de Ede (Pays-Bas). Le faisceau lumineux incident était constitué d'un laser NEC Corp. d'une puissance de 50 mW et d'une longueur d'onde de 632,8 nm. Il était émis au travers d'une fibre optique multi-modale immergée dans l'échantillon. La lumière rétro-diffusée par l'échantillon était ensuite collectée par une fibre optique réceptrice, mono-modale, reliée à un photomultiplicateur et à un corrélateur de type Flex Instruments 50R. La distance entre les deux fibres était de 4 mm. Le volume total de l'échantillon a été fixé à 90 ml et les fibres optiques ont été plongées à l'intérieur jusqu'à se trouver à 5 cm du fond de la cellule d'échantillonnage (soit environ la moitié de la hauteur de celle-ci). Les mesures, réalisées en duplicata, ont été initiées sur les dispersions de BLG et  $BLG_{agr}$  à pH 4.2, sans ajout de gomme d'acacia. Celle-ci a été ajoutée après 1 minute afin d'obtenir des ratios de mélange Pr : Ps de 8 : 1, 2 : 1 et 1 : 1 à des concentrations totales en biopolymères de 1, 4,5 et 5%.

Le choix des conditions expérimentales a été dicté par l'obtention d'une turbidité initiale importante des dispersions afin que la quantité de lumière rétro-diffusée puisse permettre le calcul d'une fonction de corrélation stable. La variation de l'intensité lumineuse rétro-diffusée a été enregistrée sur un intervalle de 60 s pendant 1 heure afin de permettre le calcul de  $g_2(t)$  via le photomultiplicateur et le corrélateur.

La variation de la mobilité des particules n'a pas pu être déterminée par l'intermédiaire du calcul du déplacement carré moyen des particules, obtenu par inversion de Laplace de la fonction de corrélation. En effet, ce traitement mathématique nécessite de connaître la valeur de  $l^*$  pour le système considéré (Weitz et Pine, 1993 ; ten Grotenhuis et al., 2000). Cette valeur est généralement déterminée par des mesures de transmission de la lumière dans une dispersion contenant des particules de taille connue et pour laquelle  $l^*$  est connue. En comparant les valeurs de transmission de la dispersion témoin avec celles de l'échantillon à analyser, on calcule la variation de  $l^*$  dans celui-ci. Dans un grand nombre d'études,  $l^*$  est, en première approximation, considéré comme constante. Cette approximation ne peut être utilisée dans nos systèmes du fait de la polydispersité initiale, mais également à cause des problèmes de floculation/coalescence ou sédimentation d'une partie des particules. Nous avons donc estimé la mobilité des particules en calculant le temps de demi-décroissance de la fonction de corrélation ( $\tau_{1/2}$ , en  $\mu s$ ). Celui-ci correspond au temps de corrélation pour lequel  $g_2(t)$  a diminué de la moitié de sa valeur initiale (Horne, 1991).

### 2.2.2 Suivi de la séparation de phase par microscopie confocale à balayage laser

Cette technique a été utilisée pour suivre les cinétiques de séparation de phase dans des dispersions colloïdales mixtes comme par exemple, caséines/gomme caroube/eau (Schorsch et al., 1999) ou gélatine/maltodextrine/eau (Lorén et al., 1999). Nous l'avons donc utilisée pour étudier la séparation de phase dans les mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau. Le principe et la préparation des échantillons ayant déjà été décrits dans le chapitre 3, nous ne précisons ici

que les points expérimentaux spécifiques de l'étude cinétique. Après marquage des dispersions de BLG et BLG<sub>agr</sub> par la FITC, et de la dispersion de gomme d'acacia par la RITC, le pH des dispersions à 1% a été ajusté à 3,6 et 4,2. Les dispersions ont ensuite été mélangées pour obtenir des ratios Pr : Ps de 8 : 1, 2 : 1 et 1 : 1. Un échantillon de 200 µl a été immédiatement prélevé puis placé sur une lame de verre pourvue d'une cupule centrale. Celle-ci a ensuite été recouverte d'une lamelle de verre, le tout étant rendu hermétique par de l'adhésif double-face afin d'éviter toute évaporation de l'échantillon. Les mélanges ainsi obtenus ont ensuite été observés à l'aide du microscope confocal. Une double excitation des fluorochromes a été mise en œuvre à des intervalles de temps logarithmiques s'échelonnant de 30 secondes à 14 heures afin d'éviter une diminution trop rapide de l'intensité de fluorescence. Lors de ces observations, le plan focal se trouvait à une distance  $\leq 30$  µm au-dessus de la lamelle en contact avec l'objectif. Les mesures ont été répétées sur deux échantillons indépendants préparés à un mois d'intervalle.

### **2.2.3 Suivi de la séparation de phase et de la structuration des mélanges par diffusion statique de la lumière aux petits angles**

#### **2.2.3.1 Principe de l'étude des phénomènes de séparation de phase par diffusion de la lumière au cours du temps**

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, la cinétique de séparation de phase liquide-liquide dans un mélange constitué de particules colloïdales ou de polymères peut être décrite par les mécanismes de décomposition spinodale ou de nucléation et croissance ; la décomposition spinodale pouvant être décrite à l'aide d'une théorie de la nucléation et croissance généralisée (Binder, 1991). Schématiquement, si la variation d'intensité de la fonction d'énergie libre d'un mélange macromoléculaire,  $\Delta G_M$ , est suffisante, la spinodale du diagramme de phases peut être franchie et le système se trouver directement dans la région biphasique (Tromp et al., 1995). En revanche, si cette variation d'énergie libre est plus faible, le mélange peut se retrouver dans la zone métastable. Dans ce cas la séparation de phase peut se réaliser selon un phénomène de nucléation et croissance.

De nombreux auteurs ont étudié le mécanisme de séparation de phase sur des mélanges de polymères ou de systèmes colloïdaux afin de prédire leurs propriétés structurales (Hashimoto et al., 1983, 1986 ; Bates et Wiltzius, 1989 ; Rouw et al., 1989 ; Lal et Bansil ; 1991 ; Lin et al., 1995 ; Mallamace et al., 1996 ; Lefebvre et al., 1999 ; Kojima et al., 1999 ; Van Bruggen et al., 1999 ; Takeshita et al., 1999) ou sur des solutions protéiques afin de déterminer les conditions optimales de cristallisation (Umbach et al., 1998 ; Georgalis et al., 1998 ; Georgalis et al., 1999). Il n'existe cependant que très peu d'études concernant des mélanges biopolymériques, constitués d'un ou de plusieurs biopolymères (Durrani et al., 1993 ; Tromp et al., 1995 ; 1996 ; Manno et al., 1999 ; Kita et al., 1999 ; Tuinier et al., 2000).

Lorsqu'un système colloïdal est sujet à un phénomène de séparation de phase, il est possible de suivre l'évolution de sa structuration au cours du temps par diffusion de la lumière aux petits angles. En effet, le suivi de la variation de l'intensité du facteur de structure,  $S(q)$  en fonction de son vecteur d'onde associé,  $q$ , est caractéristique de la structure et de la morphologie du système. Le facteur de structure d'une dispersion colloïdale est défini par :

$$S(q) = I(q).F(q) \quad (4.3)$$

où  $I(q)$  est l'intensité diffusée et  $F(q)$  le facteur de forme. Dans le cas de particules sphériques de petite taille,  $F(q) \sim 1$ , si bien que  $S(q) \sim I(q)$ .



Lorsque le mélange se trouve dans la zone biphasique du diagramme de phases, des fluctuations locales de la concentration en macromolécules apparaissent spontanément dans le système conduisant à la formation de domaines structuraux. Ces fluctuations sont généralement instables et sont caractérisées par un coefficient de diffusion négatif (migration des molécules des régions les moins concentrées vers les régions les plus concentrées). Ces phénomènes peuvent entraîner un accroissement préférentiel de la densité de certaines fluctuations avec le temps (Georgalis et Saenger, 1999 ; Tuinier et al., 2000).

En terme de signal de diffusion de la lumière, on observe un pic caractéristique d'intensité diffusée dont la croissance est plus rapide que les autres. Ce pic de corrélation est localisé à un vecteur d'onde caractéristique,  $q_{\max}$ , pour lequel la composante de Fourier possède la vitesse de croissance maximale (Hashimoto et al., 1986). Si le système se sépare par le mécanisme de décomposition spinodale, les premiers stades du phénomène sont caractérisés par une croissance exponentielle de l'intensité diffusée  $I_{\max}$  correspondant à  $q_{\max}$  en fonction du temps. En revanche,  $q_{\max}$  reste indépendant du temps dans les phases initiales. Lors d'étapes intermédiaires, l'intensité maximale diffusée correspondant à  $q_{\max}$  augmente et l'on assiste à un déplacement de  $q_{\max}$  vers des valeurs de  $q$  plus petites, ce qui signifie que la longueur de corrélation des différents domaines structuraux augmente dans la dispersion. Dans les étapes terminales ou tardives de la décomposition spinodale, la position de  $q_{\max}$  se stabilise de même que son intensité associée,  $I_{\max}$ . Après cette dernière étape, le système est proche de l'équilibre et sa structuration en voie d'achèvement (Lefebvre et al., 1999 ; Tuinier et al., 2000).

Dans le cas de la nucléation et croissance, il a longtemps été admis que sa signature caractéristique en diffusion de la lumière était la présence d'un maximum d'intensité diffusée à  $q = 0$  couplée à une décroissance monotone jusqu'à obtenir un pic de corrélation caractérisé par une valeur  $q_{\max}$  (Eliçabe et al., 1998). Dans ces conditions, il était plutôt aisé de distinguer la décomposition spinodale (DS) de la nucléation et croissance (NC). Cependant, certains auteurs ont récemment mis en évidence la possibilité d'obtenir un pic de corrélation ne se situant pas à  $q_{\max} = 0$  dans les premiers instants de la NC (Eliçabe et al., 1998). Ceci est par exemple le cas si les particules de la phase dispersée ont une faible concentration et qu'il se forme une couche de déplétion en macromolécules autour d'elles, mais également à de très fortes concentrations des particules de la phase dispersée du fait du confinement de celles-ci dans un volume restreint (Binder, 1991). Par la suite,  $q_{\max}$  peut alors se déplacer vers des valeurs de  $q$  supérieures ou vers des valeurs de  $q$  inférieures en fonction du phénomène de stabilisation et de structuration du système. La distinction entre DS et NC devient alors difficile.

Conscients de la difficulté de discerner la DS de la NC dans leurs étapes initiales et intermédiaires, nous allons cependant décrire brièvement les modèles ayant été proposés pour décrire les différentes étapes de la décomposition spinodale. Nous comparerons ceux-ci avec nos résultats expérimentaux afin d'essayer de mettre en évidence le mécanisme de séparation de phase impliqué dans le cas de nos mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau.

Les étapes initiales de la séparation de phase sont majoritairement caractérisées par des phénomènes de diffusion des macromolécules. Ainsi, Cahn et Hilliard (1958) ont montré que la valeur maximale de l'intensité diffusée,  $I_{\max}$  croît exponentiellement au cours du temps, la valeur du vecteur d'onde associé,  $q_{\max}$  restant constante selon l'équation 4.4 :

$$I(q) \sim e^{2R(q)t} \quad (4.4)$$

avec  $R(q) = Dq^2(1 - (q^2/2q_{\max(0)}^2))$ , où  $D$  est le coefficient de diffusion initial des particules et  $q_{\max(0)}$  le vecteur d'onde à  $t = 0$ . La représentation de  $\log(I(q))$  en fonction du temps ( $t$ ) doit donc aboutir à une droite si l'on se trouve dans les instants initiaux de la DS. Il est alors possible de déterminer la longueur de corrélation,  $\Lambda = 2\pi/q_{\max}$ , caractéristique de la taille des domaines structuraux et de suivre son évolution au cours du temps.

Les phases intermédiaires de la décomposition spinodale sont caractérisées par le déplacement de  $q_{\max}$  vers des valeurs faibles et une augmentation de  $I_{\max}$ . Ce phénomène peut être expliqué par une coalescence des domaines de concentration formés initialement. Si l'on assimile ceux-ci à des gouttelettes de petite taille, Lifshitz et Slyozov (1961) ont prédit que ces gouttelettes de taille  $\Lambda$  coalescent ensuite entre-elles avec un temps de diffusion caractéristique  $\tau \sim \Lambda^2/D$ , où  $D$  est le coefficient de diffusion des gouttelettes (Tuinier et al., 2000). En utilisant l'équation de Stokes-Einstein  $D = k_B T / 6\pi\eta\Lambda$ , nous pouvons obtenir l'équation différentielle de la vitesse de croissance des gouttelettes :

$$d\Lambda^3(t)/dt \sim k_B T / \eta \quad (4.5)$$

où  $\eta$  est la viscosité du solvant. De l'Eq. 4.5, il résulte que  $q_{\max} \sim t^{-1/3}$  dans les phases intermédiaires de la décomposition spinodale. Afin de généraliser cette relation en tenant compte de la contribution respective des phénomènes de diffusion et des interactions hydrodynamiques dans les phases intermédiaires, des lois en puissance ont été proposées pour décrire la variation de  $q_{\max}$  et  $I_{\max}$  au cours du temps :

$$q_{\max} \sim t^{-\alpha} \quad \text{et} \quad I_{\max} \sim t^{\beta} \quad (4.6)$$

Les valeurs prises par ces exposants sont caractéristiques du type de phénomènes mis en jeu. Ainsi lorsque  $\alpha = 1/3$ , les phénomènes de diffusion sont majoritaires. En revanche, lorsque  $\alpha = 1$ , ce sont les mécanismes hydrodynamiques liés aux mouvements de fluide qui sont prédominants (Binder et Stauffer, 1974 ; Siggia, 1979 ; Bastea et Lebowitz, 1995 ; Lin et al., 1995 ; Tromp et al., 1995). Lorsque l'inertie du fluide devient prépondérante,  $\alpha = 2/3$  (Cates et al., 1999). Il est généralement admis que les phases intermédiaires de la décomposition spinodale sont atteintes lorsque  $\beta > 3\alpha$ . En revanche, le système atteint les phases tardives de la décomposition spinodale quand  $\beta = 3\alpha$ .

L'une des caractéristiques des courbes obtenues dans les phases intermédiaires et tardives de la DS réside dans la propriété de mise à l'échelle des courbes d'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde, ceci du fait de la similitude de structure à différentes échelles d'observation (Furukawa, 1984 ; Hashimoto et al., 1986). La transformation la plus employée consiste à normaliser  $I(q)$  par  $I_{\max}$  et  $q$  par  $q_{\max}$ , puis à tracer  $I/I_{\max}$  en fonction de  $q/q_{\max}$ . On peut ensuite vérifier si les courbes ainsi normalisées se superposent sur l'un des modèles en puissance de mise à l'échelle proposés, comme par exemple celui de Dhont (1996), valable pour des mélanges de particules sphériques :

$$I(q)/I_{\max}(q) = \exp [-30 (q/q_{\max} - 1)^2 - 25 (q/q_{\max} - 1)^3] \quad (4.7)$$

Ce modèle peut être utilisé pour décrire les phases intermédiaires de la décomposition spinodale. Furukawa (1984) a proposé un modèle différent tenant compte des interactions hydrodynamiques dans les phases tardives et valable pour les valeurs de  $q/q_{\max} > 1$  :

$$I(q)/I_{\max}(q) = 3 (q/q_{\max})^2 / (2 + (q/q_{\max})^\gamma) \quad (4.8)$$

où l'exposant  $\gamma$  peut prendre la valeur de 6 lorsque l'interface entre les deux phases formées est courbe et lisse, ou 8 lorsque l'interface présente une structure enchevêtrée (« entangled »).

Lorsque le système atteint le stade final de la décomposition spinodale, la valeur de  $q_{\max}$  est minimale et la diffusion de la lumière est majoritairement due à la contribution des interfaces formées. Il est alors possible d'obtenir une proportionnalité entre  $I(q)$  et  $q$  décrite par l'asymptote obtenue pour les grandes valeurs de  $q$  (Eq. 4.9). Cette asymptote décrit en fait la morphologie du milieu de diffusion (Bansil et Liao, 1997).

$$I(q) \sim S(q) \sim q^{-\gamma} \quad (4.9)$$

avec  $\gamma = d_s - 2d_v$ , où  $d_v$  et  $d_s$  sont les contributions des dimensions de volume et de surface à l'interface formée entre les deux phases. L'asymptote est décroissante en  $q^{-6}$  si la morphologie du domaine structural possède une contribution de volume ( $d_v = 3$ ). En revanche, elle sera décroissante en  $q^{-(6-d_s)}$  dans le cas de surfaces rugueuses. Enfin, si la surface est lisse,  $d_s = 2$ , et l'on obtient la classique asymptote en  $q^{-4}$  proposée par Porod (1982). Il est à noter que la détermination de  $\gamma$  peut également être réalisée après avoir mis à l'échelle les courbes selon l'équation 4.10 (Mallamace et al., 1996) :

$$q_{\max}^3 \cdot I(q) \sim (q/q_{\max})^{-\gamma} \quad (4.10)$$

Dans certains cas, la contribution  $d_s$  peut ne pas être une valeur entière. On obtient alors une asymptote décroissante en  $q^{-d_f}$ , où  $d_f$  représente la dimension fractale de la surface des particules. Ceci indique que l'interface entre les deux phases formées est une combinaison entre une surface et un volume (Carpinetti et Giglio, 1992). Pour des systèmes colloïdaux composés de particules minérales ou organiques,  $d_f$  est généralement compris entre 2 et 3 (Chen et Teixeira, 1986 ; Bremer et al., 1990 ; Vétier et al., 1997 ; Robinson et Earnshaw, 1993 ; Brown et al., 1999 ; Lehner et al., 1999 ; Bushell et Amal, 1998, 2000 ; Tang et al., 2000).

### 2.2.3.2 Dispositif expérimental

Les mesures de DSLPA ont été réalisées au NIZO food research (Ede) à l'aide d'un granulomètre laser de type Mastersizer E (Malvern Instruments) équipé d'un laser He/Ne ( $\lambda = 632,8$  nm) et de détecteurs placés à de très petits angles. Le dispositif optique utilisé était constitué d'une lentille convergente de 45 mm de distance focale, permettant de couvrir une gamme de vecteurs d'onde allant de  $0,053469 \mu\text{m}^{-1} < q < 10,21355 \mu\text{m}^{-1}$ . L'épaisseur de la cellule de mesure était de 0,5 mm afin de minimiser les phénomènes de diffusion multiple de la lumière. Après mélange, les dispersions ont été introduites dans la cellule de mesure à l'aide d'une seringue, puis le système a été laissé à 20°C durant 14 heures. Les intensités absolues  $I(q)$  des mélanges BLG/gomme d'acacia/eau et BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau ont été corrigées en soustrayant l'intensité des dispersions protéiques correspondantes à des concentrations en  $\beta$ -lg identiques. Dans notre étude, les intensités de lumière diffusée [ $I(q)$ ] sont utilisées à la place des facteurs de structure [ $S(q)$ ] car nous avons, compte tenu des angles utilisés, approximé le facteur de forme correspondant aux domaines structuraux à 1 (van Bruggen et al., 1999). La concentration totale des dispersions utilisées était de 0,1%, le ratio de mélange de 8 : 1 (afin d'éviter une séparation de phase trop rapide et limiter le niveau

de turbidité du mélange) et les pH de 3,6 et 4,2. En effet, le pH de 5,0 conduit à la présence d'agrégats protéiques de trop grande taille et en trop grand nombre pour pouvoir négliger la diffusion multiple de la lumière. Les mesures ont été dupliquées.

### 3 Résultats et discussion

#### 3.1 Suivi de la structure au cours du temps des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau par diffusion dynamique de la lumière en milieu turbide (DLMT)

Les résultats obtenus à pH 4,2 par la méthode de DLMT pour des dispersions  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau à 1, 4,5 et 5% ont été analysés en terme de variation de l'intensité de lumière rétro-diffusée ( $I_{rd}$ ). Cette variable renseigne en fait sur le niveau de turbidité des dispersions et donc sur leur structure. Nous avons également étudié la variation de  $\tau_{1/2}$  qui est caractéristique du temps d'amortissement de la fonction de corrélation, donc de la mobilité des particules.

##### *Mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau à 1%*

La Figure 4.1 présente la variation de  $I_{rd}$  (normalisée par  $I_{rd}$  initiale) en fonction du temps pour des dispersions BLG/gomme d'acacia/eau et  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau. Chaque valeur représente la moyenne de l'intensité rétro-diffusée durant 60 secondes. La caractéristique commune à toutes les dispersions réside dans la diminution de l'intensité rétro-diffusée au cours du temps, ce qui implique une diminution de la turbidité des mélanges et par conséquent une diminution du nombre de particules.

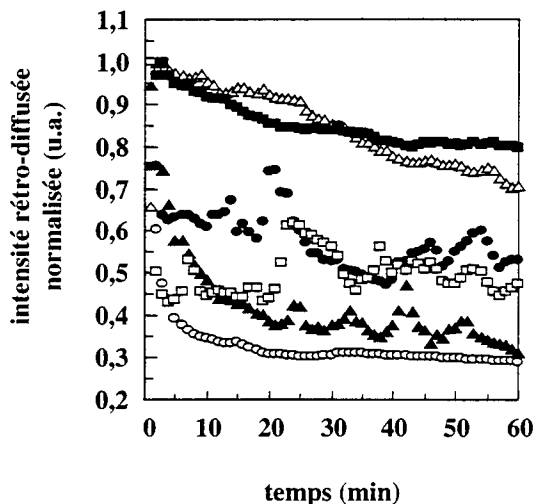
Si l'on considère l'influence du ratio  $Pr : Ps$  et de la présence d'agrégats dans la dispersion protéique initiale, il est possible de distinguer 3 groupes de cinétiques en fonction de la variation de  $I_{rd}$ :

- le premier groupe est constitué des cinétiques obtenues dans les mélanges BLG(1)/gomme d'acacia(1)/eau et  $BLG_{agr}(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau pour lesquels la diminution de  $I_{rd}$  au cours du temps est faible (~ 15 à 25%) et graduelle.

- le deuxième groupe est composé des cinétiques obtenues pour les mélanges BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau et  $BLG_{agr}(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau. Dans ce cas, on observe une évolution complexe de  $I_{rd}$  selon cinq phases. Les deux premières phases consistent en une diminution rapide de  $I_{rd}$  lors des 5 premières minutes, puis un état stationnaire (5/10 à 15 min) où  $I_{rd}$  ne varie pas au cours du temps. La troisième phase est constituée d'une augmentation de 15 à 25% de  $I_{rd}$  entre 15 et 20 minutes. Enfin, les quatrième et cinquième phases se caractérisent par une nouvelle diminution suivie d'un état plus ou moins stationnaire, respectivement.

- le troisième type de cinétique concerne les mélanges BLG(2)/gomme d'acacia(1)/eau et  $BLG_{agr}(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau ; elles sont caractérisées par une forte diminution de l'intensité rétro-diffusée au cours du temps, de l'ordre de 70%, avec une chute initiale importante durant les 10 premières minutes, puis une diminution constante.

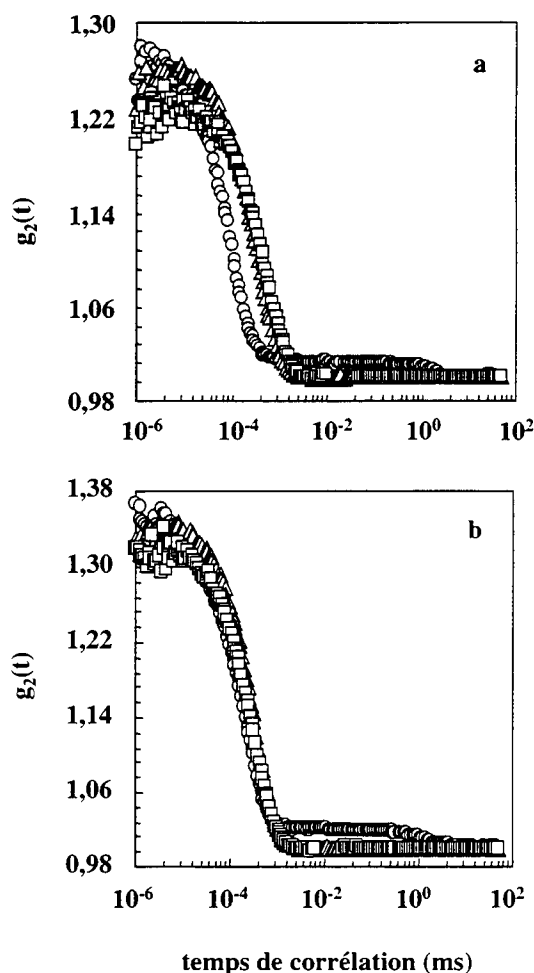
D'un point de vue macroscopique, une sédimentation des particules était observable à l'œil nu dans les mélanges des 2 derniers groupes quelques secondes après addition de la gomme d'acacia. Au contraire, les mélanges appartenant au premier groupe restaient turbides au cours de la cinétique.



**Figure 4.1 :** Variation de l'intensité rétro-diffusée normalisée au cours du temps à 20°C pour des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 1%. Mélange BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau, ratio Pr : Ps 8 : 1 (○) ; 2 : 1 (△) ; 1 : 1 (□). Mélange BLG/gomme d'acacia/eau, ratio Pr : Ps 8 : 1 (●) ; 2 : 1 (▲) ; 1 : 1 (■).

La faible turbidité de certains mélanges au cours du temps a rendu difficile le calcul d'une fonction de corrélation [cas des mélanges BLG(2)/gomme d'acacia(1)/eau et BLG<sub>agr</sub>(1)/gomme d'acacia(1)/eau], voire impossible [cas des mélanges BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau et BLG<sub>agr</sub>(8)/gomme d'acacia(1)/eau].

Dans les cas où l'intensité rétro-diffusée était suffisamment élevée et stable, c'est à dire pour les mélanges BLG<sub>agr</sub>(2)/gomme d'acacia(1)/eau et BLG(1)/gomme d'acacia(1)/eau, les fonctions de corrélation,  $g_2(t)$ , ont été calculées (Figure 4.2). On peut alors noter une diminution de la valeur initiale de  $g_2(t)$  au cours du temps ainsi que son déplacement vers des temps de corrélation plus élevés. Ceci indique une diminution du nombre des particules dans le mélange et une augmentation des coefficients de diffusion de celles-ci (Figure 4.2a et b). Les oscillations visibles sur les fonctions de corrélation pour des temps de corrélation de l'ordre de  $10^{-2}$  ms pourraient s'expliquer par le niveau moyen de turbidité des mélanges, car on les retrouve également, avec une amplitude cependant beaucoup plus marquée, sur les fonctions de corrélation correspondant aux dispersions protéiques avant ajout de la gomme d'acacia.

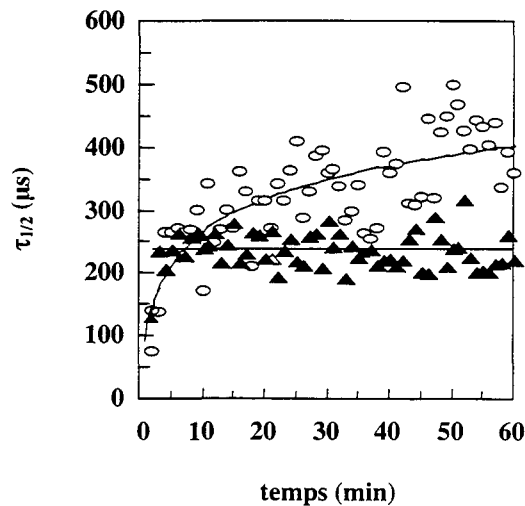


**Figure 4.2 :** Fonctions de corrélation obtenues par DLMT à 20°C pour des dispersions mixtes  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau à pH 4,2 et pour une concentration totale en biopolymères de 1%. (a) Mélange  $BLG_{agr}(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau. (b) Mélange  $BLG(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau. Les fonctions de corrélation ont été obtenues 1 min (  $\circ$  ), 4 min (  $\triangle$  ), 39 min (  $\square$  ) après ajout de la gomme d'acacia.

