



**HAL**  
open science

# Interactions et structures dans les solutions hautement concentrées de protéines globulaires – Etude du lysozyme et de l’ovalbumine

Coralie Pasquier

► **To cite this version:**

Coralie Pasquier. Interactions et structures dans les solutions hautement concentrées de protéines globulaires – Etude du lysozyme et de l’ovalbumine. Alimentation et Nutrition. Université de Rennes 1, 2014. Français. NNT: . tel-02796674

**HAL Id: tel-02796674**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02796674v1>**

Submitted on 5 Jun 2020

**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.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*Mention : Physique*

**Ecole doctorale : Sciences de la Matière**

présentée par

**Coralie Pasquier**

Préparée à l'unité de recherche UMR 6251 IPR  
Institut de Physique de Rennes  
CNRS-Université de Rennes 1

---

**Interactions et  
structures dans les  
solutions hautement  
concentrées de  
protéines globulaires  
– Etude du lysozyme  
et de l'ovalbumine**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 16 décembre 2014**

devant le jury composé de :

**André MATAGNE**

Professeur, Université de Liège, Liège / *Rapporteur*

**Paul MENUT**

Maître de Conférences, Montpellier SupAgro,  
Montpellier / *Rapporteur*

**Patrice BACCHIN**

Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse /  
*Examineur*

**Alain RIAUBLANC**

Chargé de Recherche, INRA, Nantes / *Examineur*

**Sylvie BEAUFILS**

Professeur, Université de Rennes 1, Rennes /  
*Directrice de thèse*

**Stéphane PEZENEC**

Chargé de Recherche, INRA, Rennes / *Co-directeur  
de thèse*



*A tou(te)s ceux et celles qui m'ont fait découvrir la recherche, qui ont partagé mon émerveillement et mon amusement durant ces quelques années, qui m'ont fait partager leurs passions et qui m'ont convaincue, enfin, que le monde était magique.*





# Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>11</b>
<b>1 Synthèse bibliographique</b>	<b>17</b>
1.1 Structure des protéines . . . . .	19
1.1.1 Structure primaire . . . . .	19
1.1.2 Structure secondaire . . . . .	21
1.1.3 Structure tertiaire . . . . .	23
1.1.4 Structure quaternaire . . . . .	25
1.1.5 Autres éléments structuraux des protéines . . . . .	25
1.2 Protéines étudiées . . . . .	27
1.2.1 Lysozyme . . . . .	27
1.2.2 Ovalbumine . . . . .	28
1.3 Interactions . . . . .	29
1.3.1 Répulsion de volume exclu . . . . .	29
1.3.2 Interactions hydrophobes . . . . .	29
1.3.3 Interactions de déplétion . . . . .	30
1.3.4 Modèles classiques d'interactions de protéines . . . . .	31
1.3.4.1 Sphères dures adhésives . . . . .	31
1.3.4.2 Lennard-Jones et $\alpha$ - Lennard-Jones . . . . .	32
1.3.4.3 Yukawa . . . . .	33
1.3.4.4 Théorie DLVO . . . . .	34
1.3.5 Interactions entre particules et pression osmotique . . . . .	34

1.3.5.1	Expansion du viriel de la pression osmotique et $B_{22}$ . . . . .	34
1.3.5.2	Modèles classiques pour la pression osmotique . . . . .	37
1.4	Devenir des protéines lors de la concentration . . . . .	39
1.4.1	Cristallisation . . . . .	39
1.4.2	Séparation de phases liquide-liquide . . . . .	42
1.4.3	Verres . . . . .	44
1.4.4	Gels . . . . .	45
1.4.5	Clusters dynamiques . . . . .	48
1.5	Les protéines à l'interface air/eau, une phase concentrée en 2D . . . . .	49
1.5.1	Formation de l'interface . . . . .	49
1.5.2	Propriétés de l'interface . . . . .	51
<b>2</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>55</b>
2.1	Préparation des protéines . . . . .	57
2.1.1	Lysozyme . . . . .	57
2.1.2	Ovalbumine . . . . .	57
2.1.2.1	Préparation du blanc d'oeuf démuiné . . . . .	57
2.1.2.2	Chromatographie préparative échangeuse d'anions . . . . .	57
2.1.2.3	Précipitation de l'ovalbumine et remise en solution des précipités . . . . .	59
2.1.2.4	Remise en solution des précipités et dialyse . . . . .	59
2.1.2.5	Lyophilisation de l'ovalbumine . . . . .	60
2.2	Compression osmotique . . . . .	60
2.2.1	Principe . . . . .	60
2.2.2	Protocole expérimental . . . . .	61
2.3	Mesure d'extrait sec total . . . . .	64
2.4	Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) . . . . .	66
2.4.1	Principe et notions . . . . .	66
2.4.2	Méthode expérimentale . . . . .	69
2.4.3	Traitement des résultats . . . . .	69

2.4.3.1	Facteurs de forme . . . . .	69
2.4.3.2	Rayons de giration . . . . .	70
2.4.3.3	Facteurs de structure . . . . .	71
2.4.3.4	Analyse des spectres de cristaux . . . . .	74
2.5	Microscopie . . . . .	74
2.5.1	Microscopie optique . . . . .	74
2.5.2	Microscopie confocale . . . . .	75
2.6	Sorption de vapeur dynamique . . . . .	75
2.7	Simulations Monte-Carlo . . . . .	76
2.8	Réflectivité de neutrons . . . . .	78
2.8.1	Protocole expérimental . . . . .	78
2.8.2	Analyse des données . . . . .	79
2.8.2.1	Analyse des spectres de réflectivité . . . . .	79
2.8.2.2	Modélisation des interfaces . . . . .	80
2.9	Ellipsométrie . . . . .	82
2.9.1	Principe . . . . .	82
2.9.2	Protocole expérimental . . . . .	84
2.9.2.1	Expériences à l'air libre, avec flux d'advection . . . . .	84
2.9.2.2	Expérience en atmosphère saturée, sans flux d'advection . . . . .	85
<b>3</b>	<b>Le comportement des protéines concentrées est renseigné par les équations d'état</b>	<b>87</b>
3.1	Equations d'état à pH7 et $I=20$ mM . . . . .	89
3.1.1	Régimes . . . . .	89
3.1.2	Réversibilité . . . . .	99
3.2	Effet des conditions physico-chimiques . . . . .	100
3.2.1	Effet du pH . . . . .	100
3.2.2	Effet de la force ionique . . . . .	104
3.2.3	Cas particulier du lysozyme à pH7 et $I=2,02$ M . . . . .	109
3.2.4	Réversibilité . . . . .	111
3.2.5	Importance de la prise en compte des contre-ions . . . . .	112
3.3	Conclusion . . . . .	119



<b>4</b>	<b>Les analyses structurales indiquent l'état physique des phases de protéines</b>	<b>121</b>
4.1	Le plateau est un signe de la cristallisation du lysozyme . . . . .	123
4.2	L'ovalbumine subit une transition de type verre/gel . . . . .	130
4.2.1	Evolution des facteurs de structure en fonction de la fraction volumique . . . . .	130
4.2.2	Influence des conditions physico-chimiques . . . . .	136
4.3	Conclusion . . . . .	137
<b>5</b>	<b>Modélisation de systèmes concentrés de protéines par méthode Monte-Carlo</b>	<b>139</b>
5.1	Modélisation de spectres SAXS . . . . .	142
5.1.1	Mise au point de la méthode . . . . .	142
5.1.2	Modélisation de sphères non chargées . . . . .	145
5.1.3	Modélisation de sphères chargées . . . . .	146
5.1.4	Modélisation de systèmes de protéines . . . . .	148
5.2	Modélisation d'équations d'état . . . . .	152
5.2.1	pH 7, $I=20$ mM . . . . .	152
5.2.1.1	Essais préliminaires . . . . .	152
5.2.1.2	Influence du cut-off . . . . .	154
5.2.1.3	Influence des contre-ions . . . . .	155
5.2.2	pH 7, $I=150$ mM . . . . .	157
5.2.2.1	Essais préliminaires . . . . .	157
5.2.2.2	Influence du paramètre de Lennard-Jones . . . . .	158
5.2.3	pH 7, $I=2,02$ M . . . . .	160
5.3	Conclusion . . . . .	161
<b>6</b>	<b>Rôle du confinement dans le comportement interfacial</b>	<b>165</b>
6.1	Une partie du comportement interfacial du lysozyme et de l'ovalbumine est imputable à l'effet concentration . . . . .	167
6.2	L'évaporation de l'eau à travers la couche interfaciale est nécessaire à la formation de multicouches . . . . .	170
6.3	Conclusion . . . . .	177

Conclusion générale - Perspectives	179
Références bibliographiques	185
Annexe : Valeur des constantes	201



# Introduction générale



L'application aux macromolécules d'origine biologique des outils et concepts de la physique de la matière molle et des dispersions colloïdales enrichit la description et la compréhension de leurs interactions et transitions de phases. Depuis une dizaine d'années, l'attention portée aux protéines, et en particulier à leur comportement à haute concentration, s'est accru. Ces molécules possèdent en effet une complexité structurale supérieure à celle des colloïdes (répartition de charges anisotrope, diversité de structures tridimensionnelles, flexibilité, présence de « patches » hydrophobes) et sont par conséquent des objets d'étude intéressants pour la validation et l'amélioration des modèles physiques établis sur des systèmes colloïdaux.

La compréhension des interactions dans les systèmes concentrés de protéines possède de plus une importance particulière dans de nombreuses applications, notamment en industrie agroalimentaire. En effet, lors de la transformation alimentaire, les protéines subissent couramment des étapes de concentration, que ce soit par exemple dans le cadre du séchage (poudres), de la filtration membranaire (formation de « gâteaux » de filtration, dûs à l'accumulation de protéines à la surface des membranes), ou de la formation de films denses interfaciaux dans les systèmes dispersés (mousses, émulsions...). Dans ces conditions, la concentration en protéines peut atteindre localement plusieurs centaines de grammes par litre et constitue une partie des facteurs responsables de leurs propriétés techno-fonctionnelles. L'effet concentration a également des implications dans d'autres domaines que l'agroalimentaire : la formulation de médicaments injectables à haute concentration en protéines mais ne devant pas subir de transition de phases, susceptible de rendre l'injection impossible, en est un exemple.

L'étude du seul effet de la concentration sur la modulation des interactions entre protéines ne peut s'effectuer directement dans les produits de la transformation agroalimentaire, car il ne peut être découplé des autres effets (interaction avec les autres composants ou avec une surface hydrophobe, dénaturation thermique...). Elle nécessite donc d'avoir recours à des systèmes modèles simplifiés, bien souvent constitués de la dispersion d'un seul type de protéine dans une solution aqueuse. Malgré l'intérêt scientifique et technologique qu'elles représentent, la plupart des études de ce type sont récentes et les connaissances dans le domaine sont encore limitées. Des modèles de plus en plus complexes, se basant sur les résultats expérimentaux tirés de techniques telles que la diffusion des rayonnements et la modélisation numérique (dynamique moléculaire, entre autres) sont élaborés pour rendre compte des observations faites sur des systèmes de protéines concentrées, en utilisant les connaissances héritées de la physique des colloïdes. Cependant, une part des propriétés des protéines échappe pour l'instant aux règles établies pour les colloïdes et certains rapprochements entre les protéines et ces objets plus simples font débat (à l'instar des agrégats dynamiques de lysozyme, dont nous discuterons dans la section 1.4.5). De plus, la question de la pertinence de la généralisation des observations faites sur un nombre limité de pro-

téines se pose : existe-t-il des comportements spécifiques des protéines ? Peut-on prédire le comportement d'une protéine à partir de ses propriétés physico-chimiques (charge, masse, famille de structures tertiaires...) ? Jusqu'à quel niveau de détail les modèles doivent-ils porter ?

L'étude de la relation entre pression osmotique et fraction volumique est une méthode efficace de caractérisation des interactions entre les composants d'une solution. Elle a déjà été utilisée pour de nombreuses études portant sur les interactions dans les solutions de protéines, en particulier à travers le calcul de coefficients du viriel, comme il sera détaillé dans la section 1.3.5. Cependant, les gammes de concentration jusqu'ici étudiées sont très souvent insuffisantes pour aller au-delà d'un régime dilué à semi-dilué. Or, nombre de procédés agroalimentaires font intervenir des phases concentrées, voire solides, de protéines et l'étude de la transition progressive d'un système dilué à un système solide possède un réel intérêt.

Cette étude propose de décrire, grâce à l'établissement d'équations d'état liant fraction volumique et pression osmotique, les interactions entre protéines lors d'une concentration allant d'un régime très dilué (quelques  $\text{g L}^{-1}$ ) jusqu'à un régime concentré, constitué d'une phase solide (plus de  $800 \text{ g L}^{-1}$ ). Nous avons pour cela choisi d'utiliser comme méthode de concentration la compression osmotique, qui a déjà été utilisée dans des travaux sur des colloïdes et des protéines et présente plusieurs avantages :

- la teneur en sels est maintenue constante au cours de la concentration, contrairement à des techniques comme le séchage. De plus, le contrôle des paramètres physico-chimiques (pH, force ionique) est aisé ;
- son utilisation est relativement aisée, bien que coûteuse en temps de manipulation ;
- elle peut être appliquée sur de petits volumes (quelques mL) ;
- la concentration ne se limite pas à un régime liquide, comme dans le cas de la préparation directe par dissolution de poudre dans un tampon. L'eau peut encore être extraite de l'échantillon après sa solidification, ce qui permet d'étudier les transitions de phases.

Nous avons choisi comme protéines modèles le lysozyme et l'ovalbumine, deux protéines issues du blanc d'oeuf, un ingrédient largement utilisé en industrie agroalimentaire pour ses propriétés texturantes et moussantes. Elles possèdent l'avantage d'être bien caractérisées du point de vue de leurs propriétés physico-chimiques (charge, structure, hydrophobie de surface), très différentes entre les deux protéines, et ont déjà été utilisées comme modèles d'étude des interactions entre protéines. En particulier, le lysozyme a fait l'objet de nombreux travaux concernant ses capacités d'auto-assemblage à des concentrations de plusieurs centaines de grammes par litre et le comportement interfacial des deux protéines a été largement étudié.

Les résultats de nos travaux seront présentés en quatre chapitres. Dans un premier chapitre, nous montrerons que l'établissement d'équations d'état reliant la fraction volumique

et la pression osmotique de solutions de lysozyme et d'ovalbumine sur une large gamme de fractions volumiques est une méthode efficace de caractérisation des interactions mises en jeu et de description des transitions du système qui interviennent lors de la concentration. Nous montrerons les différences existant dans le comportement de ces deux protéines lors de la concentration et proposerons des modèles d'interprétation des interactions. Dans un second temps, nous affinerons les conclusions tirées de ces équations d'état en les confrontant à l'analyse par diffusion des rayons X des échantillons de lysozyme et d'ovalbumine concentrée et montrerons notamment que la transition solide-liquide pour ces deux protéines relève de phénomènes très différents. Un troisième chapitre traitera de la modélisation numérique de systèmes concentrés de protéines et fera apparaître, à travers la confrontation avec les données expérimentales, la complexité des phénomènes mis en jeu lors de la concentration et les défis d'une représentation théorique réaliste. Enfin, un dernier chapitre sera consacré à la mise en parallèle de nos équations d'état, élaborées à partir de solutions de lysozyme et d'ovalbumine, avec les propriétés de ces deux protéines dans un système bidimensionnel, où l'effet concentration ne représente qu'une partie des facteurs influençant le comportement des protéines : les couches de protéines adsorbées à l'interface air-eau.





# Chapitre 1

## Synthèse bibliographique



Nous nous attacherons tout d'abord à décrire les grands principes d'organisation structurale des protéines, de manière à éclairer les bases de leurs propriétés physicochimiques et de leur capacité d'assemblage. Nous aborderons ensuite les grandes familles d'interactions présentes chez les colloïdes et les protéines, avant de nous intéresser aux changements de phase intervenant lors de phénomènes de concentration des protéines.

## 1.1 Structure des protéines

### 1.1.1 Structure primaire

Les unités de base d'une protéine sont les acides aminés. Ces molécules possèdent chacune un groupement amine primaire  $\text{-NH}_2$ , un groupement acide carboxylique  $\text{-COOH}$  et une chaîne latérale  $\text{-R}$ , rattachés à un carbone, dit  $\alpha$  ou asymétrique (figure 1.1).

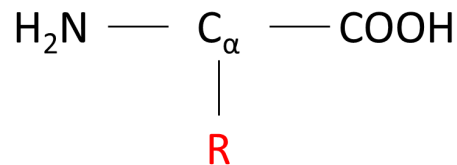


FIGURE 1.1 – *Structure générale d'un acide aminé*

Les acides aminés se différencient de par leur chaîne latérale variable, leur conférant des propriétés physico-chimiques distinctes. Ainsi, on dénombre 20 acides aminés différents entrant dans la composition des protéines (figure 1.2).

La structure primaire d'une protéine est donnée par l'enchaînement simple de ses acides aminés, liés par des liaisons peptidiques. Cette liaison est formée par réaction du groupe acide carboxylique d'un acide aminé et du groupe amine d'un autre, occasionnant le départ d'une molécule d'eau (figure 1.3.a). Les « restes » d'acides aminés sont alors appelés résidus. La liaison peptidique est partiellement double, du fait de la mobilité du doublet électronique de l'atome d'azote, qui permet l'alternance entre deux conformations mésomères (figure 1.3.b). Ceci est responsable de la rigidité de cette liaison, autour de laquelle aucune rotation n'est possible. Les seules rotations permises sont celles ayant lieu entre le carbone asymétrique et le carbone du groupement carbonyle (angle  $\Psi$ ), ou entre le carbone asymétrique et l'azote du groupement amine (angle  $\Phi$ ) (Phillips et coll., 1994).



Les extrémités de la chaîne polypeptidique, portant soit un groupement amine II intact ou un groupement acide carboxylique intact, sont respectivement dénommées extrémités N- et C- terminales (figure 1.4). Ces deux extrémités sont susceptibles de se protoner ou de se déprotoner suivant les conditions de pH, leur  $pK_a$  étant voisin de 3,3 et 7,7, respectivement (Grimsley et coll., 2008).

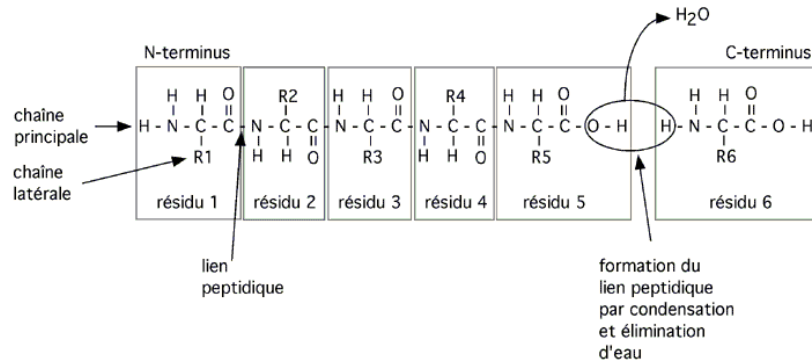


FIGURE 1.4 – Assemblage des acides aminés dans une chaîne polypeptidique

## 1.1.2 Structure secondaire

Les interactions entre résidus résultent en des organisations locales particulières, qui composent la structure secondaire de la protéine. On liste parmi elles les hélices ( $\alpha$ ,  $3_{10}$ ,  $\pi$ , II), les feuillets  $\beta$  (parallèles ou anti-parallèles), les courbes (*turns*) et les boucles aléatoires (*random coils*).

Les hélices  $\alpha$  (figure 1.5) sont stabilisées par des liaisons hydrogènes présentes entre l'oxygène du groupement carbonyle d'un résidu  $n$  et l'hydrogène du groupement amide du résidu  $(n+4)$ . Les liaisons hydrogène sont des liaisons faibles s'établissant entre l'hydrogène porté par un hétéroatome (oxygène, azote, soufre, phosphore ou halogène) et un autre hétéroatome porteur d'un doublet électronique non liant. Dans une hélice  $\alpha$ , les liaisons hydrogènes sont orientées quasi-parallèlement à l'hélice, ce qui lui confère une bonne stabilité. Les chaînes latérales des résidus sont quant à elles orientées vers l'extérieur de la structure. On trouve 3,6 résidus par tour d'hélice et un incrément en hauteur de  $5,4 \text{ \AA}$  par tour (Phillips et coll., 1994).

Moins courantes, les hélices  $3_{10}$  et  $\pi$  diffèrent principalement des hélices  $\alpha$  par le fait que la liaison se fait entre l'oxygène du groupement carbonyle d'un résidu  $n$  et l'hydrogène du groupement amine du résidu  $(n+3)$  et  $(n+5)$ , respectivement. Une hélice  $3_{10}$  possède 3 résidus par tour, tandis qu'une hélice  $\pi$  en possède 4,4.

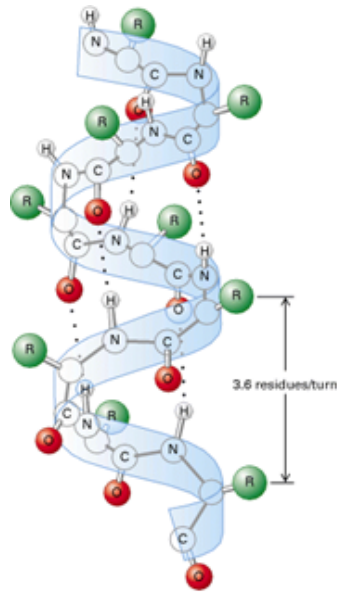


FIGURE 1.5 – *Hélice  $\alpha$*

Les feuillets  $\beta$  sont formés par deux brins polypeptidiques liés par des liaisons hydrogènes entre les résidus qui se font face. On trouve alternativement un résidu au-dessus et un résidu en-dessous du plan du feuillet, ce qui lui donne une structure plissée. Les chaînes latérales sont orientées vers l'extérieur de la structure (figure 1.6).

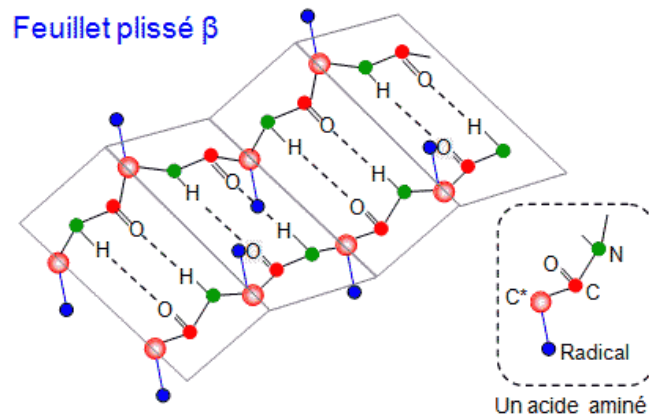


FIGURE 1.6 – *Feuillet  $\beta$*

Les feuillets  $\beta$  peuvent être parallèles (même orientation C-terminal- N-terminal des deux brins) ou antiparallèles (orientation C-terminal- N-terminal inverse pour les deux brins). Les feuillets antiparallèles sont généralement favorisés du fait de la quasi-perpendicularité des liaisons hydrogènes aux deux chaînes polypeptidiques. Dans le cas des feuillets paral-

lèles en revanche, les liaisons ne sont pas perpendiculaires aux axes des chaînes et induisent une contrainte (figure 1.7) (Phillips et coll., 1994).

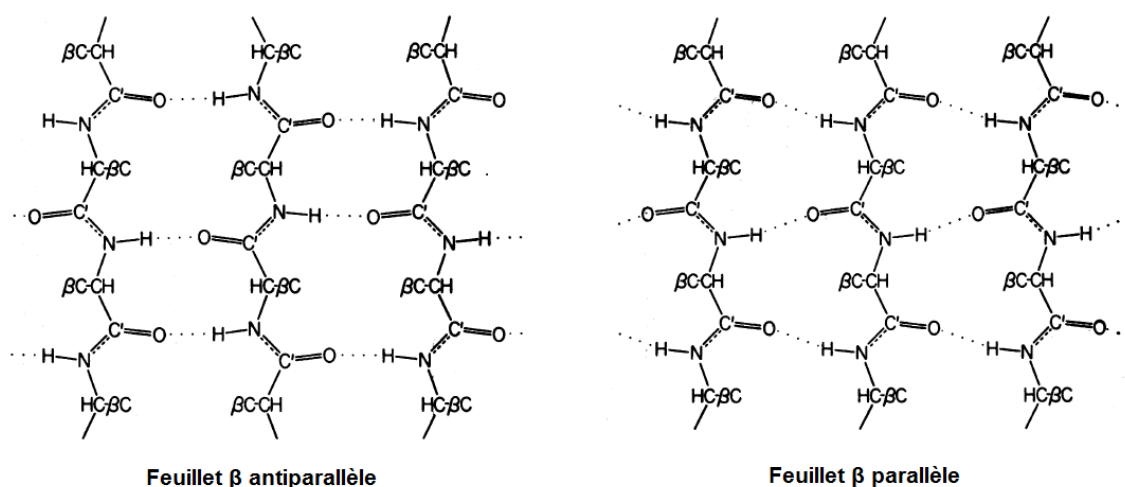


FIGURE 1.7 – Feuilletts  $\beta$  antiparallèles (haut) et parallèles (bas). D'après (Pauling et Corey, 1951)

La proportion d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  permet de classer les protéines en plusieurs catégories : les protéines  $\alpha$  sont quasi-exclusivement composées d'hélices  $\alpha$  ; les protéines  $\beta$  sont quasi-exclusivement composées de feuillets  $\beta$  ; les protéines  $\alpha + \beta$  sont composées des deux types de structures, mais qui sont réparties en deux groupes séparés spatialement (ex. lysozyme) ; enfin, les protéines  $\alpha/\beta$  montrent une alternance d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  le long de la chaîne polypeptidique.

Les *turns* sont des structures non-répétitives, à la différence des hélices et des feuillets  $\beta$ , qui se localisent généralement à la surface de la protéine et servent à lier entre eux des éléments de structure secondaire localisés plus profondément. De fait, ils se composent souvent de résidus polaires. Ils peuvent ou non être stabilisés par des liaisons hydrogène. Les *random coils* sont des sections de la chaîne polypeptidique qui ne possèdent pas de structure définie. Cependant, les angles  $\Psi$  et  $\Phi$  de la chaîne étant limités du fait des répulsions stériques et électrostatiques entre atomes, ces sections ne sont pas totalement désordonnées.

### 1.1.3 Structure tertiaire

La structure tertiaire d'une protéine représente l'agencement tridimensionnel de tous ses résidus à l'état natif. Elle lui confère sa forme, ce qui résulte en la classification des protéines en trois catégories : globulaires, fibreuses et désordonnées. Les protéines globulaires



présentent une structure compacte, sphéroïdale, et ont généralement des fonctions de liaison à des ligands (ex. enzymes, messagers cellulaires, anticorps) ou de réserve d'acides aminés. Les protéines fibreuses présentent une forme très allongée, riche en feuilletts  $\beta$ , et possèdent généralement des fonctions structurales. Les protéines désordonnées sont majoritairement composées de random coils, ce qui leur confère une grande variabilité de configurations de même énergie et donc une bonne flexibilité.

La structure tertiaire dépend fortement de l'établissement de liaisons entre les atomes des résidus. Celles-ci peuvent être des liaisons faibles (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, forces de Van der Waals, interactions hydrophobes) ou des liaisons covalentes (ponts disulfure).

Les interactions électrostatiques ont lieu entre les groupements chargés de deux résidus. Elles suivent la loi de Coulomb et sont par conséquent fonction de la distance entre les groupements chargés et de la nature de leur charge. Ainsi, les interactions seront attractives si les deux groupements portent des charges de signes opposés et répulsives s'ils portent des charges de même signe. Dans ces deux cas, l'interaction décroîtra en fonction de la distance séparant les groupements.

Les forces de Van der Waals sont des forces à courte portée, attractives ou répulsives, générées entre deux dipôles permanents ou induits. Elles sont composées de trois forces distinctes : les forces de Keesom (dipôle permanent-dipôle permanent), les forces de Debye (dipôle permanent-dipôle induit) et les forces de London (dipôle induit-dipôle induit). Elles varient toutes en fonction de  $1/r^6$ ,  $r$  étant la distance entre les dipôles (Cabane et Hénon, 2007 ; Atkins et De Paula, 2008).

Les interactions hydrophobes sont présidées par la faible affinité des résidus apolaires pour l'eau. Lorsqu'un résidu apolaire est exposé à la surface d'une protéine, les molécules d'eau ne peuvent former de liaisons hydrogène comme elles le font avec les résidus polaires. Elles adoptent donc une structure « en cage » thermodynamiquement défavorable (voir section 1.3.2). Une conséquence de ce phénomène est l'enfouissement préférentiel des résidus apolaires et l'exposition des résidus polaires. Malgré tout, il peut arriver que certains résidus apolaires se trouvent en surface de la protéine. Ils interviennent alors dans les interactions hydrophobes entre protéines.

Les ponts disulfure sont des liaisons chimiques s'établissant entre les atomes de soufre des groupements thiol (-SH) de deux résidus cystéine, après perte de deux atomes d'hydrogène. Ces liaisons sont créées en conditions oxydantes, généralement en milieu intracellulaire, lors de la synthèse de la protéine (comme d'autres modifications dites « post-traductionnelles » : phosphorylation, glycosylations...). Elles confèrent une plus grande stabilité à la protéine.

### 1.1.4 Structure quaternaire

La structure quaternaire n'existe que chez certaines protéines. Elle est formée par l'assemblage de plusieurs sous-unités protéiques, qui peuvent être identiques (ex. collagène : trois sous-unités  $\alpha$ ) ou différentes (ex. hémoglobine : deux sous-unités  $\alpha$ , deux sous-unités  $\beta$ ). Ces sous-unités peuvent se mouvoir les unes par rapport aux autres, par changement des conditions physico-chimiques du milieu ou de par leur activité biologique (ex. acceptation d'oxygène).