Nous avons estimé la variation de la mobilité des particules en calculant le temps de demi-décroissance de la fonction de corrélation,  $\tau_{1/2}$ , également proportionnel à la mobilité des particules (Figure 4.3).

Pour les deux mélanges étudiés [ $BLG(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau et  $BLG_{agr}(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau],  $\tau_{1/2}$  est caractérisé par une forte augmentation durant les 5 premières minutes, ce qui implique une forte diminution de la mobilité des particules, et par conséquent une augmentation de leur taille (Horne, 1991 ; Horne et Davidson, 1993 ; Vasbinder et al., 2000 ; ten Grotenhuis et al., 2000). Après cette phase d'augmentation,  $\tau_{1/2}$  atteint une valeur constante aux alentours de 225  $\mu$ s pour le mélange  $BLG(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau indiquant une stabilité de la taille des particules animées de mouvement brownien.

En revanche, dans le cas du mélange  $BLG_{agr}(2)/$ gomme d'acacia(1)/eau,  $\tau_{1/2}$  augmente constamment de 250  $\mu s$  à 400  $\mu s$ , ce qui prouve que la taille des particules obtenues dans ce système continue de croître.



**Figure 4.3 :** Evolution du temps de demi-décroissance de la fonction de corrélation ( $\tau_{1/2}$ ) calculé à 20°C pour des mélanges  $\beta$ -Ilg/gomme d'acacia/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 1%. (  $\circ$  ) Mélange  $BLG_{agr}(2)/$ gomme d'acacia(1)/eau. (  $\blacktriangle$  ) Mélange  $BLG(1)/$ gomme d'acacia(1)/eau. Les lignes continues constituent uniquement un repère visuel.

#### *Mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau à 4,5 et 5%*

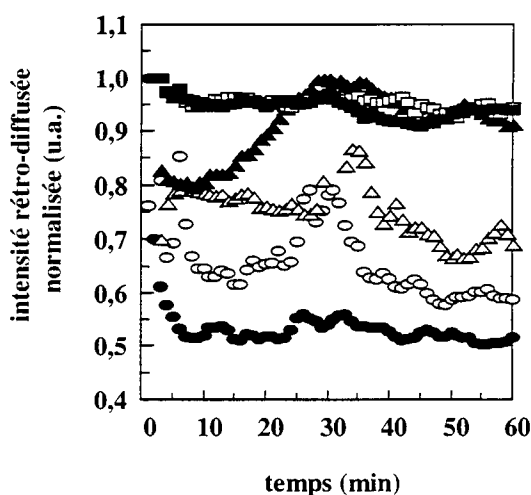
Des mesures identiques ont été réalisées sur les mélanges obtenus à 4,5% ( $BLG/gomme$  d'acacia/eau) et 5% ( $BLG_{agr}/gomme$  d'acacia/eau). L'augmentation de la concentration totale en biopolymères est censée augmenter le nombre de particules pouvant diffuser la lumière, ce qui devrait être par conséquent favorable à la technique de DLMT.

Lorsque l'on observe la variation de l'intensité rétro-diffusée en fonction du temps, on note une baisse globale de ce paramètre (Figure 4.4). Cette diminution d'intensité est modérée si on la compare à celle obtenue dans les mélanges à 1%, ce qui indique une stabilisation du signal de DLMT par l'augmentation de la concentration totale en biopolymères. Contrairement au cas précédent, le ratio de mélange Pr : Ps a une influence sur la stabilité du signal de rétro-diffusion à pH 4,2 puisque, d'une manière générale, celle-ci est d'autant plus élevée que le ratio est faible ( $1 : 1 > 2 : 1 > 8 : 1$ ). Par exemple,  $I_{rd}$  diminue respectivement de  $\sim 40\%$ ,  $\sim 30\%$  et  $\sim 10\%$  dans les dispersions  $BLG_{agr}/gomme$  d'acacia/eau pour les ratios 8 : 1, 2 : 1 et 1 : 1 (Figure 4.4).

L'évolution de l'intensité rétro-diffusée dans les mélanges  $BLG(8)/gomme$  d'acacia(1)/eau et  $BLG_{agr}(8)/gomme$  d'acacia(1)/eau est caractérisée par une très forte diminution au cours des dix premières minutes. Cette diminution peut être corrélée avec l'observation macroscopique d'une sédimentation très rapide des particules après ajout de la gomme d'acacia. A l'opposé,  $I_{rd}$  diminue faiblement pour les mélanges  $BLG(1)/gomme$

d'acacia(1)/eau et  $BLG_{agr}(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau, la valeur obtenue restant comprise entre 90 et 95% de la valeur initiale. Ces résultats sont en accord avec l'observation macroscopique des mélanges, précédemment décrite (cf chap. 3, § 3.1.4.1), qui fait apparaître une turbidité persistante dans la phase supérieure, en équilibre avec une phase concentrée, et ce même après deux jours.

Les mélanges  $BLG(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau et  $BLG_{agr}(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau et  $BLG(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau présentent une évolution de  $I_{rd}$  en quatre phases, rappelant celle précédemment décrite à une concentration totale en biopolymères de 1% (groupe 2). On observe en effet une diminution rapide initiale de  $I_{rd}$ , suivie d'une stabilisation. Une augmentation de  $I_{rd}$ , caractérisée par un maximum aux alentours de 25 à 35 min précède ensuite une nouvelle diminution.



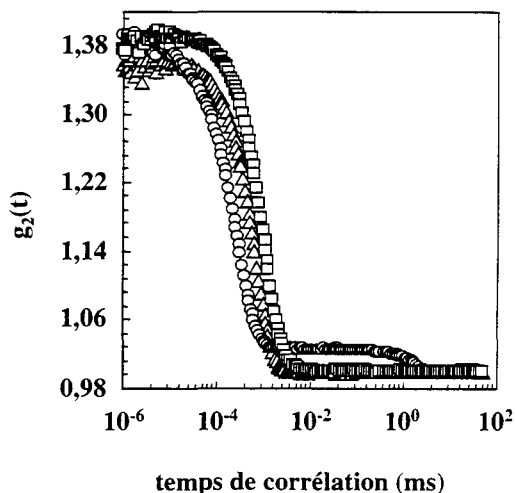
**Figure 4.4 :** Variation de l'intensité rétro-diffusée normalisée au cours du temps à 20°C pour des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 4,5 et 5%. Mélange  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau, ratio 8 : 1 (○) ; 2 : 1 (△) ; 1 : 1 (□). Mélange  $BLG$ /gomme d'acacia/eau, ratio 8 : 1 (●) ; 2 : 1 (▲) ; 1 : 1 (■).

La stabilité du signal d'intensité rétro-diffusée au cours du temps a permis le calcul des fonctions de corrélation dans le cas des mélanges  $BLG$ /gomme d'acacia/eau et  $BLG_{agr}$ /gomme d'acacia/eau aux ratios Pr : Ps 2 : 1 et 1 : 1 (Figure 4.5).

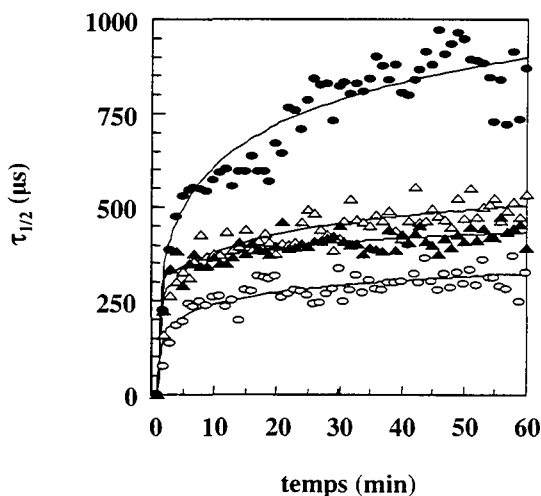
Dans le cas du ratio 8 : 1, avec ou sans agrégats, les fonctions de corrélation calculées étaient très mal définies, leur intensité rejoignant très rapidement celle du bruit de fond. Les fonctions de corrélation présentées sur la figure 4.5 sont caractéristiques de celles obtenues pour les autres mélanges. On notera ici la forme typique en exponentielle décroissante, caractérisée par un déplacement vers des temps de corrélation plus longs au cours du temps. A nouveau, ces caractéristiques indiquent une augmentation de la taille des particules obtenues au cours du temps, et de ce fait une diminution de leur mobilité. Cette analyse est confirmée par le calcul de  $\tau_{1/2}$ , puisque celui-ci augmente globalement au cours du temps dans les mélanges (Figure 4.6). Comme pour la concentration totale en biopolymères de 1%, on note une forte augmentation de  $\tau_{1/2}$  lors des 5 premières minutes suivant l'addition de gomme



d'acacia aux dispersions de  $\beta$ -lg. Des différences importantes sont ensuite remarquées entre les différents ratios Pr : Ps,  $\tau_{1/2}$  étant multiplié par 5, 8-10 et 20, respectivement pour les mélanges BLG<sub>agr</sub>(2)/gomme d'acacia(1)/eau, [BLG<sub>agr</sub>(1)/gomme d'acacia(1)/eau et BLG(2)/gomme d'acacia(1)/eau] et BLG(1)/gomme d'acacia(1)/eau.



**Figure 4.5 :** Fonctions de corrélation obtenues par DLMT à 20°C pour une dispersion mixte BLG(1)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et pour une concentration totale en biopolymères de 4,5%. Les fonctions de corrélation ont été obtenues 1 min (  $\circ$  ), 4 min (  $\triangle$  ), 39 min (  $\square$  ) après ajout de la gomme d'acacia.



**Figure 4.6 :** Evolution du temps de demi-décroissance de la fonction de corrélation calculé à 20°C pour des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 4,5 et 5%. Mélange BLG<sub>agr</sub>/gomme d'acacia/eau, ratio 2 : 1 (  $\circ$  ); 1 : 1 (  $\triangle$  ). Mélange BLG/gomme d'acacia/eau, ratio 2 : 1 (  $\bullet$  ); 1 : 1 (  $\blacktriangle$  ). Les lignes continues constituent uniquement un repère visuel.

### **Interprétation des résultats**

Comme nous l'avons mis en évidence dans le chapitre 3, les mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau sont caractérisés par la présence de particules présentant une forte polydispersité de taille à pH 4,2. Nous avons clairement montré par MCBL que les coacervats peuvent flocculer et coalescer, pour former des structures plus grandes, susceptibles de sédimenter lorsqu'elles atteignent une taille critique. Il en est de même pour les précipités obtenus dans les mélanges contenant des agrégats.

La variation de l'intensité rétro-diffusée dans les mélanges se trouve donc être la résultante d'un équilibre entre des phénomènes de formation, de floculation et/ou de coalescence et de sédimentation des précipités et coacervats, qui sont certainement caractérisés par des vitesses de réaction différentes. On peut alors aisément comprendre, qu'en fonction du ratio Pr : Ps, de la concentration totale en biopolymères ou de la présence ou pas d'agrégats de  $\beta$ -lg, la contribution de ces différents phénomènes dans le signal global de rétro-diffusion varie au cours du temps, ce qui aboutit aux trois types de cinétiques observés.

Lorsque les vitesses de réaction des différents phénomènes s'équilibrent,  $I_{rd}$  varie peu au cours du temps. A l'inverse, si l'un des phénomènes cités précédemment prévaut transitoirement dans les mélanges,  $I_{rd}$  peut augmenter (augmentation du nombre de particules) ou diminuer (floculation ou coalescence des particules soumises au mouvement brownien, sédimentation des particules les plus grosses). Ce type de scénario a été récemment proposé pour expliquer l'évolution du système BLG(1)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 et une concentration totale de 2% en suivant l'évolution de la taille des précipités et coacervats par granulométrie laser et microscopie optique à contraste de phase (Sanchez et al., 2001).

L'influence de la concentration totale sur la stabilité du signal de rétro-diffusion a été clairement démontrée puisqu'une concentration en biopolymères plus élevée stabilise le signal obtenu en DLMT. Ce résultat peut être attribué au nombre plus important de particules formées. Dans ce cas, l'utilisation de la DLMT paraît particulièrement intéressante puisque la turbidité du mélange demeure suffisamment élevée pour permettre une diffusion multiple et aléatoire de la lumière (Weitz et al., 1993).

L'apparition d'oscillations périodiques amorties sur certaines fonctions de corrélation paraît également intéressante. Celles-ci sont généralement obtenues pour des dispersions où le niveau de turbidité est faible ainsi que sur les dispersions protéiques. De telles oscillations ont été mises en évidence par diffusion dynamique classique de la lumière dans des systèmes polymère-solvant soumis à un cisaillement (Tsunashima et Takahashi, 1999). Les auteurs attribuent ce signal à la formation de structures dissipatives, caractéristiques de la structuration de nombreux systèmes polymériques hors-équilibre thermodynamique (Prigogine, 1978).

### **3.2 Suivi de la stabilité des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau par microscopie confocale à balayage laser**

Nous avons tenté de voir s'il était possible d'obtenir des indications sur les phénomènes de floculation, coalescence et sédimentation des particules au cours du temps par une observation cinétique des dispersions obtenues à pH 4,2 et une concentration de 1% en

utilisant la microscopie confocale à balayage laser. Même s'il est difficile de corrélérer des observations réalisées ici en 2D et les mesures de DLMT en 3D, le recoupement des différents résultats peut permettre de préciser l'argumentation présentée précédemment.

#### **Mélanges $BLG_{agr}(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau et $BLG(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2**

Après mélange, les cinétiques obtenues à pH 4,2 sont caractérisées par la présence de précipités et de coacervats dans le mélange  $BLG_{agr}(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau et de coacervats dans le mélange  $BLG(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau (Figures 4.7 et 4.8). Ceci confirme les résultats que nous avons présentés dans le chapitre 3. Cette observation est intéressante puisque ces expériences ont été réalisées à plus d'un an d'intervalle, ce qui prouve la répétabilité et la reproductibilité de la méthode.

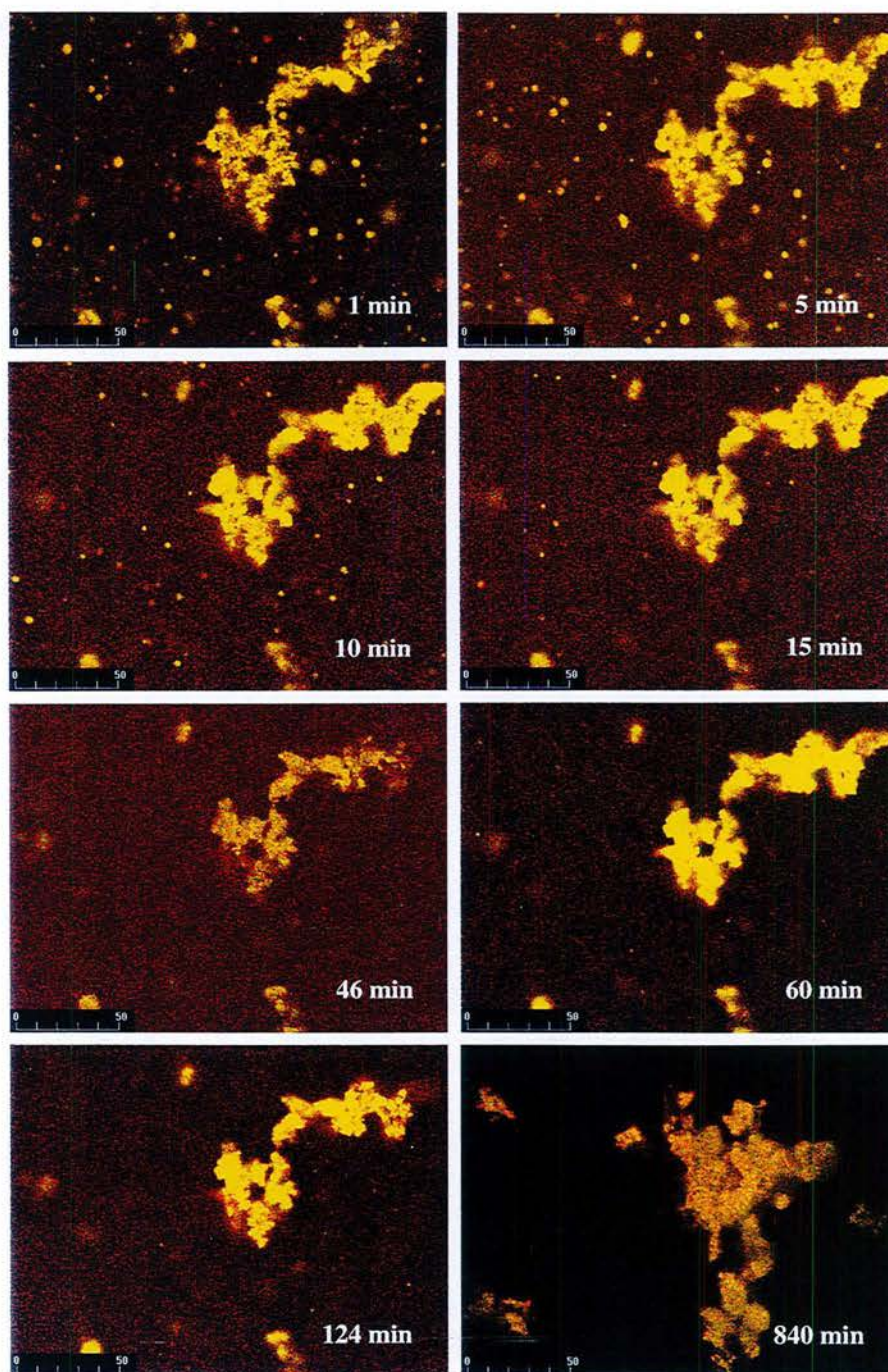
Lorsque l'on suit l'évolution de la structure du système  $BLG_{agr}(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau au cours du temps, on peut remarquer que les précipités subissent peu de modifications, excepté après des temps d'observation très longs (840 min) pour lesquels la surface semble être devenue moins hétérogène. En ce qui concerne les coacervats, que nous estimons ici non vacuolisés, l'évolution au cours du temps montre une diminution de leur nombre, puisqu'on ne parvient plus à en distinguer après 45 min. La question reste de savoir si ces particules ont disparu du plan focal du fait de leur sédimentation ou si elles ont interagi avec les précipités. En effet, comme la surface de ceux-ci est devenue plus « lisse » après 840 min, les coacervats ayant disparu ont pu s'adsorber sur les précipités.

Dans le système  $BLG(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau, des coacervats non vacuolisés sont visibles après 1 min (Figure 4.8). Ils présentent une faible polydispersité de taille puisqu'elle varie de 1 à 5  $\mu\text{m}$ . Au cours du temps, la taille des coacervats reste constante mais leur nombre diminue progressivement, si bien que l'on n'en distingue plus dans le plan focal après 2 heures. Après 930 min, des particules sphériques ayant des tailles de l'ordre de 25  $\mu\text{m}$  sont visibles.

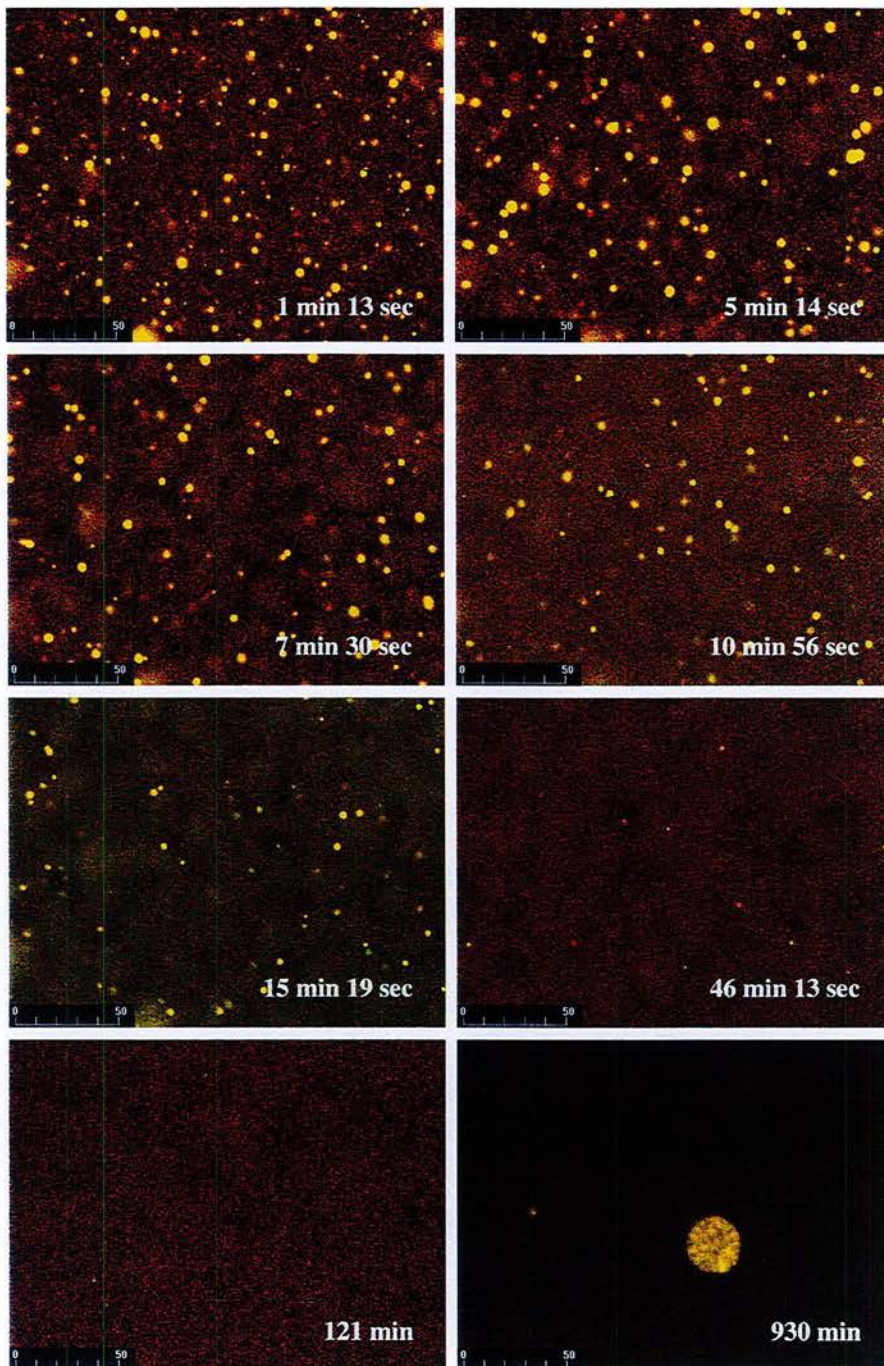
#### **Comparaison MCBL-DLMT**

Si l'on tente de corrélérer les observations de MCBL avec les résultats de DLMT dans ces deux systèmes, une bonne concordance est obtenue. En effet, dans le mélange contenant les agrégats, la diminution rapide initiale de  $I_{rd}$  s'explique par la sédimentation initiale des précipités. Le signal de DLMT résulte ensuite des coacervats et des précipités de plus petite taille présents dans le mélange.

Il est plus difficile de relier les résultats de DLMT obtenus dans le mélange  $BLG(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau et la MCBL. En effet, le nombre de particules observables par MCBL diminue fortement au cours du temps alors que le signal de  $I_{rd}$  décroît seulement de  $\sim 40\%$  en moyenne. Cette apparente contradiction peut néanmoins s'expliquer si des coacervats ayant une taille inférieure à la limite de résolution du microscope confocal soit  $\lambda/2$  ( $\sim 200$  à  $250$  nm) contribuent à l'intensité rétro-diffusée. De même, la floculation et la coalescence de ces coacervats peut être la raison des augmentations transitoires de  $I_{rd}$ . Ce résultat met en évidence la difficulté de comparer les deux types de techniques, même si les concentrations en biopolymères utilisées sont identiques.



**Figure 4.7 :** Cinétique de séparation de phase à 20°C obtenue par MCBL dans le mélange  $BLG_{agr}(8)/gomme\ d'acacia(1)/eau$  à pH 4,2 et à une concentration totale en biopolymères de 1%. La barre d'échelle représente 50 µm.



**Figure 4.8 :** Cinétique de séparation de phase à 20°C obtenue par MCBL dans le mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et à une concentration totale en biopolymères de 1%. La barre d'échelle représente 50 µm.

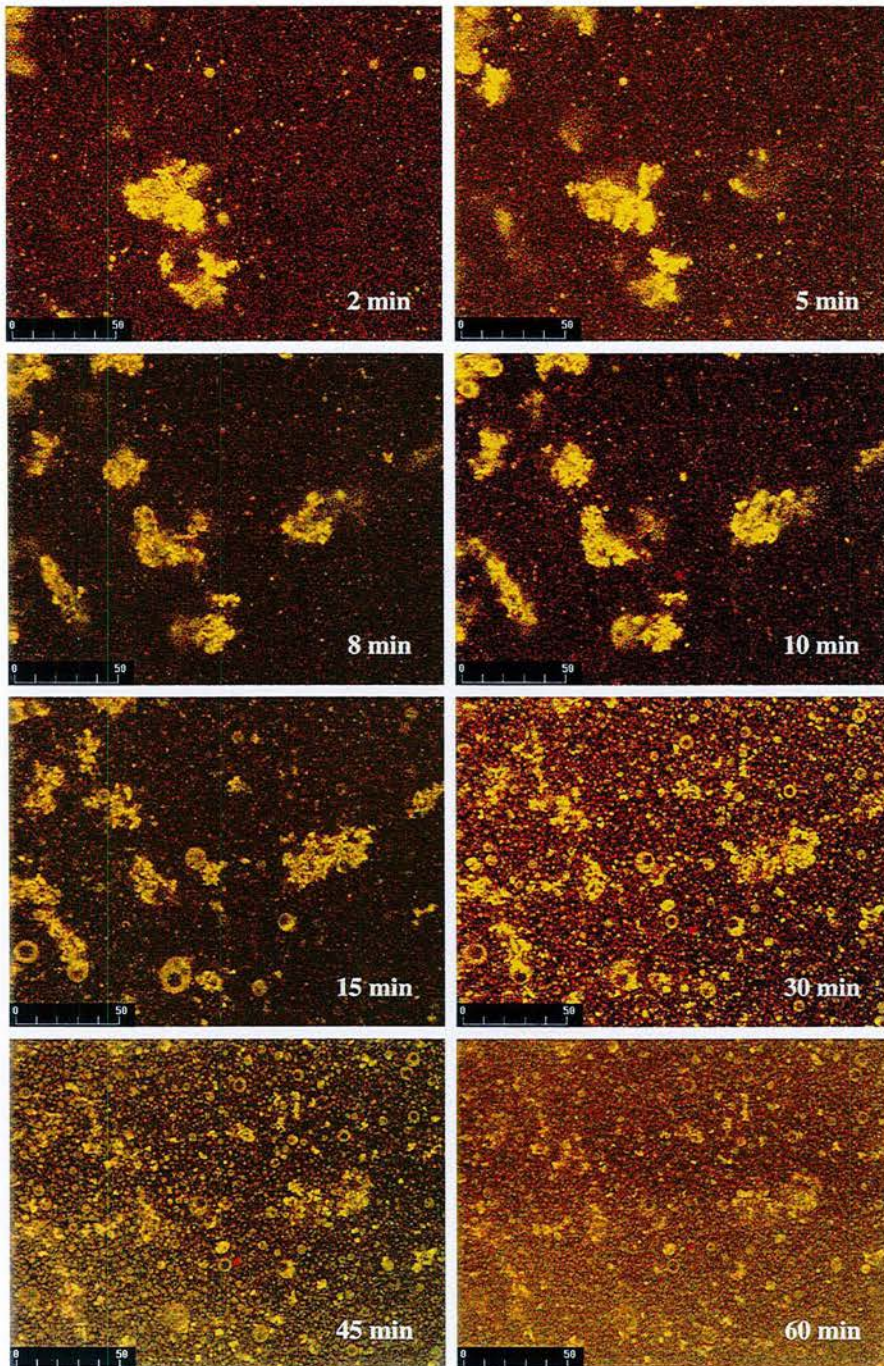
### **Mélanges $BLG_{agr}(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau et $BLG(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2**

Dans le mélange contenant des agrégats de  $\beta$ -lg, des précipités ayant un  $d_{app}$  de 50  $\mu\text{m}$  sont visibles après 2 min. Leur nombre augmente ensuite au cours du temps (Figure 4.9). Si dans les premiers instants, on ne distingue que difficilement des coacervats d'une taille de 5  $\mu\text{m}$ , ils apparaissent en nombre dans le plan focal au cours du temps, ce qui implique qu'ils se forment peu à peu ou qu'ils étaient déjà présents, mais ont sédimenté. Il est intéressant de noter que les coacervats présentent une importante polydispersité en taille ( $d_{app}$  de 1  $\mu\text{m}$  à 10-15  $\mu\text{m}$ ) et que certains d'entre eux présentent une vacuolisation caractéristique que nous avons déjà signalée. Ces observations montrent à nouveau qu'une partie des coacervats ne possédant qu'une seule vacuole ont floculé puis partiellement coalescé. A partir de 30 min, la densité de particules obtenue est très importante dans le plan focal. Les précipités deviennent moins discernables après 60 min, ce qui pourrait être dû à une diminution de la fluorescence des sondes.

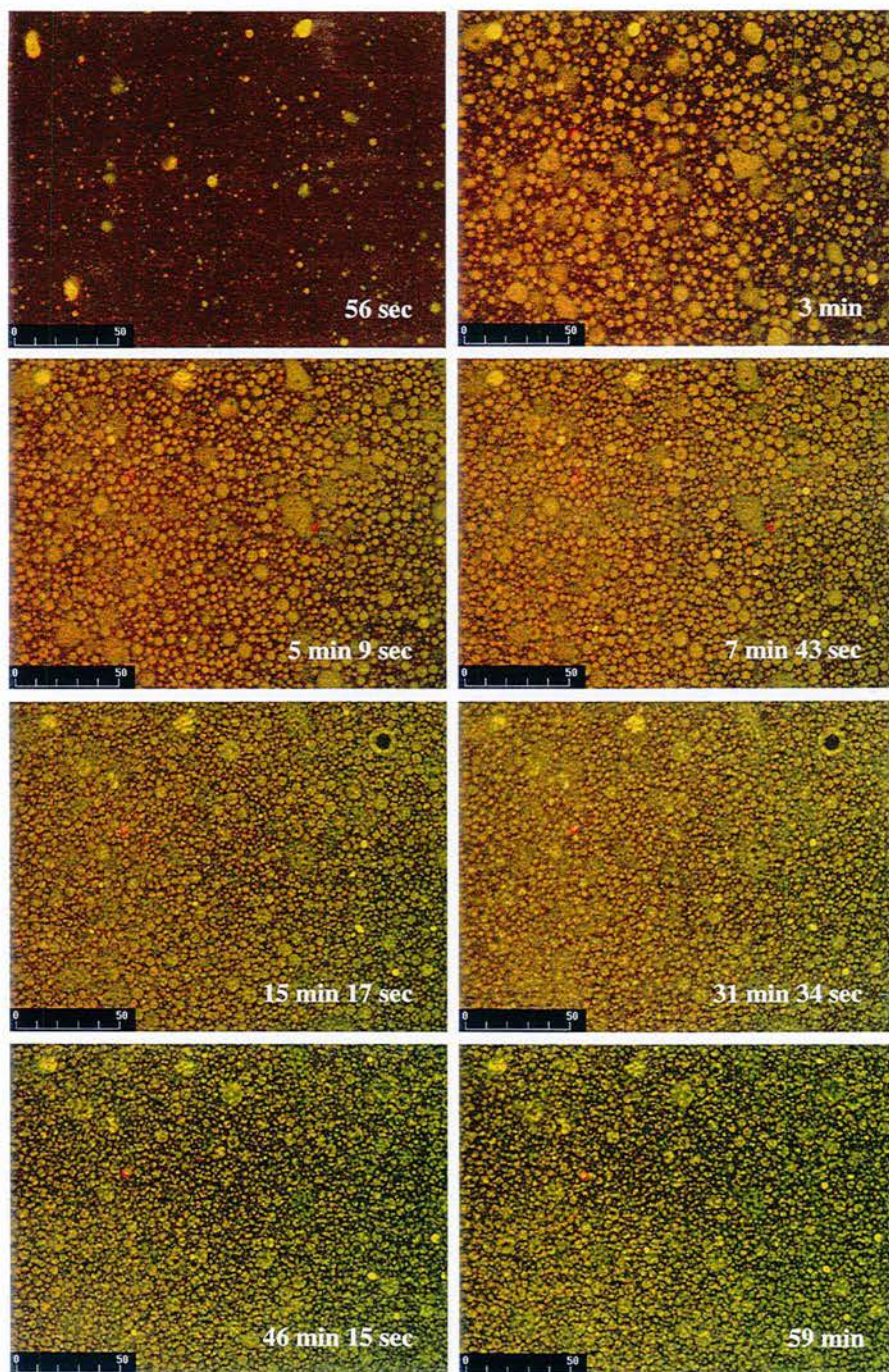
Les coacervats présents après 56 sec dans le système  $BLG(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau sont caractérisés par une polydispersité de taille et de structure importante (Figure 4.10). Ainsi, des coacervats sphériques plus ou moins vacuolisés ont des tailles comprises entre 1 et 15  $\mu\text{m}$ . En revanche, des structures irrégulières formées par la coalescence de plusieurs coacervats sont également présentes, caractérisées par des  $d_{app}$  de l'ordre de 10 à 20  $\mu\text{m}$ . Au cours du temps, la densité de petits coacervats augmente dans le plan focal considéré. Cependant, entre 7 et 15 min, les particules semblent avoir subi un changement morphologique. On ne distingue en effet pas facilement les particules de grande taille des plus petites. Après une heure, la morphologie du système est totalement différente de la morphologie initiale.

### **Comparaison MCBL-DLMT**

Si l'on tente à nouveau de relier les observations de MCBL au cours du temps avec les mesures de DLMT, l'évolution de  $I_{rd}$  peut être corrélée aux observations dans les deux mélanges. Dans le mélange  $BLG_{agr}(2)$ /gomme d'acacia(1)/eau,  $I_{rd}$  reste élevée au cours du temps, ce qui signifie qu'un équilibre s'est établi entre les différents phénomènes de formation, floculation/coalescence et sédimentation des particules. Ceci est également visible sur les observations de MCBL, puisque la sédimentation des précipités est suivie par l'apparition de coacervats de tailles variées. Ceux-ci proviennent de la coalescence des plus petits puisque  $\tau_{1/2}$  augmente au cours du temps dans ce mélange (Figure 4.3). Dans le cas du système sans agrégats, la forte diminution du signal de  $I_{rd}$  est explicable compte tenu de la sédimentation des coacervats insolubles issus de la coalescence des plus petits. L'intensité rétro-diffusée est ensuite uniquement liée à la présence des petits coacervats que l'on peut observer en MCBL (Figure 4.10).



**Figure 4.9 :** Cinétique de séparation de phase à 20°C obtenue par MCBL dans le mélange  $BLG_{agr}(2)/$ gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et à une concentration totale en biopolymères de 1%. La barre d'échelle représente 50 µm.



**Figure 4.10 :** Cinétique de séparation de phase à 20°C obtenue par MCBL dans le mélange BLG(2)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et à une concentration totale en biopolymère de 1%. La barre d'échelle représente 50 µm



### **Mélanges $BLG_{agr}(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau et $BLG(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2**

La différence entre le type de particules formées dans les mélanges obtenus pour des ratios Pr : Ps de 1 : 1, avec ou sans agrégats, est particulièrement flagrante (Figures 4.11 et 4.12).

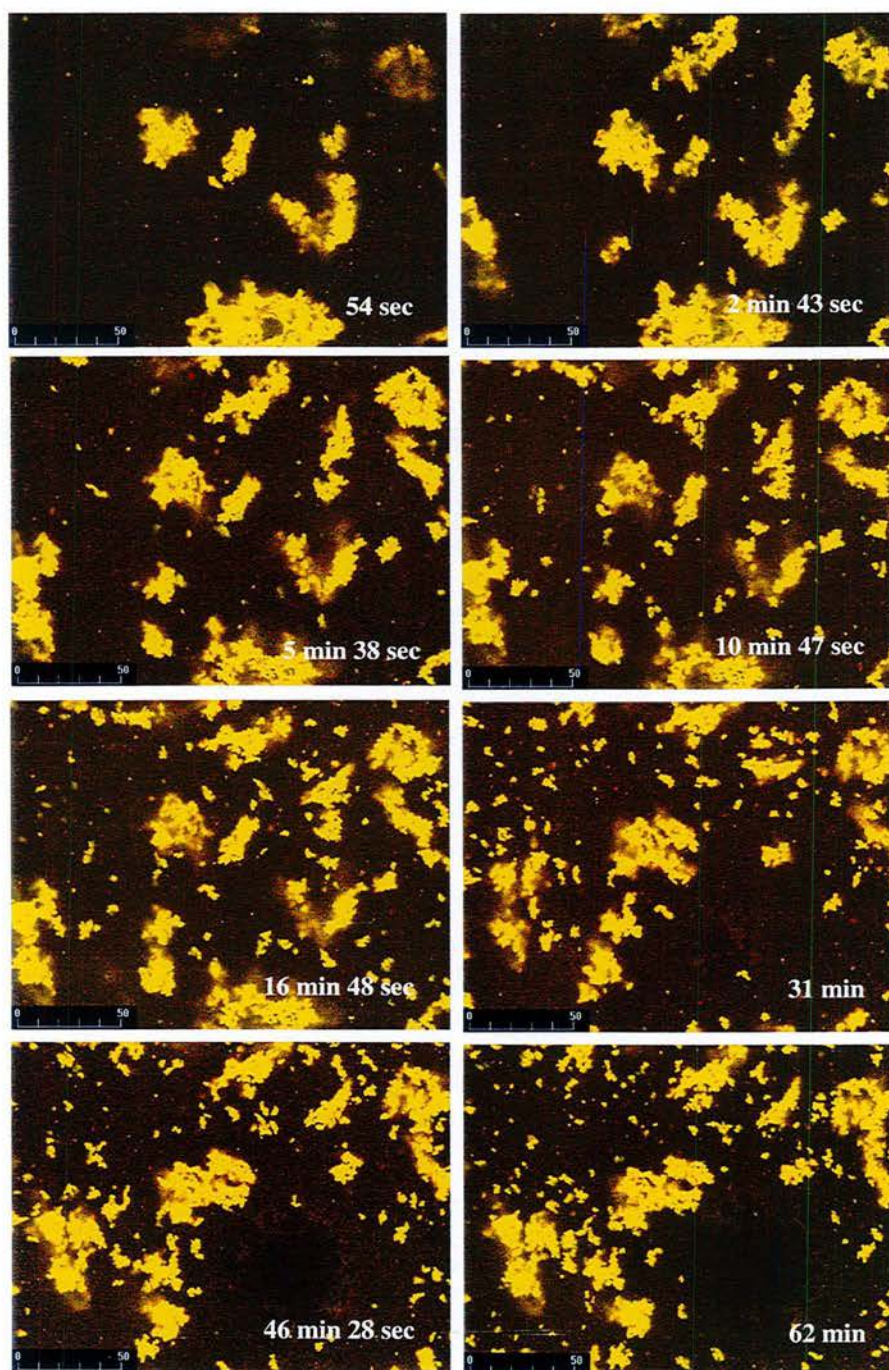
Dans le mélange  $BLG_{agr}(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau, des précipités ayant des tailles de plus de 50  $\mu\text{m}$  sont visibles dès la première minute (Figure 4.11). Le nombre de ces particules augmente ensuite avec le temps, ce qui indique qu'elles sédimentent. Cependant, il faut noter que certaines d'entre elles sont caractérisées par des  $d_{app}$  faibles, de l'ordre de 1 à 3  $\mu\text{m}$ . Il n'est pas possible d'observer de coacervats dans le plan focal que nous avons considéré. Après une quinzaine de minutes, la structure du système ne présente pas de changement important en ce qui concerne les précipités de grande taille, ce qui montre que toutes ont sédimenté. En revanche, il y a apparition de précipités de petite taille dans le plan focal (1 à 5  $\mu\text{m}$ ).

La figure 4.12 présente les résultats obtenus dans le mélange  $BLG(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau. Dans ce cas, la formation initiale de coacervats vacuolisés ne fait aucun doute. La polydispersité de taille des particules est importante puisque leur  $d_{app}$  varie de 1  $\mu\text{m}$  à 15  $\mu\text{m}$  pour les plus grosses. Il est possible d'observer des phénomènes de floculation et coalescence partielle entre des coacervats vacuolisés après 2 min 42 sec. Il faut noter que certains coacervats sont dépourvus de vacuole centrale (apparence plus dense). Au cours du temps, les coacervats sont de moins en moins discernables, comme ce fut déjà le cas pour le ratio Pr : Ps 2 : 1. Cependant, leur nombre augmente ici considérablement. On assiste après 30 min, puis surtout aux environs de 1 heure, à une diminution de la taille des particules dont le diamètre maximum est de 10  $\mu\text{m}$ . De plus, la polydispersité en taille est moindre si on la compare au système initial. Certains coacervats présentant une vacuole sont encore visibles mais la majorité d'entre eux ne sont plus vacuolisés, comme c'est le cas dans le système  $BLG(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau.

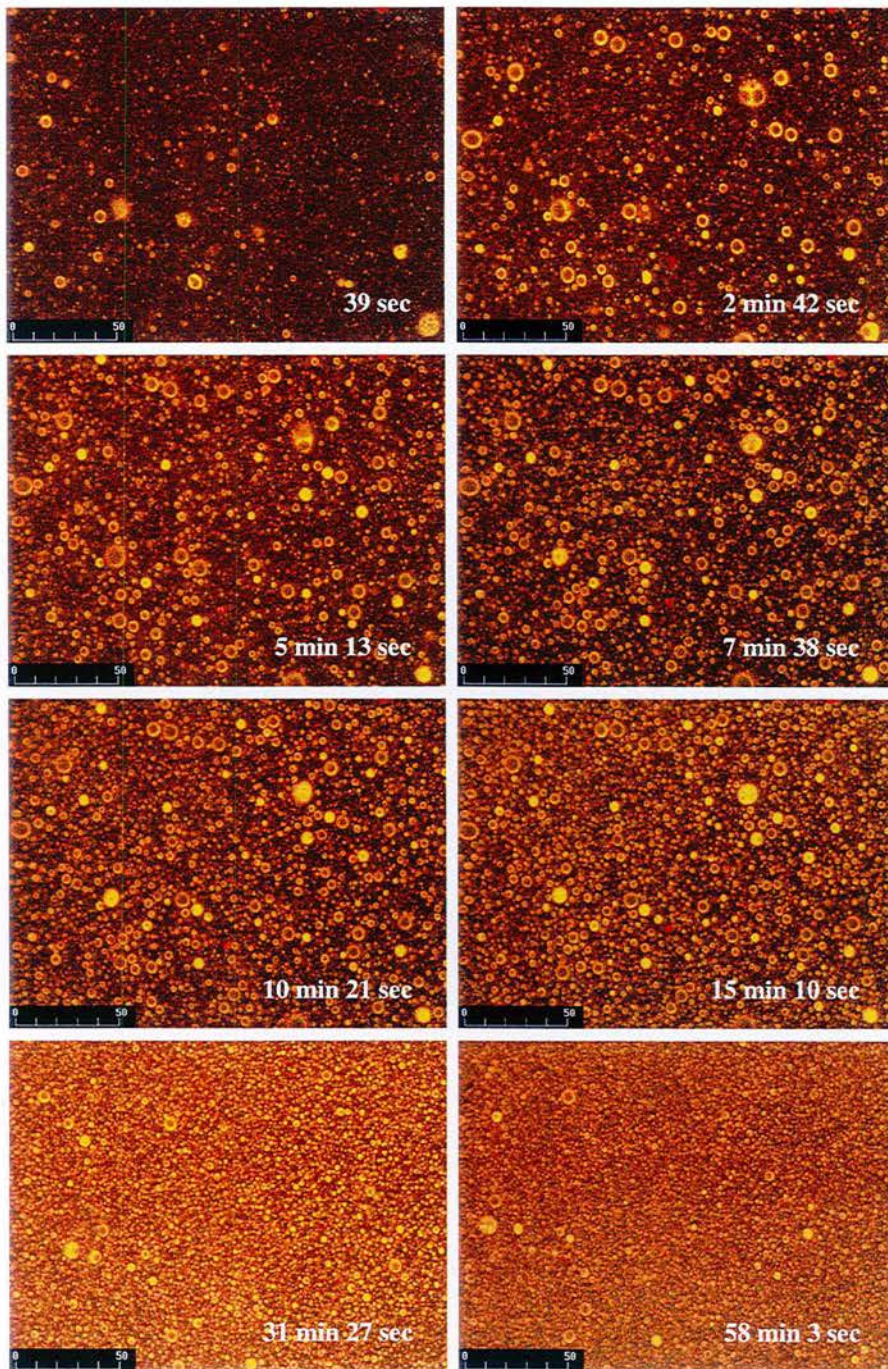
### **Comparaison MCBL-DLMT**

Une nouvelle fois, il est possible de faire un parallèle entre les mesures de DLMT et les observations de MCBL. Dans le système contenant des agrégats de  $\beta$ -lg, la variation de  $I_{rd}$  est essentiellement liée à l'équilibre des cinétiques rapides de sédimentation des gros précipités et à la formation de coacervats ou de petits précipités qui sédimentent beaucoup moins rapidement. La résultante de ces différentes cinétiques peut être une diminution rapide de  $I_{rd}$  peu de temps après le mélange, suivie d'une augmentation transitoire de ce paramètre.

Dans le système  $BLG(1)$ /gomme d'acacia(1)/eau, la stabilité de  $I_{rd}$  au cours du temps est liée au nombre important de coacervats présents initialement dans le mélange. Ceux-ci proviennent de la coalescence des coacervats animés de mouvement brownien puisque  $\tau_{1/2}$  augmente durant les 5 premières minutes, puis se stabilise, indiquant que la taille des coacervats est également stable, ce qui correspond bien aux observations de MCBL.



**Figure 4.11 :** Cinétique de séparation de phase à 20°C obtenue par MCBL dans le mélange  $BLG_{agr}(1)/$ gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et à une concentration totale en biopolymères de 1%. La barre d'échelle représente 50 μm.



**Figure 4.12 :** Cinétique de séparation de phase à 20°C obtenue par MCBL dans le mélange BLG(1)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et à une concentration totale en biopolymères de 1%. La barre d'échelle représente 50 µm.

En conclusion, des changements structuraux importants se produisent dans les différents mélanges au cours du temps, comme nous l'avons clairement mis en évidence par MCBL. La structuration des mélanges contenant des agrégats protéiques est clairement influencée par ceux-ci. La polydispersité de la protéine apparaît donc bien comme un paramètre fondamental dans le mécanisme de la coacervation complexe entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia. La morphologie des coacervats obtenus en absence d'agrégats dépend du ratio, puisque des coacervats vacuolisés sont obtenus uniquement pour des ratios Pr : Ps de 2 : 1 et 1 : 1. Même s'il est difficile d'établir un lien direct entre les mesures de DLMT et les observations de MCBL, les variations de la taille (coalescence, floculation), du nombre (coalescence, sédimentation) et de la morphologie (floculation, coalescence partielle) des particules permettent globalement de mieux appréhender l'évolution parfois complexe du signal d'intensité rétro-diffusé obtenu par DLMT.

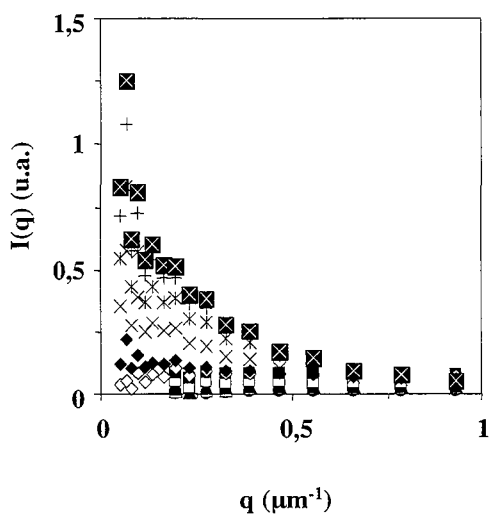
### 3.3 Etude de la cinétique de séparation de phase dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau par diffusion statique de la lumière aux petits angles

Dans le but de compléter notre étude de la cinétique de la coacervation complexe, nous avons essayé de caractériser le mécanisme de séparation de phase en milieu dilué, en fonction de la polydispersité de la  $\beta$ -lg et du pH. Nous avons pour cela utilisé la diffusion statique de la lumière aux petits angles (DSLPA) sur des dispersions à 0,1%, un ratio Pr : Ps de 8 : 1 et des pH 3,6 et de 4,2 afin de nous situer dans une fenêtre d'observation suffisamment large (vitesse de structuration du système lente et faible niveau de turbidité des mélanges). De plus, l'utilisation de mélanges peu concentrés doit permettre de diminuer de façon importante la vitesse de sédimentation des particules que nous avons subi en MCBL et de décrire avec précision le mécanisme de séparation de phase.

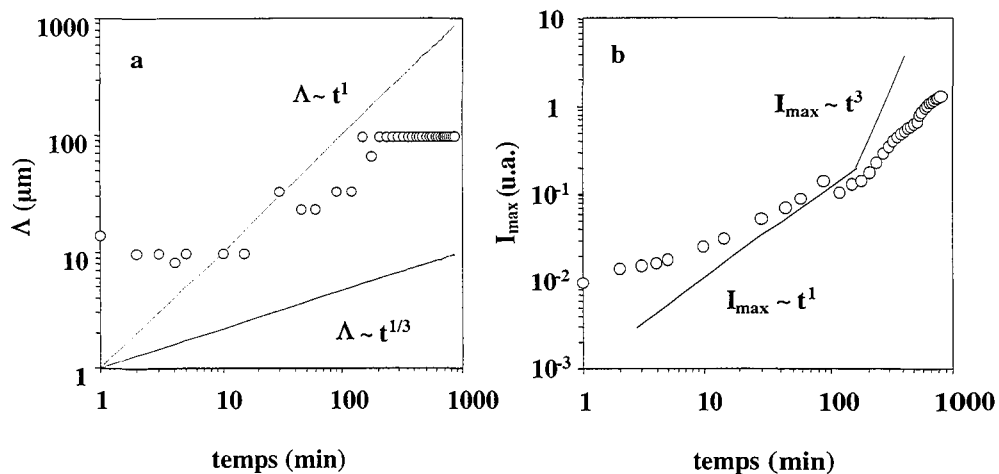
#### *Mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6*

L'intensité diffusée dans le mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 augmente au cours du temps, passant de 0,2 après 1 minute à 1,25 après 840 minutes (Figure 4.13). Ce mélange présente un pic de corrélation qui disparaît pour les temps les plus longs. Ces caractéristiques spectrales permettent de conclure à une structuration du système au cours du temps.

Entre 1 et 10 min après le mélange, la longueur de corrélation  $\Lambda$  ( $2\pi/q_{\max}$ ) est stationnaire, avec une valeur de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$  (Figure 4.14a). L'intensité diffusée maximale correspondante présente une faible croissance sur la même gamme de temps (Figure 4.14b). Ceci indique que la taille des domaines structuraux (particules, couches de déplétion en biopolymères ou fluctuations de concentration en biopolymères) reste initialement constante mais que leur nombre augmente. Après 10 min,  $\Lambda$  augmente pour atteindre 40  $\mu\text{m}$  après 100 min (pente  $\alpha \sim 1/3$ ), puis la vitesse de croissance de la taille des domaines structuraux augmente jusqu'à 210 min (pente  $\alpha \sim 1$ ). Une valeur de  $\Lambda = 90 \mu\text{m}$  est ensuite obtenue jusqu'à la fin de l'expérience. Sur les mêmes intervalles de temps,  $I_{\max}$  croît avec une pente  $\beta$  voisine de 1, puis chute subitement entre 100 et 210 min. Elle augmente ensuite à nouveau avec une pente  $\beta$  comprise entre 1 et 2.



**Figure 4.13 :** Variation de l'intensité diffusée à 20°C dans un mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde. Temps après mélange des biopolymères : (○) 1 min ; (●) 5 min ; (△) 10 min ; (▲) 15 min ; (□) 30 min ; (■) 60 min ; (◇) 120 min ; (◆) 240 min ; (×) 480 min ; (⊗) 600 min ; (+) 720 min ; (⊠) 840 min.



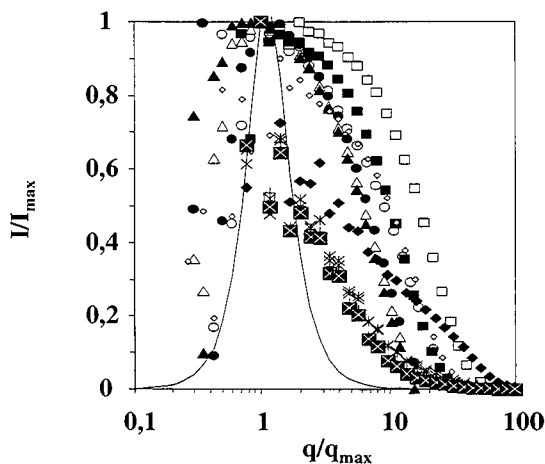
**Figure 4.14 :** Variation de (a) la longueur de corrélation  $\Lambda$ , (b) l'intensité maximale diffusée,  $I_{\max}$  au cours du temps à 20°C dans un mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 et une concentration totale en biopolymères de 0,1%. Les droites représentent les modèles de croissance en puissance.

Ces résultats combinés de l'évolution temporelle de  $\Lambda$  et  $I_{\max}$  indiquent que la taille des domaines structuraux ainsi que leur nombre augmentent au cours du temps, puis se stabilisent dans le cas de  $\Lambda$ . Les exposants  $\alpha$  calculés montrent que la croissance de ces domaines

structuraux est d'abord contrôlée par des phénomènes diffusionnels, puis par des phénomènes hydrodynamiques. Nous expliquons la chute de  $I_{\max}$  entre 100 et 210 min par une diminution du nombre de domaines structuraux présents dans le mélange. Il peut donc s'agir d'une coalescence ou d'une sédimentation de ceux-ci.

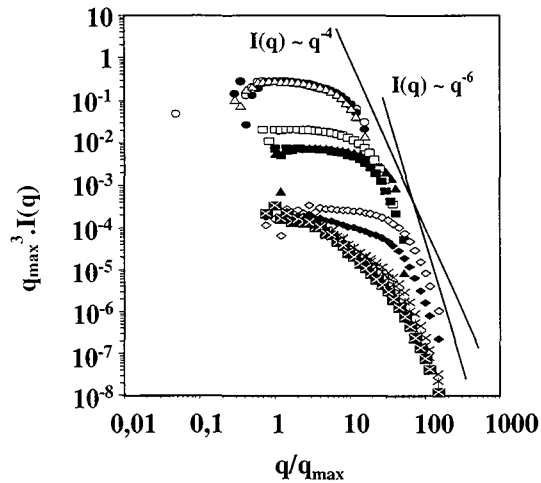
Les valeurs des exposants  $\alpha$  et  $\beta$  déterminés précédemment sont proches des valeurs obtenues pour décrire les phases intermédiaires et tardives de la décomposition spinodale. Cependant si l'on tente de vérifier  $\beta > 3$  ou  $\beta = 3$  sur les gammes de temps considérées, il faut se rendre à l'évidence que ces relations ne sont pas vérifiées. Ceci implique que sur cette fenêtre de temps, nous n'observons ni les phases intermédiaires, ni les phases tardives de la DS ou que la complexité des phénomènes de structuration caractérisant ce mélange produit un signal de diffusion ne pouvant pas être décrit par la simple théorie de la DS. La similitude des exposants avec les valeurs décrites dans la littérature signifie simplement que les mécanismes de structuration des mélanges sont régis par des phénomènes diffusionnels et hydrodynamiques, également présents lors de la nucléation et croissance.