### 1.1.5 Autres éléments structuraux des protéines

L'eau associée à la protéine se retrouve dans plusieurs zones. Une petite partie est localisée dans la protéine, à proximité de résidus polaires, avec lesquels elle établit des liaisons hydrogène (Dickinson et McClements, 1996). C'est l'eau structurale. Elle participe à la stabilisation de la structure de la protéine et ne participe pas aux réactions chimiques. Mais la majorité de l'eau associée à la protéine se trouve en surface de la protéine. Cette eau possède une structure différente de celle de la solution environnante (bulk), bien que les molécules d'eau soient en échange permanent entre ces deux compartiments. La première couche d'hydratation est en réalité une monocouche de molécules d'eau associées aux résidus polaires de la surface protéique par des liaisons hydrogène. Elle est complétée par l'eau d'hydratation hydrophobe, qui est organisée en clathrates autour des résidus apolaires. Toutes deux participent à la stabilisation de la structure de la protéine et peuvent participer aux réactions chimiques. S'y superposent plusieurs autres couches d'hydratation, dont la structure évolue en s'éloignant de la surface de la protéine, et dont les propriétés thermodynamiques sont intermédiaires entre celles de la première couche d'hydratation et le bulk. Enfin, l'eau d'hydratation hydrodynamique comprend les molécules d'eau qui sont transportées avec la protéine en cas de mouvement de celle-ci, mais qui n'y sont pas liées. Elle possède les propriétés du bulk (Phillips et coll., 1994).

Les résidus chargés présents en surface d'une protéine génèrent des interactions électrostatiques avec les ions de la solution. En particulier, il existe une attraction entre un résidu chargé et un ion de charge opposée (contre-ion). Certains contre-ions sont fortement liés à la surface de la protéine et forment la couche de Stern. Ils possèdent par conséquent une très faible mobilité. Autour de cette première couche se trouvent d'autres ions (contre-ions et co-ions), mobiles, constituant l'atmosphère ionique externe, ou couche diffuse. La réunion de ces deux couches forme la double couche électrique (figure 1.8)

Les charges portées par la protéine génèrent un potentiel électrique. L'accumulation des ions à proximité de la protéine, dans la double couche électrique, fait diminuer ce potentiel exponentiellement : c'est l'écrantage des charges. Au final, l'excès de charge généré par les ions de la double couche compense la charge de la protéine.

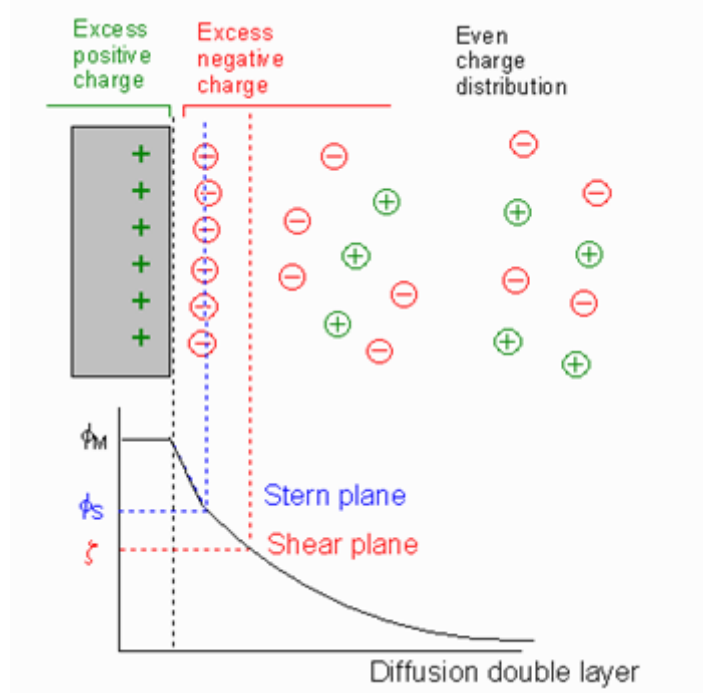


FIGURE 1.8 – *Double couche électrique*

Les répulsions électrostatiques entre protéines proviennent des répulsions entre leurs doubles couches électriques respectives. L'épaisseur de la double couche électrique correspond à la longueur de Debye,  $\kappa^{-1}$  :

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{k_B T \varepsilon_0 \varepsilon_r}{2 I N_A e^2}} \quad (1.1)$$

avec  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $\varepsilon_0$  et  $\varepsilon_r$  les permittivités du vide et la permittivité relative du solvant,  $N_A$  le nombre d'Avogadro,  $e$  la charge élémentaire et  $I$  la force ionique définie par :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (1.2)$$

avec  $c_i$  et  $z_i$  la concentration molaire et le nombre de charges des composés ioniques de la solution, respectivement.

En d'autres termes, à une distance supérieure à la longueur de Debye de la surface de la protéine, les charges de la protéine sont écrantées. Plus il y a d'ions présents dans la solution (i.e. plus la force ionique est grande), plus le potentiel décroît rapidement, et

donc plus la double couche électrique est fine et la distance de répulsion entre les protéines diminue.

## 1.2 Protéines étudiées

### 1.2.1 Lysozyme

Le lysozyme est une protéine du blanc d'œuf (3,5% des protéines totales) qui possède des propriétés antibactériennes bien connues, de par sa propriété à lyser la paroi de peptidoglycane des bactéries à coloration de Gram positive, provoquant leur éclatement. En particulier, son action bactéricide est couramment utilisée en agro-alimentaire dans le cadre de la maîtrise des populations bactériennes, que ce soit dans un but d'amélioration de la conservation des aliments ou d'auxiliaire technologique en fermentation (Nau et coll., 2010).

D'un poids moléculaire de 14305 Da, il est composé de 129 acides aminés assemblés en une seule chaîne repliée sur elle-même et contient huit cystéines formant quatre ponts disulfures, le rendant très compact et stable. De dimensions  $45 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$ , son rayon de giration est estimé à  $14,92 \text{ \AA}$  par le logiciel CRY SOL (Svergun et coll., 1995), à partir du fichier pdb 2VB1 (Wang et coll., 2007). La structure tridimensionnelle du lysozyme est présentée sur la figure 1.9. Son point isoélectrique est de 10,7 et son volume spécifique partiel est de  $0,712 \text{ mL g}^{-1}$  (Gekko et Noguchi, 1979 ; Sirotkin et coll., 2012).

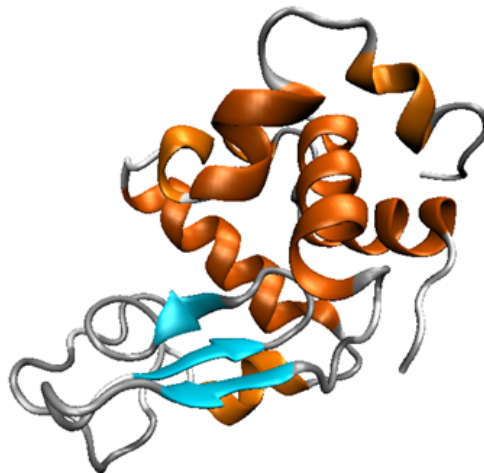


FIGURE 1.9 – Structure tridimensionnelle du lysozyme, visualisée à l'aide du logiciel VMD (Humphrey et coll., 1996). Les feuillets  $\beta$  sont représentés par des flèches bleues, les hélices par des boucles oranges.

On distingue deux domaines particuliers : un domaine très hydrophobe et compact, localisé entre deux hélices alpha (résidus 1-40) et un domaine plus hydrophile, constituant une partie du site actif de l'enzyme (résidus 40-85). La deuxième partie du site est constituée par le reste de la chaîne, et relie les deux domaines précédemment décrits. Le site actif, constitué de six sites (A à F) de fixation du peptidoglycane se trouve accessible au substrat par mouvement des deux domaines l'un par rapport à l'autre.

### 1.2.2 Ovalbumine

L'ovalbumine est également une protéine du blanc d'œuf, dont elle représente près de 54% de ses protéines totales. Cette forte proportion laisse soupçonner un rôle nutritif, en particulier en tant que source d'acides aminés pour l'embryon, mais sa fonction exacte n'est pas encore bien connue. Fortement hydrophobe, elle ne possède qu'un seul pont disulfure, la rendant plus flexible que le lysozyme. Les quatre résidus cystéine non impliqués dans le pont disulfure lui confèrent quatre groupement sulfhydryls (SH) libres, dont l'un en particulier est très sensible aux conditions environnementales ( pH, température, conditions de conservation...) (Nau et coll., 2010).

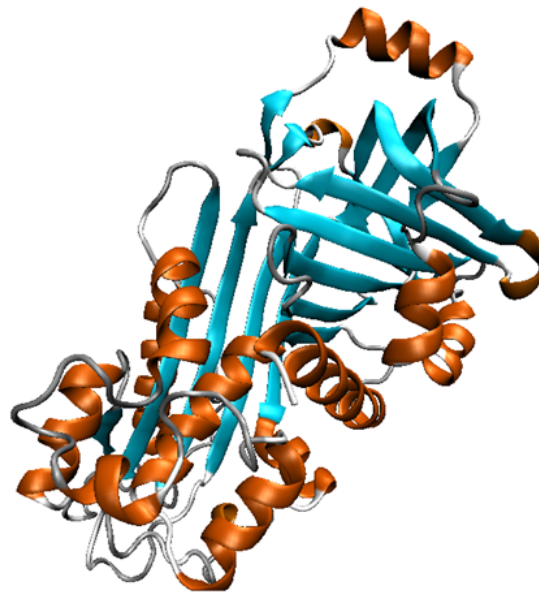


FIGURE 1.10 – *Structure tridimensionnelle de l'ovalbumine, visualisée à l'aide du logiciel VMD (Humphrey et coll., 1996). Les feuillets  $\beta$  sont représentés par des flèches bleues, les hélices par des boucles oranges.*

Plus grande que le lysozyme, elle possède 385 acides aminés, pour un poids moléculaire de 44000 Da. Ses dimensions sont de 70 x 45 x 50 Å<sup>3</sup>, et son rayon de giration est estimé

à 23,04 Å par le logiciel CRY SOL (Svergun et coll., 1995), à partir du fichier pdb 1OVA (Stein et coll., 1991). Son point isoélectrique est de 4,5 et son volume spécifique partiel est de 0,746 mL g<sup>-1</sup> (Gekko et Noguchi, 1979). Sa structure tridimensionnelle est présentée sur la figure 1.10.

## 1.3 Interactions

### 1.3.1 Répulsion de volume exclu

La distance d'approche de deux molécules est limitée par leurs volumes respectifs. Le volume inaccessible à l'une des deux molécules du fait de la présence de l'autre est nommé volume exclu (figure 1.11). L'impossibilité de superposition de ces deux molécules génère une répulsion d'ordre stérique.

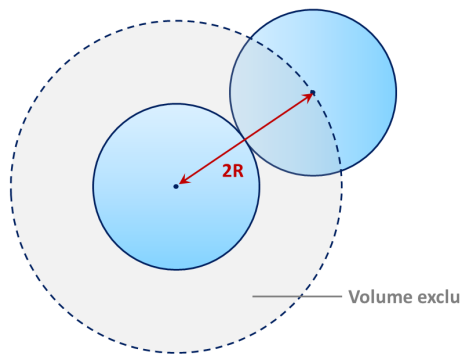


FIGURE 1.11 – *Volume exclu dans le cas de deux molécules sphériques*

Considérons des le cas de molécules sphériques de rayon  $R$  et de volume  $V$ , le volume inaccessible pour chaque paire est alors :  $V_{inaccessible} = \frac{4}{3} \pi (2R)^3 = 8 \left( \frac{4}{3} \pi R^3 \right) = 8V$ . Cependant, comme on est en présence de deux molécules, ce volume est réparti en deux : au final, le volume exclu par molécule est de  $4 \cdot V$ . C'est le volume qui entre en compte dans le modèle de Van der Waals, sous la forme du volume exclu par particule  $b$ , classiquement pris comme égal à quatre fois le volume propre de la molécule (équation 1.14).

### 1.3.2 Interactions hydrophobes

Les interactions hydrophobes entre protéines ne sont pas des interactions à proprement parler, en ce sens qu'elles ne résultent pas d'une force, mais plutôt d'un effet entropique. Elles jouent cependant un rôle non négligeable dans l'auto-assemblage des protéines. Comme expliqué dans le cas de la structure tertiaire de la protéine (voir section 1.1.3),

les molécules d'eau ne peuvent établir de liaisons hydrogène avec les résidus apolaires. À leur proximité, elles adoptent donc une structure ordonnée « en cage », dénommée clathrate (Dickinson et McClements, 1996). Cette organisation a pour conséquence que les molécules d'eau ne peuvent plus bouger librement dans la solution, ce qui génère une diminution d'entropie du système ( $\Delta S < 0$ ) et conduit à une augmentation de l'énergie libre ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ). Lorsque deux résidus apolaires de deux protéines viennent à proximité l'un de l'autre, les molécules d'eau se réorganisent en une plus grande cage, qui comprend les deux résidus. Moins de molécules d'eau sont impliquées dans cette nouvelle cage, ce qui augmente l'entropie du système et est favorable d'un point de vue thermodynamique (Atkins et De Paula, 2008).

Si elles sont favorisées, les interactions hydrophobes peuvent conduire à l'agrégation de protéines et à leur précipitation. C'est notamment le cas pour les protéines dénaturées par traitements thermiques ou chimiques, qui se déplient en exposant leurs résidus apolaires initialement enfouis.

### 1.3.3 Interactions de déplétion

Les interactions de déplétion concernent les systèmes mixtes de particules larges et de petites particules, plus nombreuses. Autour de chacune des particules larges se trouve un volume exclu aux petites particules.

Si deux grandes particules se rapprochent suffisamment pour que leurs volumes exclus aux petites particules se superposent partiellement, alors le volume exclu total est réduit. Les petites particules peuvent alors se déplacer dans un volume plus grand, ce qui augmente l'entropie du système et est thermodynamiquement favorable. La floculation des grandes particules génère de son côté une diminution de l'entropie, mais elle est plus faible.

D'autre part, le volume de superposition des volumes exclus des grandes particules est interdit aux petites particules. La région de superposition des volumes exclus des deux grandes particules est donc composée de solvant pur. Il se crée une pression osmotique entre le compartiment extérieur à la région de superposition, comprenant des petites particules, et la région de superposition, composée de solvant pur. Cette pression contribue à maintenir les deux particules ensemble (figure 1.12). Pour une raison évidente, cette force dépend du volume de superposition.

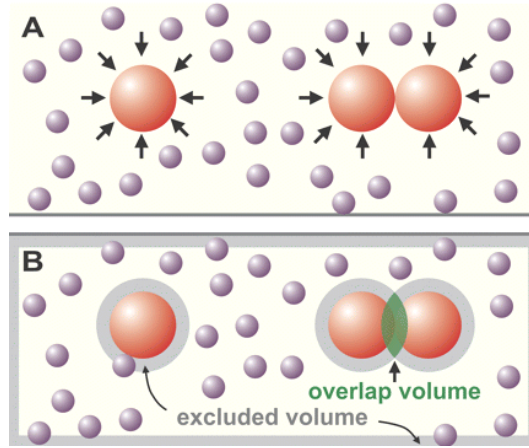


FIGURE 1.12 – Schéma des interactions de déplétion (extrait de (Marenduzzo et coll., 2006))

### 1.3.4 Modèles classiques d'interactions de protéines

#### 1.3.4.1 Sphères dures adhésives

Le potentiel de sphères dures adhésives (adhesive hard spheres, ou AHS) a été défini par Baxter (Baxter, 1968) comme extension du modèle de Percus-Yevick pour les sphères dures :

$$\beta U(r) = \begin{cases} +\infty & \text{si } 0 < r < \sigma \\ \ln\left(\frac{2\tau(a-\sigma)}{a}\right) & \text{si } \sigma < r < a \\ 0 & \text{si } a < r \end{cases} \quad (1.3)$$

avec  $\beta = \frac{1}{k_B T}$ ,  $a$  la distance où le potentiel s'annule,  $r$  la distance inter-particules,  $\sigma$  la distance de répulsion et  $\tau$  un paramètre sans dimension figurant la profondeur du puits d'attraction.  $\tau$  dépend de la température et croît avec elle.

Le potentiel présente une forme à puits carré (figure 1.13).

Il n'y a alors plus qu'un paramètre ajustable, le paramètre d'attraction  $\tau$ .

Le potentiel de sphères dures adhésives a depuis été utilisé pour des modèles de solutions de protéines (Rosenbaum et Zukoski, 1996; Piazza et coll., 1998; Farrer et Lips, 1999; Moon et coll., 2000; Parker et coll., 2005), des colloïdes et des polymères (Rosenbaum et Zukoski, 1996; Poon, 1997) possédant une interaction attractive, dont les interactions de déplétion. En particulier, son expression en termes de pression osmotique a été appliquée à l'analyse de diagrammes  $(\Phi, \Pi)$  de protéines telles que le caséinate de sodium (Farrer



et Lips, 1999), le lysozyme (Piazza et coll., 1998 ; Moon et coll., 2000), la BSA (Moon et coll., 2000) et la  $\beta$ -lactoglobuline (Parker et coll., 2005).

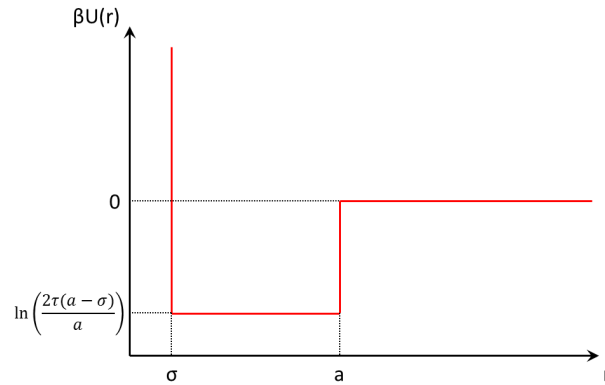


FIGURE 1.13 – *Potentiel de sphères dures adhésives, en fonction de la distance inter-particules*

#### 1.3.4.2 Lennard-Jones et $\alpha$ - Lennard-Jones

Le potentiel de Lennard-Jones est un modèle simple présentant une partie attractive à courte portée (Van der Waals, en  $1/r^6$ ) et une partie répulsive (répulsion de Pauli, due à la superposition des orbitales, en  $1/r^{12}$ ). Il s'exprime classiquement sous la forme :

$$U_{LJ}(r) = 4 \varepsilon_{LJ} \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (1.4)$$

avec  $r$  la distance inter-particules,  $\varepsilon_{LJ}$  le paramètre d'interaction de Lennard-Jones, figurant la profondeur du puits d'attraction, et  $\sigma$  la distance inter-particules où le potentiel d'interaction s'annule (figure 1.14).

Du fait de sa simplicité et de la facilité de faire varier les paramètres d'interaction, ce modèle a été utilisé dans des modélisations d'interactions de colloïdes et de protéines, que ce soit sous sa forme classique (ten Wolde et Frenkel, 1997) ou sous une forme modifiée en «  $2\alpha-\alpha$  » (Vliegthart et coll., 1999 ; Cardinaux et coll., 2011) :

$$U'_{LJ}(r) = 4 \varepsilon_{LJ} \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{2\alpha} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^\alpha \right] \quad (1.5)$$

La forme en «  $2\alpha-\alpha$  » permet de faire varier la portée de l'attraction, qui diminue lorsque  $\alpha$  augmente. En particulier, selon Vliegthart (Vliegthart et coll., 1999),  $\alpha=18$  est considéré comme une interaction très courte portée, même si d'autres auteurs ont utilisé

des valeurs de  $\alpha$  allant jusqu'à 90 pour des molécules de lysozyme (Cardinaux et coll., 2011).

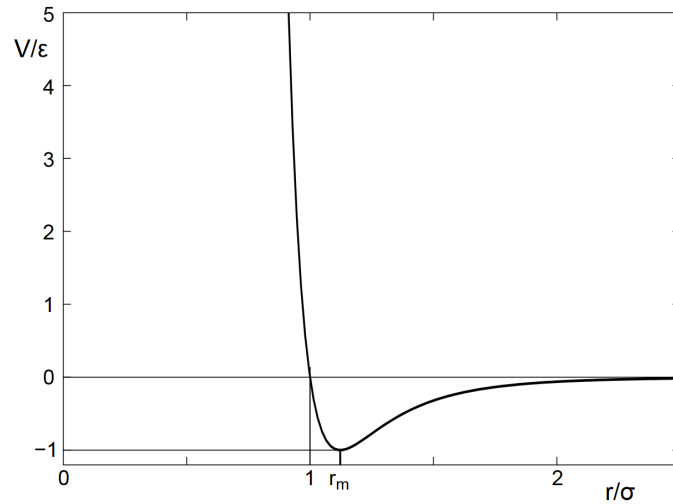


FIGURE 1.14 – *Potentiel de Lennard-Jones, en fonction de la distance inter-particules*

### 1.3.4.3 Yukawa

Le potentiel de Yukawa est une autre forme de potentiel majoritairement attractif, avec une répulsion d'ordre stérique (sphères dures). Il prend en compte l'écrantage de Debye dans son expression (Valadez-Pérez et coll., 2013) :

$$U_Y(r) = \begin{cases} \infty & \text{si } r < \sigma \\ -\epsilon \sigma \frac{\exp(-\kappa(r-\sigma))}{r} & \text{si } r \geq \sigma \end{cases} \quad (1.6)$$

avec  $\epsilon$  la profondeur du puits d'attraction au contact le plus proche,  $\sigma$  le diamètre du « coeur dur » (distance de répulsion stérique) et  $\kappa$  l'inverse de la longueur de Debye (équation 1.1).

Ce potentiel a été utilisé dans des simulations de solutions de protéines possédant des interactions attractives à courte portée, comme le lysozyme (Gögelein et coll., 2008 ; Shukla et coll., 2008a). En particulier, du fait de l'implication des forces attractives à courte portée dans les phénomènes de séparation de phases liquide-liquide et liquide-solide dans les solutions de protéines et de colloïdes, il a été utilisé dans les simulations de diagrammes de phases (Pellicane et coll., 2004 ; Tavares et Prausnitz, 2004 ; Li et coll., 2008). La forme du potentiel de Yukawa a également parfois été utilisée pour modéliser des répulsions, en changeant son signe (Gögelein et coll., 2008 ; Shukla et coll., 2008a).

### 1.3.4.4 Théorie DLVO

La théorie DLVO a été développée par Derjaguin et Landau en 1941, puis Verwey et Overbeek en 1948. Elle propose une expression du potentiel d'interaction entre des particules colloïdales chargées en solution, regroupant les concepts de répulsion électrostatique écrantée développée par Debye et Hückel, ainsi que l'attraction modélisée par le potentiel de Van der Waals.

Dans le cas de particules sphériques de charge  $Z$  et de diamètre  $\sigma$ , séparées par une distance centre-à-centre  $r$  et dispersées dans un milieu où l'inverse de la longueur de Debye est noté  $\kappa$ , le potentiel de Debye-Hückel s'exprime ainsi (Pellicane et coll., 2004 ; Pellicane, 2012) :

$$U_{DH}(r) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \left( \frac{Ze}{1 + \frac{\kappa\sigma}{2}} \right)^2 \frac{\exp(-\kappa(r - \sigma))}{r} \quad (1.7)$$

Le potentiel de dispersion de Van der Waals, quant à lui, s'exprime sous la forme :

$$U_{vdW}(r) = \frac{-A_H}{12} \left[ \frac{\sigma^2}{r^2} + \frac{\sigma^2}{r^2 - \sigma^2} + 2 \ln \left( \frac{r^2 - \sigma^2}{r^2} \right) \right] \quad (1.8)$$

avec  $A_H$  la constante de Hamaker.

Le potentiel DLVO est la somme de ces deux potentiels, pour des distances supérieures à  $(\sigma + \delta)$ , avec  $\delta$  l'épaisseur de la couche de Stern :

$$U_{DLVO}(r) = U_{DH}(r) + U_{vdW}(r) \quad (1.9)$$

## 1.3.5 Interactions entre particules et pression osmotique

### 1.3.5.1 Expansion du viriel de la pression osmotique et $B_{22}$

Dans le cas de solutions diluées, la pression osmotique peut s'exprimer en fonction de la concentration massique des particules, selon une équation nommée expansion du viriel :

$$\frac{\Pi}{RTc} = \frac{1}{M_m} + \sum_{i=2}^{\infty} A_i c^{i-1} = \frac{1}{M_m} + A_2 c + A_3 c^2 + A_4 c^3 + \dots \quad (1.10)$$

avec  $\Pi$  la pression osmotique,  $c$  la concentration massique du soluté,  $M_m$  la masse molaire de la molécule de soluté et les termes en  $A_i$  les premier, second, troisième... coefficients du viriel.

Les coefficients du viriel reflètent les différentes interactions entre particules de soluté. En particulier, le second coefficient du viriel  $A_2$ , communément noté  $B_2$  ou  $B_{22}$ , reflète les interactions de paire. Un  $B_{22}$  positif correspondra à des interactions de paire majoritairement répulsives, favorisant les interactions soluté-solvant plutôt que soluté-soluté (« bon solvant »). A l'inverse, un  $B_{22}$  négatif correspondra à des interactions de paire majoritairement attractives entre solutés (« mauvais solvant »). Lorsque le  $B_{22}$  est nul, les interactions répulsives et attractives se compensent et l'on parle alors de « solvant idéal », ou « solvant theta » (George et Wilson, 1994).

La relation entre le second coefficient du viriel et le potentiel d'interaction global entre particules  $w(r)$  peut s'écrire, pour des particules sphériques (Yousef et coll., 1998 ; Wu et Prausnitz, 1999) :

$$B_{22} = 2\pi \int_0^{\infty} \left[ 1 - \exp\left(\frac{-w(r)}{k_B T}\right) \right] r^2 dr \quad (1.11)$$

George et Wilson (George et Wilson, 1994) réalisèrent en 1994 des mesures de  $B_{22}$  par diffusion statique de la lumière (grâce à l'expression de Kratochvil (Kratochvil, 1987)) reliant la variation d'indice de réfraction en fonction de la concentration à une expansion du viriel tronquée) sur plusieurs solutions de protéines, dans des conditions favorables à leur cristallisation. Ils ont montré que les valeurs de  $B_{22}$  correspondantes étaient situées dans une gamme restreinte, légèrement négative. D'autres solutions, menant à la précipitation amorphe des protéines, ont montré des valeurs de  $B_{22}$  fortement négatives.

Suivant ces travaux, de nombreux auteurs ont utilisé le second coefficient du viriel comme outil de prédiction du comportement des protéines, dont le lysozyme et l'ovalbumine (Rosenbaum et Zukoski, 1996 ; Velev et coll., 1998 ; Curtis et coll., 2002 ; Tessier et coll., 2002 ; Dumetz et coll. 2008a et 2008b ; Mehta et coll., 2012).

Les travaux de Velev et coll. sur le lysozyme (Velev et coll., 1998) ont montré une bonne correspondance entre l'état de la solution et les valeurs de  $B_{22}$  mesurées (figure 1.15), selon les critères de George et Wilson. En effet, des valeurs de  $B_{22}$  positives correspondaient à des solutions où ni cristaux ni précipités n'étaient observés (faibles pH et force ionique), tandis que des cristaux étaient observés pour des valeurs légèrement négatives (pH faible, force ionique forte), et des précipités amorphes lors de la chute brutale du  $B_{22}$  (pH haut, force ionique modérée à faible). Les  $B_{22}$  favorables à la cristallisation sont de plus dans la gamme de ceux prédits par George et Wilson (-1 à  $-8 \cdot 10^{-4}$  mol mL  $g^{-2}$ ). Ses mesures de  $B_{22}$  sont cohérentes avec celles effectuées par d'autres auteurs (Rosenbaum et Zukoski, 1996 ; Gripon et coll., 1997 ; Bonneté et coll., 1999 ; Piazza et Pierno, 2000 ; Curtis et coll., 2002 ; Mehta et coll., 2012).

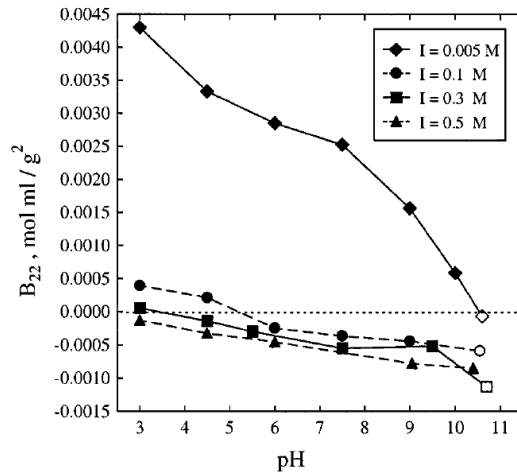


FIGURE 1.15 – Valeurs de  $B_{22}$  mesurées par diffusion statique de la lumière dans des solutions de lysozyme à  $4^\circ\text{C}$  (extrait de (Velev et coll., 1998))

Dans le cas de l'ovalbumine, Dumetz et coll. (Dumetz et coll., 2008b) ont montré que le second coefficient du viriel réduit ( $b_2 = \frac{B_2}{B_{2,HS}}$  avec  $B_{2,HS}$  une approximation de la contribution du volume exclu dans les interactions) dans des solutions de NaCl restait positif pour un pH supérieur ou égal à 5, du moins jusqu'à 3,5 M. A pH 3 et 4, il devient négatif à partir de 1 M de NaCl (figure 1.16.A). Curtis et coll. (Curtis et coll., 2002) ont également montré qu'à pH 7, le  $\text{MgBr}_2$  et le  $\text{KSCN}$  ont peu d'influence sur le  $B_{22}$ .

Dumetz et coll. ont en revanche montré que dans des solutions de sulfate d'ammonium, le  $b_2$  devient négatif pour tous les pH testés, à partir d'une certaine concentration en sel (figure 1.16.B).