La non-applicabilité de la théorie de la DS est manifeste lorsque l'on tente de mettre les courbes à l'échelle et qu'on les compare avec le modèle de Furukawa utilisable pour les phases tardives de la décomposition spinodale (Figure 4.15). Ce résultat est également une indication que le système ne présente pas une auto-similarité de structure au cours du temps.



**Figure 4.15 :** Courbes de mise à l'échelle de l'intensité diffusée à 20°C dans un mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde normalisé. Temps après mélange des biopolymères : (  $\circ$  ) 1 min ; (  $\bullet$  ) 5 min ; (  $\triangle$  ) 10 min ; (  $\blacktriangle$  ) 15 min ; (  $\square$  ) 30 min ; (  $\blacksquare$  ) 60 min ; (  $\diamond$  ) 120 min ; (  $\blacklozenge$  ) 240 min ; (  $\times$  ) 480 min ; (  $\ast$  ) 600 min ; (  $+$  ) 720 min ; (  $\boxtimes$  ) 840 min.

La théorie de la DS n'étant pas applicable, il est toutefois possible de suivre l'évolution de la structure de l'interface formée entre les deux phases en normalisant  $I(q)$  par  $q_{\max}^3$  afin de déterminer les pentes des asymptotes ( $\gamma = d_s - 2d_v$ ) qui correspondent aux grandes valeurs de  $q$  ( $q/q_{\max} > 10$ ).



**Figure 4.16 :** Courbes bi-logarithmiques de l'intensité diffusée normalisée à 20°C dans un mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde. Temps après mélange des biopolymères : (○) 1 min ; (●) 5 min ; (△) 10 min ; (▲) 15 min ; (□) 30 min ; (■) 60 min ; (◇) 120 min ; (◆) 240 min ; (×) 480 min ; (×) 600 min ; (+) 720 min ; (⊗) 840 min.

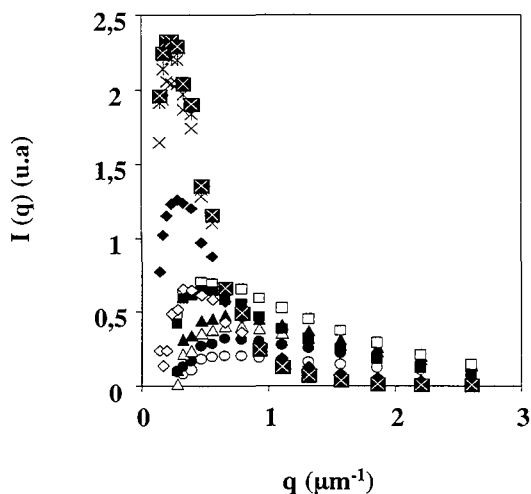
Les valeurs des pentes obtenues pour des temps inférieurs à 60 minutes varient autour de - 2,20, dimension fractale caractéristique d'une interface peu rugueuse. Pour les courbes obtenues à des temps plus longs, la valeur de  $\gamma$  est comprise entre - 3,77 et - 4,55 (Figure 4.16). Ces valeurs sont très proches de la valeur de - 4 proposée par Porod (1982) lorsque les interfaces formées entre les deux phases sont lisses et que les rayons de courbure de celles-ci sont très grands (cas de particules sphériques de petite taille). La dimension de volume est alors proche de 3 et celle de surface proche de 2.

L'étude de la cinétique de séparation de phase dans le système BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 indique donc que la structuration du système est caractérisée par la succession de plusieurs étapes de croissance de la taille des domaines structuraux. Des phénomènes diffusionnels (diffusion des macromolécules et coalescence des particules) puis hydrodynamiques (liés aux variations locales de viscosité, de pression et de tension interfaciale) sont le moteur de cette structuration.

#### **Mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2**

Lorsque l'on suit la variation de l'intensité de lumière diffusée en fonction du vecteur d'onde dans le mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2, un pic de corrélation nettement marqué est obtenu (Figure 4.17). On peut également constater que la valeur initiale de l'intensité diffusée est supérieure à celle obtenue dans le mélange à pH 3,6, ce qui prouve que l'interaction entre les deux biopolymères est plus importante (Hone et al., 2000). Cette observation confirme la valeur plus élevée d'absorbance à 650 nm obtenue pour le même mélange à pH 4,2 par rapport à pH 3,6 (Chap. 3, Figure 3.5a, ratio 8 : 1). L'intensité diffusée augmente au cours du temps et est couplée avec un déplacement du pic de corrélation vers des

vecteurs d'ondes plus petits, ce qui rappelle soit les caractéristiques de la DS soit celles de la NC dans certaines conditions.

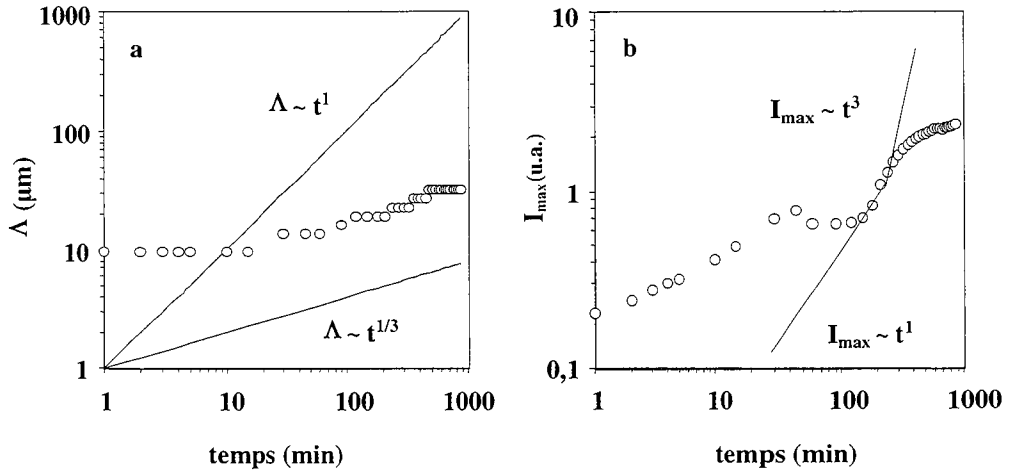


**Figure 4.17 :** Variation de l'intensité diffusée à 20°C dans un mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde. Temps après mélange des biopolymères : (○) 1 min ; (●) 5 min ; (△) 10 min ; (▲) 15 min ; (□) 30 min ; (■) 60 min ; (◇) 120 min ; (◆) 240 min ; (×) 480 min ; (✕) 600 min ; (+) 720 min ; (⊠) 840 min.

L'évolution de la longueur de corrélation  $\Lambda$  au cours du temps présente une phase de latence durant les 10 premières minutes où  $\Lambda \sim 15 \mu\text{m}$  (Figure 4.18a), ce qui est très similaire au mélange précédent. On observe ensuite une croissance de  $\Lambda$  selon une pente  $\alpha$  de 1/3 jusqu'à 420 min, temps pour lequel une valeur constante de  $\Lambda = 23 \mu\text{m}$  est obtenue. On notera donc que, si les domaines structuraux ont une taille initiale similaire ( $15 \mu\text{m}$ ) à pH 3,6 et 4,2, leurs tailles finales diffèrent considérablement,  $90 \mu\text{m}$  et  $23 \mu\text{m}$ , respectivement. Comme dans le mélange à pH 3,6, l'évolution de  $I_{\text{max}}$  est caractérisée par plusieurs phases (figure 4.18b). Elle augmente en effet pendant les 30 premières minutes, ce qui signifie que le nombre des domaines structuraux augmente. Une chute importante est ensuite visible entre 30 et 210 min, puis  $I_{\text{max}}$  à nouveau croît avec une vitesse beaucoup plus importante (pente  $\beta$  entre 1 et 2), jusqu'à atteindre un plateau.

Ces résultats indiquent que la structuration du mélange est essentiellement gouvernée par des phénomènes diffusionnels, ce qui pourrait expliquer la faible évolution de la longueur de corrélation au cours du temps. L'évolution de  $I_{\text{max}}$  traduit quant à elle une augmentation globale du nombre de domaines structuraux, avec comme dans le mélange précédent, une phase de sédimentation ou de coalescence de ceux-ci.

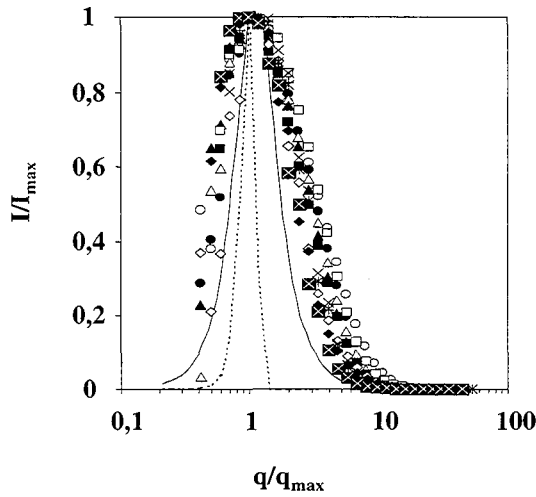




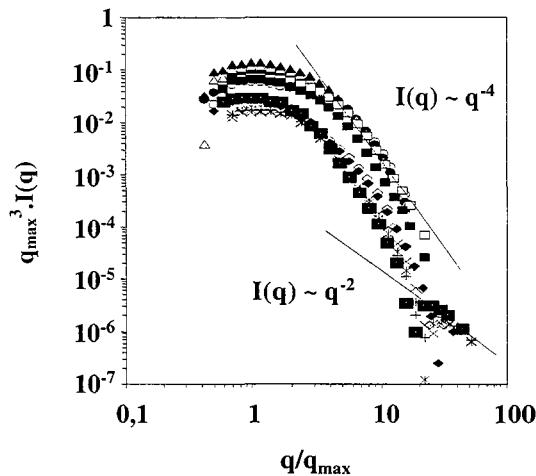
**Figure 4.18 :** Variation de (a) la longueur de corrélation  $\Lambda$ , (b) l'intensité maximale diffusée au cours du temps à 20°C dans un mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 0,1%. Les droites représentent les modèles de croissance en puissance.

L'application des relations d'équivalence entre  $\alpha$  et  $\beta$ , caractéristiques de la théorie de la DS dans les phases intermédiaires et tardives ne permet pas de déterminer de transition entre celles-ci. Il est cependant possible que, comme dans le cas précédent, une superposition de plusieurs phénomènes de structuration puisse donner un signal d'intensité diffusée complexe mettant en défaut la théorie classique de la DS. Nous avons donc tout de même procédé à la mise à l'échelle des courbes et comparé les résultats avec les modèles de Dhont et Furukawa (Figure 4.19). Une très bonne corrélation a été obtenue entre les résultats expérimentaux et les modèles théoriques, spécialement avec le modèle de Furukawa (Figure 4.19). Le modèle de Dhont est mis en défaut pour les ratios  $q/q_{\text{max}} > 1$ , ce qui peut s'expliquer par ses limitations théoriques. En effet, il n'est applicable que pour des particules rigoureusement sphériques. Le modèle de Furukawa, utilisé avec un exposant  $\gamma = 6$  (présence d'une interface lisse) décrit en revanche parfaitement la structure du mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau. Une faible déviation des points expérimentaux est toutefois observée pour les valeurs de  $q/q_{\text{max}} > 2$ . Une observation similaire avait été précédemment rapportée par Rouw et al. (1989) sur des dispersions colloïdales de particules sphériques ou Tuinier et al. (2000) dans des dispersions d'agrégats de protéines de lactosérum contenant un exopolysaccharide bactérien. L'explication de l'éloignement du modèle de Furukawa avancée par ces auteurs réside dans la polydispersité des particules formées.

Nous ne pouvons pas conclure définitivement quant au mécanisme de structuration mis en jeu lors de la coacervation complexe dans ce mélange. Cependant, compte tenu de la présence d'un pic de corrélation, de phénomènes diffusionnels et de la bonne corrélation des points expérimentaux avec le modèle de Furukawa, l'hypothèse d'un mécanisme de décomposition spinodale ou du moins d'un mécanisme faisant intervenir une croissance de fluctuations de concentration peut être ici envisagée.



**Figure 4.19 :** Courbes de mise à l'échelle de l'intensité diffusée à 20°C dans un mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde normalisé. Temps après mélange des biopolymères : (  $\circ$  ) 1 min ; (  $\bullet$  ) 5 min ; (  $\triangle$  ) 10 min ; (  $\blacktriangle$  ) 15 min ; (  $\square$  ) 30 min ; (  $\blacksquare$  ) 60 min ; (  $\diamond$  ) 120 min ; (  $\blacklozenge$  ) 240 min ; (  $\times$  ) 480 min ; (  $\ast$  ) 600 min ; (  $+$  ) 720 min ; (  $\boxtimes$  ) 840 min. La courbe pleine représente le modèle de Furukawa, caractéristique des phases tardives de la décomposition spinodale. La courbe pointillée représente le modèle de Dhont, valable pour les phases intermédiaires et tardives de la décomposition spinodale dans des mélanges de colloïdes sphériques.



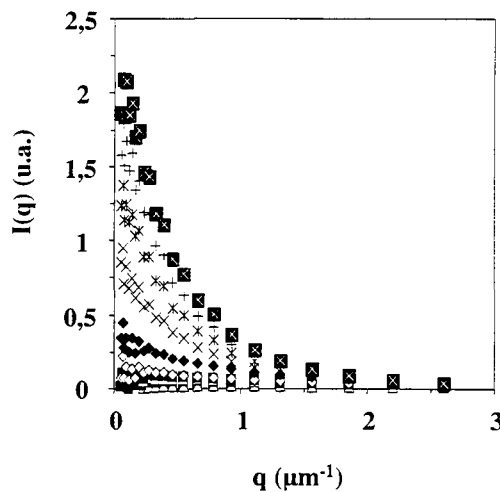
**Figure 4.20 :** Courbes bi-logarithmiques de l'intensité diffusée normalisée à 20°C dans un mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde. Temps après mélange des biopolymères : (  $\circ$  ) 1 min ; (  $\bullet$  ) 5 min ; (  $\triangle$  ) 10 min ; (  $\blacktriangle$  ) 15 min ; (  $\square$  ) 30 min ; (  $\blacksquare$  ) 60 min ; (  $\diamond$  ) 120 min ; (  $\blacklozenge$  ) 240 min ; (  $\times$  ) 480 min ; (  $\ast$  ) 600 min ; (  $+$  ) 720 min ; (  $\boxtimes$  ) 840 min.

La mise à l'échelle des courbes par une loi en puissance de  $q_{\max}^3$  permet le calcul de la pente  $\gamma$  de l'asymptote pour les valeurs de  $q/q_{\max} > 2$  et la caractérisation de l'interface formée (Figure 4.20). Quelle que soit la cinétique considérée,  $\gamma$  est comprise entre - 4,1 et - 4,3, ce qui aux erreurs expérimentales près est en accord avec la loi de Porod en  $q^4$ . Ceci indique que l'interface entre les deux phases formées est lisse et possède un fort rayon de courbure. Il est intéressant de noter que pour des  $q/q_{\max} > 7$ , il y a apparition d'un épaulement des courbes pour les cinétiques obtenues après 480 min, ce qui correspond à des temps tardifs. La pente correspondante est de - 1,9, ce qui pourrait indiquer, pour des temps suffisamment longs, une restructuration des interfaces lisses pour former des interfaces de nature fractale. La valeur de  $q/q_{\max}$  associée à ce changement de pente pourrait également correspondre au facteur de forme  $F(q)$  de particules sphériques dont la taille se trouverait comprise entre 1  $\mu\text{m}$  et 300 nm (Berne et Pecora, 1976).

Après avoir étudié l'influence du pH sur les mélanges ne contenant pas d'agrégats de  $\beta$ -lg, il est intéressant de faire un parallèle avec les systèmes contenant des agrégats. Il sera alors possible de définir le rôle de la polydispersité de la protéine sur le mécanisme de structuration des mélanges et également d'étudier l'influence de la solubilité des agrégats sur celui-ci.

#### Mélange $BLG_{agr}(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6

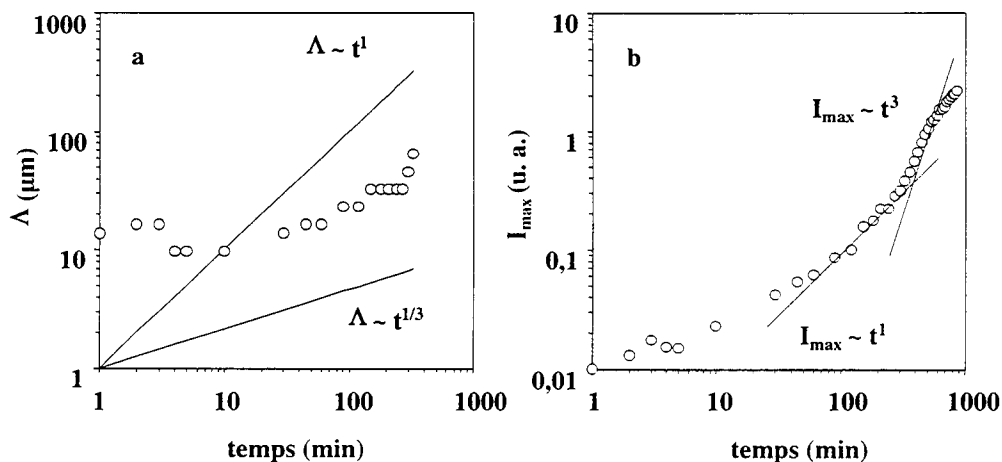
Lorsque l'on considère les résultats dans le mélange  $BLG_{agr}(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau à 0,1% et pH 3,6, une augmentation progressive de l'intensité diffusée au cours du temps est visible pour atteindre une valeur de 2,25, supérieure à celle obtenue dans le système sans agrégats qui était de 1,25 (Figure 4.21). La présence d'un pic de corrélation dans le mélange est observable uniquement jusqu'à 330 min. La valeur de  $q_{\max}$  est ensuite la dernière valeur de vecteur d'onde accessible à l'aide de notre dispositif de mesure. Il n'est en conséquence pas possible de dire si le pic de corrélation ne s'est pas déplacé vers la gauche, hors de notre fenêtre de mesure, comme cela a été rapporté par exemple dans l'étude de Lin et al. (1995).



**Figure 4.21 :** Variation de l'intensité diffusée à 20°C dans un mélange  $BLG_{agr}(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde. Temps après mélange des biopolymères : (○) 1 min ; (●) 5 min ; (△) 10 min ; (▲) 15 min ; (□) 30 min ; (■) 60 min ; (◇) 120 min ; (◆) 240 min ; (×) 480 min ; (※) 600 min ; (+) 720 min ; (⊗) 840 min.

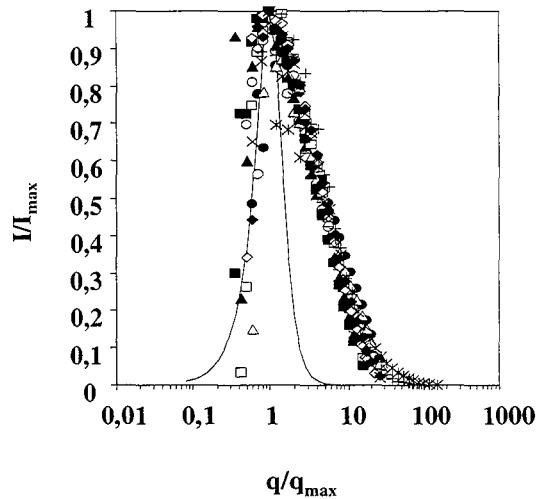
La figure 4.22a présente l'évolution de la longueur de corrélation durant les 330 premières minutes. Durant les 3 premières minutes,  $\Lambda$  reste constante aux alentours de  $15 \mu\text{m}$ , puis décroît, ce qui correspond également à une diminution de  $I_{\text{max}}$  (Figure 4.22b). Par conséquent, la taille des domaines structuraux ainsi que leur nombre diminuent durant cette phase. Une croissance de  $\Lambda$  selon une pente  $\alpha$  de  $1/3$  est ensuite visible jusqu'à 100 min. A cet instant, un changement de pente est visible, et la vitesse de croissance de la taille des domaines structuraux augmente ( $\alpha \sim 1$ ). Nous assistons donc à une transition entre un régime de structuration initialement d'origine diffusionnelle pour un régime hydrodynamique. La valeur de  $\Lambda$  atteinte après 330 min est de  $60 \mu\text{m}$ . Après la chute initiale précédemment décrite, l'évolution de  $I_{\text{max}}$  au cours du temps montre une augmentation constituée de plusieurs phases, pour lesquelles les pentes  $\beta$  augmentent de 1 à 3 (Figure 4.22b), indiquant une vitesse d'apparition et un nombre de domaines structuraux plus élevés dans le mélange.

Compte tenu de l'impossibilité de déterminer les valeurs de  $\alpha$  après 330 min, les relations d'équivalence de la DS n'ont pu être testées. Nous avons cependant tenté d'appliquer le modèle de Furukawa, après normalisation de nos courbes (Figure 4.23). Pour les temps supérieurs à 330 min, la valeur de  $q_{\text{max}}$  utilisée correspond à la dernière valeur de notre gamme expérimentale.



**Figure 4.22 :** Variation de (a) la longueur de corrélation  $\Lambda$ , (b) l'intensité maximale diffusée au cours du temps à  $20^\circ\text{C}$  dans un mélange  $\text{BLG}_{\text{agr}}(8)/\text{gomme d'acacia}(1)/\text{eau}$  à pH 3,6 et une concentration totale en biopolymères de 0,1%. Les droites représentent les modèles de croissance en puissance.

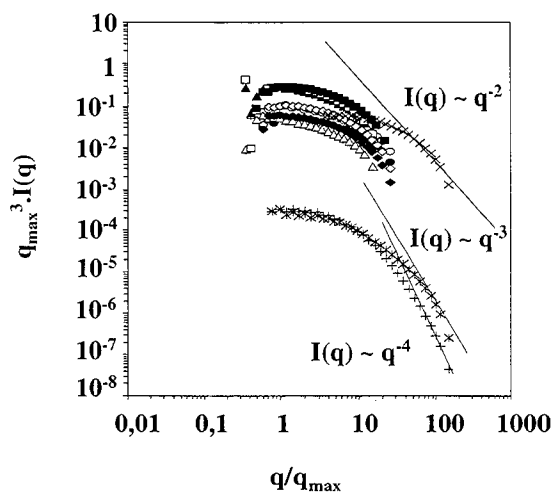
La corrélation entre le modèle et les points expérimentaux est satisfaisante pour des valeurs de  $q/q_{\text{max}} > 1$ . Pour les valeurs les plus élevées, on note une dispersion des points expérimentaux par rapport au modèle. Comme ce phénomène est indépendant du temps, il est certainement dû à la polydispersité initiale des précipités et/ou coacervats formés par l'interaction entre les agrégats de  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia.



**Figure 4.23 :** Courbes de mise à l'échelle de l'intensité diffusée à 20°C dans un mélange  $BLG_{agr}(8)/$ gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde normalisé. Temps après mélange des biopolymères : (  $\circ$  ) 1 min ; (  $\bullet$  ) 2 min ; (  $\triangle$  ) 3 min ; (  $\blacktriangle$  ) 4 min ; (  $\square$  ) 5 min ; (  $\blacksquare$  ) 10 min ; (  $\diamond$  ) 30 min ; (  $\blacklozenge$  ) 45 min ; (  $\times$  ) 60 min ; (  $\otimes$  ) 450 min ; (  $+$  ) 840 min. La courbe pleine représente le modèle de Furukawa, caractéristique des phases tardives de la décomposition spinodale.

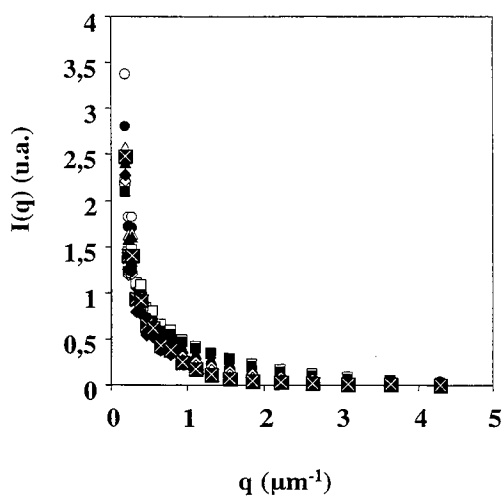
Il n'est donc pas possible de dire si la DS caractérise la cinétique de séparation de phase. Néanmoins, la bonne corrélation de nos données expérimentales avec le modèle de Furukawa atteste d'une auto-similarité des domaines structuraux.

La normalisation des courbes d'intensité diffusée par  $q_{max}^3$  (ou la dernière valeur de  $q$  pour des temps supérieurs à 330 min) amène des informations intéressantes quand à la structuration de l'interface entre les deux phases. En effet, les valeurs de  $\gamma$  obtenues pour des ratios  $q/q_{max} > 10$  laissent apparaître une valeur de - 2,2 pour les courbes obtenues entre 1 et 450 min (Figure 4.24). La pente s'accroît ensuite pour atteindre - 3,66 après 840 min. La structure de l'interface passe donc d'une nature fractale à une structure lisse, fortement incurvée. Ce phénomène intéressant pourrait être lié à la structure fractale des agrégats de  $\beta$ -lg présents initialement dans le mélange. Si l'on tient compte des phénomènes d'interaction de la gomme d'acacia ou de coacervats avec la surface des agrégats que nous avons mises en évidence dans le chapitre 3, on peut penser que la surface de contact entre les deux phases devienne plus lisse, puisqu'essentiellement composée d'une couche de gomme d'acacia ou de coacervats. Ceci expliquerait alors l'obtention d'une valeur de  $\gamma$  se rapprochant du modèle de Porod après un temps long.



**Figure 4.24 :** Courbes bi-logarithmiques de l'intensité diffusée normalisée à 20°C dans un mélange  $BLG_{agr}(8)/$ gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde. Temps après mélange des biopolymères : (○) 1 min ; (●) 2 min ; (△) 3 min ; (▲) 4 min ; (□) 5 min ; (■) 10 min ; (◇) 30 min ; (◆) 45 min ; (×) 60 min ; (×) 450 min ; (+) 840 min.

*Mélange  $BLG_{agr}(8)/$ gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2*

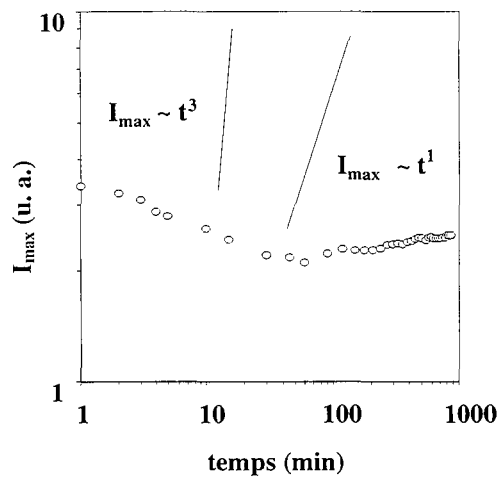


**Figure 4.25 :** Variation de l'intensité diffusée à 20°C dans un mélange  $BLG_{agr}(8)/$ gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde. Temps après mélange des biopolymères : (○) 1 min ; (●) 5 min ; (△) 10 min ; (▲) 15 min ; (□) 30 min ; (■) 60 min ; (◇) 120 min ; (◆) 240 min ; (×) 480 min ; (×) 600 min ; (+) 720 min ; (⊠) 840 min.

L'étude de la cinétique de séparation de phase par DSLPA dans le système  $BLG_{agr}(8)/$ gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 révèle l'influence de la présence d'agrégats

insolubles sur la structuration du système. En effet, le suivi de la variation de l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde fait apparaître clairement une absence de pic de corrélation pour la gamme de vecteurs d'onde qu'il nous a été possible d'étudier (Figure 4.25). On notera également que l'intensité diffusée est initialement beaucoup plus élevée que dans le mélange obtenu à pH 3,6, ce qui prouve que l'intensité de l'interaction entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia est ici très importante.

Cette observation ne permet cependant pas d'affirmer qu'aucun pic de corrélation n'est présent, peut être se trouve-t-il simplement hors de la fenêtre d'observation.



**Figure 4.26 :** Variation de l'intensité maximale\* diffusée en fonction du temps à 20°C dans un mélange BLG<sub>agr</sub>(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 0,1%. Les droites représentent les modèles de croissance en puissance.

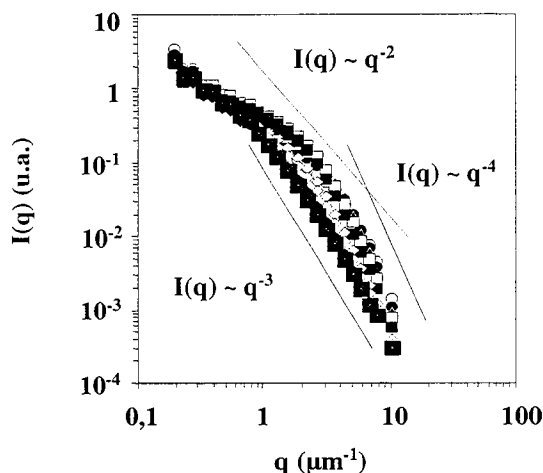
\* : dernière valeur mesurée

Si l'on suit l'intensité de lumière diffusée au cours du temps, on constate une baisse progressive depuis les instants initiaux jusqu'à 60 min. Par la suite,  $I_{\max}$  augmente très faiblement. Ces résultats indiquent que le mélange est essentiellement caractérisé par une diminution initiale du nombre des domaines structuraux, puis une légère augmentation de ce nombre. Si l'on considère la présence de précipités insolubles dans le système, cette diminution de l'intensité diffusée s'explique par une sédimentation de ceux-ci. Le signal est ensuite certainement lié à la présence de coacervats de petite taille ou de précipités solubles.

L'application des modèles de croissance de  $I_{\max}$  relatifs à la DS est ici totalement inadéquate comme le montre la figure 4.26. La cinétique de séparation de phase et de structuration du système ne peut donc pas être décrite par la DS dans l'intervalle de temps que nous avons étudié et sur la gamme de  $q$  accessible. En revanche, il est possible de représenter  $I(q)$  en fonction de  $q$  en coordonnées bi-logarithmiques, afin d'avoir des informations concernant la structuration de l'interface au cours du temps (Figure 4.27).

Il est tout d'abord intéressant de noter un phénomène de translation des courbes vers la gauche au cours du temps, preuve que l'intensité diffusée diminue au cours du temps. De telles observations ont été rapportés par Bushell et Amal (2000) lors de l'étude de l'agrégation fractale de particules de latex par DSLPA, l'explication donnée étant une sédimentation des

particules. La détermination de  $\gamma$  pour des ratios de  $q/q_{\max} > 2$  est comprise entre - 2,77 et - 3,50, indépendamment du temps considéré. Ceci correspond non pas à une surface lisse, mais à une surface fractale pouvant être reliée à la structure initiale de la surface des agrégats protéiques insolubles, qui comme nous l'avons vu en MCBL est très irrégulière.



**Figure 4.27 :** Courbes bi-logarithmiques de l'intensité diffusée à 20°C dans un mélange BLG<sub>agr</sub>(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et une concentration totale en biopolymères de 0,1 % en fonction du vecteur d'onde. Temps après mélange des biopolymères : (○) 1 min ; (●) 5 min ; (△) 10 min ; (▲) 15 min ; (□) 30 min ; (■) 60 min ; (◇) 120 min ; (◆) 240 min ; (×) 480 min ; (⊗) 600 min ; (+) 720 min ; (⊠) 840 min.

#### 4 Conclusion de l'étude cinétique de la séparation de phase dans les mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau

Le suivi de la séparation de phase dans les mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau a permis de mettre en évidence l'influence de la polydispersité sur le mécanisme de séparation de phase, mais également celle du pH, du ratio Pr : Ps et de la concentration totale en biopolymères.

Avant de rappeler les principaux résultats obtenus lors de l'étude cinétique de la coacervation complexe dans les mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau, il nous semble opportun de considérer l'influence des propriétés de surface des coacervats et complexes formés sur les mesures obtenues en MCBL et en DSLPA. En effet, compte tenu des propriétés interfaciales et tensio-actives de ces particules, il est nécessaire de tenir compte d'une adsorption partielle sur les surfaces de verre utilisées pour l'échantillonnage. Même si l'on peut considérer que l'intensité de ce phénomène est négligeable en DSLPA du fait de la configuration verticale du système, il pourrait expliquer en partie les difficultés rencontrées pour l'application de certains modèles théoriques. Egalement, la sédimentation d'une partie des particules pourrait être à l'origine des variations d'intensité diffusée en DSLPA et de l'apparition de zones concentrées en MCBL dans des plans focaux proches du plan focal d'analyse.

Les résultats obtenus par DLMT à pH 4,2 pour les dispersions concentrées à 1, 4,5 et 5% ont mis en évidence l'influence couplée de la concentration totale en biopolymères et du ratio



Pr : Ps sur la stabilité à court terme des mélanges. En effet, si à 1% le ratio de mélange ne contrôle pas de façon importante la stabilité des mélanges, celui-ci devient un paramètre crucial lorsque la concentration totale en biopolymères augmente. La stabilité des mélanges, estimée par l'intensité de lumière rétro-diffusée et du temps de demi-décroissance de la fonction de corrélation, est alors inversement proportionnelle au ratio. Les systèmes les plus stables sont obtenus à des ratios Pr : Ps de 1 : 1. En présence des agrégats protéiques, l'intensité rétro-diffusée n'est stable, et donc le mélange, qu'à de fortes concentrations en biopolymères. L'explication de cet effet réside dans le nombre plus important de précipités et coacervats de petite taille formés à ces ratios. La DLMT a également permis de mettre en évidence une floculation et une sédimentation des particules, phénomènes qui diminuent la valeur de l'intensité de lumière rétro-diffusée par le système. De plus, la formation et la coalescence des coacervats a été mise en évidence par une diminution de la mobilité des particules soumises au mouvement brownien au cours du temps. La superposition de ces phénomènes cinétiques de floculation, coalescence et sédimentation, caractérisés par des vitesses différentes, explique l'obtention de signaux complexes d'intensité rétro-diffusée qui dépend donc de la contribution respective de chacun des phénomènes au cours du temps.

L'étude des mélanges obtenus à 1% par MCBL pour des pH de 4,2 et 3,6 a permis de confirmer la différence initiale de structure entre le système contenant les agrégats et le système n'en contenant pas. Dans le premier, des précipités dont la taille varie avec le ratio Pr : Ps de mélange sont visibles de même que des coacervats. Dans les mélanges sans agrégats, seuls des coacervats sont présents. L'évolution de la taille et de la structure de ces particules au cours du temps est bien corrélée avec les résultats obtenus en DLMT à la même concentration totale en biopolymères. Ainsi, la floculation et la coalescence partielle des particules sont clairement visibles dans les mélanges BLG(2)/gomme d'acacia(1)/eau, BLG(1)/gomme d'acacia(1)/eau et BLG<sub>agr</sub>(2)/gomme d'acacia(1)/eau. De plus, ces systèmes sont caractérisés par la formation de coacervats vacuolisés, alors qu'ils ne le sont pas dans les autres mélanges. Leur formation est donc liée à l'intensité de neutralisation des charges entre les deux biopolymères. La sédimentation des particules les plus volumineuses, que l'on peut prévoir par l'application de la loi de Stokes, a été mise en évidence au cours du temps. En effet, ces particules disparaissent du plan focal d'observation ou y restent tout au long de l'observation si leur taille est supérieure à 30  $\mu\text{m}$ . Les observations de MCBL ont également permis de montrer une évolution de la structure des mélanges au cours du temps selon plusieurs phases que nous avons caractérisées par DSLPA.

Le suivi de la taille  $\Lambda$  des domaines structuraux ainsi que leur nombre dans les mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau au cours du temps par DSLPA a en effet permis de retrouver différentes phases de structuration. Celle-ci est majoritairement contrôlée par des phénomènes de diffusion des molécules dans les phases les plus précoces, puis par des phénomènes hydrodynamiques résultant de l'apparition d'un gradient de pression dû à la formation de gouttelettes ayant un rayon de courbure important. Il n'a pas été possible de définir avec certitude le type de séparation de phase mis en jeu lors de la coacervation complexe entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia, à savoir décomposition spinodale ou nucléation et croissance. En effet, des phénomènes de sédimentation des domaines structuraux rendent difficile la détermination des exposants caractéristiques de la théorie de la DS. Cependant, les mises à l'échelle et la comparaison des résultats avec le modèle de Furukawa (1984), valable pour les étapes tardives de la DS, attestent d'une auto-similarité de la structure au cours du temps dans les mélanges BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 et BLG<sub>agr</sub>(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6. La structuration du mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6 est plus complexe et caractérisée par une sédimentation des domaines structuraux et une succession de

phénomènes diffusionnels et hydrodynamiques. La structure du mélange  $BLG_{agr}(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2 est principalement caractérisé par la sédimentation des domaines structuraux. La caractérisation de l'interface formée entre les deux phases au cours du temps par la détermination de la pente de l'asymptote de  $I(q)$  aux grandes valeurs de  $q$  montre une surface lisse caractérisée par un fort rayon de courbure, comme cela a été prédit par Porod (1982) dans le cas de la formation de gouttelettes ou d'interfaces très fortement compactées [mélanges  $BLG(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau et  $BLG_{agr}(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau à pH 3,6]. On notera cependant que dans le système  $BLG(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2, une transition de la pente de l'asymptote de - 4 à - 2 pour des temps longs, ce qui indique un réarrangement de l'interface qui, de lisse devient plus hétérogène. De même une valeur proche de 2 est obtenue dans le mélange  $BLG_{agr}(8)$ /gomme d'acacia(1)/eau à pH 4,2, montrant l'effet important de la formation de précipités insolubles dans le mélange sur la structure de l'interface formée.

## Conclusions et perspectives de l'étude

Les principaux objectifs de ce travail étaient de mettre en évidence l'influence de la polydispersité de la protéine et de la concentration totale en biopolymères sur la formation, la structure et la stabilité de coacervats dans un mélange  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau.

### 1 Résultats fondamentaux obtenus au cours de cette étude

Deux systèmes ont été étudiés, le premier consistait en un mélange de  $\beta$ -lg contenant des agrégats protéiques et environ 44% de  $\beta$ -lg native avec de la gomme d'acacia en solution aqueuse. Le second mélange était composé de  $\beta$ -lg native et de gomme d'acacia en solution aqueuse.

#### 1.1 Influence des paramètres physico-chimiques sur la coacervation complexe entre la $\beta$ -lactoglobuline et la gomme d'acacia

Les effets «classiques» du pH et du ratio de mélange Pr : Ps sur la coacervation complexe ont été retrouvés dans le cadre de notre étude, indépendamment de la polydispersité de la  $\beta$ -lg.

Nous avons déterminé un pH et un ratio Pr : Ps optimum pour lesquels l'interaction entre les deux biopolymères est maximale. En plus de ces résultats, nous avons mis en évidence des effets spécifiques de la concentration totale en biopolymères et de la polydispersité de la  $\beta$ -lg qui n'avaient pas été décrits jusqu'alors :

- en premier lieu, l'augmentation de la concentration totale en biopolymères permet de réduire considérablement l'effet du pH et du ratio Pr : Ps sur la coacervation complexe. Nous pensons que cet effet est lié à un équilibre entre les effets entropiques (nombre de particules formées) et enthalpiques (interactions entre les macromolécules) au sein des mélanges.

- dans un second temps, nous avons mis en évidence une forte influence de la polydispersité sur la stabilité des mélanges obtenus à pH 4,2. En effet, la diminution de la polydispersité de la  $\beta$ -lg permet d'obtenir des systèmes où la séparation de phase est faible (la concentration maximale en biopolymères donnant lieu à une séparation de phase est de 4,5%). En revanche, lorsque la polydispersité est plus élevée, la coacervation complexe est obtenue jusqu'à une concentration totale en biopolymères de 20%, qui est très au-dessus du seuil théorique de suppression de la coacervation complexe. Nous avons également mis en évidence une interaction de la gomme d'acacia avec les agrégats de  $\beta$ -lg à des pH où l'interaction électrostatique est limitée.

#### 1.2 Structure et stabilité des particules formées

La polydispersité de la  $\beta$ -lg entraîne la formation de deux types de particules, des précipités, formés d'agrégats de  $\beta$ -lg ayant interagi avec la gomme d'acacia et des coacervats. Lorsque cette polydispersité est réduite, seuls des coacervats sont obtenus.

Ces deux types de particules sont caractérisés par des mobilités électrophorétiques assez semblables en fonction du pH, sauf lorsque les ratios Pr : Ps sont très favorables à la  $\beta$ -lg. D'une manière générale, la mobilité électrophorétique s'approche de celle de la gomme d'acacia seule en solution lorsque le pH augmente ce qui indique que la gomme d'acacia se trouve à la surface des particules, et des agrégats de  $\beta$ -lg en particulier. Cette hypothèse a été

confirmée par des observations en MCBL. L'interaction entre les agrégats de  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia possède une contribution électrostatique à des  $\text{pH} < \text{pH}_i$  de la  $\beta$ -lg, mais d'autres types d'interactions (hydrophobes) peuvent être envisagés à des  $\text{pH}$  élevés.

La taille des coacervats obtenus peut être contrôlée par la présence initiale des agrégats de  $\beta$ -lg dans les mélanges. L'explication de ce phénomène réside soit dans une encapsulation des agrégats par les coacervats formés soit à une adsorption de la gomme d'acacia à la surface de ceux-ci. Les deux mécanismes ont pour conséquence de limiter la quantité de coacervats susceptibles de flocculer et coalescer. En revanche, dans le cas du système ne contenant pas d'agrégats protéiques, la taille des coacervats peut être contrôlée par la concentration totale en biopolymères. Nous avons également mis en évidence des phénomènes de coalescence partielle entre les coacervats qui peuvent expliquer leur structure vésiculaire ou multi-vésiculaire observée dans les mélanges obtenus pour des ratios Pr : Ps de 2 : 1 et 1 : 1.

### **1.3 Modifications de la structure moléculaire de la $\beta$ -lactoglobuline**

L'étude de la structure secondaire de la  $\beta$ -lg par des méthodes spectroscopiques a mis en évidence une modification de celle-ci après interaction avec la gomme d'acacia. Les spectres de dichroïsme circulaire ont révélé une forte diminution de la longueur de l'hélice  $\alpha$  externe de la  $\beta$ -lg après interaction. Nous avons montré que cette modification de structure est d'autant plus importante que le ratio Pr : Ps est favorable à l'interaction électrostatique. Cependant, elle ne dépend pas de la polydispersité de la  $\beta$ -lg. L'explication de ces résultats réside dans la forte densité de charges positives caractérisant la structure en hélice  $\alpha$  aux  $\text{pH}$  étudiés, ce qui favorise l'interaction avec la gomme d'acacia anionique. Aucun changement de la structure secondaire en feuillets  $\beta$  ou de l'environnement des acides aminés hydrophobes n'a été mis en évidence.

### **1.4 Cinétique de structuration des mélanges $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau**

L'étude de la cinétique de structuration des mélanges par diffusion de la lumière en milieu turbide ou microscopie confocale à balayage laser a mis en évidence la superposition de différents mécanismes se produisant à des vitesses différentes

La coalescence des coacervats de petite taille au cours du temps a été clairement mise en évidence en suivant l'évolution du temps de demi-décroissance de la fonction de corrélation des mélanges. La sédimentation d'une partie des coacervats de grande taille formés, de même que celle des précipités, a été mise en évidence par l'étude des variations de l'intensité de lumière rétro-diffusée par les mélanges au cours du temps et par l'observation des mélanges par microscopie confocale à balayage laser.

Nous avons, dans des mélanges peu concentrés, caractérisé le mécanisme cinétique de structuration des mélanges par diffusion statique de la lumière aux petits angles. Ce mécanisme est caractérisé, par des phases successives de croissance de la taille des domaines structuraux à des vitesses différentes. Dans les premiers temps qui suivent la séparation de phase, les phénomènes diffusionnels sont prépondérants alors que pour des temps plus tardifs, la structuration des mélanges est liée à des phénomènes hydrodynamiques, du fait du développement d'une interface entre les deux phases. Des phénomènes de sédimentation des domaines structuraux ont également été montrés par une diminution de l'intensité de lumière diffusée. Dans le cas particulier du mélange BLG(8)/gomme d'acacia(1)/eau obtenu à  $\text{pH}$  4,2, la corrélation entre les résultats expérimentaux et les modèles théoriques de la décomposition spinodale est très bonne, indiquant que ce mécanisme peut être envisagé pour décrire la cinétique de structuration de ce système. Nous avons montré que certains systèmes possèdent

une auto-similarité des domaines structuraux au cours du temps et que, dans la plupart des cas, les interfaces formées étaient lisses et caractérisées par un rayon de courbure important (formation de particules sphériques). Dans le cas où la solubilité des agrégats de  $\beta$ -lg est faible, l'interface formée est de nature fractale.

## 2 Validité des méthodes expérimentales utilisées

Les différentes méthodes expérimentales que nous avons utilisées étaient manifestement bien adaptées à l'étude du système  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau. Nous avons cependant pu mettre en évidence les limites d'application de chacune d'entre elles. En choisissant des conditions expérimentales optimales (concentration en biopolymères, turbidité, viscosité des échantillons), il sera donc possible d'optimiser leur utilisation dans des études ultérieures.

## 3 Perspectives de cette étude

Les perspectives d'étude de ce système résident à notre avis dans une étude plus poussée des cinétiques de séparation de phase en employant les méthodes que nous avons décrites sur des temps beaucoup plus longs, entre l'instant du mélange et l'équilibre thermodynamique du système. Il serait alors possible de suivre par exemple l'évolution de la taille des particules au cours du temps, mais également la variation de leur mobilité électrophorétique ou de la structure secondaire de la protéine. Ceci permettrait de corrélérer de façon plus concrète les modifications du système aux différentes échelles d'observations et de comprendre ainsi le mécanisme global.

De façon plus précise, il faut noter que l'étude de la formation et de l'évolution des complexes macromoléculaires n'a pas été abordée ici, de même que celle de la phase concentrée. Une telle étude permettrait de comprendre avec précision le passage du stade des complexes macromoléculaires insolubles aux coacervats.

Concernant la caractérisation du mécanisme thermodynamique régissant la coacervation complexe, il serait intéressant d'étudier un système spécifique (ratio Pr : Ps et concentration totale fixés), en essayant de limiter les phénomènes de sédimentation en augmentant par exemple la viscosité de la phase continue. Il serait alors possible d'appliquer plus facilement les théories existantes.

Nous pensons que le mécanisme de stabilisation de la taille des coacervats par la présence des agrégats protéiques mérite d'être étudié plus spécifiquement. Des mesures de tension interfaciale entre les phases en présence pourrait permettre de vérifier l'hypothèse de l'encapsulation des agrégats par les coacervats.

La formation et la stabilité des vacuoles obtenues dans certains mélanges n'ont pas pu être expliquée et mérite donc une étude approfondie puisqu'elle peut permettre la synthèse de particules pouvant posséder des propriétés de transport de molécules d'intérêt.

La caractérisation des propriétés fonctionnelles des différents types de particules obtenues (précipités, coacervats) paraît également indispensable afin de contrôler celles-ci en fonction du type de mélange considéré et des conditions dans lequel il est obtenu.

#### **4 Domaines d'application de cette étude**

Dans le domaine alimentaire, le contrôle de la polydispersité de la protéine, peut permettre d'obtenir, à partir de deux molécules, toute une gamme de nouveaux ingrédients alimentaires multifonctionnels possédant également des propriétés nutritionnelles importantes. Si l'on considère le potentiel d'application de la complexation entre la  $\beta$ -lg et la gomme d'acacia, un point très intéressant réside dans la modification de la structure en hélice  $\alpha$  de la protéine. Sélo et al. (1999) ont en effet montré que les principales zones d'interaction entre les immunoglobulines du sérum humain et la  $\beta$ -lg étaient localisées sur les portions 102-124 et 149-162 de la protéine, donc à proximité de l'hélice  $\alpha$ . L'interaction de la  $\beta$ -lg avec la gomme d'acacia pourrait donc représenter un moyen de diminuer l'allergénicité de la  $\beta$ -lg en modifiant stériquement et électrostatiquement l'accessibilité des zones allergènes aux anticorps du sérum humain, tout en l'utilisant comme ingrédient alimentaire.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, un nombre important de domaines sont susceptibles d'utiliser les complexes protéines-polysaccharides et les coacervats. Les résultats que nous avons présentés dans le cadre de notre étude y sont tout aussi valables.

## Références bibliographiques

Acharya, L. et Chattoraj, D. K. (1975). Molecular Weight and Radius of Gyration of the Macroions of Gum Arabic from Light Scattering Measurements. *Ind. J. Chem.*, 13, 569-573.

Ahmed, L. S., Xia, J. et Dubin, P. L. (1994). Stoichiometry and the mechanism of complex formation in protein-polyelectrolyte coacervation. *Pure Appl. Chem.*, 31, 17-29.

Albertsson, P. Å. (1971). *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 2<sup>ème</sup> édition, New York : Wiley Interscience.

Allain, A-F., Paquin, P. et Subirade, M. (1999). Relationships between conformation of  $\beta$ -lactoglobulin in solution and gel states as revealed by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.*, 26, 337-344.

Ambjerg Pedersen, H. C. et Jørgensen, B. B. (1991). Influence of pectin on the stability of casein solutions studied in dependence of varying pH and salt concentration. *Food Hydrocoll.*, 5, 323-328.

Anderson, D. M. W. (1986). Evidence for the safety of gum arabic (*Acacia senegal* (L.) Willd.) as a food additive-a brief review. *Food Add. Contam.*, 3, 225-230.

Anderson, D. M. W. et Eastwood, M. A. (1989). The safety of gum arabic as a food additive and its Energy Value as an ingredient : a brief review. *J. Hum. Nutr. Diet.*, 2, 137-144.

Anderson, D. M. W. et Rahman, S. (1967). Studies on uronic acid materials – Part XX : The viscosity-molecular weight relationship for *Acacia* gums. *Carbohydr. Res.*, 4, 298-304.

Anderson, D. M. W., Bridgeman, M. M. E., Farquhar, J. G. K. et McNab, C. G. A. (1983). The chemical characterization of the test article used in toxicological studies of gum arabic (*Acacia senegal* (L.) Willd). *Int. Tree Crops J.*, 2, 245-254.

Anderson, D. M. W., Millar, J. R. A. et Weiping, W. (1991). Gum arabic (*Acacia senegal*) : unambiguous identification by <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy as an adjunct to the Revised JECFA Specification, and the application of <sup>13</sup>C-NMR spectra for regulatory/legislative purposes. *Food Addit. Contam.*, 8, 405-421.

Antonov, Y. A., Lashko, N. P., Glotova, Y., Malovikova, A. et Markovich, O. (1996). Effect of the structural features of pectins and alginates on their thermodynamic compatibility with gelatin in aqueous media. *Food Hydrocoll.*, 10, 1-9.

AOAC. (1984). Dans W. Horwitz (Ed.), *Official methods of analysis*, 40<sup>ème</sup> édition, Washington DC : Association of Official Analytical Chemists.

Arai, M., Ikura, T., Semisotnov, G. V., Kihara, H., Amemiya, Y. et Kuwajima, K. (1998). Kinetic Refolding of  $\beta$ -Lactoglobulin. Studies by Synchrotron X-ray Scattering, and Circular Dichroism, Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 275, 149-162.

Arakawa, T. et Timasheff, S. N. (1987). Abnormal Solubility Behavior of  $\beta$ -Lactoglobulin : Salting-In by Glycine and NaCl. *Biochemistry*, 26, 5147-5153.

Assimon, S. A. et Stein, T. P. (1994). Digestible Fiber (Gum Arabic), Nitrogen Excretion and Urea Recycling in Rats. *Nutrition*, 10, 544-550.

Aymard, P., Durand D. et Nicolai, T. (1996). The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of  $\beta$ -lactoglobulin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 19, 213-221.

Babiker, E. E., Hiroyuki, A., Matsudomi, N., Iwata, H., Ogawa, T., Bando, N. et Kato, A. (1998). Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 866-871.

Baker, P. H. et Saroff, H. A. (1965). Binding of Sodium Ions to  $\beta$ -Lactoglobulin. *Biochemistry*, 4, 1670-1677.

Baldini, G., Beretta, S., Chirico, G., Franz, H., Maccioni, E., Mariani, P. et Spinozzi, F. (1999). Salt-Induced Association of  $\beta$ -Lactoglobulin by Light and X-ray Scattering. *Macromolecules*, 32, 6128-6138.

Baldwin, T. C., McCann M. C. et Roberts, K. (1993). A novel Hydroxyproline-Deficient Arabinogalactan Protein Secreted by Suspension-Cultured Cells of *Daucus carota*. Purification and Partial Characterization. *Plant Physiol.*, 103, 115-123.

Baldwin, T. C., Quah, P. E. et Menzies, A. R. (1999). A serotaxonomic study of *Acacia* gum exudates. *Phytochemistry*, 50, 599-606.

Bandekar, J. (1992). Amide modes and protein conformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1120, 123-143.

Bansil, R. et Liao, G. (1997). Kinetics of Spinodal Decomposition in Homopolymer Solutions and Gels. *Trends Polym. Sci.*, 5, 146-154.

Bastea, S. et Lebowitz, J. L. (1995). Domain growth in computer simulations of segregating two-dimensional binary fluids. *Phys. Rev. E*, 52, 3821-3826.

Bates, F. S. et Wilsius, P. (1989). Spinodal decomposition of a symmetric critical mixture of deuterated and protonated polymer. *J. Chem. Phys.*, 91, 3258-3274.

Bauer, R., Hansen, S. et Øgandal, L. (1998). Detection of Intermediate Oligomers, Important for the Formation of Heat Aggregates of  $\beta$ -Lactoglobulin. *Int. Dairy J.*, 8, 105-112.

Bazhlekov, I. B., Chesters, A. K. et van de Vosse, F. N. (2000). The effect of the dispersed to continuous-phase viscosity ratio on film drainage between interacting drops. *Int. J. Multiphase Flow*, 26, 445-466.

Berne, B. J. et Pecora, R. (1976). Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics. New York : Wiley Interscience.