Les courbes à pH 3 et 4 sont similaires, tout comme le sont les courbes à pH 6,7 et 8. Seule la courbe à pH 5 est différente, ce que Dumetz interprète comme une transition révélée par le  $b_2$  au voisinage du point isoélectrique. Les courbes de  $b_2$  à pH 3 et 4 deviennent négatives aux concentrations en sel les plus faibles, suivies par la courbe à pH 5, puis les courbes à pH 6, 7 et 8. De même, les courbes de solubilité des agrégats à pH 3 et 4, superposées, sont situées à des concentrations en sel plus faibles que celles à pH 4,5 et 5, elles-mêmes situées à des concentrations en sel plus faibles que celles à pH 6 et 7, également superposées. Les cristaux ne sont observés que dans la fenêtre de transition du  $b_2$ . Les travaux de Mehta (Mehta et coll., 2012) ont montré que le  $B_{22}$  de l'ovalbumine dans des solutions de sulfate d'ammonium devient négatif à des concentrations en sel de plus en plus fortes lorsque le pH augmente. Cependant, les valeurs déterminées par Mehta, Dumetz, Curtis, Demuroella, To et Lenhoff (Demuroelle et coll., 2002; To et Lenhoff, 2007) sont assez différentes les unes des autres.

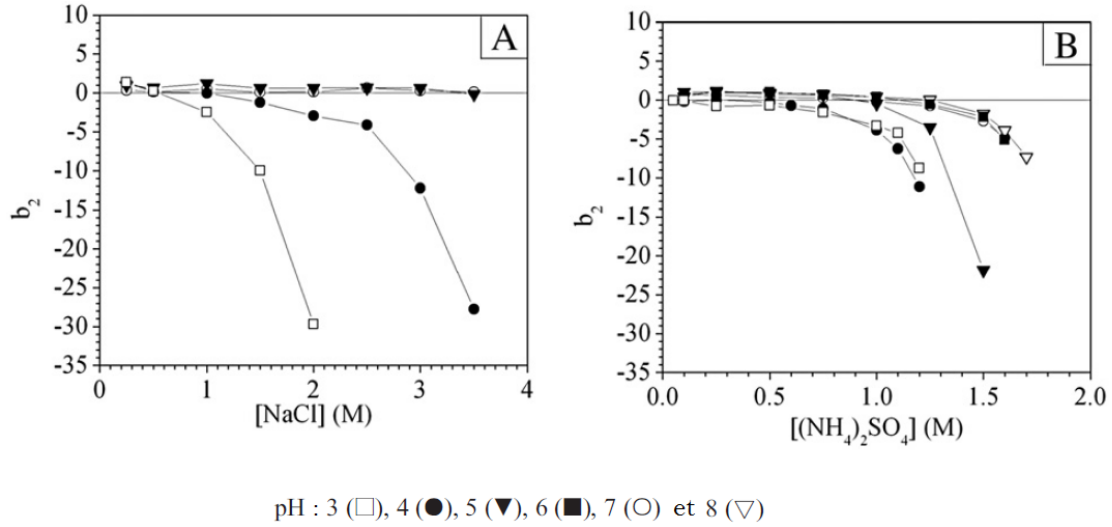


FIGURE 1.16 –  $b_2$  mesurés sur des solutions d'ovalbumine en présence de chlorure de sodium (A) et de sulfate d'ammonium (B) à différents pH (d'après (Dumetz et coll., 2008b))

### 1.3.5.2 Modèles classiques pour la pression osmotique

**Modèle de Van't Hoff** L'équation de Van't Hoff donne la pression osmotique dans le cas d'une solution diluée (Atkins et De Paula, 2008). Son expression est :

$$\Pi = cRT = nk_B T \quad (1.12)$$

avec  $c$  la concentration molaire de soluté,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température,  $n$  la densité numérique de particules,  $V$  le volume et  $k_B$  la constante de Boltzmann.

Cette équation ne s'applique qu'à des systèmes très dilués (fraction molaire  $x$  du solvant telle que  $\ln(1-x) \sim -x$ ) et ne prend pas en compte le volume propre du soluté, ni les interactions entre molécules de soluté.

**Modèle de Van der Waals** Le modèle de Van der Waals pour les gaz réels dérive de l'équation de Van't Hoff. Une première différence est la prise en compte du volume des molécules, à travers leur volume exclu  $b'$  (voir section 1.3.1) : le volume  $V$  de l'équation de Van't Hoff est remplacé par  $(V - nb)$ . Les forces attractives entre particules sont également prises en compte à travers un terme réduisant la pression du système :  $-a \left(\frac{n}{V}\right)^2$ . En effet, ces forces sont proportionnelles à la concentration  $\left(\frac{n}{V}\right)$  des particules et diminuent à la fois les chocs sur les parois et la force mise en jeu, d'où l'expression au carré (Atkins et De Paula, 2008 ; Diu et coll., 1996).

Au final, le modèle de Van der Waals se présente sous cette forme :

$$\left( \Pi + a \frac{n^2}{V^2} \right) (V - nb) = n k_B T \quad (1.13)$$

ou

$$\left( \Pi + \frac{a'}{V_m^2} \right) (V_m - b') = RT \quad (1.14)$$

avec  $\Pi$  la pression,  $a$  et  $a'$  les paramètres d'attraction,  $n$  le nombre de particules,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $b$  et  $b'$  les composantes de volume exclu,  $V$  le volume,  $V_m$  le volume molaire,  $R$  la constante des gaz parfaits et  $T$  la température.

**Modèle de Carnahan-Starling** Le modèle de Carnahan-Starling concerne des sphères dures, monodisperses, sans interaction autre que stérique (Carnahan et Starling, 1969). Ce modèle est dérivé de celui de Percus-Yevick pour des sphères rigides :

$$\frac{\Pi}{n k_B T} = \frac{1 + \Phi + \Phi^2}{(1 - \Phi)^3} \quad (1.15)$$

En analysant les valeurs des coefficients du viriel déterminés pour des sphères dures par Ree et Hoover (Ree et Hoover, 1964), Carnahan et Starling ont pu les exprimer sous la forme générale :

$$\frac{\Pi}{n k_B T} = 1 + \sum_{n=0}^{\infty} (n^2 + 3n) \Phi^n \quad (1.16)$$

En identifiant cette forme comme la dérivée d'une suite géométrique, ils parviennent à l'expression finale de la pression osmotique d'une dispersion de sphères dures :

$$\frac{\Pi}{n k_B T} = \frac{1 + \Phi + \Phi^2 - \Phi^3}{(1 - \Phi)^3} \quad (1.17)$$

Ce modèle a été utilisé pour l'analyse de diagrammes  $(\Phi, \Pi)$  de protéines dans son expression simple (Bouchoux et coll., 2009) ou comme composante d'une expression synthétique des interactions (Wu et Prausnitz, 1999).

## 1.4 Devenir des protéines lors de la concentration

Les transitions de phases des protéines concernent de nombreux domaines : la cristallographie, la médecine, la pharmacologie, l'industrie alimentaire... Cette problématique a amené les scientifiques à établir des « cartes » des changements de phases de protéines en fonction des conditions physico-chimiques du milieu et de leur concentration, appelés diagrammes de phases. Ces diagrammes présentent plusieurs régions, dont les plus courantes sont délimitées par la courbe de solubilité, la binodale liquide-liquide et le solidus. (figure 1.17).

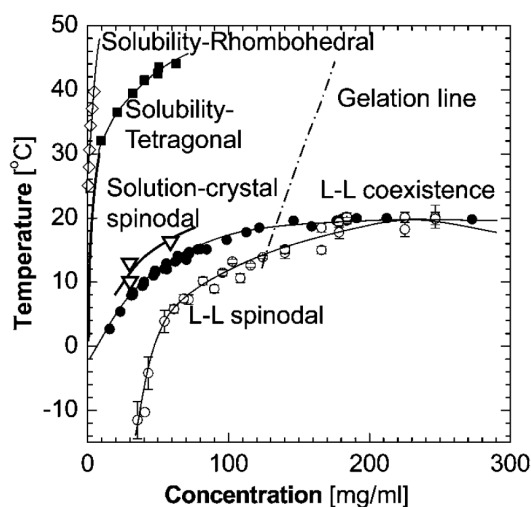


FIGURE 1.17 – Diagramme de phases d'une solution de lysozyme en tampon acétate 0.05 M, à pH 4.5 et 4 % de NaCl (Vekilov, 2010)

Ces courbes délimitent respectivement les régions où se trouvent des cristaux en équilibre avec la solution, un système constitué de deux phases liquides distinctes et un système entièrement cristallisé. Cependant, d'autres types de systèmes peuvent exister et se superposer à ces régions « classiques ». On rapportera dans cette partie les différents systèmes observables chez les protéines du fait de traitements non-dénaturants.

### 1.4.1 Cristallisation

La capacité des protéines à cristalliser est l'une de leurs propriétés les plus connues et les plus étudiées depuis les premières observations faites par Hünefeld en 1840 sur la présence de cristaux, plus tard identifiés comme des cristaux d'hémoglobine, dans des échantillons de sang. Tout d'abord utilisée comme outil de purification des protéines, la cristallisation s'est au fil du temps orientée vers la détermination de la structure des protéines par diffraction des rayons X (Giegé, 2013).



On définit la solubilité d'une protéine comme la concentration au-delà de laquelle une solution de cette protéine sera susceptible de produire des cristaux. Elle varie avec les conditions physicochimiques du milieu, ce qui permet de tracer des courbes de solubilité (Asherie, 2004). Si pour une même protéine il existe plusieurs formes cristallines, alors on trouvera plusieurs courbes de solubilités - une par forme cristalline - sur le diagramme de phases (Vekilov, 2010).

Au-delà de la solubilité, le rapport entre la concentration de la solution et la solubilité est appelée sursaturation. La région où la solution est sursaturée est divisible en trois zones : la zone métastable, la zone de cristallisation, ou labile, et la zone de précipitation (figure 1.18).

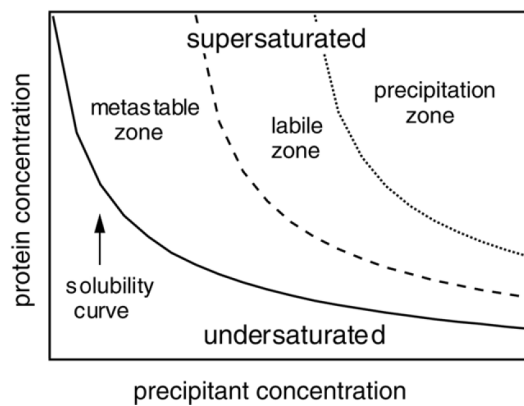


FIGURE 1.18 – Schéma des différentes zones dans des conditions de sursaturation d'une solution de protéine (Asherie, 2004)

L'existence de ces différentes zones est liée à l'existence d'une barrière d'énergie libre pour la nucléation de cristaux, qui introduit un aspect cinétique dans la cristallisation. A l'instar de la condensation d'un gaz (Atkins et De Paula, 2008), la génération d'un cristal est initiée par la formation d'un petit assemblage de monomères de protéine, le nucleus. La formation d'un nucleus peut être décomposée en deux constituantes : la formation d'une interface entre liquide et solide, et le remplacement d'un volume de liquide par un même volume de solide, plus stable (Garcia-Ruiz, 2003). La première composante correspond à une variation d'énergie libre,  $\Delta G_S$ , positive, donc thermodynamiquement défavorable, alors que l'autre correspond à une variation d'énergie libre,  $\Delta G_V$ , négative (voir l'équation 1.18).

$$\Delta G = \Delta G_S - \Delta G_V = A\gamma - n(\mu_\alpha - \mu_\beta) = A\gamma - n[k_B T \ln(S)] \quad (1.18)$$

avec  $A$  la surface du *cluster*,  $\gamma$  sa tension de surface,  $n$  le nombre de molécules dans le *cluster*,  $\mu_\alpha$  et  $\mu_\beta$  les potentiels chimiques respectives de la protéine dans le liquide et dans



Le solidus représente la limite hypothétique au-delà de laquelle la solution est entièrement cristallisée. La concentration en protéine dans le système est alors celle de la protéine dans un cristal. Cette concentration dépend du groupe d'espace et des paramètres de maille de la forme cristalline dans laquelle se trouve la protéine, ainsi que de la masse moléculaire de la protéine.

Afin de calculer la fraction volumique de protéine dans un cristal, Drenth (Drenth, 2007) définit :  $V_{cell}$  le volume de la maille,  $Z$  le nombre de protéines par maille et  $M_m$  la masse molaire de la protéine. Soit  $V_M = V_{cell}/(Z \cdot M_m)$  le volume par mole de protéine dans la maille, alors la fraction volumique en protéine dans le cristal est :

$$\Phi_{prot} = \frac{\text{Volume de protéine dans la maille}}{V_{cell}} = \frac{\bar{v}}{V_M N_A} \quad (1.20)$$

avec  $\bar{v}$  le volume spécifique partiel de la protéine (en  $L g^{-1}$ ). Le tracé précis du solidus par cette méthode implique donc de connaître parfaitement les paramètres de maille de la forme cristalline présente à toutes les températures étudiées, ce qui n'a jamais été fait pour une protéine actuellement. La détermination expérimentale de la densité des cristaux est également possible (Low et Richards, 1952 ; Colman et Matthews, 1971 ; Westbrook, 1976 ; Leung et coll., 1999) mais là encore, la variation de la densité des cristaux de protéines en fonction de la température est peu étudiée. Le solidus est donc par défaut tracé comme une ligne verticale au voisinage de  $800 g L^{-1}$  sur les diagrammes de phases de protéines (Vekilov, 2010).

### 1.4.2 Séparation de phases liquide-liquide

Certaines conditions du diagramme de phases correspondent à une solution de protéine composée de deux phases liquides : une phase diluée, de faible concentration, et une phase dense, de concentration plus élevée. Une telle séparation est généralement liée à des forces fortement attractives, donnant lieu à une forme d'association locale, qui permet de minimiser l'énergie (Zaccarelli, 2007). La phase dense peut être présente sous la forme de gouttelettes dans la phase diluée, ou les deux phases peuvent être totalement séparées (figure 1.20). Ce phénomène porte le nom de séparation de phases liquide-liquide.

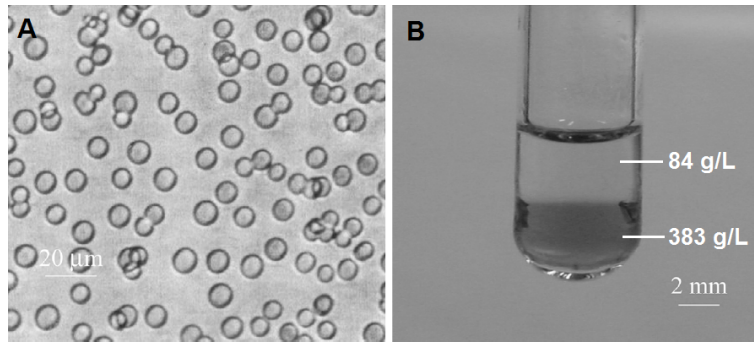


FIGURE 1.20 – Séparations de phases liquide-liquide dans une solution de  $\gamma E$ -cristalline bovine (A) et une solution de thauMATINE de concentration initiale 229 g/L (B) (d'après Asherie, 2004)

La région du diagramme de phases où se produit la séparation de phases liquide-liquide est délimitée par la binodale liquide-liquide. Sous cette première courbe, on trouve la spinodale liquide-liquide, qui rejoint la binodale au niveau du point critique. La région entre la binodale et la spinodale est nommée région métastable (figure 1.21).

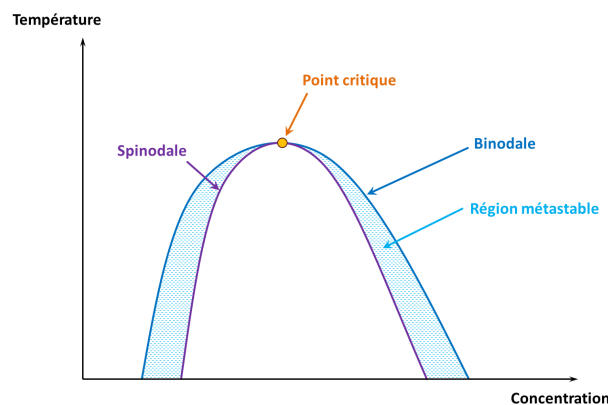


FIGURE 1.21 – Schéma de la zone de séparation liquide-liquide sur un diagramme de phases ( $c$ ,  $T$ )

Comme dans le cas de la cristallisation, cette zone est caractérisée par l'existence d'une barrière d'énergie libre limitant la nucléation de gouttelettes de phase dense. Si l'abaissement de température est plus fort, alors on se retrouve dans une zone instable où la séparation de phases se fait spontanément, selon un phénomène appelé décomposition spinodale. La séparation ne nécessite alors pas de points de nucléation. Si la température est gardée constante après son abaissement, les deux phases se sépareront progressivement par diffusion (figure 1.22), jusqu'à la création de deux régions distinctes, délimitées par un ménisque (figure 1.20.B).

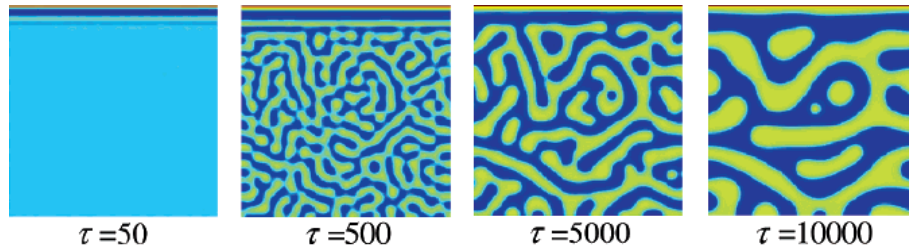


FIGURE 1.22 – *Evolution d'une décomposition spinodale (d'après (Yan et Xie, 2006))*

La séparation de phases liquide-liquide des protéines a particulièrement été étudiée chez la  $\gamma$ -cristalline (Thomson et coll., 1987; Broide et coll., 1991) et le lysozyme (Ishimoto et Tanaka, 1977; Taratuta et coll., 1990; Broide et coll., 1996; Tanaka et coll., 1997; Muschol et Rosenberger, 1997; Park et Bae, 2004; Shah et coll., 2004). Ces deux protéines possèdent des interactions attractives de courte portée, qui peuvent être favorisées par diminution de la température ou des répulsions électrostatiques (par addition de sel). Les deux techniques classiques pour la détermination de la ligne de coexistence liquide-liquide sont la diffusion de la lumière, permettant de mesurer la température d'apparition ( $T_{cloud}$ ) et de disparition ( $T_{clear}$ ) des gouttelettes de phase dense lorsque l'on refroidit, puis que l'on chauffe l'échantillon, et la mesure de concentration dans les deux phases après séparation totale à une température donnée.

Tanaka et coll. (Tanaka et coll., 1997) rapportent l'apparition d'agrégats ou de cristaux au niveau des gouttelettes de phase dense dans des solutions de lysozyme, montrant qu'elles sont dans un état métastable. Muschol et Rosenberger (Muschol et Rosenberger, 1997) montrent également que la cristallisation du lysozyme est favorisée après un passage dans la région de séparation liquide-liquide, puis retour au-dessus de la binodale.

Tout comme la courbe de solubilité, la ligne de coexistence liquide-liquide est sensible à la nature du sel (Broide et coll., 1996; Park et Bae, 2004).

### 1.4.3 Verres

Les verres sont des systèmes solides métastables dans lesquels la mobilité des particules est si lente que les mouvements ne sont plus détectables sur les temps de l'observation. Une transition vitreuse est généralement réalisée en refroidissant une solution de protéines ou de colloïdes sous sa température de cristallisation, tout en évitant la formation de cristaux.

Il a été montré qu'en augmentant la fraction volumique de dispersions colloïdales, une augmentation de la viscosité et une diminution de la mobilité se produisaient, conduisant au final à un état similaire à un verre obtenu par refroidissement (Trappe et coll., 2001). Les verres colloïdaux se répartissent en deux catégories, selon les interactions présentes : les

verres répulsifs et les verres attractifs. Les verres répulsifs se rencontrent par exemple dans le cas de sphères dures, où les seules interactions sont les répulsions de volume exclu. À une fraction volumique élevée ( $\Phi = 0,58$  pour des sphères dures), chaque particule se retrouve « bloquée » par ses voisines, du fait de leur proximité et de leurs répulsions. L'amplitude et la fréquence des mouvements des particules diminue alors fortement, générant un verre. En revanche, si les interactions entre particules possèdent une composante attractive significative, alors, à fraction volumique élevée, de nombreux liens s'établiront entre les particules et limiteront les mouvements. On sera alors en présence d'un verre attractif, généralement plus rigide qu'un verre répulsif. Dans le cas de particules chargées avec une composante additionnelle attractive, on aura un verre dit de Wigner (Sciortino et Tartaglia, 2005). Du fait des répulsions électrostatiques à longue portée, ce verre possède une densité assez faible (Bosse et Wilke, 1998). Les verres de Wigner peuvent être formés par l'assemblage de *clusters* formés par l'équilibre entre attraction à courte portée et répulsion à longue portée (voir section 1.4.5) (Sciortino et coll., 2004; Zaccarelli, 2007) .

Pour des particules possédant des interactions attractives à courte portée et répulsives de type sphères dures, on peut observer dans certains cas une « vitrification ré-entrante » en abaissant la température. À haute température, les attractions sont négligeables et les répulsions prédominent, ce qui amène à un verre de type répulsif, où les particules sont emprisonnées par leurs voisines. Quand la température est abaissée, des liaisons se forment entre les particules et conduisent à une hétérogénéité du système. Des « canaux » se forment entre les paquets de molécules, qui peuvent alors y diffuser sans être bloqués par les répulsions stériques. Le verre fond alors et redevient liquide. Enfin, lorsque la température est encore abaissée, les liaisons attractives deviennent suffisamment fortes et avec un temps de vie suffisamment long pour bloquer les mouvements de toutes les particules, ce qui produit un nouvel arrêt structural sous la forme d'un verre attractif (Pham et coll., 2002).

Des transitions vitreuses dues à la concentration ont été observées pour des solutions de protéines, comme la BSA (Brownsey et coll., 2003) et la  $\beta$ -lactoglobuline (Parker et coll., 2005).

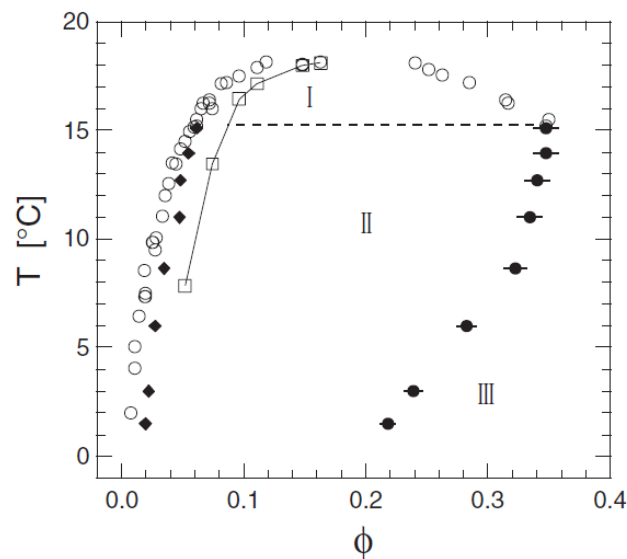
#### 1.4.4 Gels

Tout comme les verres, les gels sont caractérisés par un état arrêté et ne possèdent pas d'ordre particulier. Ils possèdent des caractéristiques propres aux liquides (faible densité, système non ordonné) et aux solides (ne coulent pas, possèdent une limite d'élasticité). (Zaccarelli, 2007). Les théories, dont celles de Flory (Flory, 1941) et de Stockmayer divergent sur le fait que la gélification soit ou non une transition thermodynamique. Cependant, les considérations discutables et les erreurs dans les approximations de Stockmayer

et d'Erukhimovich semblent indiquer que la théorie de Flory, selon laquelle la gélification n'est pas une transition thermodynamique, ni le gel une phase, est valable (Rubinstein et Dobrynin, 1999). Cependant, et même si les mécanismes et la nature de la gélification des colloïdes est toujours débattue, les verres et les gels sont de plus en plus souvent considérés comme étant liés.

Les gels colloïdaux peuvent être formés de deux façons : les gels colloïdaux dits « chimiques » sont formés par réaction chimique et impliquent des liaisons irréversibles, tandis que les gels colloïdaux dits « physiques » sont formés par des liaisons attractives réversibles (déplétion, hydrogène, hydrophobe...) et sont générés du fait de la concentration (Rubinstein et Dobrynin, 1999 ; Zaccarelli, 2007).

La gélification peut se faire par un chemin dit « hors-équilibre ». Chez les colloïdes et les protéines attractives, il existe une ligne d'arrêt dynamique située sous la spinodale liquide-liquide (Foffi et coll., 2005). En particulier, Cardinaux et coll. (Cardinaux et coll., 2007b) ont montré que si une solution de lysozyme (pH 7,8 et 0,5 M de NaCl) était refroidie fortement sous la spinodale liquide-liquide, la phase dense vitrifiait, tandis que la phase diluée restait liquide (figure 1.23), menant à une structure gélifiée de densité plus faible qu'un verre.



I : Séparation de phases liquide-liquide totale  
 II : Gel formé d'une phase diluée liquide et d'une phase dense vitrifiée  
 III : Verre

FIGURE 1.23 – Diagramme de phases du lysozyme à pH 7,8 (tampon Hepes 20mM) et 0,5 M de NaCl (d'après (Cardinaux et coll., 2007b))

S'il n'y a pas de séparation de phases, il peut y avoir gélification par un chemin dit « d'équilibre ». Dans ce cas, le système forme peu à peu un réseau stable, d'une manière continue.

Comme la transition se fait graduellement, la limite de gélification est généralement prise de façon arbitraire, par un minimum de viscosité (classiquement  $10^{13}$  poise= $10^{12}$  Pa.s) ou par un temps de vie minimal des liaisons (classiquement  $10^2$  s). En particulier, un mode de formation des gels fait intervenir la formation et la croissance d'agrégats (ou *clusters*) fractals, qui finissent par créer un réseau branché continu. Deux modes limites de formation de ces agrégats sont couramment cités : la *diffusion-limited cluster aggregation* (DLCA) et la *reaction-limited cluster aggregation* (RLCA). La DLCA concerne des colloïdes dont les interactions sont purement attractives et dont l'agrégation n'est limitée que par la vitesse de diffusion des particules. Elle est à l'origine de réseaux très aérés, avec une faible dimension fractale. Au contraire, la RLCA concerne des colloïdes dont les interactions à courte portée sont attractives, mais qui possèdent une composante répulsive jouant le rôle de barrière à l'association spontanée des particules. Les particules subissent donc de multiples tentatives avant de pouvoir se fixer à l'agrégat en croissance, donnant lieu à des structures plus compactes, à dimension fractale élevée (voir figure 1.24) (Lu et Weitz, 2013).

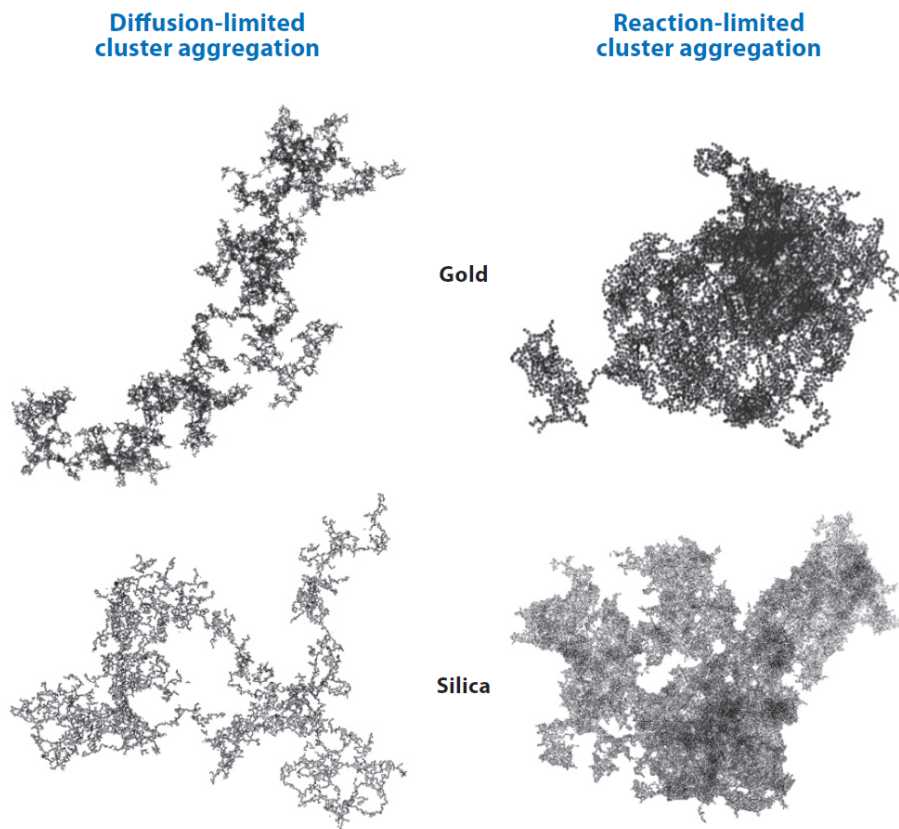


FIGURE 1.24 – Images, en microscopie électronique à transmission, de clusters typiques formés de particules d'or (haut) et de silice (bas), issus d'agrégation DLCA (gauche) ou RLCA (droite). Extrait de (Lu et Weitz, 2013).



### 1.4.5 Clusters dynamiques

La formation de *clusters* de taille finie par des particules dotées d'interactions attractives à courte portée (ex. déplétion) et répulsives à longue portée (ex. électrostatiques) a été étudiée pour les colloïdes (Groenewold et Kegel, 2001 ; Sciortino et coll., 2004 ; Stradner et coll., 2004). L'attraction favorise l'assemblage et produit une diminution de l'énergie de surface, qui est en retour contrebalancée par l'accumulation des charges dans le *cluster* et l'augmentation de son énergie électrostatique. Ainsi, les *clusters* ne peuvent croître indéfiniment.