- Binder, K. (1991). Spinodal Decomposition. Dans R. W. Cahn, P. Haasen et E. J. Kramer (Eds), *Material Science and Technology. A comprehensive Treatment*, vol. 5, pp. 405-471, Weinheim : VCH.
- Binder, K. et Stauffer, D. (1974). Theory of Slowing Down of the Relaxation and Spinodal Decomposition of Binary Mixtures. *Phys. Rev. Lett.*, 33, 1006-1009.
- Blanch, E. W., Hecht, L. et Barron, L. D. (1999). New insight into the pH-dependent conformational changes in bovine  $\beta$ -lactoglobulin from Raman optical activity. *Prot. Sci.*, 8, 1362-1367.
- Borue, V. Yu et Erukhimovich, I Ya. (1990). A Statistical Theory of Globular Polyelectrolyte Complexes. *Macromolecules*, 23, 3625-3632.
- Bough, W. A. et Landes, D. R. (1976). Recovery and Nutritional Evaluation of Proteinaceous Solids Separated from Whey by Coagulation with Chitosan. *J. Dairy Sci.*, 59, 1874-1880.
- Bourriot, S. (1999). Comportement de phase, rhéologie et ultrastructure des mélanges caséines micellaires/polyosides. Thèse de Doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Massy, 189 p.
- Bowman, W. A., Rubinstein, M. et Tan, J. S. (1997). Polyelectrolyte-Gelatin Complexation: Light Scattering Study. *Macromolecules*, 30, 3262-3270.
- Boye, J. I., Ismail, A. A. et Alli, I. (1996). Effects of physicochemical factors on the secondary structure of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Dairy Res.*, 63, 97-109.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Braudo, E. E. et Antonov, Y. A. (1993). Non-coulombic complex formation of proteins as a structure forming factor in food systems. Dans K. D. Schwenke et R. Mothes (Eds), *Food Proteins, Structure and Functionality*, pp. 210-215, Weinheim : VCH.
- Bremer, L. G. B., Bijsterbosch, B. H., Schrijvers, R., van Vliet, T. et Walstra, P. (1990). On the fractal nature of the structure of acid casein gels. *Coll. Surf.*, 51, 159-170.
- Brignon, G., Chtourou, A. et Ribadeau-Dumas, B. (1985). Does  $\beta$ -lactoglobulin occur in human milk? *J. Dairy Res.*, 52, 249-254.
- Brooker, B. E. (1991). The Study of Food Systems Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Microscopy Analysis*, 26, 13-15.
- Brooker, B. E. (1995). Imaging Food Systems by Confocal Laser Scanning Microscopy. Dans E. Dickinson, (Ed.), *New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*, pp. 53-85, Glasgow : Blackie Academic & Professional.

Brown, A. B. D., Ferrero, C., Narayanan, T. et Rennie, A. R. (1999). Phase separation and structure in a concentrated colloidal dispersion of uniform plates. *Eur. Phys. J. B*, 11, 481-489.

Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. T. et Sawyer, L. (1997). Bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8 Å resolution - still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5, 481-495.

Buchhammer, H. M., Petzold, G. et Lunkwist, K. (1993). The interaction between oppositely charged polyelectrolytes in the presence of solid surfaces. *Coll. Surf. A*, 76, 81-85.

Bungenberg de Jong, H. G. (1936). Dans E. Fauré-Fremiet (Ed.), *La coacervation complexe et son importance en biologie*, vol. 1, Paris : Hermann et Cie.

Bungenberg de Jong, H. G. (1949). Crystallisation-coacervation-flocculation. Dans H. G. Kruyt (Ed.), *Colloid Science*, vol. 2, pp. 232-258, Amsterdam : Elsevier.

Bungenberg de Jong, H. G., Bank, O. et Hoskam, E. G. (1940). Morphologische Studien an Komplexkoazervaten. Flüssige bzw. Gelatinierte Schaum- und Hohlkörper. *Protoplasma*, 34, 30-54.

Burgess, D. J. (1990). Practical analysis of complex coacervate systems. *J. Colloid Interf. Sci.*, 140, 227-238.

Burgess, D. J. (1994). Complex coacervation : microcapsule formation. Dans P. L. Dubin, J. Bock, R. Davis, D. N. Schulz et C. Thies (Eds), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, pp. 281-300, Berlin : Springer Verlag.

Burgess, D. J. et Carless, J. E. (1984). Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia gum for prediction of complex coacervation. *J. Coll. Interf. Sci.*, 88, 1-8.

Burgess, D. J. et Carless, J. E. (1985). Manufacture of gelatin/gelatin coacervate microcapsules. *Int. J. Pharm.*, 27, 61-70.

Burgess, D. J. et Carless, J. E. (1986). Dans A. Eisenberg et E. F. Bayley (Eds), *Coulombic Interactions in Macromolecular Systems*, ACS Symposium Series 302, Washington DC : American Chemical Society.

Burgess, D. J. et Singh, O. N. (1993). Spontaneous formation of small sized albumin/acacia coacervate particles. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45, 586-591.

Burgess, D. J., Kwok, K. K. et Megremis, P. T. (1991) Characterization of albumin-acacia complex coacervation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 232-236.

Bushell, G. et Amal, R. (1998). Fractal Aggregates of Polydispersed Particles. *J. Coll. Interf. Sci.*, 205, 459-469.

Bushell, G. et Amal, R. (2000). Measurement of Fractal Aggregates of Polydispersed Particles Using Small-Angle Light Scattering. *J. Coll. Interf. Sci.*, 221, 186-194.

Byler, D. M. et Susi, H. (1986). Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvoluted FTIR Spectra. *Biopolymers*, 25, 469-487.

Cahn, J. W. et Hilliard, J. E. (1958). Free energy of a nonuniform system. I. Interfacial free energy. *J. Chem. Phys.*, 28, 258-267.

Cairolì, S., Iametti, S. et Bonomi, F. (1994). Reversible and Irreversible Modifications of  $\beta$ -Lactoglobulin Upon Exposure to Heat. *J. Prot. Chem.*, 13, 347-354.

Calatroni, A., Vinci, R. et Ferlazzo, A. M. (1992). Characteristics of the interactions between acid glycosaminoglycans and proteins in normal human plasma as revealed by the behaviour of the protein-polysaccharide complexes in ultrafiltration and chromatographic procedures. *Clin. Chim. Acta*, 206, 167-180.

Cannan, R. K., Palmer, A. H. et Kibric, A. C. (1942). The hydrogen ion dissociation curve of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Biol. Chem.*, 142, 803-822.

Carpinetti, M. et Giglio, M. (1992). Spinodal-Type Dynamics in Fractal Aggregation of Colloidal Clusters. *Phys. Rev. Lett.*, 68, 3327-3330.

Caruso, R., Niikura, K., Furlong, D. N. et Okahata, Y. (1997). Assembly of Alternating Polyelectrolyte and Protein Multilayer Films for Immunosensing. *Langmuir*, 13, 3427-3433.

Casal, H. L., Köhler, U. et Mantch, H. H. (1988). Structural and conformational changes of  $\beta$ -lactoglobulin B : an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, 957, 11-20.

Cates, M. E., Kendon, V. M., Bladon, P. et Desplat, J-C. (1999). Inertia, coarsening and fluid motion in binary mixtures. *Faraday Discuss.*, 112, 1-11.

Cayot, P. et Lorient, D. (1998). Structures et technofonctions des protéines du lait. Paris : Lavoisier.

Chang, H-M., Lu, T-C., Chen, C-C, Tu, Y-Y et Hwang, J-Y. (2000). Isolation of Immunoglobulin from Egg Yolk by Anionic Polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 995-999.

Chen, S-H. et Texeira, J. (1986). Structure and Fractal Dimension of Protein-Detergent Complexes. *Phys. Rev. Lett.*, 57, 2583-2586.

Chen, W-S., Henry, G. A., Gaud, S. M., Miller, M. S., Kaiser, J. M., Balmadeca, E. A., Morgan, R. G., Baer, C. C., Borwankar, R. P., Hellgeth, L. C., Strandholm, J. J., Hasenheuttl, G. L., Kerwin, P. J., Chen, C. C., Kratochvil, J. F. et Lloyd, W. L. (1989). Microfragmented ionic polysaccharide/protein complex dispersions. European Patent Application 0,340,035, Kraft, Inc.

Chen, Y-H., Yang, J. T. et Martinez, H. M. (1972). Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochem.*, 11, 4120-4131.

Chern, C. S., Lee, C. K. et Ho, C. C. (1999). Electrostatic interaction between chitosan-modified latex particles and bovine serum albumin. *Colloid Polym Sci*, 277, 979-985.

Chikamai, B. N., Banks, W. B., Anderson, D. M. W. et Weiping, W. (1996). Processing of gum arabic and some new opportunities. *Food Hydrocoll.*, 10, 309-316.

Chikamai, B. N., Hall, J. B. et Banks, W. B. (1995). Survey of *Acacia senegal* ressources for gum arabic in northern Kenya. *Comm. Forest. Rev.*, 74, 246-252.

Chilvers, G. R. et Morris, V. J. (1987). Coacervation of Gelatin-Gellan Gum Mixtures and Their Use in Microencapsulation. *Carbohydr. Polym.*, 7, 111-120.

Chobert, J-M., Briand, L., Dufour, E., Dib, R., Dalgarrondo, M. et Haertlé, T. (1997). How to increase  $\beta$ -lactoglobulin susceptibility to peptic hydrolysis. *J. Food Biochem.*, 20, 439-462.

Clark, D. T., Gazi, M. I., Cox, S. W., Eley, B. M. et Tinsley, G. F. (1993). The effect of *Acacia arabica* on the in vitro growth and protease activities of periodontopathic bacteria. *J. Clin. Periodontol.*, 20, 238-243.

Collins, T. F. X., Welsh, J. J., Black, T. N., Graham, S. L. et Brown, L. H. (1987). Study of the teratogenic potential of gum arabic. *Food Chem. Toxic.*, 25, 815-821.

Connolly, S., Fenyo, J-C. et Vandeveld, M-C. (1988). Heterogeneity and homogeneity of an arabinogalactan-protein : *Acacia senegal* gum. *Food Hydrocoll.*, 1, 477-480.

Creamer, L. K., Parry, D. A. et Malcolm, G. N. (1983). Secondary Structure of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin B. *Arch. Biochem. Biophys.*, 227, 98-105.

Curley, R. W. Jr., Sundaram, A. K., Fowble, J. W., Abildgaard, F., Westler, W. M. et Markley, J. L. (1999). NMR Studies of Retinoid-Protein Interactions : The Conformation of [ $^{13}\text{C}$ ]- $\beta$ -Ionones Bound to  $\beta$ -Lactoglobulin B. *Pharm. Res.*, 16, 651-659.

Dai-Dong, J. X. (1990). Etude physicochimique de l'interaction entre la vitamine C et la  $\beta$ -lactoglobuline. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 134 p.

Daniels, R. et Mittermaier, E. M. (1995). Influence of pH ajustement on microcapsules obtained from complex coacervation of gelatin and acacia. *J. Microencapsulation*, 12, 591-599.

Dash, A. K. (1997). Determination of the physical state of drug in microcapsules and microsphere formulations. *J. Microencapsulation*, 14, 101-112.

de Rham, O. et Chanton, S. (1984). Rôle of ionic environment in insolubilization of whey protein during heat treatment of whey products. *J. Dairy Sci.*, 67, 939-949.

de Wit, J. N., Hontelez-Backx, E. et Adamse, M. (1988). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 3. Functional properties in aqueous solution. *Neth. Milk Dairy J.*, 42, 155-172.

de Wit, J. N. et van Kessel, Th. (1996). Effects of ionic strength on the solubility of whey products. A colloid chemical approach. *Food Hydrocoll.*, 10, 2, 143-149.

Debye, P. et Hückel, E. (1923). Zur Theorie der Elektrolyte. *Physikalische Z.*, 24, 185-206.

Debye, P. et Hückel, E. (1924). Bemerkung zu einem Satze über kataphoretische Wanderungsgeschwindigkeit suspendierte Teilschen. *Physikalische Z.*, 25, 49-52.

Delben, F. et Stefancich, S. (1997). Interaction of food proteins with polysaccharides. I. Properties upon mixing. *J. Food Eng.*, 31, 325-346.

Delben, F. et Stefancich, S. (1998). Interaction of food polysaccharides with ovalbumin. *Food Hydrocoll.*, 12, 291-299.

Dhont, J. K. G. (1996). Spinodal decomposition of colloids in the initial and intermediate stages. *J. Chem. Phys.*, 105, 5112-5125.

Diaz de Villegas, H. C., Oria, R., Sala, F. J. et Calvo, M. (1987). Lipid binding by  $\beta$ -lactoglobulin of cow milk. *Milchwissenschaft*, 42, 357-358.

Dickinson, E. (1998). Stability and rheological properties of milk protein-polysaccharide interactions. *Trends Food Sci. Nutr.*, 9, 347-354.

Dickinson, E. et Galazka, V. B. (1991a). Emulsion stabilisation by ionic and covalent complexes of  $\beta$ -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocoll.*, 5, 281-296.

Dickinson, E. et Galazka, V. B. (1991b). Emulsifying Behaviour of Gum Arabic. Part 1: Effect of the Nature of the Oil Phase on the Emulsion Droplet-Size Distribution. *Carbohydr. Polym.*, 14, 373-383.

Dickinson, E. et Galazka, V. B. (1991c). Emulsifying Behaviour of Gum Arabic. Part 2: Effect of the Gum Molecular Weight on the Emulsion Droplet-Size Distribution. *Carbohydr. Polym.*, 14, 385-392.

Dickinson, E. et Pawlowski, K. (1996). Rheology as a probe of protein-polysaccharide interactions in oil-in-water emulsions. Dans G. O. Phillips, P. A. Williams et D. J. Wedlock (Eds), *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, vol. 8, pp. 181-191, Oxford : IRL Press.

Dickinson, E. et Pawlowsky, K. (1998). Influence of  $\kappa$ -carrageenan on the properties of a protein-stabilized emulsion. *Food Hydrocoll.*, 12, 417-423.

Dickinson, E. et Semenova, M. G. (1992). Emulsifying properties of covalent protein-dextran hybrids. *Coll. Surf.*, 64, 299-310.

Dickinson, E., Elverson, D. J. et Murray, B. S. (1989). On the film-forming and emulsion-stabilizing properties of gum arabic : dilution and flocculation aspects. *Food Hydrocoll.*, 3, 101-114.

Dickinson, E., Murray, B. S., Stainsby, G. et Anderson, D. M. W. (1988). Surface activity and emulsifying behaviour of some *Acacia* gums. *Food Hydrocoll.*, 2, 477-490.

Dickinson, E., Semenova, M. G., Antipova, A. S. et Pelan, E. G. (1998). Effect of high-methoxy pectin on properties of casein-stabilized emulsions. *Food Hydrocoll.*, 12, 425-432.

Dione, M. (1996). Recherches expérimentales sur le gommier *Acacia senegal* dans le Ferlo sénégalais. Thèse de Doctorat de l'Université Paul Sabatier de Toulouse. 134 p.

Doi, E. (1993). Gels and gelling of globular proteins. *Trends Food Sci. Technol.*, 4, 1-5.

Dong, A., Masuura, J., Allison, S. D., Chrisman, E., Manning, M. C. et Carpenter, J. F. (1996). Infrared and Circular Dichroism Spectroscopic Characterization of Structural Differences between  $\beta$ -Lactoglobulin A and B. *Biochemistry*, 35, 1450-1457.

Dong, A., Prestrelski, S. J., Allison, S. D. et Carpenter, J. F. (1995). Infrared Spectroscopy Studies of Lyophilization- and Temperature-Induced Protein Aggregation. *J. Pharm. Sci.*, 84, 415-424.

Douglas, N. G., Humffray, A. A., Pratt, H. R. C. et Stevens, G. W. (1995). Electrophoretic mobilities of proteins and protein mixtures. *Chem. Eng. Sci.*, 50, 743-754.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. et Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.

Dufour, E., Robert, P., Bertrand, D. et Haertlé, T. (1994). Conformation Changes of  $\beta$ -Lactoglobulin : An ATR Infrared Spectroscopic Study of the Effect of pH and Ethanol. *J. Prot. Chem.*, 13, 143-149.

Durrani, C. M., Prystupa, D. A., Donald, A. et Clark, A. H. (1993). Fourier Transform Infrared Microscopy of Phase-Separate Mixed Biopolymer Gels. *Macromolecules*, 27, 110-119.

Duvallet, S., Fenyo, J-C. et Vandeveld, M-C. (1989). Meaning of molecular weight measurements of gum arabic. *Polym. Bull.*, 21, 517-521.

Elgindy, N. A. et Elegakey, M. A. (1981). Carbopol-Gelatin Coacervation: Influence of some Variables. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 7, 587-603.

Eliçabe, G. E., Larrondo, H. A. et Williams, J. J. (1998). Light Scattering in the Course of a Polymerization-Induced Phase Separation by a Nucleation-Growth Mechanism. *Macromolecules*, 31, 8173-8182.

Ellis, D. L. et Yannas, I. V. (1996). Recent advances in tissue synthesis *in vivo* by use of collagen-glycosaminoglycan copolymers. *Biomaterials*, 17, 291-299.

Evreinova, T. N., Mamontova, T. W., Karnauhov, V. N., Stephanov, S. B. et Hrust, U. R. (1974). Coacervate systems and origin of life. *Origins of Life*, 5, 201-205.

Fanni, J. (1987). Etude de l'hydratation de la  $\beta$ -lactoglobuline en présence de Chlorure de Sodium. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 202 p.

Fanni, J., Canet, D., Elbayed, K. et Hardy, J. (1989).  $^1\text{H}$  and  $^{23}\text{Na}$  NMR Relaxation Studies of the NaCl/ $\beta$ -Lactoglobulin System Equilibrated at Various Water Activities. *J. Food Sci.*, 54, 909-916.

Farell, H. M. Jr. et Thompson, M. P. (1971). Biological significance of milk protein polymorphism. *J. Dairy Sci.*, 54, 1219-1228.

Fauconnier, M-L., Blecker, C., Groyne, J., Razafindralambo, H., Vanzeveren, E., Marlier, M. et Paquot, M. (2000). Characterization of Two Acacia Gums and Their Fractions Using a Langmuir Film Balance. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2709-2712.

FIL-IDF. (1995). Détermination de l'indice de solubilité de l'azote dans les poudres de protéines maitières, norme n°173.

Flory, P. J. (1942). Thermodynamics of high polymer solutions. *J. Chem. Phys.*, 10, 51-61.

Flory, P. J. (1953). Principles of Polymer Chemistry. Londres : Cornell University Press.

Fogolari, F., Ragona, L., Licciardi, S., Romagnoli, S., Michelutti, R., Ugolini, R. et Molinari, H. (2000). Electrostatic properties of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin. *Proteins : Struct. Funct. Gen.*, 39, 317-330.

Fortelný, I. et Zivný, A. (1998). Film drainage between droplets during their coalescence in quiescent polymer blends. *Polymer*, 39, 2669-2675.

Fortelný, I., Zivný, A. et Juza, J. (1999). Coarsening of the Phase Structure in Immiscible Polymer Blends. Coalescence or Ostwald Ripening? *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, 37, 181-187.

Frugier, D. (1988). Copolymères anioniques et cationiques de faible densité de charge : synthèse et étude de leur coacervation complexe. Thèse de Doctorat de l'Université de Paris VI, 96 p.

Frugier, D. et Audebert, R. (1994). Interaction between oppositely charged low ionic density polyelectrolytes : complex formation or simple mixture? Dans P. L. Dubin, J. Bock, R. Davis, D. N. Schultz et C. Thies (Eds), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, pp. 135-149, Berlin : Springer Verlag.

Furukawa, H. (1984). Dynamic-scaling theory for phase separating unmixing mixtures : growth rates of droplets and scaling properties of autocorrelation functions. *Physica*, 123A, 497-515.

Galazka, V. B., Smith, D., Ledward, D. A. et Dickinson, E. (1999a). Complexes of bovine serum albumin with sulfated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chem.*, 64, 303-310.

Galazka, V. B., Smith, D., Ledward, D. A. et Dickinson, E. (1999b). Interaction of ovalbumin with sulfated polysaccharides: effects of pH, ionic strength, heat and high pressure treatment. *Food Hydrocoll.*, 13, 81-88.

Ganz, A. J. (1974). How cellulose reacts with proteins. *Food Eng.*, 6, 67-69.

Gao, J. Y. et Dubin, P. L. (1999). Binding of Proteins to Copolymers of Varying Hydrophobicity. *Biopolymers*, 49, 185-193.

García-Hernández, E., Hernández-Arana, A., Zubillaga, R. A. et Rojo-Dominguez, A. (1998). Spectroscopic and thermodynamic evidence for a complex denaturation mechanism of bovine  $\beta$ -lactoglobulin A. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 45, 761-768.

Gazi, M. I. (1990). The finding of antiplaque features in *Acacia Arabica* type of chewing gum. *J Clin. Periodontol.*, 18, 75-77.

Georgalis, Y., Umbach, P., Raptis, J. et Saenger, W. (1997). Lysozyme Aggregation Studied by light Scattering. I. Influence of Concentration and Nature of Electrolytes. *Acta Cryst.*, D53, 691-702.

Georgalis, Y. et Saenger, W. (1999). Light scattering studies on supersaturated protein solutions. *Sci. Prog.*, 82, 271-294.

Georgalis, Y., Umbach, P., Saeger, W., Ihmels, B. et Soumpasis, D. M. (1999). Ordering of Fractal Clusters in Crystallizing Lysozyme Solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1627-1635.

Georgalis, Y., Umbach, P., Soumpasis, D. M. et Saenger, W. (1998). Dynamic and Microstructure Formation during Nucleation of Lysozyme Solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 5539-5548.

Gimel, J. C., Durand, D. et Nicolai, T. (1994). Structure and distribution of aggregates formed after heat-induced denaturation of globular proteins. *Macromolecules*, 27, 583-589.

Goycoolea, F. M., Morris, E. R., Richardson, R. K. et Bell, A. E. (1995). Solution rheology of mesquite gum in comparison with gum arabic. *Carbohydr. Res.*, 27, 37-45.

Green, D. W. et Aschaffenburg, R. (1959). Twofold symmetry of the  $\beta$ -lactoglobulin molecule in crystals. *J. Mol. Biol.*, 1, 54-64.

Greenfield, N. J. (1996). Methods to Estimate the Conformation of proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Anal. Biochem.*, 235, 1-10.

Grinrod, J. et Nickerson, T. A. (1968). Effect of various gums on skimmilk and purified milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 51, 834-841.

Gurov, A. N. et Nuss, P. V. (1986). Protein-polysaccharide complexes as surfactants. *Nahrung*, 30, 349-353.



Gurov, A. N., Larichev, N. A., Krylov, V. I. et Tolstoguzov, V. B. (1978). On the conformational behaviour of bovine serum albumin in a complex with dextransulfate. *Stud. Biophys.*, 72, 7-13.

Hamada, D. et Goto, Y. (1996). Non-Native  $\alpha$ -Helical Intermediate in the Refolding of  $\beta$ -Lactoglobulin, a Predominantly  $\beta$ -Sheet Protein. *Nature Struct. Biol.*, 3, 868-873.

Hamada, D. et Goto, Y. (1997). The Equilibrium Intermediate of  $\beta$ -Lactoglobulin with Non-native  $\alpha$ -Helical Structure. *J. Mol. Biol.* 269, 479-487.

Hamada, D., Kuroda, Y., Tanaka, T. et Goto, Y. (1995). High Helical Propensity of the Peptide Fragments derived from  $\beta$ -Lactoglobulin, a Predominantly  $\beta$ -Sheet Protein. *J. Mol. Biol.*, 254, 737-746.

Hambling, S. G., McAlpine, A. S. et Sawyer, L. (1992).  $\beta$ -lactoglobulin. Dans P. F. Fox (Ed), *Advanced Dairy Chemistry 1: Proteins*, pp. 141-190, Londres : Elsevier Science Publishers Ltd.

Hansen, P. M. T., Hidalgo, J. et Gould, I. A. (1971). Reclamation of whey protein with carboxymethylcellulose. *J. Dairy Sci.*, 54, 830-834.

Haque, Z. U. et Sharma, M. (1997). Thermal Gelation of  $\beta$ -Lactoglobulin AB Purified from Cheddar Whey. 1. Effect of pH on Association as Observed by Dynamic Light Scattering. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2958-2963.

Harding, S., Jumel, K., Kelly, R., Gudo, E., Horton, J. C. et Mitchell, J. R. (1993). The structure and nature of protein-polysaccharide complexes. Dans K. D. Schwenke et R. Mothes, *Food Proteins, Structure and Functionality*, pp. 216-226, Weinheim : VCH.

Hashimoto, T., Itakura, M. et Shimidzu, N. (1986). Late stage spinodal decomposition of a binary polymer mixture. II. Scaling analyses on  $Q_m(\tau)$  and  $I_m(\tau)$ . *J. Chem. Phys.*, 85, 6773-6786.

Hashimoto, T., Kumaki, J. et Kawai, H. (1983). Time-Resolved Light Scattering Studies on Kinetics of Phase Separation and Phase Dissolution of Polymer Blends. 1. Kinetics of Phase Separation of Binary Mixture of Polystyrene and Poly(vinyl methyl ether). *Macromolecules*, 16, 641-648.

Hattori, M., Nagasawa, K., Amenati, A., Kaminogawa, S. et Takahashi, K. (1994). Functional changes in  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2120-2125.

Hattori, M., Numamoto, K-i., Kobayashi, K. et Takahashi, K. (2000). Functional Changes in  $\beta$ -Lactoglobulin by Conjugation with Cationic Saccharides. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2050-2056.

Hattori, M., Yang, W. et Takahashi, K. (1995). Functional changes of carboxymethyl potato starch by conjugation with whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2007-2011.

Heertje, I., van der Vlist, P., Blonk, J. C. G., Hendrickx, H. A. C. M. et Brakenhoff, G. J. (1987). Confocal Scanning Laser Microscopy in Food Research : Some Observations. *Food Microstruct.*, 6, 115-120.

Hidalgo, J. et Hansen, P. M. T. (1969). Interactions between food stabilizers and  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, 17, 1089-1092.

Hill, R. D. et Zadow, J. G. (1974). The precipitation of whey proteins by carboxymethyl cellulose of differing degrees of substitution. *J. Dairy Sci.*, 41, 373-380.

Hoffmann, M. A. M. et van Mil, P. J. J. M. (1997). Heat-Induced Aggregation of  $\beta$ -Lactoglobulin : Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2942-2948.

Hone, J. H. E., Howe, A. M. et Cosgrove, T. (2000). A Small-Angle Neutron Scattering Study of the Structure of Gelatin/Polyelectrolyte Complexes. *Macromolecules*, 33, 1206-1212.

Horne, D. S. (1991). Diffusing wave spectroscopy studies of gelling systems. Dans K. S. Schmitz (Ed.), *Proceedings of the SPIE, Photon Correlation Spectroscopy : Multicomponents Systems*, vol. 1430, pp. 166-180.

Horne, D. S. et Davidson, C. M. (1993). Application of diffusing-wave spectroscopy to particle sizing in concentrated dispersions. *Coll. Surf. A*, 77, 1-8.

Hsu, C. C. et Prausnitz, J. M. (1974). Thermodynamics of polymer compatibility in ternary systems. *Macromolecules*, 7, 320-324.

Huggins, M. L. (1942). Theory of solutions of high polymers. *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 1712-1719.

Hunter, R. J. (1986). Transport properties of suspensions. Dans R. J. Hunter (Ed.), *Foundations of colloid science*, vol. 1, pp. 494-536, New York : Oxford University Press.

Iametti, S., Scaglioni, L., Mazzini, S., Vecchio, G. et Bonomi, F. (1998). Structural Features and Reversible Association of Different Quaternary Structures of  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2159-2166.

Idris, O. H. M., Williams, P. A. et Phillips, G. O. (1998). Characterisation of gum from *Acacia senegal* trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocoll.*, 12, 379-388.

Ikeguchi, M., Kato, S-i., Shimizu, A. et Sugai, S. (1997). Molten Globule State of Equine  $\beta$ -Lactoglobulin. *Proteins : Struct. Funct. Gen.*, 27, 567-575.

Ilhan, F., Galow, T. H., Gray, M., Clavier, G. et Rotello, V. M. (2000). Giant Vesicle Formation through Self-Assembly of Complementary Random Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 5895-5896.

Imeson, A. P., Ledward, D. A. et Mitchell, J. R. (1977). On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 28, 669-672.

Imeson, A. P., Watson, P. R., Mitchell, J. R. et Ledward, D. A. (1978). Protein recovery from blood plasma by precipitation with polyuronates. *J. Food Technol.*, 13, 329-338.

Islam, A. M., Phillips, G. O., Sljivo, A., Snowden, M. J. et Williams, P.A. (1997). A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocoll.*, 11, 493-505.

Jayme, M. L., Dunstan, D. E. et Gee, M. L. (1999). Zeta potential of gum arabic stabilised oil in water emulsions. *Food Hydrocoll.*, 13, 459-465.

Jensen, C. D., Haskell, W. et Whittman, J. H. (1997). Long-Term Effects of Water-Soluble Dietary Fiber in the Management of Hypercholesterolemia in Healthy Men and Women. *Am. J. Cardiol.*, 79, 34-37.

Johansson, G., Brooks, D. E. et Haynes, C. A. (2000). Macromolecular Crowding and Its Consequences. Dans H. Walter, D. Brooks et P. A. Snere (Eds), *Microcompartmentation and Phase Separation in Cytoplasm*, *Int. Rev. Cytology*, vol. 192, pp. 155-170, San Diego : Academic Press.

Johnson, C. W. Jr. (1988). Secondary Structure of Proteins Trough Circular Dichroism Spectroscopy. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17, 145-166.

Joseleau, J-P. et Ullman, G. (1990). Biochemical evidence for the site of formation of gum arabic in *Acacia senegal*. *Phytochemistry*, 29, 3401-3405.

Joseph, M. et Nagaraj, R. (1998). Insight into the environment of tryptophane in a hydrophobic model peptide upon aggregation and interaction with lipid vesicles : A steady state and time resolved fluorescence study. *Ind. J. Biochem. Biophys.*, 35, 67-75.

Kabanov, V. A., Evdakov, V. P., Mustafaev, M. I. et Antipina, A. D. (1977). A cooperative interaction of serum albumin with quaternized poly-4-vinyl pyridine and structure of the complexes. *Mol. Biol.*, 11, 582-597.

Kaibara, K., Okazaki, T., Bohidar, H. B. et Dubin, P. L. (2000b). pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes. *Biomacromolecules*, 1, 100-107.

Kaibara, K., Watanabe, T. et Miyakawa, K. (2000a). Characterization of Critical Processes in Liquid-Liquid Phase Separation of Elastomeric Protein-Water System : Microscopic Observations and Light Scattering Measurements. *Biopolymers*, 53, 369-379.

Kato, A. (1996). Functional Protein-Polysaccharide Conjugates. *Comments Agric. Food Chem.*, 3, 139-153.

Kato, A., Mifuru, R., Matsudomi, N. et Kobayashi, K. (1992). Functional Casein-Polysaccharide Conjugates Prepared by Controlled Dry Heating. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 567-571.

- Kato, A., Sato, T. et Kobayashi, K. (1989). Emulsifying properties of protein-polysaccharide complexes and hybrids. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2147-2152.
- Kinsella, J. E. (1984). Milk Proteins: Physicochemical and Functional Properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 21, 197-262.
- Kita, R., Kaku, T., Kubota, K. et Dobashi, T. (1999). Pinning of phase separation of aqueous solution of hydroxymethylcellulose by gelation. *Phys. Lett. A.*, 259, 302-307.
- Koh, G. L. et Tucker, I. G. (1988a). Characterization of sodium carboxymethylcellulose-gelatin complex coacervation by viscosity, turbidity and coacervate wet weight and volume measurements. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 233-236.
- Koh, G. L. et Tucker, I. G. (1988b). Characterization of sodium carboxymethylcellulose-gelatin complex coacervation by chemical analysis of the coacervate and equilibrium fluid. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 309-312.
- Kojima, J., Takenaka, M., Nakayama, Y. et Hashimoto, T. (1999). Early Stage of Spinodal Decomposition in Polymer Solution under High Pressure. *Macromolecules*, 32, 1809-1815.
- Kong, C. Y. et Muthukumar, M. (1998). Monte Carlo Study of adsorption of a polyelectrolyte onto charged surfaces. *J. Chem. Phys.*, 109, 1522-1527.
- Kötz, J. et Beitz, T. (1997). The Phase Behaviour of Polyanion-Polycation Systems. *Trends Polym. Sci.*, 5, 86-90.
- Kravtchenko, T. P. (1997). Application of Acacia Gum as a Natural Source of Soluble Dietary Fibre. Dans *Food Ingredients Europe, Conference Proceedings*, pp. 56-60, Maarssen (The Netherlands) : Miller Freeman.
- Kuwajima, K. (1995). Circular Dichroism. Dans B. A. Shirley (Ed.), *Methods in Molecular Biology. Protein Stability and Folding : Theory and Practice*, vol. 40, pp. 115-135, Totowa (NJ) : Humana Press Inc.
- Kuwata, K., Hoshino, M., Forge, V., Era, S., Batt, C.A. et Goto, Y. (1999). Solution structure and dynamics of bovine  $\beta$ -lactoglobulin A, *Prot. Sci.*, 8, 2541-2545.
- Lal, J. et Bansil, R. (1991). Light-Scattering Study of Kinetics of Spinodal Decomposition in Polymer Solutions. *Macromolecules*, 24, 290-297.
- Lamprecht, A., Schäfer, U. F. et Lehr, C-M. (2000). Characterisation of microcapsules by confocal laser light microscopy : structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 49, 1-9.
- Laneuville, S. I., Paquin, P. et Turgeon, S. L. (2000). Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein-xanthan gum complexes. *Food Hydrocoll.*, 14, 305-314.

Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A. et de Kruif, C. G. (2000). Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food hydrocoll.*, 14, 273-280.

Lapanje, S. et Poklar, N. (1989). Calorimetric and circular dichroic studies of the thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. *Biophys. Chem.*, 34, 155-162.

Laurent, T. C. et Ogston, A. G. (1963). The interaction between polysaccharides and other Macromolecules. 4. The osmotic pressure of serum albumin and hyaluronic acid. *Biochem. J.*, 89, 249-253.

Le Hénaff, S. (1996). Microparticules de complexes de protéines de lactosérum et de xanthane comme substitut de matière grasse. Thèse de Master of Science, Université Laval, Québec, Canada.

Le Hénaff, S., Turgeon, S. L., Sanchez, C. et Paquin, P. (1997). Study of the formation of whey protein-xanthan complexes. *J. Dairy Sci.*, 80, 103.

Leach, S. J. et Scheraga, H. A. (1960). Effect of Light Scattering on Ultraviolet Difference Spectra. *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 4790-4792.

Ledward, D. A. (1994). Protein-polysaccharide interactions. Dans N. Hettiarachchy et G. R. Ziegler (Eds), *Protein Functionality in Food Systems*, pp. 225-259, New York : Marcel Dekker, Inc.

Lee, W. Y. et Schon, A. H. (1978). Suppression of Reaginic Antibodies with Modified Allergens. *Int. Archs Allergy Appl. Immun.*, 56, 159-170.

Lefebvre, A. A., Lee, J. H., Jeon, H. S., Balsara, N. P. et Hammouda, B. (1999). Initial stages of nucleation in phase separating polymer blends. *J. Chem. Phys.*, 111, 6082-6099.

Lehner, D., Worning, P., Fritz, G., Øgdenal, L., Bauer, R. et Glatter, O. (1999). Characterization of Enzymatically Induced Aggregation of Casein Micelles in Natural Concentration by *in situ* Static Light Scattering and Ultra Low Shear Viscosimetry. *J. Coll. Interf. Sci.*, 213, 445-456.

Levy, M-C. et Andry, M-C. (1989). Microcapsules à propriétés modulables formées de protéines et de polysaccharides coréticulés. *Thérapie*, 44, 365-369.

Levy, M-C. et Andry, M-C. (1991). Mixed-walled microcapsules made of cross-linked protein and polysaccharides: preparation and properties. *J. Microencapsulation*, 8, 335-347.

Li, X. Y., Asato, A. E. et Liu, R. S. H. (1990).  $\beta$ -lactoglobulin directed photoisomerization of retinol and related compounds. *Tetrahedron Lett.*, 31, 4841-4844.

Li, Y., Mattison, K. W., Dubin, P. L., Havel, H. A. et Edwards S. L. (1996). Light Scattering Studies of the Binding of Bovine Serum Albumin to a Cationic Polyelectrolyte. *Biopolymers*, 38, 527-533.

Lifshitz, I. M. et Slyozov, V. V. (1961). The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. *J. Phys. Chem. Solids*, 19, 35-50.

Lin, C. C., Jeon, H. S., Balsara, N. P. et Hammouda, B. (1995). Spinodal decomposition in multicomponent polymer blends. *J. Chem. Phys.*, 103, 1957-1971.

Lorén, N., Langton, M. et Hermansson, A-M. (1999). Confocal laser microscopy and image analysis of kinetically trapped phase-separated gelatin/maltodextrin gels. *Food Hydrocoll.*, 13, 185-198.

Lucido, G. (1998). Life out of magma : a new theory for the origin of life. *Il Nuovo Cimento*, 20D, 2575-2591.

Mallamace, F., Micali, N. et Trusso, S. (1996). A light scattering study of spinodal decomposition in systems containing surfactant molecules. *J. Phys. : Condens. Matter*, 8, A81-A101.

Manderson, G. A., Creamer, L. K. et Hardman, M. J. (1999a). Effect of Heat Treatment on the Circular Dichroism Spectra of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin A, B, and C. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4557-4567.

Manderson, G. A., Hardman, M. J. et Creamer, L. K. (1999b). Effect of Heat Treatment on Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin A, B, and C Explored Using Thiol Availability and Fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3617-3627.

Manno, M., Emanuele, A., Martorana, V., Bulone, D., San Biagio, P. L., Palma-Vitorelli, M. B. et Palma, M. U. (1999). Multiple interactions between molecular and supramolecular ordering. *Phys. Rev. E*, 59, 2222-2230.

Maret, G. (1997). Diffusing-wave spectroscopy. *Curr. Opinion Coll. Interf. Sci.*, 2, 251-257.

Marin, I. et Relkin, P. (1999). Adsorption kinetics of  $\beta$ -lactoglobulin at the air/solution interface : impact of pre-heating and addition of isoamyl acetate. *Lait*, 79, 587-594.

Matsuura, J. E. et Manning, M. C. (1994). Heat-Induced Gel Formation of  $\beta$ -Lactoglobulin: A Study on the Secondary and Tertiary Structure as Followed by Circular Dichroism Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1650-1656.

Mattison, K. W., Brittain, I. J. et Dubin, P. L. (1995). Protein-Polyelectrolyte Phase Boundaries. *Biotechnol. Prog.*, 11, 632-637.

Mattison, K. W., Dubin, P. L. et Brittain, I. J. (1998). Complex Formation between Bovine Serum Albumin and Strong Polyelectrolytes : Effect of Polymer Charge Density. *J. Phys. Chem. B*, 102, 3830-3836.

Mattison, K. W., Wang, Y., Grymonpré, K. et Dubin, P. L. (1999). Micro- and macro-phase behavior in protein-polyelectrolyte systems. *Macromol. Symp.*, 140, 53-76.

McKenzie, H. A. (1971).  $\beta$ -Lactoglobulins. Dans H. A. McKenzie (Ed), Milk Proteins Chemistry and Molecular Biology, vol. 2, pp. 257-330, Londres : Academic Press.

McLean Ross, A. H., Eastwood, M. A., Anderson, J. R. et Anderson, D. M. W. (1993). A study of the effects of dietary gum arabic in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 37, 368-375.

McSwiney, M., Singh, H. et Campanella, O. H. (1994b). Thermal Aggregation and Gelation of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin. *Food Hydrocoll.*, 8, 441-453.

McSwiney, M., Singh, H., Campanella, O. H. et Creamer, L. K. (1994a). Thermal Gelation and Denaturation of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin A and B. *J. Dairy Res.*, 61, 221-232.

Mee, K. A. et Gee, D. L. (1997). Apple fibre and gum arabic lowers total and low-density lipoprotein cholesterol levels in men with mild hypercholesterolemia. *J. Am. Diet. Assoc.*, 97, 422-424.

Merfeld, G. D. et Paul, D. R. (2000). Light scattering characterization of tetramethyl polycarbonate blends with polystyrene and with styrene-pentabromobenzyl acrylate copolymers. *Polymer*, 41, 649-661.

Michon, C., Vigouroux, F., Boulenger, P., Cuvelier, G. et Launay, B. (2000). Gelatin/iota-carrageenan interactions in non-gelling conditions. *Food Hydrocolloids*, 14, 203-208.

Mills, O. E. (1976). Effect of temperature on tryptophan fluorescence of  $\beta$ -lactoglobulin B. *Biochim. Biophys. Acta*, 434, 324-332.

Molinari, H., Ragona, L., Varani, L., Musco, G., Consonni, R., Zetta, L. et Monaco, H. L. (1996). Partially folded structure of monomeric bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *FEBS Lett.*, 381, 237-243.

Monaco, H. L., Zanotti, G., Spadon, P., Bolognesi, M., Sawyer, L. et Eliopoulos, E. E. (1987). Crystal Structure of the Trigonal Form of Bovine Beta-lactoglobulin and of its Complex with Retinol at 2.5 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 197, 695-706.

Mothé, C. G. et Rao, M. A. (1999). Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic : effect of concentration and blending. *Food Hydrocoll.*, 13, 501-506.

Mulvihill, D. M. et Donovan, M. (1987). Whey Proteins and Their Thermal Denaturation – A Review. *Ir. J. Food Sci. Technol.*, 11, 43-75.

Mulvihill, D. M. et Kinsella, J. E. (1988). Gelation of  $\beta$ -Lg : Effect of Sodium Chloride and Calcium Chloride on the Rheological and Structural Properties of Gels. *J. Food Sci.*, 3, 231-236.

Mustafaev, M. I., Babakhin, A. A., Popov, A. N., Litvinov, I. S., Merkushev, A. V. et Gushchin, I. S. (1990). The effect of structural-chemical characteristics of water soluble polyelectrolyte complexes of ovalbumin on their immunological properties. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 24, 358-369.

- Nagasawa, K., Takahashi, K. et Hattori, M. (1996). Improved emulsifying properties of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugating with carboxymethyl dextran. *Food Hydrocoll.*, 10, 63-67.
- Nakajima, A. et Sato, H. (1972). Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated polyvinyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution. *Biopolymers*, 10, 1345-1355.
- Nath, S., Patrickios, C. S. et Hatton, T. A. (1995). Turbidimetric titration study of the interactions of proteins with acrylic polyampholytes. *Biotechnol. Prog.*, 11, 99-103.
- Netz, R. R. et Joanny, J-F. (1998). Complexation Behavior of Polyampholytes and Charged Objects. *Macromolecules*, 31, 5123-5141.
- Netz, R. R. et Joanny, J-F. (1999). Adsorption of Semiflexible Polyelectrolytes on Charged Planar Surfaces : Charge Compensation, Charge Reversal, and Multilayer Formation. *Macromolecules*, 32, 69013-9025.
- Newton, D. W., McMullen, J. N. et Becker, C. H. (1977). Characteristics of Medicated and Unmedicated Microglobules Recovered from Complex Coacervates of Gelatin-Acacia. *J. Pharm. Sci.*, 66, 1327-1330.
- Noguchi, H. (1956). Interactions of proteins with polymeric materials. *Biochim. Biophys. Acta*, 22, 459-462.
- Noguchi, H. (1959). Interactions of serum albumin and synthetic polyelectrolytes in various buffer systems. *J. Phys. Chem.*, 64, 185-187.
- Nozaki, Y., Bunville, L. G. et Tanford, C. (1959). Hydrogen ion titration curves of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 5523-5529.
- Oparin, A. I. (1957). *The Origin of Life on the Earth*, 3<sup>ème</sup> édition. Edinburgh : Oliver and Boyd.
- Ostwald, W. et Hertel, R. H. (1929). Kolloid-chemische Reaktionen zwischen Solen von Eiveikrpern und polymeren Kohlenhydraten. II. *Kolloid Z.*, 47, 357-370.
- Overbeek, J. T. J. et Voorn, M. J. (1957). Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 49, 7-26.
- vez, B., itak, B., ztemel D., Balbas, A., Peker, S. et akir, S. (1997). Variation of droplet sizes during the formation of microcapsules of microcapsules from emulsions. *J. Microencapsulation*, 14, 484-499.
- Palmer, A. H. (1934). The preparation of crystalline globulin from albumin fraction of cow's milk. *J. Biol. Chem.*, 104, 359-372.
- Pantaloni, D. (1965). Structure et changements de conformations de la  $\beta$ -lactoglobuline en solution. Thèse de Doctorat de l'Université de Paris, 192 p.



Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E. et Kraulis, P. J. (1986). The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324, 383-385.

Paquot, M., Godin, F. et Dumont de Chassart, Q. (1994). Effects of electrokinetic characteristics on the formation of a protein-microcrystalline cellulose complex. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 27, 11-15.

Park, J. M., Muhoberac, B. B., Dubin, P. L. et Xia, J. (1992). Effect of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules*, 25, 290-295.

Patterson, D. (1982). Polymer compatibility with and without a solvent. *Polym. Eng. Sci.*, 22, 2, 64-73.

Payens, T. A. J. (1972). Light scattering of protein reactivity of polysaccharides especially of carrageenans. *J. Dairy Sci.*, 55, 141-150.

Perez, M. D., Sanchez, L., Aranda, P., Ena, J. M., Oria, R. et Calvo, M. (1992). Effect of  $\beta$ -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. *Biochim. Biophys. Acta*, 1123, 151-155.

Pervaiz, S. et Brew, K. (1985). Homology of  $\beta$ -lactoglobulin, serum retinol-binding protein and protein HC. *Science*, 228, 335-337.

Pessen, H., Purcell, J. M. et Farrell, H. M. Jr. (1985). Proton relaxation rates of water in dilute solutions of  $\beta$ -lactoglobulin. Determination of the cross relaxation and correlation with the structural changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 828, 1-12.

Peters, H. J. W., van Bommel, E. M. G. et Fokkens, J. G. (1992). Effect of gelatin properties in complex coacervation processes. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 18, 123-134.

Petit, F., Audebert, R. et Iliopoulos, I. (1994). Interactions of hydrophobically modified poly(sodium acrylate) with globular proteins. *Colloid Polym. Sci.*, 273, 777-781.

Petrov, R. V., Khaitov, R. M., Zhdanov, V. M., Sinyakov, M. S., Norimov, A. Sh., Nekrasov, A. V., Podchernyaeva, R. Ya., Kharitononkov, I. G. et Shchipanova, M. V. (1985). Influenza virus antigens conjugated with a synthetic polyelectrolyte : a novel model of vaccines. *Vaccine*, 3, 392-400.

Phares, R. E. Jr. et Sperandio, G. J. (1964). Preparation of a Phase Diagram for Coacervation. *J. Pharm. Sci.*, 53, 518-521.

Phillips, G. O. (1998). Acacia gum (Gum Arabic) : a nutritional fibre; metabolism and calorific value. *Food Add. Contam.*, 15, 251-264.

Phillips, G. O. et Williams, P. A. (1995). Interaction of hydrocolloids in food systems. Dans A. G. Gaonkar (Ed.), *Ingredient Interactions, Effects on Food Quality*, pp. 131-169, New York : Marcel Dekker, Inc.

- Phillips, G. O., Takigami, S. et Williams, P. A. (1996). Hydration characteristics of the gum exudate from *Acacia senegal*. *Food Hydrocoll.*, 10, 11-19.
- Picton, L., Bataille, I., et Muller, G. (2000). Analysis of a complex polysaccharide (gum arabic) by multi-angle laser light scattering coupled with on-line to size exclusion chromatography and flow field fractionation. *Carbohydr. Polym.*, 42, 23-31.
- Piculell, L. et Lindman, B. (1992). Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant and surfactant/surfactant mixtures : similarities and differences. *Adv. Colloid Interf. Sci.*, 41, 149-178.
- Piculell, L., Bergfeldt, K. et Nilsson, S. (1995). Factor Determining Phase Behaviour of Multi-Component Polymer Systems. Dans S. E. Harding, S. E. Hill et J. R. Mitchell (Eds), *Biopolymer Mixtures*, pp. 13-36, Nottingham : Nottingham University Press.
- Pine, D. J., Weitz, D. A., Chaikin, P. M. et Herbolzheimer, E. (1988). Diffusing-Wave Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 60, 1134-1137.
- Pogodina, N. V. et Tsvetkov, N. V. (1997). Structure and Dynamics of the Polyelectrolyte Complex Formation. *Macromolecules*, 30, 4897-4904.
- Porod, G. (1982). General Theory. Dans O. Glatter et O Kratky (Eds), *Small Angle X-ray Scattering*. pp. 17-51, Londres : Academic Press.
- Préaux, G., Braunitzer, G., Shrank, B. et Stangl, A. (1979). The amino acid sequence of goat  $\beta$ -lactoglobulin. *Hoop-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 360, 1595-1604.
- Prigogine, I. (1978). Time, Structure, and Fluctuations. *Science*, 201, 777-785.
- Prouchayret, F., Fasan, G., Grandgeorge, M., Vigneron C., Menu, P. et Dellacherie, E. (1992). A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobine. I. preparation, purification and characterization. *Biomat., Art. Cells Immob. Biotech.*, 20, 319-322.
- Ptitsyn, O. B. (1995). Molten globule and protein folding. *Adv. Prot. Chem.*, 47, 83-229.
- Qi, X. L., Holt, C., McNulty, D., Clarke, D. T. et Jones, G. (1995). Limited interpretation of changes in the FTIR spectrum of  $\beta$ -lactoglobulin with temperature. *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 612S.
- Qi, X. L., Holt, C., McNulty, D., Clarke, D. T., Brownlow, S. et Jones, G. R. (1997). Effect of temperature on the secondary structure of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy : a test of the molten globule hypothesis. *Biochem. J.*, 324, 341-346.
- Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, E. N. et Jameson, G. B. (1999). Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Prot. Sci.*, 8, 75-83.

Qin, B. Y., Creamer, L. K., Baker, E. N. et Jameson, G. B. (1998). 12-Bromododecanoic acid binds inside the calyx of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *FEBS Lett.*, 438, 272-278.

Ragona, L., Fogolari, F., Romagnoli, S., Zetta, L., Maubois, J. L. et Molinari, H. (1999). Unfolding and Refolding of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin Monitored by Hydrogen Exchange Measurements. *J. Mol. Biol.*, 293, 953-969.

Randall, R. C., Phillips, G. O. et Williams, P. A. (1989). Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocoll.*, 3, 65-75.

Ray, A. K., Bird, P. B., Iacobucci, G. A. et Clark, B. C. Jr. (1995). Functionality of gum arabic. Fractionation, characterization and evaluation of gum fractions in citrus oil emulsions and model beverages. *Food Hydrocoll.*, 9, 123-131.

Reisman, A. (1970). Phase equilibria, basic principles, applications, experimental techniques. New York : Academic Press.

Remuñán-López, C. et Bodmeier, R. (1996). Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. *Int. J. Pharm.*, 135, 63-72.

Renard, D. (1994). Etude de l'agrégation et de la gélification des protéines globulaires : application à la beta-lactoglobuline. Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes, 233 p.

Renard, D., Boué, F. et Levebvre, J. (1997). Protein-polysaccharide mixtures : structure and effect of shear studied by small-angle neutron scattering. Dans E. Dickinson et B. Bergenstahl (Eds), *Food colloids, proteins, lipids and polysaccharides*, pp. 303-315, Londres : Royal Society of Chemistry.

Renard, D., Lefebvre, J., Griffin, M. C. A. et Griffin, W. G. (1998). Effects of pH and salt environment on the association of  $\beta$ -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *Int. J. Biol. Macromol.*, 22, 41-49.

Renard, D., Lefebvre, J., Robert, P., Llamas, G. et Dufour, E. (1999). Structural investigation of  $\beta$ -lactoglobulin gelation in ethanol/water solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 26, 35-44.

Roberts, F. D. et Steinke, J. J. (1978). Dentifrice containing visible agglomerated particles of polishing agents. United States Patent Application Re. 29,634. Colgate Palmolive Company.

Robinson, D. J. et Earnshaw, J. C. (1993). Long Range Order in two Dimensional Fractal Aggregation. *Phys. Rev. Lett.*, 71, 715-718.

Roefs, S. P. F. M. et de Kruif, C. G. (1996). A model for the denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin. *Eur. J. Biochem.*, 226, 883-889.

Rouw, P. W., Woutersen, A. T. J. M., Ackerson, B. J. et de Kruif, C. G. (1989). Adhesive hard sphere dispersions. V. Observation of spinodal decomposition in a colloidal dispersion. *Physica A*, 156, 876-898.

Samant, S. K., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R. et Rege, D. V. (1993). Protein-polysaccharide interactions : a new approach in food formulation. Review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 28, 547-562.

Sanchez, C. et Paquin, P. (1997). Protein and protein-polysaccharide microparticles. Dans S. Damodaran et A. Paraf (Eds), *Food Proteins and Their Applications*, pp. 503-528. New York : Marcel Dekker, Inc.

Sanchez, C., Pouliot, M., Gauthier, S. F. et Paquin, P. (1997). Thermal Aggregation of Whey Protein Isolate Containing Microparticulated or Hydrolyzed Whey Proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2384-2392.

Sanchez, C., Despond, S., Schmitt, C. et Hardy, J. (2001). Effect of heat and shear on  $\beta$ -lactoglobulin-acacia gum complex coacervation. Dans E. Dickinson et R. Miller (Eds), *Food Colloids : Fundamentals of Formulation*, Chambridge : Royal Society of Chemistry, 332-341.

Sanchez, C., Pouliot, M., Renard, D. et Paquin, P. (1999). Uniaxial Compression of Thermal Gels Based on Microfluidized Blends of WPI and Heat-Denatured WPI. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1162-1167.

Sato, T., Mattison, K. W., Dubin, P. L., Kamachi, M. et Morishima, Y. (1998). Effect of protein aggregation on the binding of the lysozyme to pyrene-labeled polyanions. *Langmuir*, 14, 5430-5437.

Sawyer, L. et Richardson, J. (1991). Using appropriate nomenclature. *Lett. TIBS*, 16, 11.

Sawyer, L., Kontopidis, G. et Wu, S-Y. (1999).  $\beta$ -Lactoglobulin – a three dimensional perspective. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 34, 409-418.

Sawyer, L., Papiz, M. Z., North, A. C. T. et Eliopoulos, E. E. (1985). Structure and function of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochem. Soc. Trans.*, 13, 265-266.

Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S. et Hardy J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 8, 689-753.

Schorsch, C., Jones, M. G. et Norton, I. T. (1999). Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocoll.*, 13, 89-99.

Scott, R. L. (1949). The thermodynamics of high polymer solutions. V. Phase equilibria in the ternary system : polymer1-polymer2-solvent. *J. Chem. Phys.*, 17, 279-284.

Scott, R. L. et Hildebrand, J. L. (1951). *The solubility of non-electrolyte*, New York : Reinhold.

Sedlák, E. et Antalík, M. (1998). Coulombic and Noncoulombic Effect of Polyanions on Cytochrome c Structure. *Biopolymers*, 46, 145-154.

Sélo, I., Clément, G., Bernard, H., Chatel, J-M., Créminon, C., Peltre G. et Wal, J-M. (1999). Allergy to bovine  $\beta$ -lactoglobulin : specificity of human IgE to tryptic peptides. Clin. Experiment. Allergy, 29, 1055-1063.

Semenova, M. G. (1996). Factor determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modelling food systems. Dans N. Parris, A. Kato, L. K. Creamer et J. Pearce (Eds), Macromolecular Interactions in Food Colloids in Food Technology, pp. 37-49, Washington DC : ACS Symposium Series 650.

Serov, A. V., Antonov, Y. A. et Tolstoguzov, V. B. (1985). Isolation of lactic whey proteins in form of complexes with apple pectin. Nahrung, 29, 19-30.

Servant-Duvallet, S. (1994). Variabilité des propriétés physico-chimiques d'exsudats d'*Acacia senegal* (gomme arabique) d'une exploitation expérimentale au Ferlo (Sénégal). Modification des chaînes. Thèse de Doctorat de l'Université de Rouen, 188 p.

Sharma, M., Haque, Z. U. et Wilson, W. W. (1996). Association tendency of  $\beta$ -lactoglobulin AB purified by gel permeation chromatography as determined by dynamic light scattering under quiescent conditions. Food Hydrocoll., 10, 323-328.