L'existence de *clusters* dans les solutions de protéines a été longtemps débattue et le sujet n'est toujours pas clos. Des études menées par diffusion de neutrons et de rayons X aux petits angles sur des solutions concentrées de lysozyme (jusqu'à  $273 \text{ g L}^{-1}$ ) par Stradner et coll. (Stradner et coll., 2004 et 2006) ont mis en évidence la présence de *clusters* d'équilibre similaires à ceux rencontrés chez les colloïdes. Ces *clusters* sont formés par les attractions entre protéines et les répulsions électrostatiques causées par la charge nette de  $+8e$  du lysozyme à pH 7,8 et le faible écrantage (tampon HEPES 20 mM). L'équilibre de ces deux types d'interactions sont essentiels, comme le montrent l'absence de *clusters* dans les solutions de  $\gamma$ -cristalline possédant des interactions attractives mais une faible charge (Stradner et coll., 2005). La densité des *clusters* de lysozyme est constante et proche de 60%. En revanche, le nombre d'agrégation augmente avec la fraction volumique totale en protéine dans la solution. Diminuer la température ou augmenter la concentration en sel favorise l'attraction et augmente le nombre d'agrégation, avec un effet réversible de la température, ce qui pointe dans la direction de *clusters* d'équilibre. Cependant, s'il y a trop de sel, la longueur de Debye devient inférieure à la taille du *cluster* et l'énergie électrostatique ne peut plus contrebalancer l'énergie attractive : il y a alors agrégation irréversible et précipitation. Les travaux de Baglioni sur le cytochrome C (Baglioni et coll., 2004) ont eux aussi montré la présence de *clusters*, en présence de sel et à faible charge négative. Les caractéristiques de ces *clusters* étaient affectées par la nature de l'anion du sel employé (sulfate et chlorure donnant des *clusters* plus compact).

Les travaux de Stradner et coll. ont provoqué un large débat quant à la validité de leurs observations. En particulier, Liu et coll. (Liu et coll., 2005) ont réalisé des expériences de diffusion de neutrons sur des solutions de lysozyme et en ont conclu qu'une troisième force, une attraction à longue portée universelle chez les protéines, devait être ajoutée au modèle des *clusters* de lysozyme. Stradner et coll. (Stradner et coll., 2006) firent une réponse montrant que ces conclusions étaient basées sur un artéfact de manipulation, dû à la mauvaise solubilité du lysozyme dans le  $\text{D}_2\text{O}$ , employé par Liu et coll, et la formation d'agrégats dus au vieillissement de la solution. Liu et coll. (Liu et coll., 2006) répondirent en retour, nouveaux résultats à l'appui, que leurs observations n'étaient pas dues à un

phénomène de vieillissement, mais suggérèrent que les différences entre leurs résultats et ceux de Stradner et coll. provenaient des conditions utilisées : dans le cas de Stradner et coll. (pD 7,8), le tampon Hepes était susceptible d'écranter les charges du lysozyme, mais pas dans le cas de Liu et coll. (pD 5).

D'autre part, les travaux de Shukla et coll. (Shukla et coll., 2008a et 2008b), réalisés dans les mêmes conditions que Stradner et coll., ont montré la présence d'agrégats dans ces conditions et l'inadéquation d'un modèle de *clusters* à leurs résultats. Leur conclusion a été que les spectres obtenus montraient des solutions de monomères de lysozyme interagissant avec une attraction courte portée et une répulsion longue portée.

Porcar et coll. (Porcar et coll., 2009) se sont intéressés à la dynamique de ces *clusters* et ont conclu qu'ils n'étaient pas des *clusters* permanents mais des *clusters* transitoires, ou *clusters* dynamiques, à durée de vie courte et caractérisés par la mobilité de ses unités de base. De plus, Porcar et coll. concluent que la proportion de *clusters* augmente avec la concentration, et que les propriétés de la solution sont déterminées par les *clusters* sur des temps courts, mais par les monomères sur des temps longs.

Des simulations (Cardinaux et coll., 2007a et 2011 ; Kowalczyk et coll. 2011) ont de leur côté soutenu l'hypothèse des *clusters* dynamiques.

## 1.5 Les protéines à l'interface air/eau, une phase concentrée en 2D

Les propriétés amphiphiles des protéines leur confèrent la capacité à s'adsorber au niveau d'interfaces séparant un compartiment hydrophobe et un compartiment hydrophile, telles que les interfaces air/eau, eau/huile et eau/solide (Mezzenga et Fischer, 2013). A l'instar des surfactants, les protéines sont capables, par adsorption à ces interfaces, de former et de stabiliser des mousses et des émulsions. L'adsorption des protéines à une interface plane air/eau a en outre été largement étudiée comme modèle des mousses.

### 1.5.1 Formation de l'interface

Il a été montré que la formation d'un film de protéines à l'interface air-eau s'effectuait en quatre grandes étapes (Wierenga, 2005b ; Dickinson, 2011) (figure 1.25) :

- transport par diffusion ;
- adsorption à l'interface ;
- dépliement de la protéine ;
- saturation de la couche interfaciale et formation d'un réseau.

Comme toutes les molécules en solution, les protéines sont soumises à un mouvement Brownien. L'amplitude de ces mouvements est représenté par le coefficient de diffusion de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R_H} \quad (1.21)$$

avec  $D$  le coefficient de diffusion (en  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température (en K),  $\eta$  la viscosité du solvant (en Pa s) et  $R_H$  le rayon hydrodynamique de la particule (en m).

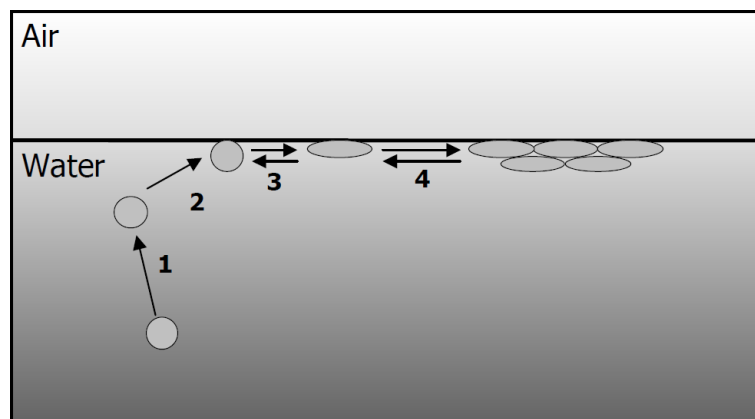


FIGURE 1.25 – Schéma présentant les quatre grandes étapes de la formation d'une couche interfaciale de protéines : transport par diffusion (1), adsorption (2), dépliement (3), saturation de la couche interfaciale et formation d'un réseau (4). Extrait de (Wierenga, 2005b)

Ward et Tordai (Ward et Tordai, 1946) ont proposé que les protéines s'adsorbent principalement par diffusion. La quantité de protéines adsorbées à l'interface au cours du temps était directement liée au coefficient de diffusion :

$$\frac{d\Gamma}{dt} = C \left( \frac{D}{\pi t} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (1.22)$$

avec  $\Gamma$  la pression de surface à l'instant  $t$  (en  $\text{mg m}^{-2}$ ),  $C$  la concentration de la protéine en solution (en  $\text{mg m}^{-3}$ ),  $D$  le coefficient de diffusion (en  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $k_B$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température (en K).

Cependant, plusieurs travaux (Benjamins et coll., 1975; Blank et coll., 1975; Graham et Phillips, 1979; de Feijter et Benjamins, 1987) ont les limites de ce modèle, et en particulier que la vitesse d'adsorption n'était égale à la vitesse de diffusion qu'aux stades

initiaux de l'adsorption. En effet, au-delà d'une pression de surface de 0,1 mN/m, le rapport  $\frac{\text{vitesse d'adsorption}}{\text{vitesse de diffusion}}$  devient de plus en plus faible au fur et à mesure que l'interface se recouvre de protéines (de Feijter et Benjamins, 1987). L'hypothèse d'une barrière énergétique freinant l'adsorption des protéines à l'interface fut traduit par MacRitchie et coll. (MacRitchie et Alexander, 1963) en une correction à la vitesse de diffusion :

$$\frac{d\Gamma}{dt} = K C \exp\left(\frac{-\Pi \Delta A}{k_B T}\right) \quad (1.23)$$

avec  $K$  la constante d'adsorption,  $\Pi$  la pression de surface (en  $\text{N m}^{-2}$ , voir la section 1.5.2) et  $\Delta A$  la surface nécessaire à une protéine pour accéder à l'interface (en  $\text{m}^2$ ). Cependant, Ter-Minassian-Saraga (Ter-Minassian-Saraga, 1981) a montré que le  $\Delta A$  nécessaire pour ajuster le modèle de MacRitchie était inférieur à la dimension de plusieurs protéines (Ter-Minassian-Saraga, 1981). D'autres auteurs ont en effet par la suite montré que cette barrière énergétique dépendait d'interactions directes entre la protéine et l'interface, composées à la fois de phénomènes hydrophobes et électrostatiques (Xu et Damodaran, 1992 ; Sengupta et coll., 1999).

Des études rapportent que les protéines, dont le lysozyme, subissent une réorganisation conformationnelle une fois adsorbées à l'interface (Yano et coll., 2009 ; Dickinson, 2011 ; Yano, 2012). Cependant, les avis diffèrent sur le caractère systématique d'un tel phénomène et son amplitude. La cinétique d'adsorption serait une des explications à ces différences (Wierenga et coll., 2006).

Enfin, les protéines établissent des liens entre elles via la formation de feuillets bêta intermoléculaires, ce qui confère à la couche interfaciale des propriétés rhéologiques propres à chaque type de protéine et qui sont susceptibles d'évoluer dans le temps (Dickinson, 2011).

## 1.5.2 Propriétés de l'interface

L'énergie libre dans un liquide à l'équilibre est minimale, du fait de l'arrangement optimal des molécules. Si ce liquide est en contact avec un autre corps avec lequel il est immiscible, alors une interface se créera, où les molécules de liquide seront dans un environnement différent. L'énergie libre du liquide augmentera alors.

On définit la tension de surface,  $\gamma$ , comme la dérivée de l'énergie libre de Helmholtz  $F$  par rapport à la surface  $A$  de l'interface, à température, volume et nombre de molécules constants (Cabane et Hénon, 2007) :

$$\gamma = \left( \frac{\partial F}{\partial A} \right)_{T,V,n} \quad (1.24)$$

Elle s'exprime en  $\text{N m}^{-1}$  ou  $\text{J m}^{-2}$ .

Les protéines, comme les surfactants, sont tensioactives : en s'adsorbant à l'interface, elles remplacent des molécules de solvant et diminuent donc l'énergie nécessaire à la création d'une surface plus grande. La tension de surface d'une interface contenant des protéines est donc plus faible que celle d'une interface de solvant pur.

On définit alors la pression superficielle d'une solution ( $\Pi$ ) comme la différence entre la tension de surface du solvant pur ( $\gamma^*$ ) et celle de la solution ( $\gamma$ ) (Atkins et De Paula, 2008) :

$$\Pi = \gamma^* - \gamma \quad (1.25)$$

La pression de surface exercée par une protéines dépend de sa nature (charge, hydrophobie...), de sa concentration en solution et des conditions physico-chimiques du milieu. Ces facteurs influencent également la quantité de matière adsorbée à l'interface, qui peut dans certains cas dépasser  $3 \text{ mg m}^{-2}$ , témoignant de la formation de multicouches. C'est en particulier le cas du lysozyme à pH 7 et faible force ionique (concentration de surface estimée à  $4,2 \text{ mg m}^{-2}$ ), tandis que dans les mêmes conditions, l'ovalbumine ne possède une concentration de surface que de  $2 \text{ mg m}^{-2}$  (Le Floch-Fouéré, 2008). Deux exemples de la variation de la quantité adsorbée et de la pression de surface générée par l'ovalbumine à l'interface air-eau, en fonction de sa concentration en solution et de sa charge sont présentées sur la figure 1.26.

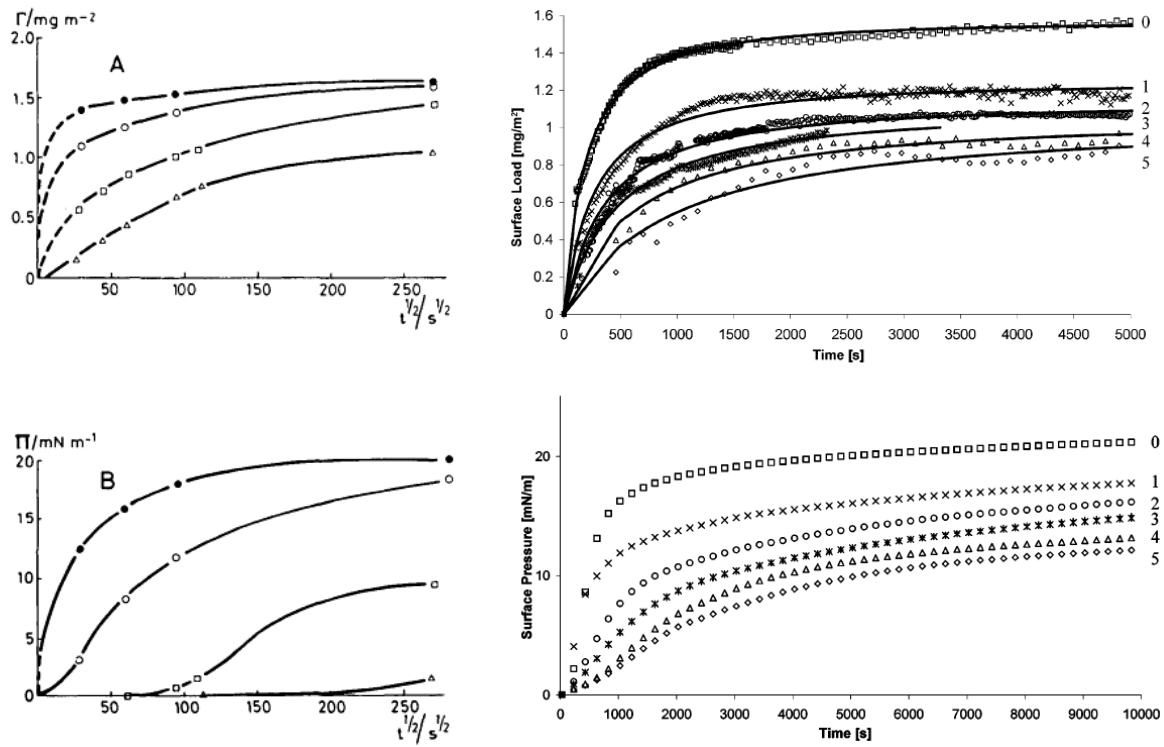


FIGURE 1.26 – Concentration (haut) et pression de surface pour des solutions d'ovalbumine dont la concentration (gauche, pH 6,4 et  $I = 20$  mM) ou la charge (droite, pH 7,  $I = 10$  mM) varient. Les concentrations sont, de la courbe la plus haute vers la plus basse :  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-1}$  % en termes massiques ; les charges nettes sont, de la courbe la plus haute vers la plus basse : -12 e, -18 e, -20 e, -22 e, -24 e et -26 e. Les figures sont extraites de (de Feijter et Benjamins, 1987) et (Wierenga et coll., 2005a)



# Chapitre 2

## Matériel et méthodes





## 2.1 Préparation des protéines

### 2.1.1 Lysozyme

La poudre de lysozyme a été fournie par la société LIOT (Annezin, France). Il s'agit d'une poudre de chlorhydrate de lysozyme (97 % de lysozyme, 3 % d'ions chlorure), obtenue par séchage par atomisation d'une solution concentrée ajustée à pH 3,5. Le stock initial a été réparti en fractions de 5 à 10 g dans des piluliers, qui ont été stockés à -20 °C.

### 2.1.2 Ovalbumine

#### 2.1.2.1 Préparation du blanc d'œuf démuçiné

L'ovalbumine a été purifiée à partir de blanc d'œuf en utilisant le protocole décrit par Croguennec et coll. (Croguennec et coll., 2000). Pour chaque session de purification, nous commençons par casser entre 10 et 12 œufs, dont nous séparons le blanc du jaune. Nous mesurons dans une éprouvette graduée le volume de blanc d'œuf obtenu, jusqu'à ce qu'à obtenir un volume d'environ 330 mL. Nous rajoutons ensuite deux fois ce volume en eau MilliQ au blanc d'œuf, puis nous le plaçons sous agitation et nous ajustons le pH à 6,00 avec du HCl 1 N. La solution était ensuite stockée en chambre froide (4 °C) sous agitation toute la nuit. Le lendemain, le pH de la solution était ré-ajusté à 6,00 avec du HCl 1 N, puis la solution était centrifugée à 2000xg, 5 °C pendant 3-4 minutes. Le surnageant était collecté et le pH était ajusté à 8,2 avec du NaOH 1 N, puis une nouvelle centrifugation était réalisée à 25900xg, 4 °C, pendant 20 minutes. Le surnageant (blanc d'œuf démuçiné) était collecté et pesé.

#### 2.1.2.2 Chromatographie préparative échangeuse d'anions

La chromatographie échangeuse d'anions est une technique de séparation reposant sur le principe des interactions électrostatiques. L'échantillon passe dans une colonne remplie par une résine chargée positivement, sur laquelle sont à l'origine fixés des contre-ions négatifs (figure 2.1). Les protéines chargées négativement vont remplacer ces contre-ions, qui ont une affinité moindre pour les groupements positifs de la résine, et être donc retenues. Ces protéines pourront ensuite être décrochées de la résine grâce au passage d'un éluant, contenant des contre-ions chargés négativement, qui se substitueront à leur tour à elles. Cette substitution dépend de l'affinité de la protéine pour la résine (fonction du pH utilisé et de son point isoélectrique), qui nécessitera une plus ou moins grande quantité d'ions pour la décrocher. En faisant graduellement augmenter la concentration en ions, on peut ainsi décrocher les protéines les unes après les autres et les séparer.

### Résine échangeuse d'anions (anionique) :

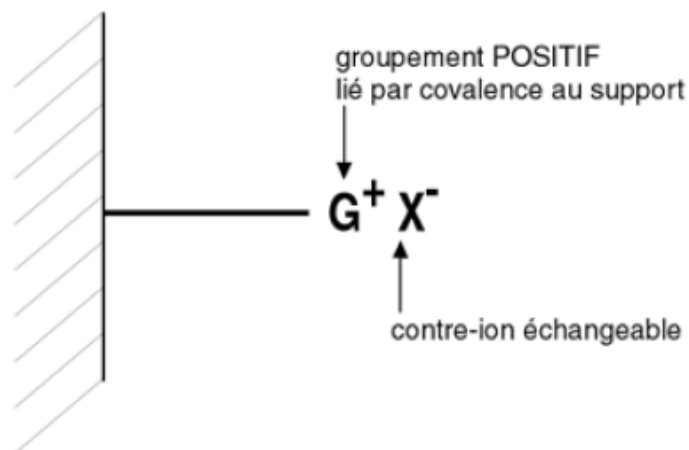


FIGURE 2.1 – Schéma de principe d'une résine échangeuse d'anions (extrait de (Le Floch-Fouéré, 2008))

La chromatographie était réalisée sur une colonne LRC de 50 x 200mm (Pall Life Sciences, Port Washington, USA), packée avec de la résine Q-Sépharose fast flow (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède) et montée sur une chaîne Varian PrepStar, équipée d'une cellule de détection UV 325 Dual Wavelength UV-Vis Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Dans notre cas, le contre-ion échangeable était le  $Cl^-$ , provenant du  $NaCl$ . Les protéines étaient détectées en sortie de colonne grâce à une cellule de détection UV, permettant de faire une mesure de densité optique à une longueur d'onde de 280 nm, correspondant au maximum d'adsorption pour les groupements tryptophanes et tyrosines (acides aminés aromatiques).

La cellule de détection UV générant une forte contre-pression qui causait le décrochement du bas de la colonne, les débits, et en particulier celui du chargement du blanc d'oeuf, plus visqueux, ont été réduits par rapport au protocole originel (Croguennec et coll., 2000). La colonne était préparée par passage de  $NaCl$  1 M pendant 30 minutes, à  $20\text{ mL min}^{-1}$ . Elle était ensuite rincée par passage d'eau osmosée à  $20\text{ mL min}^{-1}$ , pendant 30 minutes également. La cellule de détection était ensuite déconnectée afin de réduire au maximum la pression et l'échantillon, d'un volume de 900-1000 mL était injecté à  $15\text{ mL min}^{-1}$ . La colonne était ensuite rincée à l'eau osmosée à  $15\text{ mL min}^{-1}$  pendant 1 heure. Ainsi, les protéines chargées positivement (lysozyme, avidine), non retenues sur la colonne, étaient éliminées. En revanche, les protéines chargées négativement, dont l'ovalbumine, étaient retenues. La cellule de détection était ensuite raccordée à la sortie de la colonne, et nous vérifions que la pression n'excédait pas 5 bar. Nous pouvions alors monter le débit d'eau à  $20\text{ mL min}^{-1}$ , tout en vérifiant que la pression était toujours suffisamment basse. Lorsque

le signal à 280 nm était stable, le zéro était fait l'enregistrement était démarré (figure 2.2). Un premier palier d'éluion était effectué avec une solution à 0,035 M de NaCl, ce qui permettait le décrochement des protéines (dont l'ovotransferrine) chargées négativement mais avec une affinité moindre que celle de l'ovalbumine pour la résine. Après retour du signal détecté à la ligne de base, un second palier était effectué avec une solution à 0,14 M de NaCl, ce qui permettait l'éluion de l'ovalbumine. Pour obtenir une plus grande pureté, on ne collectait que la fraction correspondant à la partie haute du pic (de 15 AU en montant à 5 AU en redescendant). Enfin, le reste des protéines était éluée par passage d'une solution de NaCl à 1 M.

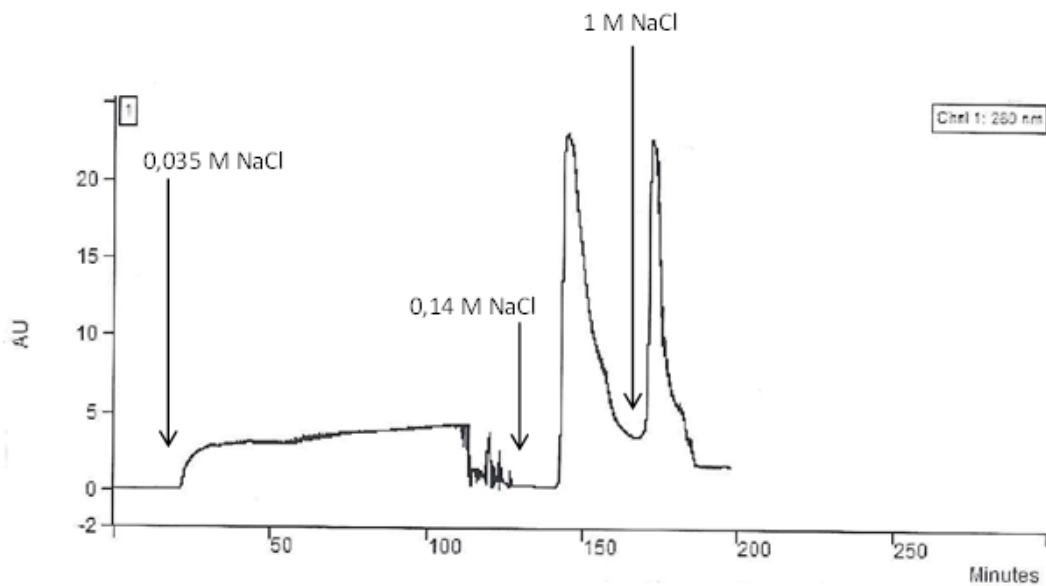


FIGURE 2.2 – *Chromatogramme-type obtenu lors de la purification d'ovalbumine à partir de blanc d'oeuf démuçiné*

### 2.1.2.3 Précipitation de l'ovalbumine et remise en solution des précipités

Nous ajoutons une masse de sulfate d'ammonium à la solution obtenue par chromatographie afin d'être à 75 % de saturation, à 10 °C et sous agitation. La solution était ensuite stockée en chambre froide à 4 °C.

### 2.1.2.4 Remise en solution des précipités et dialyse

Nous centrifugions nos précipités à 18600xg pendant 25 min à 4 °C. Nous récupérons ensuite les culots et nous les resolubilisons doucement avec un minimum d'eau milliQ, afin de ne pas trop diluer les protéines en vue de faciliter la dialyse qui suivrait.

La dialyse de la solution obtenue permettait d'éliminer la sulfate d'ammonium, encore présent en grande quantité. Nous utilisons pour cela des sacs de dialyse en cellulose avec un seuil de coupure 6-8 kDa de 8 cm de diamètre. Nous changions l'eau plusieurs fois par jour, sur 3 jours minimum. La solution était ensuite centrifugée pendant 50 min à 18600xg.

#### **2.1.2.5 Lyophilisation de l'ovalbumine**

La lyophilisation est un procédé de conservation par élimination d'eau, dont le principe repose sur la sublimation de la glace d'un produit préalablement congelé. Elle est particulièrement pertinente pour la conservation des protéines, qui sont très sensibles à la congélation. Nous placions la solution dans une barquette en plastique, que nous mettions dans une chambre de surgélation à -18 °C pendant 1 heure, ce qui permettait de congeler la solution sans abimer les protéines par la formation de cristaux de glace. La solution était ensuite lyophilisée durant toute la nuit.

## **2.2 Compression osmotique**

Les compressions osmotiques (Bonnet-Gonnet et coll., 1994; Mourchid et coll., 1995; Brownsey et coll., 2003; Parker et coll., 2005; Martin et coll., 2006; Vauthier et coll., 2008; Bouchoux et coll., 2009 et 2010) ont été réalisées selon le protocole de Bouchoux et coll. (Bouchoux et coll., 2010).

### **2.2.1 Principe**

Le principe de la méthode repose sur le phénomène d'osmose : soient deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable, laissant passer l'eau mais pas les solutés. Un déséquilibre des potentiels chimiques dans les deux compartiments (par exemple par présence du soluté d'un seul côté de la membrane) entraînera la migration spontanée de l'eau du compartiment dont le potentiel chimique est le plus fort, vers le compartiment dont le potentiel chimique est le plus faible, jusqu'à ce que l'équilibre soit rétabli. La pression osmotique est la force qu'il faudrait appliquer pour empêcher le passage de l'eau. Dans notre cas, nous avons utilisé des sacs de dialyse remplis d'une solution de protéines, que nous avons plongé dans une solution de polymère concentré. La pression osmotique induite par le polymère entraînait la migration de l'eau hors du sac de dialyse, et la concentration de la solution de protéines jusqu'à ce que l'équilibre des potentiels chimiques, et des pressions osmotiques, soit atteint (figure 2.3).

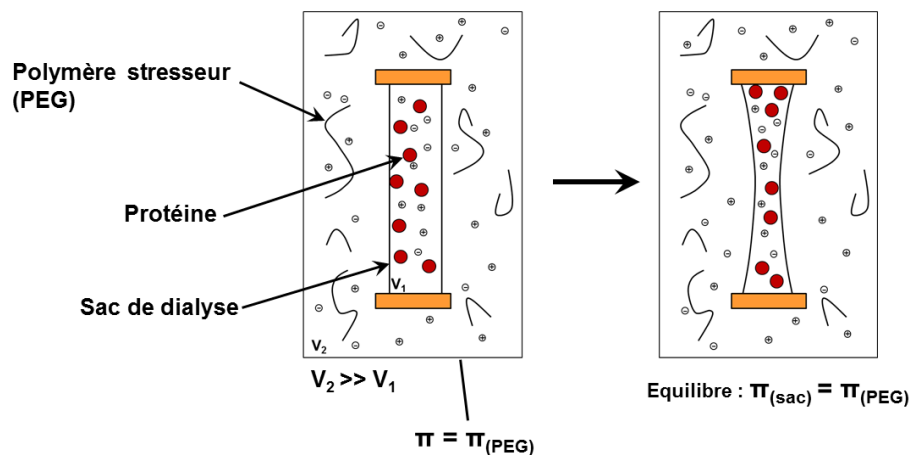


FIGURE 2.3 – Schéma du principe de la compression osmotique

## 2.2.2 Protocole expérimental

Nous commençons par préparer les solutions-tampon qui serviraient à faire les solutions de polymère. Les conditions utilisées pour les compressions osmotiques sont listées dans le tableau 2.1.

	pH 5 I = 20 mM	pH 9 I = 20 mM	pH 7 I = 20mM	pH 7 I = 35 mM	pH 7 I = 150 mM	pH 7 I = 2,02 M	pH 3,6 I = 2,02 M
Lysozyme		X	X	X	X	X	
Ovalbumine	X		X	X	X		X

TABLE 2.1 – Conditions physico-chimiques étudiées en compression osmotique pour le lysozyme et l'ovalbumine

Nous préparons pour cela des solutions-mères de bis-tris propane à  $0,113 \text{ mol L}^{-1}$  (solution A), de bis-tris propane à  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  (solution B) et d'acide acétique  $0,315 \text{ mol L}^{-1}$  (solution C), de tampon lactate de force ionique  $I = 200 \text{ mM}$  (solution D), de thiomersal à  $40 \text{ g L}^{-1}$  (solution E) et de NaCl à  $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0,13 \text{ mol L}^{-1}$  et  $2 \text{ mol L}^{-1}$  (solutions F, G, H). Le tampon lactate de force ionique  $200 \text{ mM}$  (solution D) était préparé en mélangeant du lactate de sodium à  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  et de l'acide lactique à  $0,27 \text{ mol L}^{-1}$ .