Shieh, J-Y. et Glatz, C. E. (1994). Precipitation of proteins with polyelectrolytes : role of the polymer molecular weight. Dans P. L. Dubin, J. Bock, R. Davis, D. N. Schultz et C. Thies (Eds), Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology, pp. 273-284, Berlin : Springer Verlag.

Shimada, K. et Cheftel, J-C. (1989). Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. J. Agric. Food Chem., 37, 161-168.

Siggia, E. D. (1979). Late stages of spinodal decomposition in binary mixtures. Phys. Rev. A, 20, 595-605.

Singh, O. N. et Burgess, D. J. (1989). Characterization of albumin-alginate complex coacervation. J. Pharm. Pharmacol., 41, 670-673.

Singh, O. N. et Burgess, D. J. (1996). Development of a novel method of microencapsulation for a model protein,  $\beta$ -glucuronidase. Pharm. Sci., 2, 223-228.

Snoeren, T. H. M., Payens, T. A. J., Jeunink, J. et Both, P. (1975). Electrostatic interactions between  $\kappa$ -carrageenan and  $\kappa$ -casein. Milchwissenschaft, 30, 393-396.

Snowden, M. J., Phillips, G. O. et Williams, P. A. (1987). Functional characteristics of gum arabic. Food Hydrocoll., 1, 291-300.

Soucie, W. G. et Chen, W-S. (1986). Edible xanthan gum-protein fibrous complexes. U. S. Patent Application 4,563,360, Kraft, Inc.

Spiegel, T. (1999). Whey protein aggregation under shear conditions-effects of lactose and heating temperature on aggregate size and structure. Int. J. Food Sci. Technol., 34, 523-531.

- Stading, M. et Hermansson, A.-M. (1990). Viscoelastic behaviour of  $\beta$ -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocoll.*, 4, 121-135.
- Stainsby, G. (1980). Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. *Food Chem.*, 6, 3-14.
- Stapelfeld, H. et Skibsted, L. H. (1999). Pressure denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin studied by intrinsic fluorescence depolarization, Rayleigh scattering, radiationless energy transfer and hydrophobic fluoroprobing. *J. Dairy Res.*, 66, 545-558.
- Stefancich, S. et Delben, F. (1997). Interaction of food proteins with polysaccharides. II. Properties upon freeze-drying of mixed solutions and thermal treatment of the lyophilizate. *J. Food Eng.*, 31, 347-363.
- Stephen, A. M. et Churms, S. C. (1995). Dans A. M. Stephen (Ed.), *Food Polysaccharides and their Applications*, New York : Marcel Dekker Inc.
- Štěpánek (1993). Data analysis in dynamic light scattering. Dans W. Brown (Ed.), *Dynamic light scattering. The methods and some applications*, pp. 177-241, Londres : Clarendon Press.
- Strasburg, G. M. et Ludescher, R. D. (1995). Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 69-75.
- Street, C. A. et Anderson, D. M. W. (1983). Refinement of the structures previously proposed for gum arabic and other *Acacia* gum exudates. *Talanta*, 30, 887-893.
- Strege, M. A., Dubin, P. L., West, J. S. et Flinta, C. D. (1990). Protein separation via polyelectrolyte complexation. Dans M. Ladisch, R. C. Wilson, C. C. Painton et S. E. Builder (Eds), *Protein Purification: from Molecular Mechanisms to Large Scale Processes*, Washington DC : ACS Symposium Series 427.
- Strelzowa, S. A. et Tolstoguzov, V. B. (1977). Eigenschaften von Eiweißstoffen in Komplexen mit sauren Polysacchariden und anderen Polyelectrolyten. *Colloid Polymer Sci.*, 255, 1054-1066.
- Sun, S. F. (1994). *Physical Chemistry of Macromolecules. Basic Principles and Issues*. New-York : Wiley Interscience.
- Surewicz, W. K. et Mantsch, H. H. (1988). New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, 952, 115-130.
- Swaisgood, H. E. (1982). Chemistry of milk proteins. Dans P. F. Fox (Ed), *Developments in dairy chemistry – I. Proteins*, pp. 1-59, Londres : Applied Science Publishers.
- Swedberg, T. (1938). The ultracentrifuge and its field of research. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 10, 113-129.

- Swenson, H. A., Kaustinen, H. M., Kaustinen, O. A. et Thompson, N. S. (1968). Structure of Gum Arabic and Its Configuration in Solution. *J. Polym. Sci. Part A2*, 6, 1593-1606.
- Tainaka, K-I. (1979). Study of complex coacervation in low concentration by virial expansion method. I. Salt Free Systems. *J. Phys. Soc. Jpn*, 46, 1899-1906.
- Tainaka, K-I. (1980). Effect of counterions on complex coacervation. *Biopolymers*, 19, 1289-1298.
- Takeshita, H., Kanaya, T., Nishida, K. et Kaji, K. (1999). Gelation Process and Phase Separation of PVA Solutions As Studied by a Light Scattering Technique. *Macromolecules*, 32, 7815-7819.
- Tanford, C., Bunville, L. G. et Nozaki, Y. (1959). The reversible trans-conformation of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 4.75. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4032-4036.
- Tang, S., Preece, J. M., McFarlane, C. M. et Zhang, Z. (2000). Fractal Morphology and Breakage of DLCA and RLCA Aggregates. *J. Coll. Interf. Sci.*, 221, 114-123.
- Taravel, M. N. et Domard, A. (1994). Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interaction with chitosan. I. *Biomaterials*, 14, 930-938.
- ten Grotenhuis, E., Paques, M. et van Aken, G. A. (2000). The application of diffusing-wave spectroscopy to monitor the phase behaviour of emulsion-polysaccharide systems. *J. Coll. Interf. Sci.*, 227, 495-504.
- Thalberg, K., Lindman, B. et Karlström, G. (1991). Phase Behavior of a System of Cationic Surfactant and Anionic Polyelectrolyte : The Effect of Salt. *J. Phys. Chem.*, 95, 6004-6011.
- Tiebackx, F. W. (1911). Gleichzeitige Ausflockung zweier Kolloide. *Z. Chem. Ind. Kolloide*, 8, 198-201.
- Thomasin, C., Merkle, H. P. et Gander, B. (1997). Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation. *Int. J. Pharm.*, 147, 173-186.
- Thomasin, C., Nan-Trân, H., Merkle, H. P. et Gander, B. (1998). Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of Thermodynamics. I. Overview and theoretical considerations. *J. Pharm. Sci.*, 87, 259-268.
- Timasheff, S. N. et Townend, R. (1961). Molecular interactions in  $\beta$ -lactoglobulin. VI. The Dissociation of the genetic species of  $\beta$ -lactoglobulin at acid pH's. *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 470-473.
- Timasheff, S. N. et Townend, R. (1964). Structure of the  $\beta$ -Lactoglobulin tetramer. *Nature*, 203, 517-519.

Timasheff, S. N., Mescanti, L., Basch, J. J. et Townend, R (1966b). Conformational transitions of bovine  $\beta$ -lactoglobulins A, B and C. *J. Biol. Chem.*, 241, 2496-2501.

Timasheff, S. N., Townend, R. et Mescanti, L. (1966a). The Optical Rotatory Dispersion of the  $\beta$ -Lactoglobulins. *J. Biol. Chem.*, 241, 1863-1870.

Tirkkonen, S. Turakka, L. et Paronen, P. (1994). Microencapsulation of indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in presence of surfactants. *J. Microencapsulation*, 11, 615-626.

Tolstoguzov, V. B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. Dans J. R. Mitchell et D. A. Ledward (Eds), *Functional properties of macromolecules*, pp. 385-415, Londres : Elsevier Applied Science.

Tolstoguzov, V. B. (1993). Functional properties of food proteins. Role of interactions in protein systems. Dans K. D. Schwenke et R. Mothes (Eds), *Food Proteins, Structure and Functionality*, pp. 203-209, Weinheim : VCH.

Tolstoguzov, V. B. (1995). Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. *Multicomponent gels. Food Hydrocoll.*, 9, 317-332.

Tolstoguzov, V. B. (1997). Protein-polysaccharide interactions. Dans S. Damodaran et A. Paraf (Eds), *Food Proteins and Their Applications*, pp. 171-198, New York : Marcel Dekker, Inc.

Tolstoguzov, V. B. (1999). Origin of globular structure in proteins. *FEBS Lett.*, 444, 145-148.

Tolstoguzov, V. B. (1999). Physico-chemical modification of food proteins : food emulsions. *Nahrung*, 42, 205-209.

Tompa, H. (1956). *Polymer Solutions*, Londres : Butterworth Scientific Publications.

Torza, S. et Mason, S. G. (1970). Three-phase interaction in shear and electrical fields. *J. Coll. Interf. Sci.*, 33, 67-83.

Townend, R. et Timasheff, S. N. (1960). Molecular Interactions in  $\beta$ -Lactoglobulin. III. Light Scattering Investigation of the Stoichiometry of the Association between pH 3.7 and 5.2. *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 3168-3174.

Townend, R., Kumosinski, T. F. et Timasheff, S. N. (1967). The Circular Dichroism of Variants of  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Biol. Chem.*, 242, 4538-4545.

Townend, R., Winterbottom, R. J. et Timasheff, S. N. (1960). Molecular Interactions in  $\beta$ -Lactoglobulin. II. Ultracentrifugal and Electrophoretic Studies of the Association of  $\beta$ -Lactoglobulin below its Isoelectric Point. *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 3161-3168.

Treece, J. M., Sheinson, R. S. et McMeekin, T. L. (1964). The Solubilities of  $\beta$ -Lactoglobulins A, B, and AB. *Arch. Biochem. Biophys.*, 108, 99-108.



Tribet, C., Porcar, I., Bonnefont, P. A. et Audebert, R. (1998). Association between Hydrophobically Modified Polyanions and Negatively Charged Bovine Serum Albumin. *J. Phys. Chem. B*, 102, 1327-1333.

Trindade, M. A. et Grosso, C. R. F. (2000). The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. *J. Microencapsulation*, 17, 169-176.

Tromp, R. H. et Jones, R. A. L. (1996). Off-Critical Phase Separation and Gelation in Solutions of Gelatin and Dextran. *Macromolecules*, 29, 8109-8116.

Tromp, R. H., Rennie, A. R. et Jones, R. A. L. (1995). Kinetics of the Simultaneous Phase Separation and Gelation in Solutions of Dextran and Gelatin. *Macromolecules*, 28, 4129-4138.

Tsianou, M., Kjøniksen, A-L., Thuresson, K. et Nyström, B. (1999). Light Scattering and Viscoelasticity in Aqueous Mixtures of Oppositely Charged and Hydrophobically Modified Polyelectrolytes. *Macromolecules*, 32, 2974-2982.

Tsuchida, E. (1994). Formation of Polyelectrolyte Complexes and Their Structures. *J. M. S. – Pure Appl. Chem.*, A31, 1-15.

Tsuda, K., Dol, G. C., Gensch, T., Hofkens, J., Latterini, L., Weener, J. W., Meijer, E. W. et De Schryver, F. C. (2000). Fluorescence from Azobenzene Functionalized Poly(propylene imine) Dendrimers in Self-Assembled Supramolecular Structures. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 3445-3452.

Tsunashima, Y. et Takahashi, H. (1999). Shear induced fluctuations and fluctuation-length transition in the quasiflexible polymer in a solution of a hydrogen-bond enhancing solvent. *J. Chem. Phys.*, 111, 3294-3301.

Tuinier, R., Dhont, J. K. G. et de Kruif, C. G. (2000). Depletion-Induced Phase Separation of Aggregated Whey Protein Colloids by an Exocellular Polysaccharide. *Langmuir*, 16, 1497-1507.

Turula, V. E., Bishop, R. T., Ricker, R. D. et de Haseth J. A. (1997). Complete structure elucidation of a globular protein by particle beam liquid chromatography-Fourier transform infrared spectrometry and electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. Sequence and conformation of  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Chromatogr. A.*, 763, 91-103.

Umbach, P., Georgalis, Y. et Saenger, W. (1998). Time-Resolved Small-Angle Static Light Scattering on Lysozyme during Nucleation and Growth. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 2382-2390.

Ustunol, Z., Xiong, Y. L., Means, W. J. et Decker, E. A. (1992). Forces Involved in Mixed Pork Myofibrillar Protein and Calcium Alginate Gels. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 577-580.

Uversky, V. N., Narizhneva, N. V., Kirschstein, S. O., Winter, S. et Löber, G. (1997). Conformational transitions provoked by organic solvents on  $\beta$ -lactoglobulin : can a molten

globule like intermediate be induced by the decrease in dielectric constant? *Fold. Design.* 2, 163-172.

van Bruggen, M. P. B., Dhont, J. K. G. et Lekkerkerker, H. N. W. (1999). Morphology and Kinetics of the Isotropic-Nematic Phase Transition in Dispersions of Hard Rods. *Macromolecules*, 32, 2256-2264.

van Dijk, J. A. P. P. et Smit, J. A. M. (2000). Size-exclusion chromatography-multiangle laser scattering analysis of  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin in aqueous solution with added salt. *J. Chromatogr. A*, 867, 105-112.

Vandeveldel, M-C. et Fenyo, J-C. (1989). Estimation of the charge density of arabic acid by potentiometry and dye binding. *Polym. Bull.*, 18, 47-51.

Varunsatian, S., Watanabe, K., Hayakawa, S. et Nakamura, R. (1983). Effects of  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  and  $\text{Na}^+$  on Heat Aggregation of Whey Protein Concentrates. *J. Food Sci.*, 48, 42-46, 70.

Vasbinder, A. J., van Mil, P. J. J. M., Bot, A. et de Kruif, K. G. (2000). Acid-induced gel formation in heat-treated milk studied by diffusing-wave spectroscopy. *Food Colloids 2000 – Fundamentals in Formulation*, 2-5 April 2000, Postdam : Germany.

Vaziri, A. (1976). Coacervation of acacia for emulsification purposes. *Planta Medica*, 29, 20-25.

Weis, A. (1963). Phase Separation in Polyelectrolyte Systems. III. Effect of Aggregation and Molecular Weight Heterogeneity. *J. Chem. Phys.*, 67, 1960-1965.

Weis, A. et Aranyi, C. (1960). Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. *J. Phys. Chem.*, 64, 1203-1210.

Weis, A., Bodor, E. et Mussell, S. (1967). Molecular Weight Fractionation and the Self-Suppression of Complex Coacervation. *Biopolymers*, 5, 37-59.

Verheul, M. (1999). Aggregation and gelation of whey proteins. Thèse de Doctorat, Université de Twente, Pays-Bas, 153 p.

Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M. et de Kruif, K. G. (1999). Association behaviour of native  $\beta$ -lactoglobulin. *Biopolymers*, 49, 11-20.

Verheul, M., Roefs, S. P. F. M. and de Kruif, K. G. (1998a). Aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin and influence of  $\text{D}_2\text{O}$ . *FEBS Letters*, 421, 273-276.

Verheul, M., Roefs, S. P. F. M. et de Kruif, K. G. (1998b). Kinetics of Heat-Induced Aggregation of  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 896-903.

Vétier, N., Desobry-Banon, S., Ould-eleya, M. et Hardy, J. (1997). Fractal dimension of the casein aggregates obtained during milk acidification at 20, 30 and 42°C. *J. Dairy Sci.*, 80, 3161-3166.

- Visser, S., Slangen, C. J. et Rollema, H. S. (1991). Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, 548, 361-370.
- Voorn, M. J. (1956). Complex coacervation. I. General theoretical considerations. II. Thermodynamic calculations of a specific model, with application to two-component systems. III. Thermodynamic calculations on three-component systems. IV. Thermodynamic calculations on four-component systems. V. Experiment on the distribution of salts. Comparison of theory and experiment. *Recl. Trav. Chim.*, 75, 317-330, 405-426, 427-446, 925-937, 1021-1030.
- Wainerman, E. S., Gurov, A. N., Tolstoguzov, V. B., Ebder, B., Prahl, L. et Schwenke, K. D. (1975). Wechselwirkung zwischen Proteinen und Sauren Polysacchariden. *Nahrung*, 19, 929-933.
- Wang, L. et Miller, W. G. (1992). Short-time mobility of spherical particles in concentrated aqueous dispersions determined by diffusing wave spectroscopy. *Theor. Chim. Acta*, 82, 419-423.
- Wang, Q., Allen, J. C. et Swaisgood, H. E. (1997). Binding of Vitamin D and Cholesterol to  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*, 80, 1054-1059.
- Wang, Q., Allen, J. C. et Swaisgood, H. E. (1998). Protein Concentration Dependence of Palmitate Binding to  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*, 81, 76-81.
- Wang, Q., Allen, J. C. et Swaisgood, H. E. (1999). Binding of Lipophilic Nutrients of  $\beta$ -Lactoglobulin Prepared by Bioselective Adsorption. *J. Dairy Sci.*, 82, 257-264.
- Wang, Y., Kimura, K., Dubin, P. L. et Jaeger, W. (2000). Polyelectrolyte-Micelle Coacervation : Effects of Micelle Surface Charge Density, Polymer Molecular Weight, and Polymer/Surfactant Ratio. *Macromolecules*, 33, 3324-3331.
- Wang, Y., Kimura, K., Huang, Q., Dubin, P. L. et Jaeger W. (1999). Effect of Salt on Polyelectrolyte-Micelle Coacervation. *Macromolecules*, 32, 7128-7134.
- Wang, Y-f., Gao, J. Y. et Dubin, P. L. (1996). Protein separation via polyelectrolyte coacervation : selectivity and efficiency. *Biotechnol. Prog.*, 12, 356-362.
- Wapnir, R. A., Teichberg, S., Go, J. T., Wingertzahn, M. A. et Harper, R. G. (1996). Oral Rehydration Solution : Enhanced Sodium Absorption with Gum Arabic. *J. Am. Coll. Nutr.*, 15, 377-382.
- Wapnir, R. A., Wingertzahn, M. A., Moyse, J. et Teichberg, S. (1997). Gum Arabic Promotes Rat Jejunal Sodium and Water Absorption From Oral Rehydration Solutions in Two Models of Diarrhea. *Gastroenterology*, 112, 1979-1985.
- Warner, D. W. et Araujo, O. E. (1971). Kinetics of Rheological Properties of Acacia Solutions. *J. Pharm. Sci.*, 60, 6, 863-866.

Watase, M. et Nishinari, K. (1983). Rheological properties of mixtures of protein-polysaccharide – dynamic viscoelasticity of blend gels of acetylated gelatin, kappa-carrageenan, and agarose. *Biorheology*, 20, 495-505.

Weiss, J., Wright, G., Bekkers, A. C. A. P. A., van den Bergh, C. J. et Verheij, H. M. (1991). Conversion of Pig Pancreas Phospholipase A<sub>2</sub> by Protein Engineering into Enzyme Active against *Escherichia coli* Treated with the Bactericidal/Permeability-Increasing Protein. *J. Biol. Chem.*, 266, 4162-4167.

Weitz, D. A. et Pine, D. J. (1993). Diffusing-wave spectroscopy. Dans, W. Brown (Ed.), *Dynamic Light Scattering. The method and some applications*, pp. 652-720, Oxford : Clarendon Press.

Weitz, D. A., Zhu, J. X., Durian, D. J., Gang, H. et Pine, D. J. (1993). Diffusing-Wave Spectroscopy : The Technique and Some Applications. *Phys. Scripta*, T49. 610-621.

Wen, S., Xiaonan, Y. et Steventon, W. T. K. (1991a). Microcapsules through polymer complexation. I : Complex coacervation of polymers containing a high charge density. *Biomaterials*, 12, 374-384.

Wen, S., Xiaonan, Y., Steventon, W. T. K. et Alexander, H. (1991b). Microcapsules through polymer complexation. II : By complex coacervation of polymers containing a low charge density. *Biomaterials*, 12, 479-488.

Wen, Y-p. et Dubin, P. L. (1997). Potentiometric Studies of the Interaction of Bovine Serum Albumin and Poly(dimethyldiallylammonium chloride). *Macromolecules*, 30, 7856-7861.

Whistler, R. L. (1993). Exudate Gums, Gum Arabic. Dans R. L. Whistler et J. N. BeMiller (Eds), *Industrials Gums. Polysaccharides and Their Derivatives*, 3<sup>ème</sup> édition, pp. 309-339, San Diego : Academic Press.

Williams, P. A., Phillips, G. O. et Stephen, A. M. (1990). Spectroscopic and molecular comparisons of three fractions from *Acacia senegal*. *Food Hydrocoll.*, 4, 305-311.

Witz, J., Timasheff, S. N. et Luzzati, V. (1964). Molecular Interactions in  $\beta$ -Lactoglobulin. VIII. Small-Angle X-Ray Scattering Investigation of the Geometry of  $\beta$ -Lactoglobulin A Tetramerization. *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 168-173.

Wilson, R. H. (1995). Recent Developments in Infrared Spectroscopy and Microscopy. Dans E. Dickinson (Ed.), *New Physico-Chemical Techniques for the Characterization of Complex Food Systems*, pp. 177-195, Londres : Blackie Academic and Professional.

Wong, D. W. S., Camirand, W. M. et Pavlath, A. E. (1996). Structures and Functionalities of Milk Proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36, 807-844.

Xia, J. et Dubin, P. L. (1994). Protein-polyelectrolyte complexes. Dans P. L. Dubin, J. Bock, R. Davis, D. N. Schulz et C. Thies (Eds), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, pp. 247-271, Berlin : Springer Verlag.

Xia, J., Dubin, P. L. et Kokufuta, E. (1993). Dynamic and Electrophoretic Light Scattering of a Water-Soluble Complex Formed between Pepsin and Poly(ethylene glycol). *Macromolecules*, 26, 6688-6690.

Xia, J., Dubin, P. L., Kokufuta, E., Havel, H. et Muhoberac, B. B. (1999). Light Scattering, CD, and Ligand Binding Studies of Ferrihemoglobin-Polyelectrolyte Complexes. *Biopolymers*, 50, 153-161.

Xia, J., Mattison, K., Romano, V., Dubin, P. L. et Muhoberac, B. B. (1997). Complexation of Trypsin and Alcohol Dehydrogenase with Poly(diallyldimethylammonium Chloride). *Biopolymers*, 41, 359-365.

Xiong, Y. L., Dawson, K. A. et Wan, L. (1993). Thermal aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin : Effect of pH, ionic environment and thiol reagent. *J. Dairy Sci.*, 76, 70-77.

Yan, X., Khor, E. et Lim, L-Y. (2000). PEC Films Prepared from Chitosan-Alginate Coacervates. *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 941-946.

Yang, C-C., Chen, C-C. et Chang H-M. (1998). Separation of Egg White Lysozyme by Anionic Polysaccharides. *J. Food Sci.*, 63, 962-965.

Yuan, T., Weljie, A. M. et Vogel, H. J. (1998). Tryptophan Fluorescence Quenching by Methionine and Selenomethionine Residues of Calmodulin : Orientation of Peptide and Protein Binding. *Biochemistry*, 37, 3187-3195.

Zaitsev, V. S., Izumrudov, V. A. et Zezin, A. B. (1992). A New Family of Water-Soluble Protein-Polyelectrolyte Complexes. *Polym. Sci. USSR*, 34, 54-55.

Zeman, L. et Patterson, D. (1972). Effect of the solvent on polymer incompatibility in solution. *Macromolecules*, 5, 513-516.

Zimm, B. H. (1946). The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. *J. Chem. Phys.*, 16, 1093-1099.

Zuñiga de Lopez, R. (1999). Etude structurale et texturale de laits acidifiés par hydrolyse de Glucono-Delta-Lactone et contenant des polysaccharides. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 179 p.



AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

000

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR  
Monsieur Cees G. de Kruijff, Professeur, NIZO food research, BA, The Netherlands  
Monsieur Ilias Iliopoulos, Directeur de Recherche CNRS, ESCPI - CNRS - UMR 7615, PARIS

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur SCHMITT Christophe

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE  
une thèse intitulée :

« Etude de la coacervation complexe entre la  $\beta$ -Lactoglobuline et la gomme d'acacia en  
solution aqueuse »

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « BIOTECHNOLOGIES ET INDUSTRIES ALIMENTAIRES »

Fait à Vandoeuvre, le 17 octobre 2000

Le Président de l'I.N.P.L.

J. HARDY



NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 5 4 5 0 1  
VANDOEUVRE CEDEX

Service Commun de la Documentation  
INPL  
Nancy-Brabois

TEL 33/03.83.59.59.59  
FAX 33/03.83.59.59.55





## Résumé

L'influence de la concentration totale en biopolymères et de la polydispersité de la protéine sur la formation et la stabilité de coacervats a été étudiée dans un mélange  $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia/eau. Les mélanges de  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -lg) native ou agrégée (56% d'agrégats insolubles à pH 4,75) et de gomme d'acacia à des pH compris entre 3,6 et 5,0 sont caractérisés par une séparation de phase par coacervation complexe. Une concentration totale élevée en biopolymères limite l'influence du pH et du ratio de mélange protéine : polysaccharide sur la formation des coacervats dans les deux systèmes. En revanche, une forte polydispersité de la  $\beta$ -lg permet d'étendre l'aire de la zone biphasique des diagrammes de phases ternaires obtenus à pH 4,2. Des coacervats et des précipités sont obtenus en présence d'agrégats de  $\beta$ -lg. Seuls des coacervats sont visibles avec la  $\beta$ -lg native. Leur taille est contrôlée par les agrégats protéiques qui interagissent spécifiquement avec une fraction de la gomme d'acacia. La structure des coacervats est caractérisée par une vacuolisation issue d'une coalescence partielle des plus petits coacervats. Après interaction avec la gomme d'acacia, des mesures de dichroïsme circulaire indiquent une modification de la structure en hélice  $\alpha$  de la  $\beta$ -lg, caractérisée par une densité de charge positive. La stabilité et la structuration des coacervats formés résultent d'un équilibre entre des phénomènes de floculation, coalescence et sédimentation des coacervats comme indiqué par des mesure de diffusion de la lumière en milieu turbide et microscopie confocale à balayage laser. Enfin, l'étude de la cinétique de structuration des mélanges  $\beta$ -lg/gomme d'acacia/eau par diffusion de la lumière aux petits angles, révèle des phénomènes de diffusionnels et hydrodynamiques responsables de la croissance des domaines structuraux. Dans certains cas, la cinétique de coacervation complexe peut être décrite par le modèle théorique de décomposition spinodale.

## Abstract

Effects of total biopolymer concentration and protein polydispersity on the formation and stability of coacervates have been investigated in  $\beta$ -lactoglobulin/acacia gum/water mixtures. Blends consisting in native  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) or aggregated one (56% insoluble aggregates at pH 4.75) and acacia gum exhibited phase separation through complex coacervation between pH 3.6 and 5.0. The increase of the total biopolymer concentration reduced the effect of pH and protein to polysaccharide mixing ratio on the formation of coacervates in both mixtures. By contrast, a high polydispersity of the  $\beta$ -lg increased the area of the two-phase region on ternary phase diagrams obtained at pH 4.2. Coacervates and precipitates were formed in presence of protein aggregates, whereas only coacervates were obtained with native  $\beta$ -lg. The size of the coacervates was controlled by the aggregates because of their specific interaction with a fraction of the acacia gum present in the mixture. The structure of the coacervates is characterised by the presence of vacuoles due to the partial coalescence of small coacervates. After interaction with the acacia gum, circular dichroism measurements have shown a shift in the a helical structure of the  $\beta$ -lg. This region is characterised by a high positive charge density. Stability and structuration of coacervates resulted from an equilibrium between flocculation, coalescence and sedimentation phenomena as described by diffusing-wave spectroscopy and confocal laser scanning microscopy. The study of  $\beta$ -lg/acacia gum/water mixtures self-organisation using time-resolved small-angle static light scattering highlighted diffusion and hydrodynamic phenomena resulting in the growth of the structural domains. In some cases, it was possible to describe the complex coacervation kinetics by the spinodal decomposition theory.