Le bis-tris propane (1,3-Bis[tris(hydroxyméthyl)méthylamino]propane), le lactate de sodium et le thiomersal (éthylmercurithiosalicylate de sodium) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Le NaCl et l'acide lactique ont été fournis par VWR Chemicals (Radnor, USA), l'acide acétique glacial par Merck (Darmstadt, Allemagne).

Les solutions étaient préparées comme il suit, en quantités pour 1 L total :

- 100 mL de solution A, B, C ou D selon le pH désiré (pH 7 pour A, pH 9 pour B, pH 5 pour C, pH 3,6 pour D). Cela représente une force ionique de 20 mM.

- 5 mL de solution E. Le thiomersal était utilisé comme agent antimicrobien du fait de la longue durée de nos expériences (plusieurs semaines).

- Si la force ionique totale est supérieure à 20 mM : 100 mL de solution F, G ou H selon la force ionique désirée. La force ionique imposée par le NaCl est égale à sa concentration.

La valeur de pH de 7 a été choisie afin d'avoir une charge nette théorique comparable en valeur absolue pour les deux protéines : +8 e pour le lysozyme, -10 e pour l'ovalbumine. Les deux autres pH ont été choisis afin d'avoir des conditions où la charge nette en valeur absolue était plus faible qu'à pH 7 : à pH 9, le lysozyme porte une charge nette de +6 e, tandis qu'à pH 5, l'ovalbumine porte une charge nette de -3 e. Les charges des deux protéines à différents pH, présentées sur la figure 2.4, ont été calculées grâce au programme PropKa (Li et coll., 2005), qui prend en compte l'impact de la structure tridimensionnelle de la protéine sur le déplacement des  $pK_a$  des résidus.

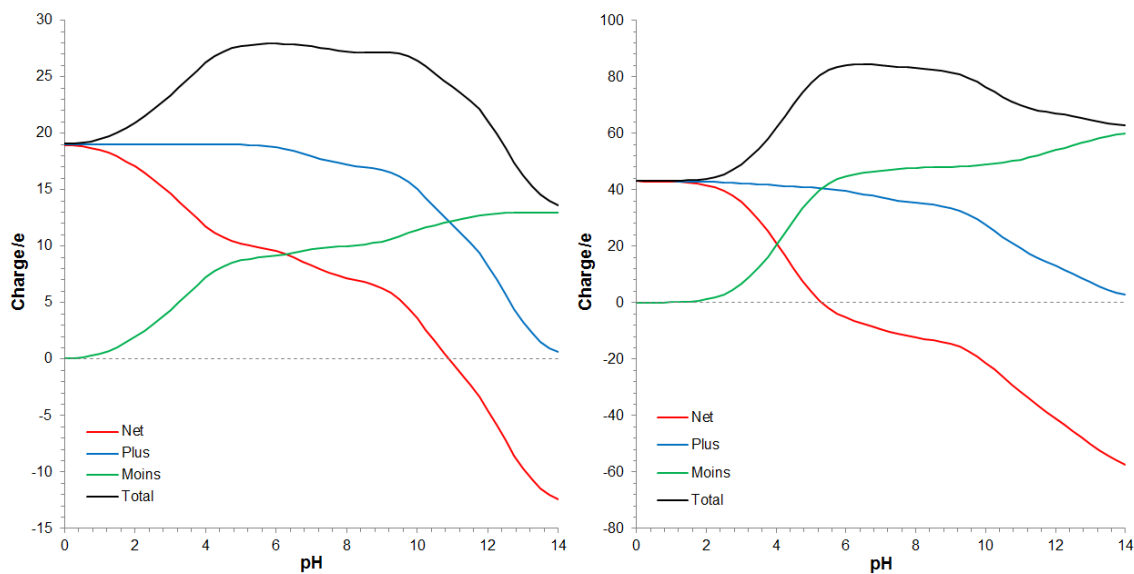


FIGURE 2.4 – Nombre de charges net (rouge), de charges positives (bleu), de charges négatives (vert) et nombre total de charges (noir) du lysozyme (gauche) et de l'ovalbumine (droite) en fonction du pH, calculées grâce au programme PropKa (Li et coll., 2005)

Les valeurs de force ionique choisies permettaient de faire varier la longueur de Debye sur une décade, de 2,13 nm pour 20 mM de force ionique à 0,21 nm pour 2,02 M de force ionique (figure 2.5).

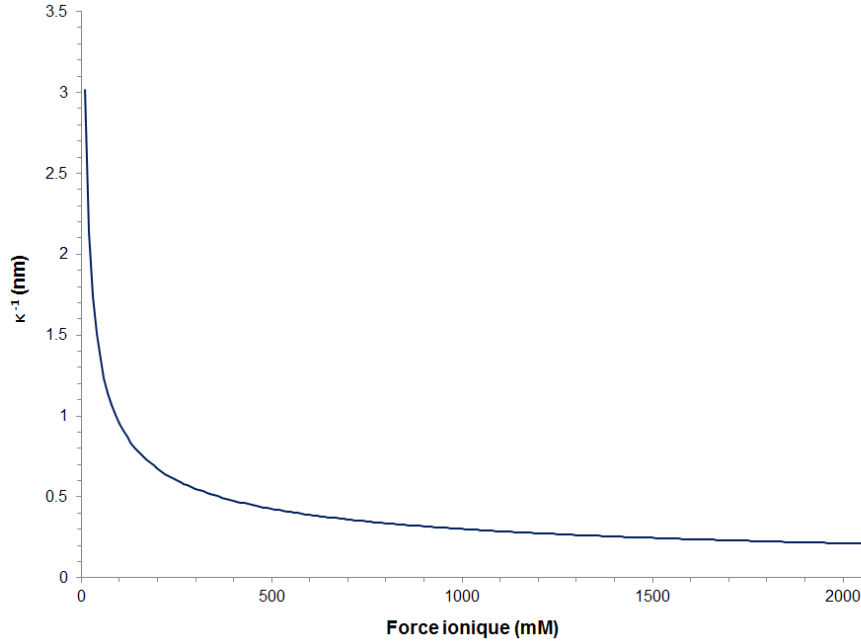


FIGURE 2.5 – Longueur de Debye en nm, en fonction de la force ionique du milieu

Les solutions de polymère, constituées de polyéthylène glycol (PEG) d'un poids moléculaire de 20 000 g mol<sup>-1</sup> (PEG 20 000) et du tampon désiré, étaient préparées directement dans des flacons de 500 mL, stockés durant toute la durée des expériences dans une pièce climatisée à 20 °C. Le PEG 20 000 a été fourni par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). La relation entre fraction massique de PEG 20 000 et pression osmotique a été déterminée à partir des travaux de Cohen et coll. (Cohen et coll., 2009) :

$$\Pi N^{\frac{9}{5}} = \frac{RT}{M_m \bar{v}} \left[ \left( \frac{C}{C_N^*} \right) + \alpha \left( \frac{C}{C_N^*} \right)^{\frac{9}{4}} \right] \quad (2.1)$$

avec  $\Pi$  la pression osmotique,  $N$  le nombre de monomères du PEG 20 000,  $M_m$  la masse d'un monomère de PEG 20 000 (44 Da),  $\bar{v}$  le volume spécifique partiel du PEG (0,825 mL g<sup>-1</sup>),  $C$  la concentration massique en PEG 20 000,  $\alpha$  « l'indice de recouvrement » (0,49) et  $C_N^*$  une concentration caractéristique du passage d'un régime dilué à semi-dilué définie comme :

$$C_N^* = \frac{N^{-\frac{4}{5}}}{\bar{v}} \quad (2.2)$$

La masse molaire réelle du PEG 20 000 a été déterminée à 17 100 Da par chromatographie d'exclusion stérique par Li et coll. (Li et coll., 2014). Le nombre de monomères  $N$  est donc égal à  $N = \frac{17100}{44} \sim 388,6$ .



Les solutions de PEG ont été préparées pour imposer 32 pressions différentes variant entre 0,04 bar et 44,3 bar.

Les sacs de dialyse étaient composés de membrane SpectraPor de seuil de coupure 6-8 kDa, diamètre 6,4 mm, volume/longueur = 0,32 mL cm<sup>-1</sup> (SpectrumLabs, Rancho Dominguez, USA). Cette membrane laisse passer l'eau et les ions, mais pas les deux protéines étudiées. Pour chaque échantillon, nous coupons un sac de dialyse de longueur 10 cm, que nous laissons tremper dans de l'eau MilliQ pendant 30 minutes minimum, de façon à le rincer et à assouplir la membrane.

Les sacs étaient ensuite remplis d'une solution de protéines, préparée dans de l'eau MilliQ, de concentration 50 g L<sup>-1</sup>, sauf pour les échantillons destinés à 0,05 bar ou 0,14 bar de pression osmotique. En effet, la concentration finale dans ces échantillons après compression était inférieure à 50 g L<sup>-1</sup>. Afin d'éviter l'éclatement des sacs par entrée d'eau, nous utilisons donc des solutions à 10 g L<sup>-1</sup> pour le lysozyme et à 20 g L<sup>-1</sup> pour l'ovalbumine.

Après le premier remplissage, chaque sac était plongé durant une semaine dans un flacon contenant une solution de PEG 20 000 imposant une pression de 1,3 bar, pour les échantillons destinés à aller à une pression supérieure. Ainsi, cette première semaine servait de « palier » afin d'éviter la compression directe à une pression osmotique élevée et une concentration trop brutale. Les échantillons destinés à des pressions finales inférieures à 1,3 bar étaient en revanche directement soumis à leur pression de consigne. Les sacs perdant du volume par sortie d'eau, ils étaient régulièrement sortis de la solution de PEG 20 000, soigneusement rincés à l'eau osmosée, ouverts et re-remplis avec de la solution-mère de protéines, puis replacés dans la solution de PEG 20 000.

A la fin de la première semaine de compression, les sacs de dialyse étaient transférés dans une solution neuve de PEG 20 000, à la pression osmotique finale désirée. Ils étaient alors soumis à compression osmotique, en étant régulièrement re-remplis, durant deux semaines.

A la fin des trois premières semaines, la solution concentrée de protéines contenue dans chaque sac devait avoir un poids compris entre 1 et 2 g, afin de pouvoir être analysée par la suite par mesure d'extrait sec total (section 2.3). Les sacs étaient alors transférés dans une solution neuve de PEG 20 000 à pression osmotique de consigne, puis laissés pour équilibration durant une semaine, sans re-remplissage ni autre manipulation.

## 2.3 Mesure d'extrait sec total

Cette technique a été utilisée afin de déterminer la concentration en protéine dans les solutions obtenues après compression.

Nous utilisons des capsules à fond plat (environ 60 mm de diamètre, 25 mm de hauteur), en acier inoxydable, munies d'un couvercle métallique amovible. Nous versons environ 25 g de sable de Fontainebleau dans chacune d'elles à l'aide d'un doseur, puis nous les laissons à l'étuve à 102 °C, couvercles posés à côté, pendant au moins une heure. De courtes baguettes de verre, une par capsule, étaient également mises à l'étuve.

Nous remettons les couvercles sur les capsules, puis nous les sortons de l'étuve et les plaçons immédiatement dans un dessiccateur muni de gel de silice récemment déshydraté, duquel nous éliminons ensuite l'air à l'aide d'une pompe à vide. Les capsules et les baguettes en verre étaient laissés à refroidir à température ambiante au moins 45 minutes. A l'issue du refroidissement, chaque capsule était sortie du dessiccateur et pesée sur une balance de précision à 0,1 mg près, couvercle fermé et baguette en verre posée sur le couvercle (masse  $m_1$ , en g). L'échantillon était ensuite versé rapidement sur le sable de la capsule, puis le couvercle était refermé et le tout (capsule, couvercle, échantillon, baguette en verre) était pesé à nouveau (masse  $m_2$ , en g). Pour les échantillons liquides, le bout du sac de dialyse était découpé au bistouri et l'échantillon sorti par pression sur le sac. Pour les échantillons solides, le sac devait être ouvert sur toute sa longueur au bistouri, et l'échantillon sorti délicatement. Après la pesée, l'échantillon était homogénéisé soigneusement avec le sable. La baguette était ensuite mise dans la capsule et le couvercle refermé. Les capsules étaient ensuite mises à l'étuve à 102 °C, couvercle posé à côté, pour toute la nuit.

Le lendemain, nous replaçons les couvercles sur les capsules, puis nous les sortons de l'étuve et les plaçons immédiatement dans un dessiccateur, duquel nous éliminons ensuite l'air à l'aide d'une pompe à vide. Les capsules étaient laissés à refroidir à température ambiante au moins 45 minutes. Enfin, nous pesons chaque capsule sur la même balance de précision que précédemment (masse  $m_3$ , en g).

Soient :

$$m_{éch\ ini} = m_2 - m_1 \quad (2.3)$$

$$m_s = m_3 - m_1 \quad (2.4)$$

$$m_{eau} = m_{éch\ ini} - m_s \quad (2.5)$$

La différence entre la masse initiale de l'échantillon,  $m_{éch\ ini}$  et la masse d'eau perdue,  $m_{eau}$ , nous donne le poids de matière sèche ( $m_s$ ) contenue dans l'échantillon.

Le solvant initialement contenu dans l'échantillon était composé d'eau et de solutés autres

que la protéine (tampon, sels). Soit  $V$  le volume de solvant contenu initialement dans l'échantillon,  $V_e$  le volume d'eau et  $V_i$ ,  $c_i$  et  $\rho_i$  le volume, la concentration massique et la densité du soluté  $i$  (autre que la protéine), respectivement. Alors :

$$V = V_e + \sum_i V_i = V_e + \sum_i \frac{c_i V}{\rho_i} = V \left( 1 - \sum_i \frac{c_i}{\rho_i} \right) \quad (2.6)$$

La fraction volumique d'eau dans le solvant était alors :

$$\Phi_e = 1 - \sum_i \frac{c_i}{\rho_i} \quad (2.7)$$

Les masses de solutés  $m_i$  dans le volume  $V$  de solvant étaient donc :

$$m_i = c_i V = \frac{c_i V_e}{\Phi_e} = \frac{c_i m_e}{\Phi_e \rho_e} \quad (2.8)$$

La masse  $m_p$  de protéine était donc :

$$m_p = m_s - \frac{m_e}{\Phi_e \rho_e} \sum_i c_i \quad (2.9)$$

Soit  $\bar{v}_p$  le volume spécifique partiel de la protéine, sa concentration massique  $c_p$  était donc :

$$c_p = \frac{m_p}{V + V_p} = \frac{m_p}{\frac{m_e}{\Phi_e \rho_e} + m_p \bar{v}_p} \quad (2.10)$$

La fraction volumique en protéine dans l'échantillon initial était donc :

$$\Phi_p = c_p \bar{v}_p \quad (2.11)$$

## 2.4 Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

### 2.4.1 Principe et notions

La diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering, ou SAXS) est une technique permettant d'obtenir des informations notamment sur la structure d'une solution et les formes et dimensions des molécules, grâce à des angles de diffusion faibles

(0,1 à 3 °). Un faisceau monochromatique de rayons X frappe l'échantillon et est diffracté selon les caractéristiques de la solution (figure 2.6).

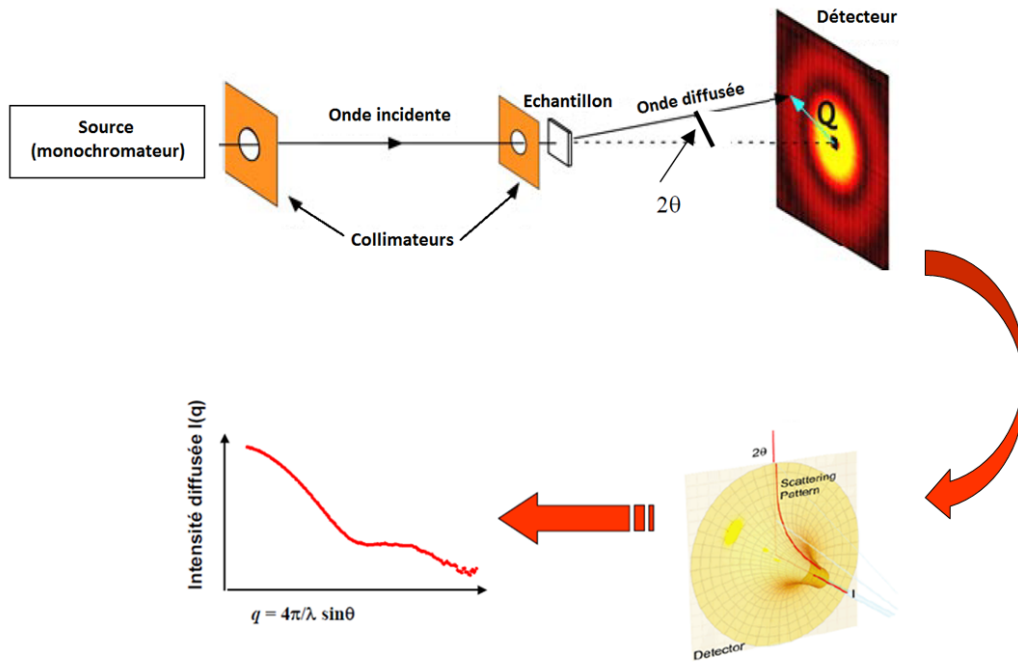


FIGURE 2.6 – Principe général de la diffusion des rayons X aux petits angles

Le diagramme de diffraction correspondant est alors enregistré par un détecteur bidimensionnel, installé dans une chambre sous vide, et converti en un signal d'intensité en fonction du vecteur de diffusion. Le vecteur de diffusion, en  $\text{\AA}^{-1}$  se définit en fonction de l'angle de diffraction  $2\theta$  (figure 2.7) et de la longueur d'onde  $\lambda$  du rayon incident :

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (2.12)$$

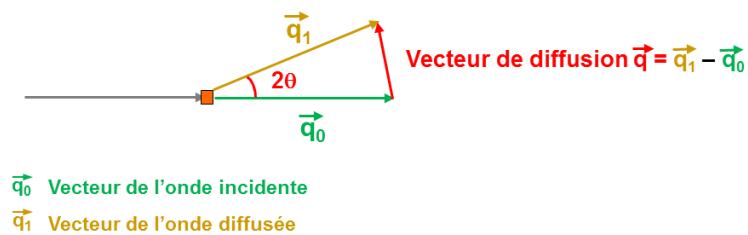


FIGURE 2.7 – Vecteur de diffusion

L'intensité  $I(q)$  peut classiquement être écrite comme le produit du facteur de forme  $P(q)$ , donnant des informations sur les formes et dimensions sur les molécules, du facteur

de structure  $S(q)$ , renseignant sur la structure de la solution et les interactions entre molécules, et une constante (figure 2.8) :

$$I(q) = n \Delta\rho^2 V^2 P(q) S(q) \quad (2.13)$$

avec  $n$  la densité numérique des particules,  $\Delta\rho^2$  le facteur de contraste et  $V$  le volume d'une particule.

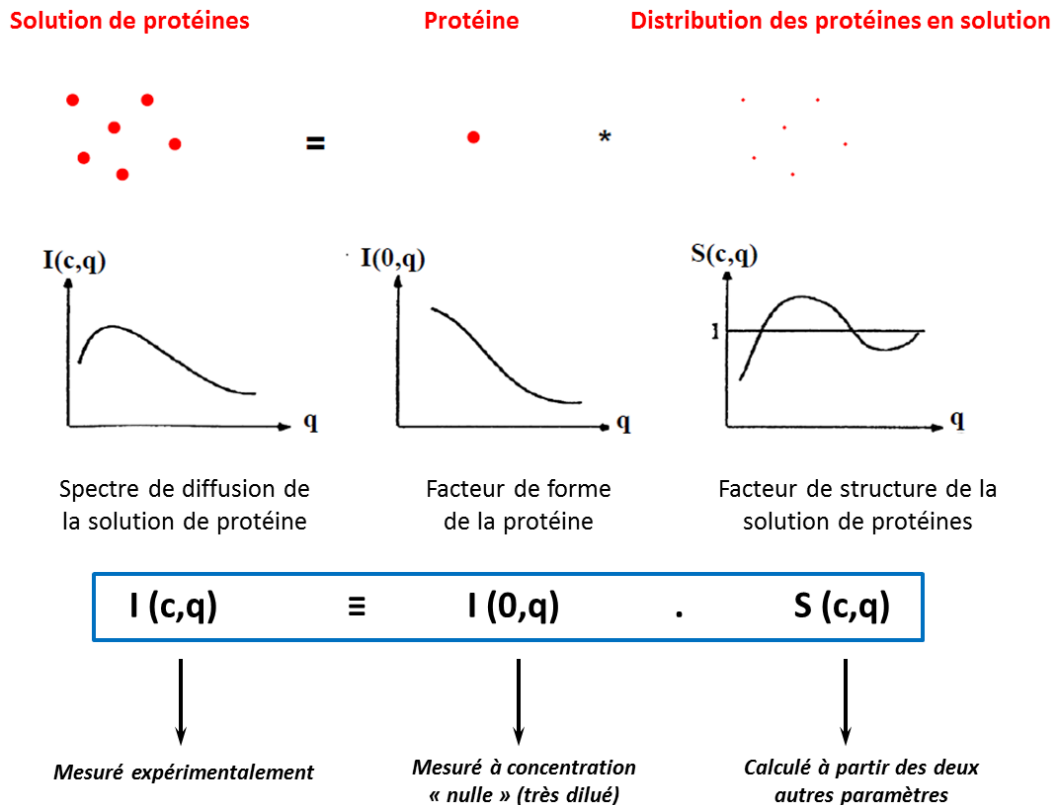


FIGURE 2.8 – Décomposition de l'intensité brute en facteurs de forme et de structure

avec  $n$  la densité numérique des particules,  $\Delta\rho$  le facteur de contraste et  $V$  le volume d'une particule. Le facteur de forme est obtenu à concentration « nulle » (approximée par des concentrations très faibles dans la pratique), où les interactions sont considérées comme inexistantes, ce qui implique un facteur de structure  $S(q) = 1$ .

Le facteur de structure, quand à lui, permet en particulier de remonter aux distances caractéristiques ( $d$ ) de la structure de la solution et des molécules, grâce à l'équation :

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (2.14)$$

## 2.4.2 Méthode expérimentale

Les expériences de SAXS ont été réalisées sur la ligne SWING du synchrotron SOLEIL, à Gif-sur-Yvette (France).

La longueur d'onde utilisée était de  $\lambda = 1,0332 \text{ \AA}$  et l'énergie de  $E = 12,00 \text{ keV}$ . Nous avons utilisé une distance de détecteur de 1,5885 m pour les échantillons « dilués » (1 à 10  $\text{g L}^{-1}$ ) et de 5,130 et 1,130 m pour les échantillons « concentrés » (pression osmotique supérieure à 1,3 bar). La gamme de  $q$  couverte au total s'étend d'environ  $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$  à  $0,99 \text{ \AA}^{-1}$  (donnant donc accès à des distances de  $6,35 \text{ \AA}^{-1}$  à  $0,35 \text{ nm}$ ).

Les échantillons « dilués » ont été réalisés pour chaque condition en mélangeant directement de la protéine avec du tampon, afin d'obtenir les concentrations de 1, 2, 4, 6, 8 et 10  $\text{g L}^{-1}$ . Ces échantillons étaient destinés à permettre d'obtenir le facteur de forme des deux protéines dans chaque condition, par extrapolation à concentration nulle, ainsi qu'à observer les changements potentiels du rayon de giration ( $R_g$ ) en fonction du pH et de la force ionique. Ces échantillons, ainsi que les tampons purs destinés à servir de référence, étaient tous passés dans le même capillaire de quartz. Une mesure de tampon était effectuée entre chaque couple de mesures sur les échantillons de protéines.

Les échantillons « concentrés », obtenus par compression osmotique, ont été disposés dans des puits de 3 mm de diamètre d'un passeur en téflon (15 puits par passeur). Les puits étaient ensuite fermés par une feuille de Kapton (film de polyimide) et le tout maintenu par deux plaques métalliques percées de trous au niveau des puits, serrées par des vis. Chaque mesure était constituée d'un ensemble d'images, ou *frames*, prises à intervalles réguliers au cours de l'irradiation.

## 2.4.3 Traitement des résultats

### 2.4.3.1 Facteurs de forme

Les dégâts d'irradiation constatés sur les protéines des solutions « diluées » faisant dériver le signal (figure 2.9), plusieurs méthodes ont été testées afin de nettoyer le signal en vue de l'obtention d'un facteur de forme correct.

Finalement, pour chaque mesure  $N$  d'échantillon, nous avons décidé que le spectre d'intensité brute serait égal à la moyenne entre : la soustraction de la première *frame* de la mesure ( $N+1$ ) du tampon à la dernière *frame* de la mesure  $N$  de l'échantillon et la soustraction de la dernière *frame* de la mesure ( $N-1$ ) du tampon à la première *frame* de la mesure  $N$  de l'échantillon.

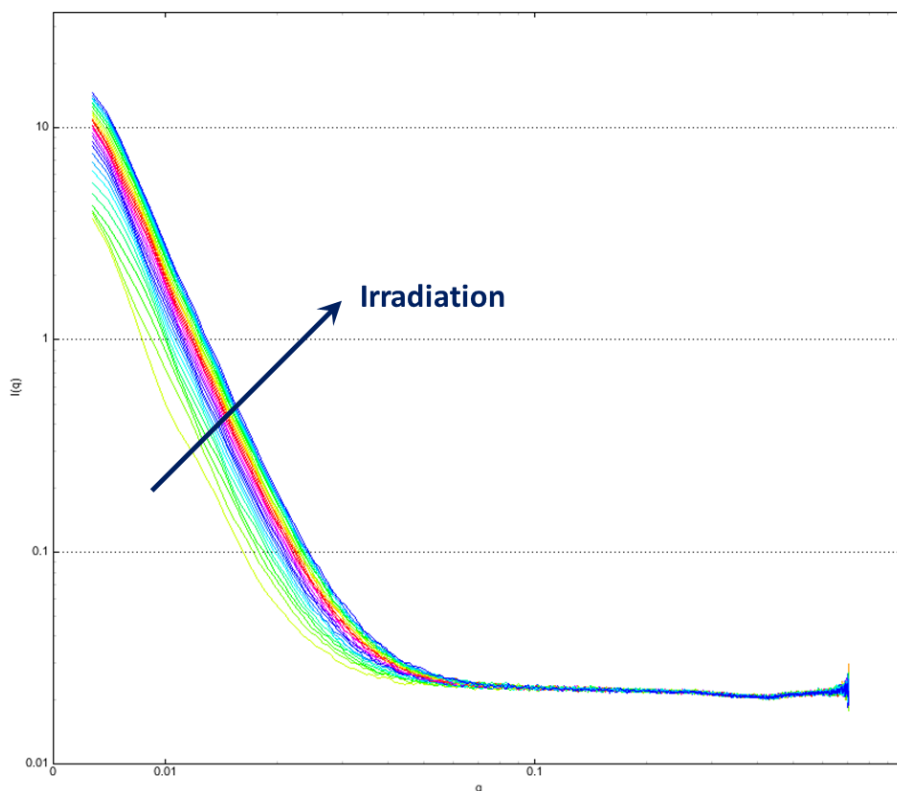


FIGURE 2.9 – Exemple de dérive de signal due aux dégâts d’irradiation, obtenu sur du tampon bis-tris propane à pH 9 et 20 mM de force ionique

La correction a ensuite été affinée grâce au logiciel CRY SOL version 2.8 (Svergun et coll., 1995), qui nous a permis de fitter les courbes obtenues avec un facteur de forme calculé à partir de la structure de chaque protéine. Les fits retournés par Crysol ont été utilisés comme facteurs de forme dans la suite des travaux. Les échantillons dilués d’ovalbumine à pH5 et 20mM n’ayant pas pu être analysés en SAXS, le facteur de forme utilisé pour la division de l’intensité des échantillons concentrés dans ces conditions a été celui de pH7, 20mM.

### 2.4.3.2 Rayons de giration

Les rayons de giration ( $R_g$ ) ont été déterminés grâce au logiciel PRIMUS (Konarev et coll., 2003), sur les facteurs de forme obtenus précédemment, grâce à l’équation de Guinier (applicable si  $q R_g < 1$ ) :

$$I(q) = I(0) \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (2.15)$$

d’où :

$$\ln(I(q)) = \left(\frac{-R_g^2}{3}\right) q^2 + \ln(I(0))$$

Le tracé de  $\ln(I(q))$  en fonction de  $q^2$  nous donnait, à travers la pente, la valeur du rayon de giration  $R_g$  :

$$R_g = \sqrt{-3 \text{ pente}}$$

Les rayons de giration ont été déterminés sur les facteurs de forme obtenus pour les solutions à  $4 \text{ g L}^{-1}$ . En effet, les facteurs de forme obtenus pour les échantillons à  $10 \text{ g L}^{-1}$  donnaient des valeurs de rayon de giration faibles, ce qui pouvait laisser penser que la concentration était trop élevée. D'autre part, le bord du plateau à faibles  $q$  n'étant pas bien marqué pour 1 et 2  $\text{g L}^{-1}$ , la détermination d'un  $R_g$  était impossible.

### 2.4.3.3 Facteurs de structure

Les solutions concentrées n'ont pas subi de dégâts d'irradiation, du fait d'un taux d'humidité plus faible. Le spectre d'intensité brute pour chaque échantillon était donc simplement obtenu en faisant la moyenne des *frames*.

Les spectres d'intensité brute obtenus à une distance de détecteur de 5,130 et 1,130 m, s'étendant sur des gammes de  $q$  complémentaires, ont été raccordés grâce au logiciel Primus. Puis, chaque spectre d'intensité a été divisée par le facteur de forme correspondant, grâce au logiciel R (R Development Core Team, 2008). Pour cela, nous avons créé la fonction suivante sur R, intégrant les tableaux de données de l'intensité de l'échantillon concentré (gel01) et du facteur de forme (forme01) :

```
> structure<-function(gel01,forme01,cst=0){
# la fonction a besoin des données gel et f.forme; la constante par défaut est 0 (si non
entrée manuellement)
interpol<-spline(forme01,xout=gel01[,1])
# on fait l'interpolation sur le facteur de forme avec les abscisses de gel01
gelcorr<-data.frame(gel01[,1],gel01[,2]-cst)
# on ôte la constante des valeurs gel01
struct<-data.frame(gel01[,1],gelcorr[,2]/interpol$y)
# division de gel01 par forme01
plot(struct,ty="l",log="xy")
```



```
# on trace la figure (optionnel)
invisible(list(x=struct[,1],y=struct[,2])) }
```

```
# les valeurs de sortie sont x et y, mais ne sont pas affichés
```

Cependant, un facteur de structure doit tendre vers 1 à très grands  $q$ , ce que nous n'obtenions pas par la simple division de l'intensité par le facteur de forme (figure 2.10), car la partie de l'intensité due à l'eau de l'échantillon « concentré » n'avait pas été soustraite.

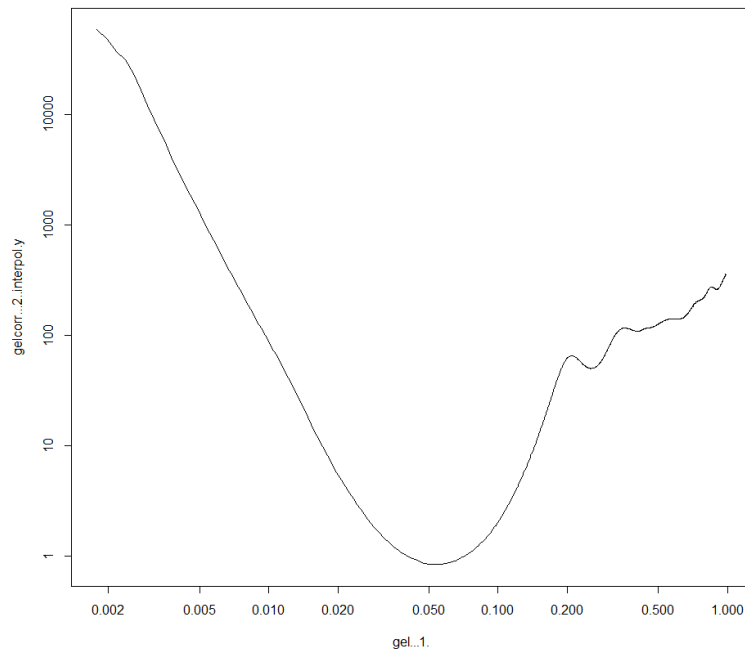


FIGURE 2.10 – Exemple de facteur de structure obtenu par simple division de l'intensité brute par le facteur de forme, sans soustraction du « background »

Pour figurer l'eau, nous avons décidé de soustraire une constante (« background ») à l'intensité avant de la diviser par le facteur de forme, la calculant grâce au logiciel R de façon à obtenir une tendance plane à très grands  $q$ . Chaque courbe d'intensité a été traitée comme il suit :

```
> plot(essai<-structure(gel01,forme01),ty="l",log="xy")
```

```
# création d'un objet « essai » correspondant au facteur de forme sans correction, tracé en coordonnées log-log
```

```
> identify(essai$x,essai$y)
```

```
# identification, dans le tableau de données, de l'intervalle (noté « intv » par la suite) où avait lieu la montée à grands  $q$  que l'on désirait supprimer
```

```
> abline(essai.lin<-lm(log10(essai$y)~log10(essai$x),subset=intv))
```

```

# régression linéaire sur l'intervalle choisi, afin d'avoir la tendance de la courbe
> f.lin<-function(background,donnees,forme,intervalle){
# fonction calculant le background à utiliser pour que la pente de la droite de régression
linéaire soit égale à 0 (tendance générale horizontale à grands  $q$ ) ??????????
facstruct<-structure(donnees,forme,background)
# on applique la fonction structure et on récupère les données de sortie dans facstruct
modele<-lm(log10(facstruct$y)~log10(facstruct$x),subset=intervalle)
# même principe qu'avec ablne précédemment
abs(coef(modele)[2])
# ce que la fonction ressort, c'est la valeur absolue de la pente de la droite de régression
linéaire (on la veut minimale); coef fait référence au vecteur donné par lm, avec b en 1e
position et a en 2e, pour une équation  $y=ax+b$ .
}
> essai.lin<-optimise(f.lin,interval=c(0,.1),donnees=gel01,forme=forme01,
intervalle=intv)
# la fonction optimise a besoin de ce qu'il faut minimiser (la valeur absolue de la pente
retournée par la fonction f.lin, l'intervalle du premier terme de f.lin (ici le background),
et les valeurs entrées dans f.lin, dans le même ordre que dans la fonction)
Les facteurs de structure ainsi obtenus (figure 2.11) ont ensuite été normalisés par division
d'une constante, de façon à ce que la valeur moyenne à grands  $q$  soit similaire pour toutes
les courbes.

```

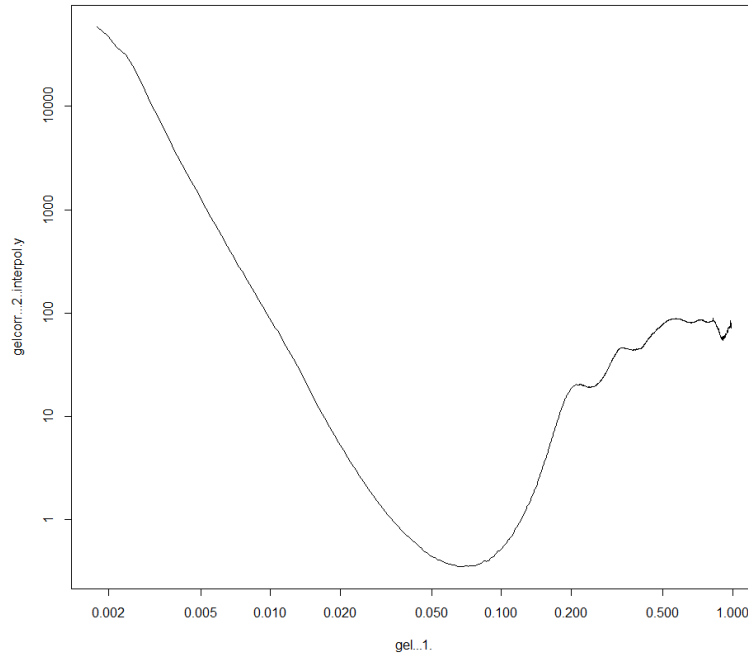


FIGURE 2.11 – Facteur de structure précédemment présenté sur la figure 2.10, après soustraction du « background »

#### 2.4.3.4 Analyse des spectres de cristaux

Les pics de Bragg obtenus sur quelques spectres de diffraction des rayons X ont été analysés en utilisant le programme libre Fityk (Wojdyr, 2010). Ce programme permet, grâce à son module dédié à l'analyse des spectres de poudre, de tester la correspondance entre les emplacements des pics expérimentaux et ceux de pics théoriques calculés pour un système cristallin de groupe d'espace et de paramètres de maille initiaux définis par l'utilisateur. Les paramètres de maille sont ensuite affinés par le programme en utilisant la méthode de Pawley (Pawley, 1981) et une optimisation impliquant un algorithme de Levenberg-Marquardt. Les caractéristiques des groupes d'espace cristallins utilisés par le programme sont issus de la Computational Crystallography Toolbox (Grosse-Kunstleve et coll., 2002).

## 2.5 Microscopie

### 2.5.1 Microscopie optique

Les échantillons liquides, déposés entre lame et lamelle, ont été observés à l'objectif 40x sur un microscope Nikon Optiphot (Tokyo, Japon).

## 2.5.2 Microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique permettant d'obtenir des images sur des échantillons aussi bien liquides que solides, à très faible profondeur de champ (environ 400 nm). Elle peut fonctionner en fluorescence, l'image étant obtenue par détection de la fluorescence émise par des fluorochromes intégrés dans l'échantillon et excités par un ou plusieurs lasers.

100  $\mu\text{L}$  d'échantillon, déposé sur une lame de verre, était laissé en contact pendant 15 minutes à l'abri de la lumière, avec 10  $\mu\text{L}$  de colorant fluorescent, obtenu à partir de 2/3 de Fast Green, dilué initialement à 1/10e, et d'1/3 de Rouge de Nil. Le Fast Green est un colorant spécifique des protéines, tandis que le Rouge de Nil est un colorant spécifique de la matière grasse. L'échantillon était ensuite observé avec un microscope confocal Nikon Eclipse TE2000-E (Tokyo, Japon) aux objectifs 40 x et 60 x.

## 2.6 Sorption de vapeur dynamique

La sorption de vapeur dynamique (ou dynamic vapor sorption, ou DVS) est une technique gravimétrique permettant d'étudier la relation entre l'humidité relative d'une atmosphère et l'absorption, ou perte, d'eau par un échantillon soumis à cette atmosphère. Cette relation est classiquement présentée sous la forme d'isothermes d'absorption/de désorption, lorsque les mesures sont effectuées à température constante.

L'isotherme de désorption du lysozyme à pH 7 et 35 mM de force ionique a été obtenue à partir d'une solution de lysozyme de concentration 50  $\text{g L}^{-1}$ . Les expériences ont été réalisées à 20 °C sur un analyseur DVS (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) équipé d'une microbalance Cahn. Une goutte de solution (environ 35 mg) était déposée sur la balance et soumise à trois paliers d'humidité relative (90, 60 et 5 %) réalisés par bullage d'azote dans l'eau. La masse de la goutte était mesurée à chaque palier et donnait accès à la fraction volumique en protéine par un raisonnement analogue à celui présenté section 2.3. L'activité de l'eau était quant à elle converti en pression osmotique grâce à la formule :

$$\Pi = \frac{-RT}{v_a} \ln(a_w) \quad (2.16)$$

avec  $\Pi$  la pression osmotique,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température,  $v_a$  le volume molaire de l'eau et  $a_w$  l'activité de l'eau ( $a_w = \frac{\% \text{ humidité relative}}{100}$ ).

## 2.7 Simulations Monte-Carlo

Les simulations ont été réalisées grâce au logiciel Faunus (Lund et coll., 2008) et opérées sur la grappe de serveurs Alarik de l'Université de Lund.

Les protéines étaient représentées selon un modèle *coarse-grained*, ici des assemblages rigides où chaque résidu était représenté par une sphère avec une charge centrale (figure 2.12). Ces modèles, nommés modèles AAM (*Amino-Acid Model*), ont été directement obtenus par conversion des fichiers PDB (Protein Data Bank) : le rayon de chaque résidu sphérique était obtenu à partir de la masse molaire de l'acide aminé de la PDB, modulée par un facteur  $\rho$  qui pouvait être ajusté afin d'obtenir un volume total proche de la réalité.

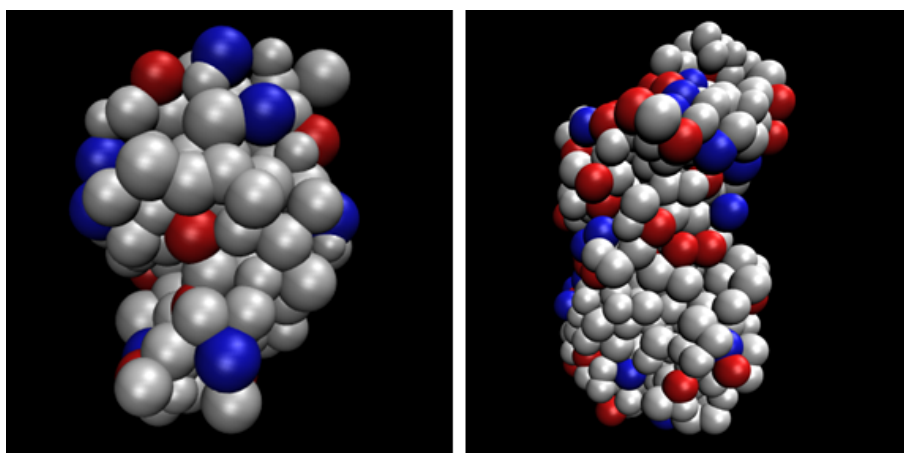


FIGURE 2.12 – Modèles AAM du lysozyme (gauche) et de l'ovalbumine (droite) à pH 7. Chaque sphère représente un résidu. Ceux chargés positivement sont colorés en bleu, ceux chargés négativement en rouge. Les deux modèles ne sont pas présentés à l'échelle.

L'espace de simulation était composé d'une boîte virtuelle cubique, de dimensions ajustables. Les faces de la boîte possédaient des conditions périodiques : toute molécule sortant par une face re-rentrait par la face opposée. Cela permettait de simuler un milieu infini à l'aide d'un nombre fini d'objets et de s'affranchir des effets des bords sur le déplacement des molécules.

La méthode employée était une procédure Monte-Carlo : le système évoluait grâce à des changements aléatoires successifs de position ou d'orientation de molécules. Ici, nous employions un algorithme Metropolis, qui génère une chaîne de Markov d'états du système. Cette chaîne repose sur deux principes :

- le succès ou l'échec d'un essai dépend uniquement de l'essai précédent. En cela, on diffère de la Dynamique Moléculaire, où tous les états successifs du système sont liés temporellement ;
- les issues possibles d'un essai sont en nombre fini.

Dans notre cas, à chaque étape, le programme choisissait entre plusieurs possibilités d'évènements : mouvement de translation et rotation d'une molécule, *swap move* (arrivée ou départ d'un proton sur un résidu titrable d'une molécule) ou variation du volume de la boîte et remise à l'échelle des molécules (utilisé pour les équations d'état uniquement).

Un mouvement (rotation, translation, fluctuation du volume de la boîte) prenait en compte un paramètre de déplacement et un facteur multiplicatif généré aléatoirement entre -0,5 et 0,5. L'amplitude maximale du mouvement dans chacune des directions possibles était ainsi égal à la moitié du paramètre de déplacement choisi. Le paramètre de déplacement devait être choisi attentivement : un facteur trop faible ne permettait pas aux molécules d'explorer correctement l'espace dans le temps de simulation, et un facteur trop grand génèrait un nombre important d'échecs.

L'énergie totale du système après la réalisation de l'évènement était comparée à celle du système à l'étape précédente. Si la différence d'énergie  $dU$  était négative, l'évènement était accepté et le système adoptait la nouvelle configuration. Si la différence d'énergie était positive, l'évènement était accepté avec une probabilité  $p = \exp\left(\frac{-dU}{k_B T}\right)$ . L'organisation d'une étape de simulation est résumée sur la figure 2.13.

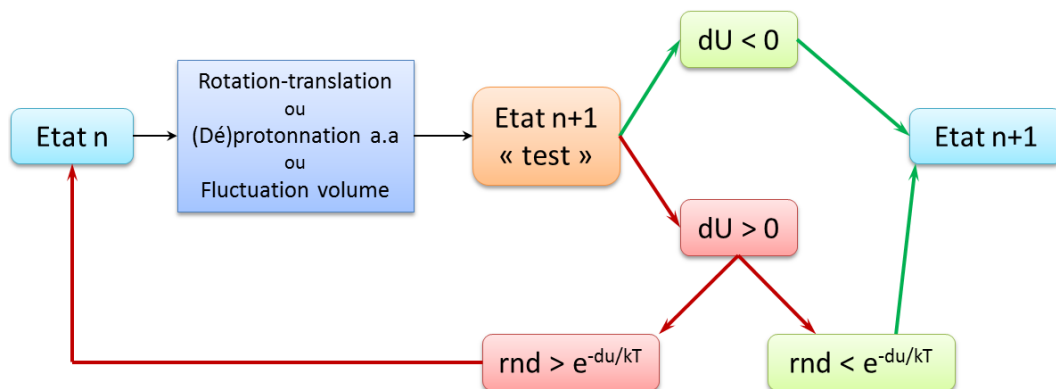


FIGURE 2.13 – Réalisation d'une étape de simulation Monte-Carlo. La variation d'énergie totale du système est notée  $dU$ ,  $rnd$  est un nombre aléatoire généré par le programme

Du fait des hautes fractions volumiques étudiées, la position initiale des protéines était différente selon que des simulations de spectres de SAXS ou d'équations d'état étaient réalisées. Dans les simulations d'équations d'état, le volume de la boîte pouvait fluctuer : il était donc possible d'utiliser une boîte de grandes dimensions comme espace de départ et d'y placer aléatoirement les protéines. La réduction de la taille de la boîte dans les étapes suivantes permettait d'obtenir les fractions volumiques voulues. En revanche, pour les simulations de spectres de SAXS, la fluctuation de volume était désactivée. Le placement aléatoire des protéines dans la boîte de simulation était alors impossible aux

hautes fractions volumiques, du fait du fort encombrement de l'espace. Dans ce cas, le recouvrement des protéines était autorisé pour le placement initial.

Chaque simulation était composée de deux parties :

- un *run* d'équilibration du système. Dans cette partie, le système évoluait fortement : les protéines se répartissaient dans l'espace et/ou le volume de la boîte diminuait, afin de minimiser progressivement l'énergie totale du système. L'énergie du système décroissait ainsi rapidement durant un certain nombre d'étapes, puis se stabilisait une fois que le système était à l'équilibre énergétique ;
- un *run* de production, où l'énergie totale du système était stable et où l'on enregistrait les données de sortie (facteur de structure, volume de la boîte).

## 2.8 Réflectivité de neutrons

La réflectivité de neutrons est une méthode de diffraction visant à étudier l'organisation de films minces, notamment en mesurant le profil de densité dans l'épaisseur du film. Les expériences de réflectivité des neutrons ont été réalisées sur le réflectomètre à temps de vol G3 bis « Eros » du Laboratoire Léon Brillouin, à Gif-sur-Yvette (France).

### 2.8.1 Protocole expérimental

Le réflectomètre G3 bis est un spectromètre à temps de vol, utilisant un faisceau polychromatique de neutrons, qui est envoyé avec un angle d'incidence fixe ( $\sim 1,5^\circ$ ) sur une interface air-eau et s'y réfléchit (voir figure 2.14).

La longueur d'onde ( $\lambda$ ) des neutrons atteignant le détecteur est proportionnelle à leur vitesse ( $\nu$ ) à travers la relation de de Broglie :

$$\lambda = \frac{h}{m\nu} \quad (2.17)$$

avec  $h$  la constante de Planck et  $m$  la masse des neutrons ( $1,675 \cdot 10^{-27}$  kg).

La valeur du vecteur de diffusion  $q$  varie à travers la longueur d'onde (voir l'équation 2.12). Le rapport des intensités réfléchies aux intensités mesurées donne la réflectivité pour chaque longueur d'onde.

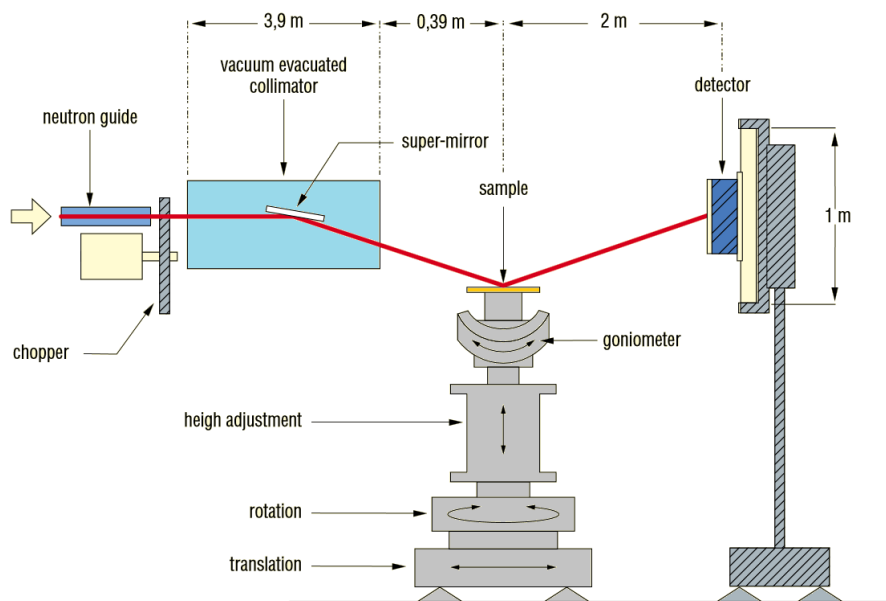


FIGURE 2.14 – Schéma du montage du réflectomètre G3 bis du Laboratoire Léon Brillouin. D'après la fiche de présentation disponible à <http://www-llb.cea.fr/fr-en/pdf/eros-llb.pdf>

Les solutions de protéines ont toutes été préparées à une concentration de  $1 \text{ g L}^{-1}$  dans de l'eau deutérée, dans les conditions suivantes :

- Lysozyme : pD 7, avec une force ionique ( $I$ ) de 20 mM et 170 mM ;
- Ovalbumine : pD 7, avec une force ionique de 20 mM et 170 mM et pD 3,6 avec une force ionique de 20 mM et 170 mM.

Les forces ioniques comportaient à chaque fois 20 mM imposées par du tampon bis-tris propane (pour pD 7) ou du tampon lactate (pour pD 3,6) et 0 mM ou 150 mM imposées par du NaCl.

Les mesures ont toutes été réalisées à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  sous un capot hermétique visant à empêcher l'échange  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  dans l'échantillon, sauf une mesure pour le lysozyme réalisée à pD 7,  $I=20 \text{ mM}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (avec capot hermétique) et une mesure pour le lysozyme à pD 7,  $I=20 \text{ mM}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  sans capot hermétique.

## 2.8.2 Analyse des données

### 2.8.2.1 Analyse des spectres de réflectivité

Les spectres de réflectivité se présentaient sous la forme suivante (figure 2.15) :



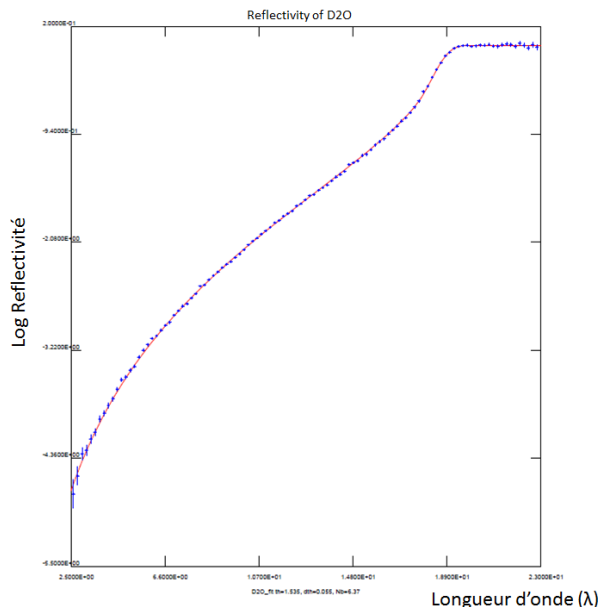


FIGURE 2.15 – *Logarithme de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde pour une solution pure de D<sub>2</sub>O*

Il existe une longueur d'onde critique  $\lambda_c$ , au-delà de laquelle la réflexion est totale (partie plane de la courbe, à grandes valeurs de  $\lambda$ ) :

$$\lambda_c = \theta_i \sqrt{\frac{\pi}{Nb}} \quad (2.18)$$

avec  $\theta_i$  l'angle d'incidence du faisceau et  $Nb$  la densité de longueur de diffusion du liquide.

L'ajustement d'un modèle à la courbe expérimentale correspondant à une solution pure de D<sub>2</sub>O, dont le  $Nb$  est connu, a permis de déterminer  $\theta_i$  avec plus de précision. L'angle d'incidence étant fixe, cette valeur de  $\theta_i$  a été conservée pour toutes les analyses ultérieures.

Des mesures de réflectivité ont été réalisées sur tous les types de tampons. En ajustant des modèles similaires au précédent à nos données expérimentales, nous en avons déduit les valeurs de  $\lambda_c$  pour chaque tampon et donc les densités de longueur de diffusion ( $Nb_s$ ) correspondantes. Cette démarche a été répétée à différents temps, sur plusieurs heures, afin de mesurer l'évolution du  $Nb_s$  des tampons lors de leur vieillissement. Nous avons considéré par la suite que la différence entre les  $Nb$  des tampons purs et des solutions de protéines réalisées avec les tampons correspondants était négligeable.

### 2.8.2.2 Modélisation des interfaces

Les spectres de réflectivité des solutions de protéines ont été analysés en utilisant un modèle en boîtes (figure 2.16) : chaque couche  $i$  de protéine était modélisée par une boîte

d'épaisseur  $d_i$  et de densité de longueur de diffusion  $Nb_i$ . Chaque interface (air/couche de protéine, couche de protéine/couche de protéine, couche de protéine/eau) possédait une rugosité  $\sigma_j$ . Les paramètres d'ajustement ( $Nb_i$ ,  $d_i$  et  $\sigma_j$ ) étaient dans un premier temps tous laissés flottants, mais les premiers essais ont montré que les valeurs de rugosité variaient peu d'une couche à l'autre. Nous avons donc décidé de fixer les valeurs de  $\sigma_j$  à 3 Å, sauf pour la rugosité de l'interface protéine/solvant, qui a été laissée flottante.



FIGURE 2.16 – Schéma du modèle « en boîtes » utilisé pour l'ajustement aux données expérimentales de réflectivité de neutrons sur des interfaces air/eau de protéines.  $Nb_i$  et  $d_i$  représentent la densité de longueur de diffusion et l'épaisseur des couches, respectivement, et  $\sigma_j$  la rugosité des interfaces.

Les protéines adsorbées à l'interface air/solution ont été systématiquement supposées totalement immergées dans la solution. En effet, la prise en compte d'une partie aérienne des protéines aurait nécessité trop d'hypothèses difficiles à tester (dimensions de la partie émergée, hydratation, proportion d'échange).

La fraction volumique en protéine dans chaque couche a ensuite été déduite des valeurs des paramètres après ajustement :

$$\Phi_{p,i} = \frac{Nb_i - Nb_s}{Nb_p - Nb_s} \quad (2.19)$$

avec  $Nb_i$ ,  $Nb_s$  et  $Nb_p$  les densités de longueur de diffusion de la couche considérée, du solvant et de la protéine entièrement hydratées dans le D<sub>2</sub>O pur, respectivement.  $Nb_p$  a été pris comme étant égal à  $3,66 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  en se basant sur les travaux de Lu et coll. (Lu et coll., 1998).

La fraction volumique totale en protéine à l'interface est alors :

$$\Phi_p = \frac{\sum_i \Phi_{p,i}}{n} \quad (2.20)$$

avec  $n$  le nombre de couches de protéines utilisées dans la procédure d'ajustement.

On en déduit la valeur de la densité d'adsorption en protéine (en  $\text{mg m}^{-2}$ ) à l'interface :

$$\Gamma = \Phi_p d \rho \quad (2.21)$$

avec  $d$  l'épaisseur totale de la couche interfaciale (en m) et  $\rho$  la densité de la protéine (en  $\text{g cm}^{-3}$ ).

## 2.9 Ellipsométrie

### 2.9.1 Principe

L'ellipsométrie est une technique d'analyse de surfaces planes, basée sur le changement de polarisation d'un faisceau lumineux incident lors de sa réflexion sur la surface. Un schéma du dispositif expérimental est présenté sur la figure 2.17.

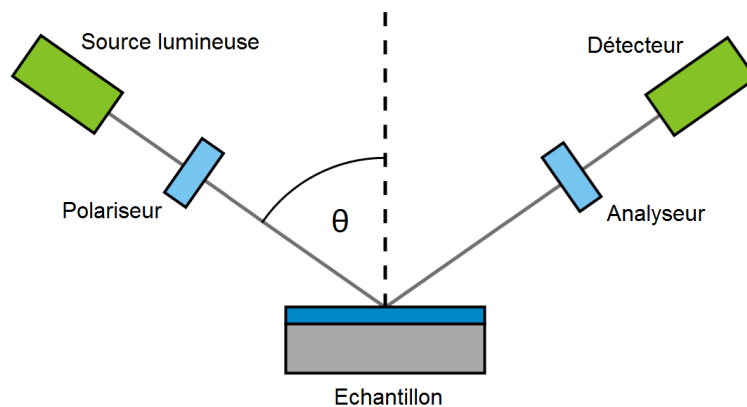


FIGURE 2.17 – Schéma du montage d'un ellipsomètre

Le champ électrique initial de l'onde incidente, comporte deux composantes (figure 2.18) : une composante parallèle au plan d'incidence ( $E_{pi}$ ) et une composante perpendiculaire au plan d'incidence ( $E_{si}$ ).

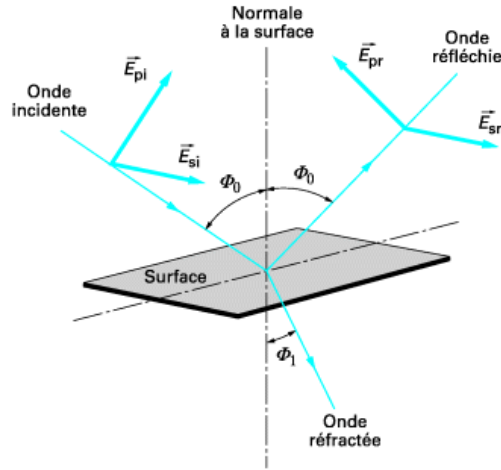


FIGURE 2.18 – Géométrie du système d'ellipsométrie

Après réflexion, ces deux composantes deviennent  $E_{pr}$  et  $E_{sr}$ . On définit les coefficients de réflexion de l'échantillon pour la polarisation parallèle ( $R_p$ ) au plan d'incidence et la polarisation perpendiculaire au plan d'incidence ( $R_s$ ) comme :

$$R_p = \frac{E_{pr}}{E_{pi}} = \frac{|E_{pr}|}{|E_{pi}|} \exp [i (\varphi_{pr} - \varphi_{pi})] = |R_p| \exp (i\delta_p) \quad (2.22)$$

et

$$R_s = \frac{E_{sr}}{E_{si}} = \frac{|E_{sr}|}{|E_{si}|} \exp [i (\varphi_{sr} - \varphi_{si})] = |R_s| \exp (i\delta_s) \quad (2.23)$$

avec  $\varphi_{pr}$ ,  $\varphi_{pi}$ ,  $\varphi_{sr}$ ,  $\varphi_{si}$  les phases des composantes  $E_{pr}$ ,  $E_{pi}$ ,  $E_{sr}$  et  $E_{si}$ , respectivement, et  $\delta_p$ ,  $\delta_s$  les retards de phases correspondants induits par la réflexion.

Le paramètre mesuré par l'ellipsomètre est l'ellipticité, définie comme :

$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \tan (\Psi) \exp (i\Delta) \quad (2.24)$$

L'angle ellipsométrique  $\Delta$  (en  $^\circ$ ) est donc équivalent à un déphasage et égal à :

$$\Delta = \delta_p - \delta_s \quad (2.25)$$

Dans le cas de monocouches de protéines, la relation entre l'angle ellipsométrique et la concentration de surface  $\Gamma$  (en  $\text{mg m}^{-2}$ ) peut être approximée par ((de Feijter et coll., 1978)) :

$$\Gamma = 0,2 \Delta \quad (2.26)$$

## 2.9.2 Protocole expérimental

Les mesures d'angle ellipsométrique ont été réalisées sur un dispositif développé à l'Institut de Physique de Rennes, sur le principe de l'ellipsomètre à annulation (Azzam et Bashara, 1977). Selon ce dispositif, un laser He-Ne de longueur d'onde  $\lambda = 632,8$  nm est envoyé sur la surface de la cuve avec un angle égal à l'angle de Brewster de l'interface eau-air moins  $1^\circ$  (soit  $52,06^\circ$ ), ceci pour avoir un signal suffisant sur le photomultiplicateur. Le polariseur Glan-Thompson situé juste après la source lumineuse permet d'imposer une polarisation linéaire au faisceau lumineux. Après réflexion sur la surface de la solution, le faisceau est polarisé elliptiquement et doit donc être de nouveau polarisé linéairement grâce à une lame quart d'onde avant d'atteindre l'analyseur Glan-Thompson. Un minimum d'intensité est alors mesuré par le photomultiplicateur lorsque l'analyseur est perpendiculaire à la polarisation du champ électromagnétique, ce qui permet de repérer l'orientation de ce dernier et d'en déduire les deux angles  $\Psi$  et  $\Delta$ . Le réglage initial du polariseur et de l'analyseur est effectué sur l'eau, ou sur la solution tampon, ce qui définit les positions « zéro ».

Lors de l'adsorption de la protéine à l'interface, la couche interfaciale modifie le rapport d'atténuation et le déphasage entre les deux polarisations et la recherche du nouveau minimum d'intensité donne deux nouvelles valeurs pour le polariseur et l'analyseur, soit deux nouvelles valeurs pour  $\Psi$  et  $\Delta$ . Le suivi d'une cinétique d'adsorption consiste alors à suivre l'évolution de  $\Delta$  en fonction du temps. Si la couche formée est une monocouche,  $\Delta$  est convertie en concentration surfacique  $\Gamma$  (en  $\text{mg m}^{-2}$ ) par la relation mentionnée au paragraphe précédent ( $\Gamma = 0,2 \Delta$ ). Typiquement, une monocouche dense correspond à une valeur de  $\Delta$  autour de  $10^\circ$ .

En revanche, si les valeurs de  $\Delta$  sont significativement plus élevées que  $10^\circ$ , cela traduit une accumulation de protéines sur une épaisseur nettement plus élevée que celle d'une monocouche et la relation de proportionnalité entre  $\Delta$  et  $\Gamma$  n'est plus appropriée. Il serait en théorie possible d'extraire l'indice et l'épaisseur de la couche à partir des valeurs des deux angles ellipsométriques  $\Psi$  et  $\Delta$  mais la précision sur  $\Psi$  n'est pas suffisante sur notre dispositif, car ce dernier est optimisé pour effectuer des mesures rapides (sur quelques secondes), compatibles avec le suivi de cinétiques. Notons que si la conversion  $\Delta$ -épaisseur n'est plus valide pour des valeurs élevées de  $\Delta$ , ces dernières reflètent toutefois des fractions volumiques élevées de la couche adsorbée.

### 2.9.2.1 Expériences à l'air libre, avec flux d'advection

Les solutions de lysozyme étaient préparées à  $1 \text{ gL}^{-1}$  en diluant les protéines dans la solution tampon adéquate.

Le tampon pur était versé dans une cuve en téflon de surface  $S = 23 \text{ cm}^2$  et de hauteur  $h = 3 \text{ mm}$ . L'ellipsomètre était réglé sur la solution tampon, puis celle-ci était aspirée et la solution de protéines était versée dans la cuve, définissant ainsi le temps  $t = 0$  de la mesure. L'angle ellipsométrique était suivi sur des durées variant de 20 h à 70 h. Le flux d'évaporation moyen estimé sur toute la durée de cinétique est d'environ  $E = 50 \text{ nm s}^{-1}$ . Le nombre de Peclet estimé pour ce flux se situe entre 0,24 et 1,3 selon la valeur choisie pour le coefficient de diffusion ( $D_0 = 1,146 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  ou  $D_{\text{coop}} = 6,22 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) (Koning et coll., 2008).

### 2.9.2.2 Expérience en atmosphère saturée, sans flux d'advection

Une bouteille en verre à face parallèles a été utilisée comme enceinte hermétique pour les mesures d'angle ellipsométrique avec atmosphère contrôlée. 300 mL de solution tampon étaient déposés dans la bouteille sur une hauteur de 6,5 cm, puis la bouteille était scellée. Un capillaire, servant par la suite à l'injection de la protéine, passait par le bouchon et était rempli de solution-tampon afin d'empêcher l'évaporation. La bouteille était laissée ainsi durant une nuit afin que son atmosphère se sature en vapeur d'eau. Le réglage du zéro de l'analyseur et du polariseur étaient alors effectués sur le tampon pur, puis 10 mL de tampon étaient ôtés grâce au capillaire et remplacés par 10 mL de solution de lysozyme à  $30 \text{ g L}^{-1}$  afin d'obtenir une concentration totale en protéine de  $1 \text{ g L}^{-1}$ . L'angle ellipsométrique était suivi pendant 71 h.

Le flux d'évaporation n'a pas pu être estimé dans le cas où la bouteille était fermée car la variation du niveau d'eau était non décelable sur la durée de la cinétique.



## Chapitre 3

Le comportement des protéines concentrées est renseigné par les équations d'état





La compression osmotique est une approche thermodynamique permettant de mettre aisément en relation la pression osmotique d'une solution ( $\Pi$ ) à sa fraction volumique en solutés ( $\Phi$ ). Cette relation se traduit à travers des équations d'état ( $\Phi, \Pi$ ), qui fournissent des informations sur toutes les interactions présentes dans le système, qu'elles soient des interactions soluté/soluté, soluté/ion ou soluté/eau.

Le lysozyme et l'ovalbumine font partie des protéines pour lesquelles quelques diagrammes présentant la pression osmotique en fonction de la fraction volumique ont été réalisés, dans des gammes de concentration diluées à semi-diluées (Moon et coll., 2000 ; Yousef et coll., 2001). Leurs propriétés physico-chimiques très différentes (voir section 1.2) en font deux modèles intéressants dans une optique de comparaison. Étudier leur comportement en parallèle permet ainsi de mettre en évidence les points communs partagés par les protéines globulaires à haute concentration, ainsi que leurs spécificités : l'objectif est de déterminer si les protéines globulaires obéissent à des règles générales d'interaction, ou s'il existe une « histoire » par protéine. D'autre part, l'étude comparée de leur comportement à l'interface air-eau, où elles sont en conditions d'encombrement, a été réalisée et a montré des différences nettes à pH 7 (Le Floch-Fouéré, 2008). Les expériences de compression osmotique sur le lysozyme et l'ovalbumine offrent donc des potentialités intéressantes de mise en relation avec le comportement interfacial, dans le but d'apporter des éléments d'explication quant au rôle du confinement dans les couches interfaciales.

## 3.1 Equations d'état à pH 7 et $I=20$ mM

Afin d'établir les équations d'état de solutions de lysozyme et d'ovalbumine, 8 pressions osmotiques ont été initialement étudiées pour un pH de 7 et une force ionique ( $I$ ) de 20 mM, imposés avec du bis-tris propane. Dans le cas du lysozyme, onze points supplémentaires ont été par la suite réalisés dans la zone 1,3-2,57 bar.

### 3.1.1 Régimes

Les diagrammes ( $\Phi, \Pi$ ) de l'ovalbumine et du lysozyme pour un tampon bis-tris propane à pH 7 et  $I=20$  mM sont présentées sur la figure 3.2. Elles sont comparées au modèle des gaz parfaits de Van't Hoff et au modèle des sphères dures de Carnahan-Starling, en prenant des sphères de même masse que chaque protéine.

Pour les deux protéines, on note une augmentation totale de fraction volumique aux alentours de 0,56 - 0,6 sur la gamme de pression 0,05 - 44,3 bar. En revanche, de nombreuses différences sont à noter dans la forme des diagrammes ( $\Phi, \Pi$ ) et dans la nature des interactions révélées par leur position relative vis-à-vis du modèle de Carnahan-Starling.

En effet, le modèle de Carnahan-Starling représentant le comportement de sphères sans interaction autre que stérique, l'espace  $(\Phi, \Pi)$  peut être globalement découpé en deux zones (figure 3.1) :

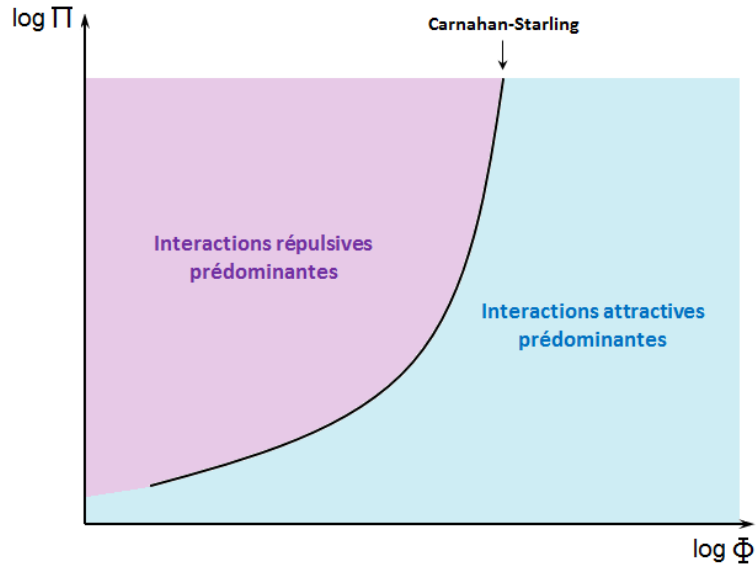


FIGURE 3.1 – Schéma des zones d'interaction délimitées par Carnahan-Starling

Le diagramme  $(\Phi, \Pi)$  de l'ovalbumine présente une tendance constamment croissante, quasi-parallèle au modèle de Carnahan-Starling en représentation log-log. La courbe expérimentale étant positionnée, à même fraction volumique, à des pressions supérieures au modèle de Carnahan-Starling, nous pouvons en déduire que les interactions entre molécules d'ovalbumine dans ces conditions physico-chimiques sont de nature principalement répulsives dans toute la gamme de concentrations étudiée ( $\Phi = 0,036$  à  $0,6$ , soit environ  $50$  à  $800 \text{ g L}^{-1}$ ).

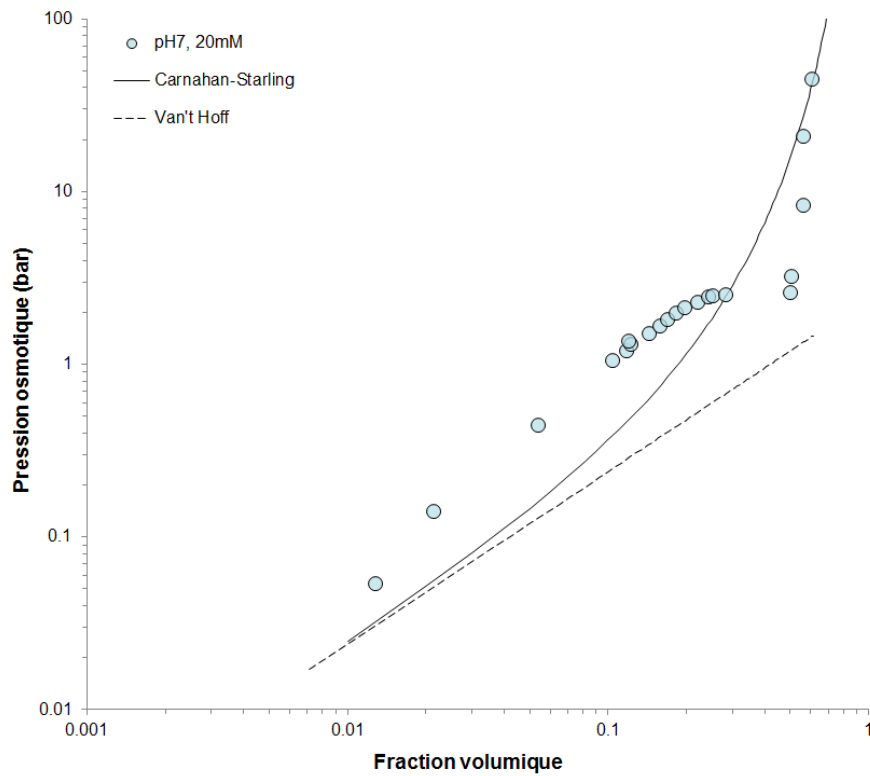
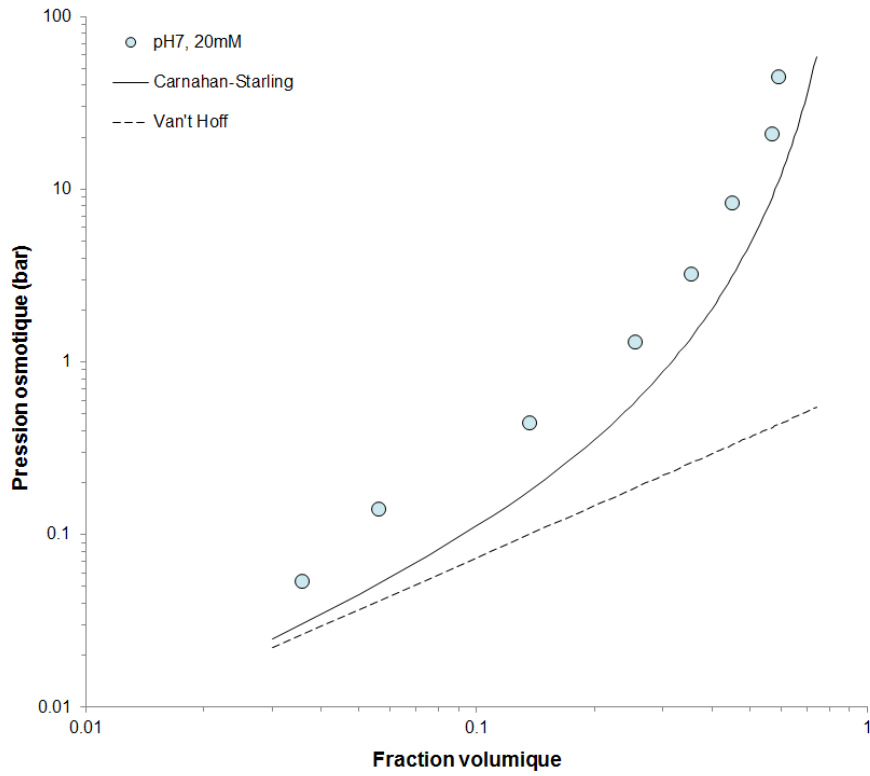


FIGURE 3.2 – Equations d'état de l'ovalbumine (haut) et du lysozyme (bas) avec un tampon bis-tris propane à pH 7 et  $I = 20$  mM

L'aspect progressif de l'augmentation de concentration avec la pression osmotique se retrouve dans l'aspect des échantillons comprimés d'ovalbumine (figure 3.3) :

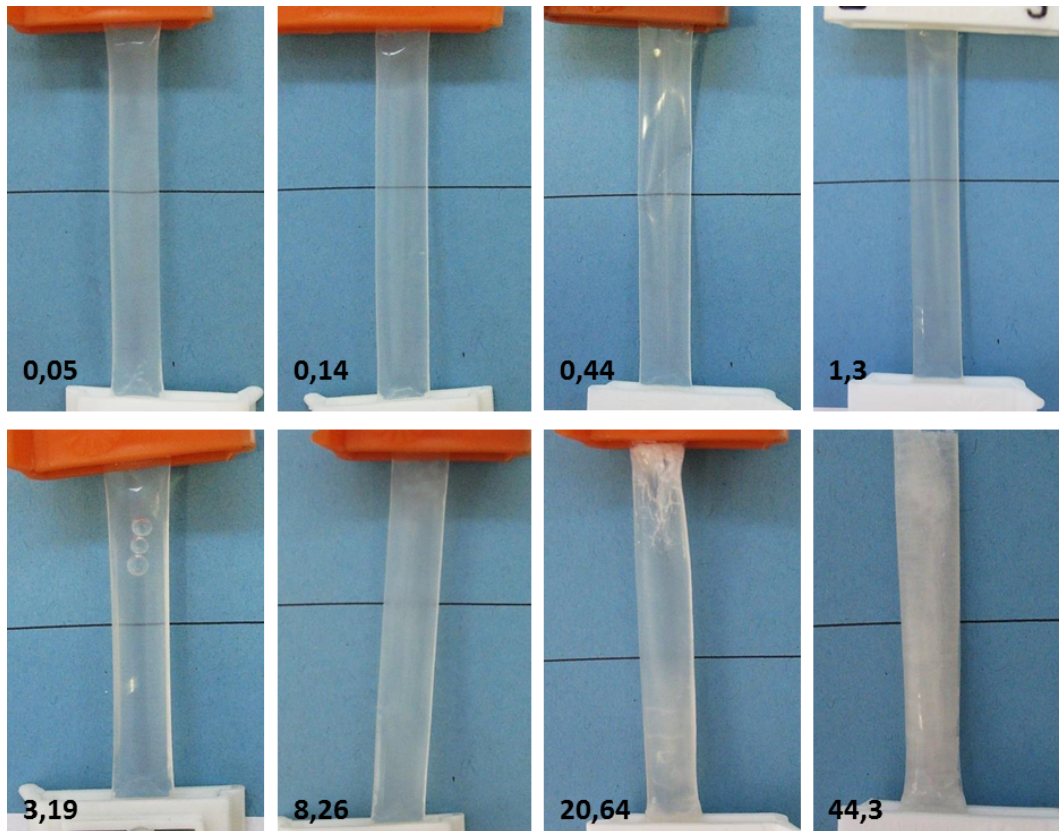


FIGURE 3.3 – Photographies des échantillons d'ovalbumine soumis à une pression osmotique de 0,05 à 44,3 bar, en tampon pH 7 et  $I = 20$  mM. Les pressions osmotiques correspondantes, en bar, sont notées en bas de chaque photographie.

De 0,05 bar à 0,44 bar, la solution est un liquide translucide de faible viscosité, similaire aux solutions de remplissage à 20 et 50 gL<sup>-1</sup>. Les échantillons à 1,3 bar et 3,19 bar possèdent le même aspect, mais présentent une densité croissante, comme montré par les différences d'indices de réfraction avec la solution-mère lors des remplissages. À 3,19 bar, la solution possède une densité rappelant le glycérol. À partir de 8,26 bar, la solution devient trouble et présente une texture gélifiée. La densité du gel augmente jusqu'à 44,3 bar, où il présente une texture souple et déformable, semblable à un plastique mou.

Dans le cas du lysozyme en revanche, le diagramme ( $\Phi, \Pi$ ) à pH 7 et  $I = 20$  mM se découpe nettement en trois zones (figure 3.4), que nous nommerons par la suite zone diluée, zone de transition et zone concentrée.

La zone diluée s'étend jusqu'à une fraction volumique approximative de 0,1. Dans cette région, la pression est approximativement deux fois plus haute que celle donnée par le

modèle de Carnahan-Starling, traduisant des interactions majoritairement répulsives.

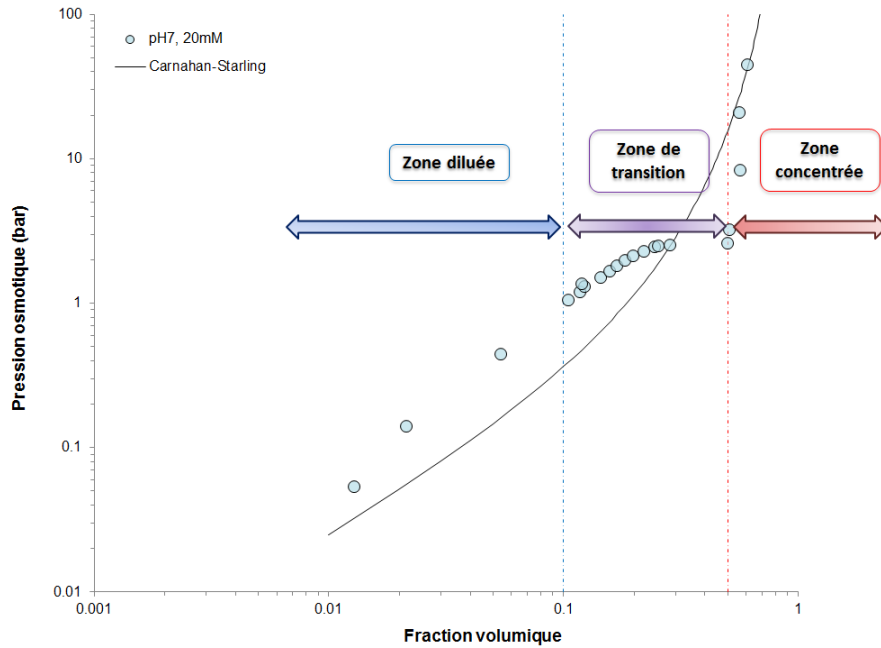


FIGURE 3.4 – Zones de l'équation d'état à pH 7 et  $I = 20 \text{ mM}$  du lysozyme

La zone de transition s'étend environ de 0,1 à 0,5 en fraction volumique et est caractérisée par une décroissance de la pente de la courbe expérimentale, jusqu'à la formation d'un plateau. Au niveau de ce plateau, la pression n'augmente pratiquement plus ( $\Delta\Pi = 0,05 \text{ bar}$ ), mais la fraction volumique subit une augmentation brusque ( $\Delta\Phi = 0,22$ ), ce qui se traduit par une discontinuité (que nous nommerons par la suite « saut ») dans le diagramme  $(\Phi, \Pi)$ . Dans cette zone, le diagramme  $(\Phi, \Pi)$  dévie de la parallèle au modèle de Carnahan-Starling et le croise, puis reste à une pression osmotique inférieure à celle du modèle, à fraction volumiques égales. Cela traduit le passage d'un système dominé par les répulsions à un système où les interactions attractives sont prédominantes.

La caractéristique principale de la zone de transition est le plateau, où deux points à une pression osmotique similaire correspondent à deux fractions volumique très différentes (0,28 et 0,50). Si nous supposons que chaque point du diagramme à des fractions volumiques supérieures et inférieures à la transition représente un état d'équilibre, ce qui sera montré dans la section 3.1.2, alors le plateau reflète une transition de phases du système.

Enfin, la zone concentrée s'étend au-delà de  $\Phi = 0,5$ . Elle est caractérisée par une augmentation très rapide de la pression osmotique avec la concentration ( $\Delta\Pi = 42 \text{ bar}$  pour  $\Delta\Phi = 0,11$ ), que nous nommerons par la suite « mur ». Dans cette zone, les pressions osmotiques sont inférieures à celles prédites par le modèle de Carnahan-Starling, montrant que le système est toujours dominé par les attractions.

Les trois zones définies à partir du diagramme ( $\Phi$ ,  $\Pi$ ) du lysozyme peuvent être mises en relation avec les observations morphologiques faites sur les échantillons comprimés (figure 3.5).

Les échantillons comprimés à 0,05 bar ou 0,14 bar sont des liquides transparents, similaires aux solutions de remplissage à 10 et 50 g L<sup>-1</sup>. Les échantillons comprimés à des pressions comprises entre 0,44 bar et 2,42 bar, la solution reste transparente mais devient plus dense avec la concentration, comme montré par les différences d'indices de réfraction avec la solution-mère lors des remplissages. Des précipités blancs et « moutonneux » sont visibles en faible quantité au fond des sacs de dialyse. A 2,47 et 2,53 bar, la solution est liquide mais présente un aspect nacré lors de la remise en suspension des précipités présents au fond du sac. Enfin, pour les pressions supérieures ou égales à 2,57 bar, soit après le « saut » de concentration, les échantillons sont blancs, solides, rigides et cassants. Les observations morphologiques vont donc dans le sens d'un changement d'état du système au niveau du saut de concentration, comme supposé plus haut.

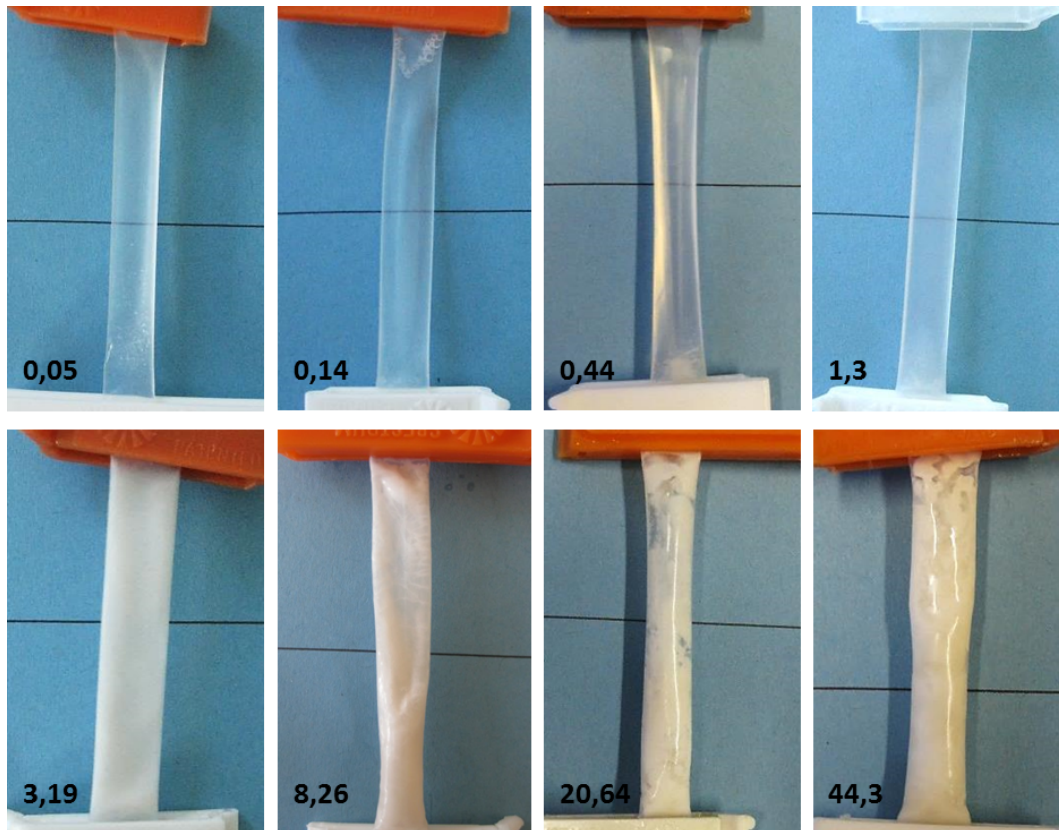


FIGURE 3.5 – Photographies des échantillons de lysozyme soumis à une pression osmotique de 0,05 à 44,3 bar, en tampon pH 7 et 20 mM de force ionique. Les pressions osmotiques correspondantes, en bar, sont notées en bas de chaque photographie.

L'hypothèse d'un changement d'état dans la zone de transition et la similitude particulière

de cette zone avec celle vue dans les diagrammes  $(\Phi, \Pi)$  relevant de la théorie de Van der Waals nous a conduit à tenter d'ajuster ce modèle à nos données. Il n'a pas été possible d'obtenir une adéquation au diagramme  $(\Phi, \Pi)$  du lysozyme issu du modèle de Van der Waals, pour lequel on faisait varier le paramètre d'attraction  $a'$  et le volume exclu  $b'$  de chaque protéine. En effet, si le volume  $b'$  était pris comme égal à quatre fois celui de la protéine ( $b' = 0,041 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$ ), comme il est classique de le faire, le modèle de Van der Waals restait systématiquement à des pressions inférieures à celles de la courbe expérimentale, à fractions volumiques similaires et ce quelque soit la valeur de  $a'$  (graphe de gauche, figure 3.6). D'autre part, la position de la transition dans le modèle de Van der Waals était située à des fractions volumiques inférieures à celles observées dans le cas expérimental. Si le volume  $b'$  était laissé libre, il était possible d'ajuster le modèle de Van der Waals à l'équation d'état dans la zone concentrée, mais les pressions du modèle étaient encore une fois très inférieures aux pressions expérimentales, à fractions volumiques égales (graphe de droite, figure 3.6).

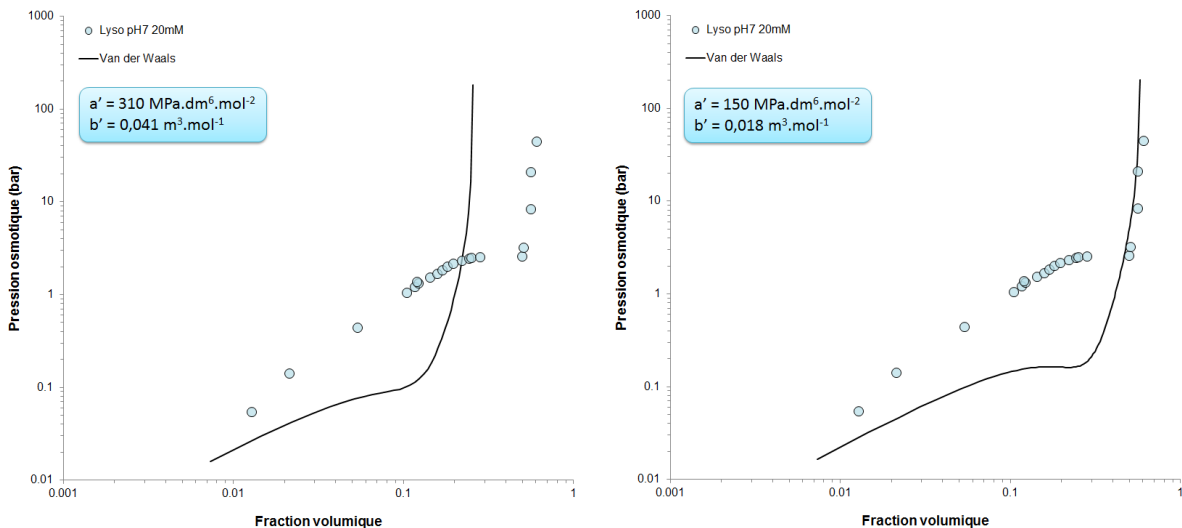


FIGURE 3.6 – Modèles de Van der Waals (VdW) à différentes valeurs de  $a'$  et  $b'$ , pour une température de  $293,15 \text{ K}$

De la même façon, il n'a pas été possible d'ajuster un modèle de sphères dures adhésives (AHS), comme celui décrit par Barboy et coll. (Barboy, 1974), à notre diagramme  $(\Phi, \Pi)$  (figure 3.7). Même s'il semblait possible d'obtenir une transition dans les bonnes gammes de fraction volumique ( $\tau = 0,8$ ), les pressions du modèle étaient systématiquement inférieures aux pressions expérimentales, à fractions volumiques similaires, même à valeurs de  $\tau$  très élevées ( $\tau = 50$ ).



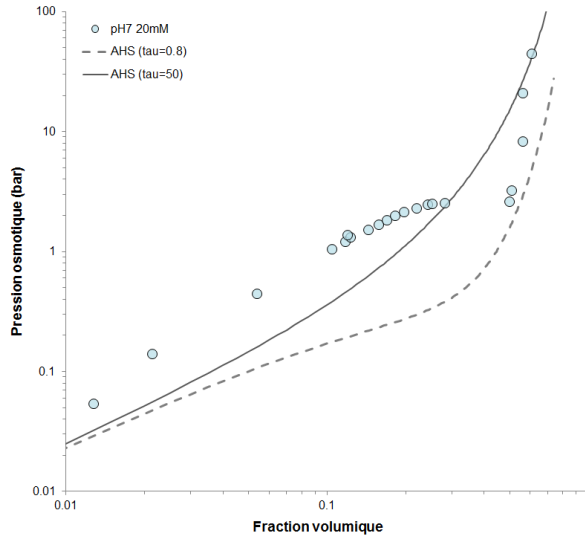


FIGURE 3.7 – Modèles de sphères dures adhésives (AHS) à deux valeurs de  $\tau$  (0,8 et 50), pour une température de 293,15 K

Les données bibliographiques nous permettent de formuler plusieurs hypothèses quant à la nature de la transition de phases présente dans la zone de transition, qui ne peut être déterminée avec exactitude par la seule analyse du diagramme  $(\Phi, \Pi)$ .

Rickard et ses collaborateurs (Rickard et coll., 2010) ont réalisé des expériences de déshydratation de gouttelettes de solutions aqueuses de lysozyme suspendues dans le décanol, dans des gammes de concentration allant de 700 à 1150 g L<sup>-1</sup>, soit des fractions volumiques allant de 0,50 à 0,82. Leurs résultats sont comparés à notre diagramme  $(\Phi, \Pi)$  sur la figure 3.8. Chaque jeu de données présenté est issu d'une technique différente : déshydratation d'une seule gouttelette de lysozyme dans du décanol comme précédemment cité (« *single particle dehydration* »), sorption de vapeur par une bille vitrifiée de lysozyme obtenue par cette technique (« *single-particle dehydration* »), et adsorption de vapeur à partir de lysozyme lyophilisé ou de billes obtenues « en masse » par simple mélange de solution de lysozyme et de décanol (« *bulk vapor adsorption* »), suivie d'une désorption (« *bulk vapor desorption* »). Les résultats des mesures de sorption dynamique de vapeur (Dynamic Vapor Sorption, ou DVS) que nous avons réalisées à pH 7 et  $I = 35$  mM (section 3.2.2) sont également représentés.

On peut voir que les données de DVS obtenues sur le lysozyme à pH 7 et  $I = 35$  mM correspondent aux données obtenues par Rickard et coll. par sorption de vapeur à partir de lyophilisat ou d'une population de billes vitrifiées. En revanche, les points de Rickard et coll. à des fractions volumiques inférieures à 0,6 ne semblent pas suivre le diagramme  $(\Phi, \Pi)$  du lysozyme à pH 7 et  $I = 20$  mM.

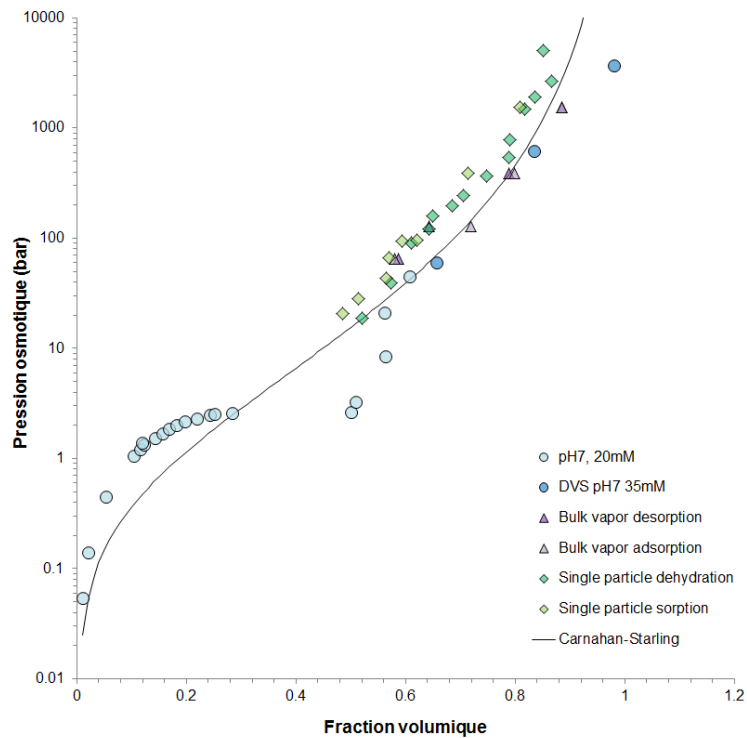


FIGURE 3.8 – Données obtenues par diverses méthodes par Rickard et coll. (Rickard et coll., 2010) (losanges verts et triangles violets) représentées avec le diagramme  $(\Phi, \Pi)$  du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique (cercles bleus clairs) et les données de DVS du lysozyme à pH 7 et 35 mM de force ionique (cercles bleus plus foncés).

En particulier, malgré la faible gamme de fractions volumiques sur lesquelles il est possible de faire une comparaison entre nos données et celles de Rickart et coll., ces dernières ne semblent pas montrer de signe d'un franchissement de Carnahan-Starling et d'une diminution brutale de la pression osmotique lorsque la fraction volumique diminue. On peut donc imaginer que, dans cette gamme de fractions volumiques, les systèmes concentrés obtenus par compression osmotique ne relèvent pas du même état physique que ceux obtenus par déshydratation dans le decanol ou sorption de vapeur.

Stradner et ses collaborateurs (Stradner et coll., 2004 et 2006 ; Cardinaux et coll., 2007a) ont proposé l'existence d'agrégats dynamiques (*equilibrium clusters*) dans les solutions de lysozyme à pH 7,8 et faible force ionique, dans des gammes de concentrations en protéines qui correspondent à celles rencontrées dans notre zone de transition. La formation d'objets plurimoléculaires tels que ces agrégats pourrait induire une courbure de l'équation d'état telle que celle vue expérimentalement : à une même fraction volumique, une solution de clusters en équilibre avec des monomères induirait, du strict point de vue du nombre d'objets présents, une pression plus faible qu'une dispersion de monomères seuls. Une augmentation de la proportion de clusters avec la fraction volumique, comme

suggérée par les simulations de Cardinaux et coll. (Cardinaux et coll., 2011), serait alors une explication de la divergence progressive de la courbe expérimentale par rapport à une courbe convexe représentative d'un comportement liquide de monomères (telle que le modèle de Carnahan-Starling). La zone concentrée, correspondant à des échantillons solides, serait alors le siège d'un phénomène d'arrêt dynamique, comme décrit par Cardinaux et coll. La correspondance des fractions volumiques de la transition de percolation dans les simulations numériques effectuées par Cardinaux et coll. ( $\Phi = 0,15$ ) et de l'un des premiers points de notre zone de transition ( $\Pi = 1,66$  bars), ainsi que le fait que la fraction volumique correspondant à l'arrêt dynamique ( $\Phi = 0,26$ ), selon Cardinaux et coll., soit située dans le « saut » de concentration de notre équation d'état, vont dans le sens de cette hypothèse.

D'autre part, les travaux de Retailleau et coll. (Retailleau et coll., 1997) montrent que la solubilité du lysozyme, pour une concentration en NaCl comprise entre 0 et 50 mM est située entre 300 et 370 g L<sup>-1</sup> à pH 6,5 ( $\Phi = 0,21$  à 0,26) et entre 190 et 250 g L<sup>-1</sup> à pH 8,4 ( $\Phi = 0,14$  à 0,18). Ces valeurs sont reportées avec l'équation d'état sur la figure 3.9. On peut voir que les valeurs de solubilité dans des conditions voisines de pH 7 et 20 mM de force ionique sont situées au niveau de la zone de transition. Le changement de phases peut donc également être de la cristallisation.

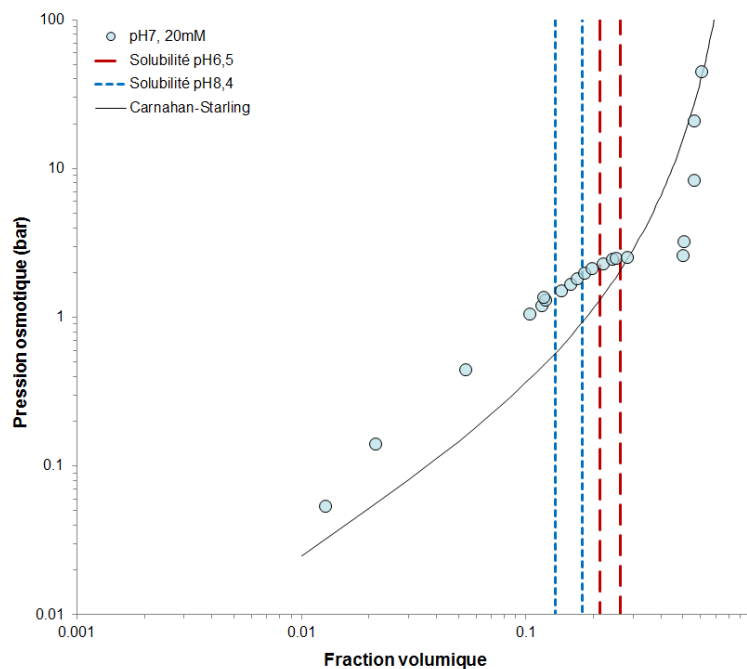


FIGURE 3.9 – Equation d'état du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique et solubilités du lysozyme à pH 6,5 et 8,4 déterminées par Retailleau et coll. (Retailleau et coll., 1997) pour des concentrations de NaCl de 0 et 50 mM (droites pointillées)

### 3.1.2 Réversibilité

Une équation d'état se définit par l'existence d'un état d'équilibre thermodynamique pour tous ses points. Expérimentalement, une manière de montrer qu'un diagramme ( $\Phi, \Pi$ ) est une équation d'état est de varier les chemins thermodynamiques menant à ses points et de vérifier leur similitude, notamment, dans le cas de compressions osmotiques, en effectuant des expériences de compression-décompression (Bonnet-Gonnet et coll., 1994 ; Bouchoux et coll., 2009).

À pH 7 et 20 mM de force ionique, des échantillons ont été comprimés à 44,3 bar, puis, après équilibre à cette pression, décomprimés à une pression inférieure à 44,3 bar (8,26 bar, 3,19 bar, 1,3 bar et 0,05 bar). Une vérification supplémentaire a été réalisée en comprimant une solution-mère trois fois plus concentrée ( $150 \text{ g L}^{-1}$ ) à 3,19 bar. Les résultats présentés sur la figure 3.10 montrent que les points de compression « classiques », de compression-décompression et de compression à partir d'une solution à  $150 \text{ g L}^{-1}$  sont confondus.

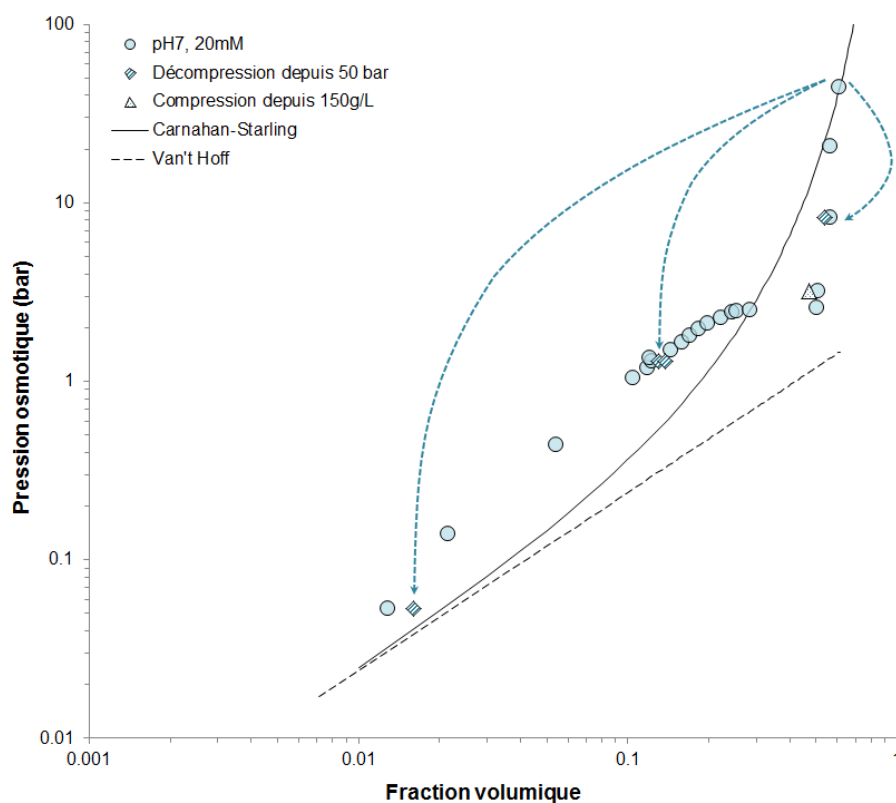


FIGURE 3.10 – Equation d'état du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique, avec les points obtenus par compression à 44,3 bar et décompression à une pression inférieure (losanges rayés) et par compression à partir d'une solution de concentration égale à  $150 \text{ g L}^{-1}$  (triangles mouchetés). Les chemins de décompression sont symbolisés par les flèches pointillées.

On remarque en particulier que la déviation du diagramme du comportement liquide, qui suivrait une tendance analogue à celle de Carnahan-Starling, au niveau de la zone de transition et de la zone concentrée n'est pas un effet cinétique. Les diagrammes  $(\Phi, \Pi)$  établis pour le lysozyme à pH 7 et 20 mM sont donc bien des équations d'état : dans ces conditions physico-chimiques, à une fraction volumique ne correspond qu'une seule pression osmotique, et réciproquement.

L'existence d'un état d'équilibre en chaque point de notre équation d'état, en particulier dans la zone concentrée, va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle le système est dans un état d'arrêt dynamique, métastable (à l'instar d'un verre) dans la zone concentrée (Cardinaux et coll., 2011), comme évoqué à la section 3.1.1.

## 3.2 Effet des conditions physico-chimiques

La théorie DLVO appliquée aux protéines considère que leurs répulsions à longue portée obéissent à un potentiel écranté de Debye-Hückel (voir section 1.3.4.4). En particulier, deux paramètres sont susceptibles de faire varier le potentiel d'interaction électrostatique : la charge des protéines (représenté par le terme  $Z$ ) et l'écrantage des charges, à travers la longueur de Debye  $\kappa^{-1}$  (voir section 1.1.5).

### 3.2.1 Effet du pH

Afin de vérifier l'influence de la charge des protéines sur les interactions du lysozyme et de l'ovalbumine, une équation d'état a été réalisée pour chacune de ces deux protéines dans une condition où leur charge nette en valeur absolue était inférieure à celle à pH 7 : pH 9 et 20 mM de force ionique pour le lysozyme (charge +6,3 e) et pH 5 et 20 mM de force ionique pour l'ovalbumine (charge -3,7 e). La force ionique était gardée constante afin de mesurer uniquement l'impact de la variation de charge. Les résultats sont présentés sur la figure 3.11.

L'effet attendu d'une diminution de charge est une atténuation des répulsions électrostatiques entre protéines et que un comportement du lysozyme et de l'ovalbumine se rapprochant de celui des sphères dures. Ceci est illustré par la diminution du potentiel électrostatique avec la charge de la protéine (figure 3.12). Ce potentiel  $W(r)$  a été calculé à partir d'un potentiel de Debye-Hückel entre des particules non ponctuelles sphériques (voir section 1.3.4.4, équation 1.7 ).

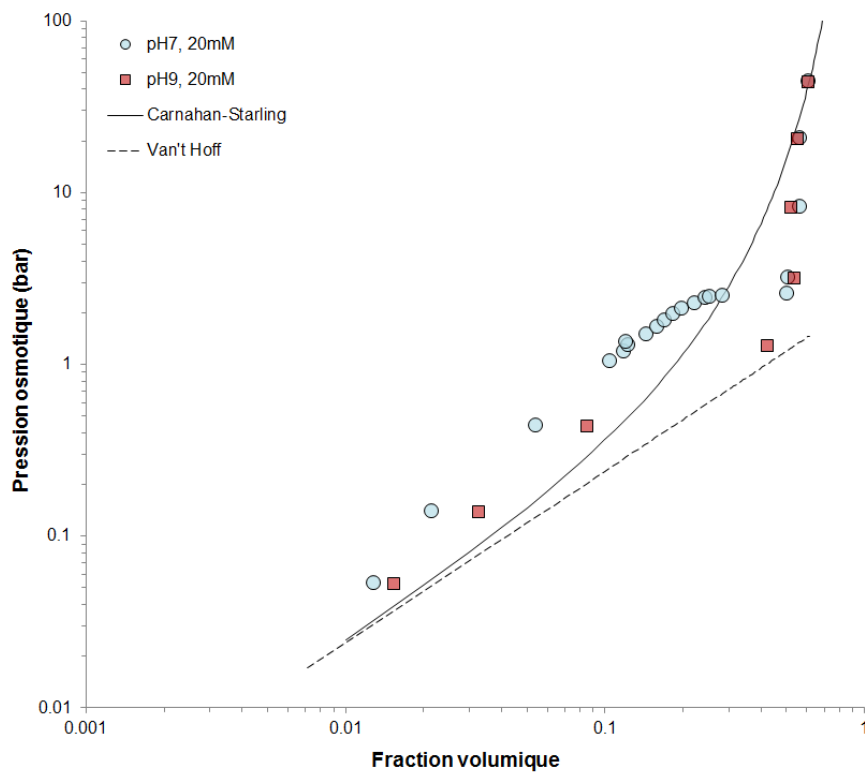
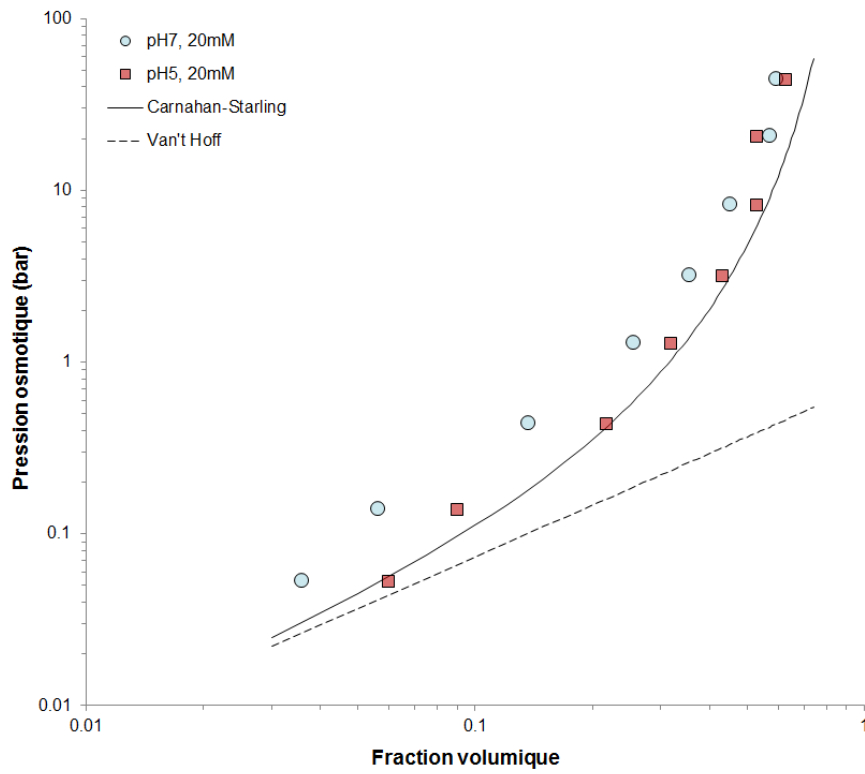


FIGURE 3.11 – Equations d'état de l'ovalbumine à pH 7 et pH 5,  $I=20\text{ mM}$  (haut) et du lysozyme à pH 7 et pH 9,  $I=20\text{ mM}$  (bas)

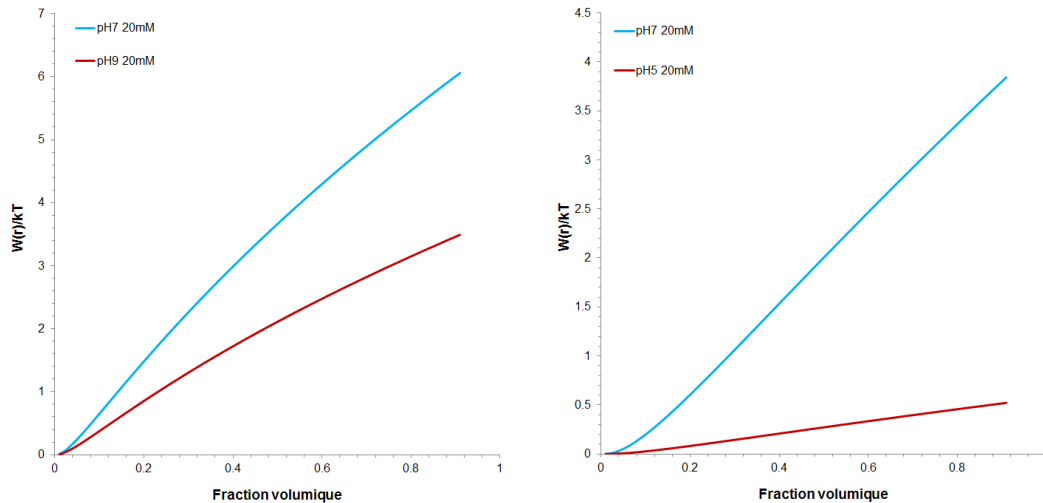


FIGURE 3.12 – *Potentiel d'interaction électrostatique en fonction de la fraction volumique. Figure de gauche : lysozyme à 20 mM de force ionique, et pH 7 (ligne bleue,  $Z = 8,3 e$ ) et 9 (ligne rouge,  $Z = 6,3 e$ ). Figure de droite : ovalbumine à 20 mM de force ionique, et pH 7 (ligne bleue,  $Z = -9,5 e$ ) et 5 (ligne rouge,  $Z = 3,5 e$ ).*

Pour les deux protéines, on constate que les équations d'état à pH 5 et pH 9 sont plus proches du modèle de Carnahan-Starling que leurs homologues à pH 7, même si cela n'est valable que dans la zone diluée pour le lysozyme. En effet, il existe un « saut » de concentration analogue à celui rencontré à pH 7, menant à un « mur » situé à la même fraction volumique qu'à pH 7. La zone de transition est cependant située à une pression osmotique et à une fraction volumique plus basses à pH 5 qu'à pH 7 : en effet, le point à 1,3 bar est déjà situé dans la zone concentrée pour pH 5, alors qu'il est toujours dans la zone diluée à pH 7. La zone de transition faisant écho à un passage vers une prédominance des interactions attractives, nous pouvons supposer que la réduction des répulsions électrostatiques par diminution de charge favorise ce phénomène et permet son occurrence à une pression osmotique et une fraction volumique plus faibles.

Quelques points de compression ont également été réalisés pour l'ovalbumine à un pH de 3,6 et différentes forces ioniques (20 mM, 150 mM et 2,02 M). Les résultats sont présentés sur la figure 3.2.1.

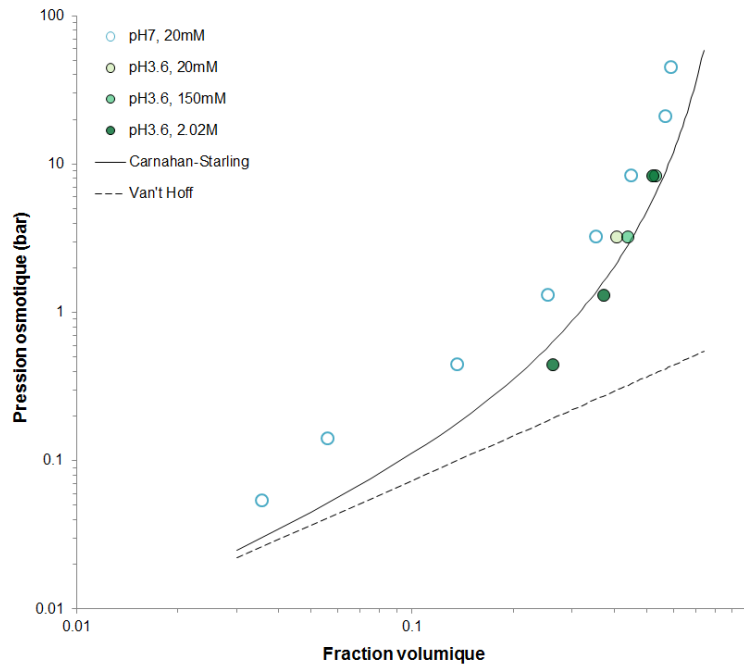


FIGURE 3.13 – *Equations d'état de l'ovalbumine à pH 3,6 et 20 mM (cercles verts clairs), 150 mM (cercles verts moyens) et 2,02 M de force ionique (cercles verts foncés). L'équation d'état à pH 7 et 20mM de force ionique est rappelé pour comparaison (cercles bleus vides).*

Pour une même fraction volumique, les points à pH 3,6 sont placés à des pressions osmotiques très inférieures à ceux correspondant à pH 7 et sont même, dans le cas de pH 3,6 et 2,02 M de force ionique, situés sous le modèle de Carnahan-Starling. Cette position relative montre que les attractions sont dominantes, malgré la très forte charge nette de la protéine à pH 3,6 (+31 e). Les données de Dumetz et coll. (Dumetz et coll., 2008b) sur les valeurs de  $B_{22}$  de l'ovalbumine dans des solutions de NaCl corroborent les nôtres : contrairement à pH 7 où le  $B_{22}$  reste quasi-constant et positif sur toute la gamme de concentrations en NaCl testée (0-3,5 M), la valeur du second coefficient du viriel à pH 3 et 4 chute rapidement et devient négatif à partir de 1 M (pH 3) ou 1,5 M (pH 4) de NaCl. La prédominance apparente des attractions dans les interactions entre molécules d'ovalbumine à pH 3,6 est difficile à expliquer. En effet, nous avons montré précédemment que les interactions étaient principalement répulsives à pH 7 sur toute la gamme de fractions volumiques étudiée. Nous nous serions donc attendus à ce que les répulsions soient d'autant plus marquées dans des conditions où la charge nette de l'ovalbumine est plus élevée en valeur absolue (+31 e à pH 3,6 contre -7,5 e à pH 7).



### 3.2.2 Effet de la force ionique

L'influence de la force ionique a été testée en réalisant des équations d'état à différentes teneurs en NaCl, à pH 7 : 15 mM et 130 mM de NaCl pour l'ovalbumine (forces ioniques totales de 35 mM et 150 mM) ; 15 mM, 130 mM et 2 M de NaCl pour le lysozyme (forces ioniques totales de 35 mM, 150 mM et 2,02 M). Les résultats sont présentés sur la figure 3.15.

L'effet attendu d'une augmentation de force ionique est similaire à celui d'une diminution de charge, à savoir une atténuation des interactions électrostatiques entre protéines (voir figure 3.14) et que un comportement du lysozyme et de l'ovalbumine se rapprochant de manière similaire du modèle de Carnahan-Starling. Or, ce n'est le cas pour aucune des deux protéines et leur comportement lors de l'augmentation de la force ionique est radicalement différent.

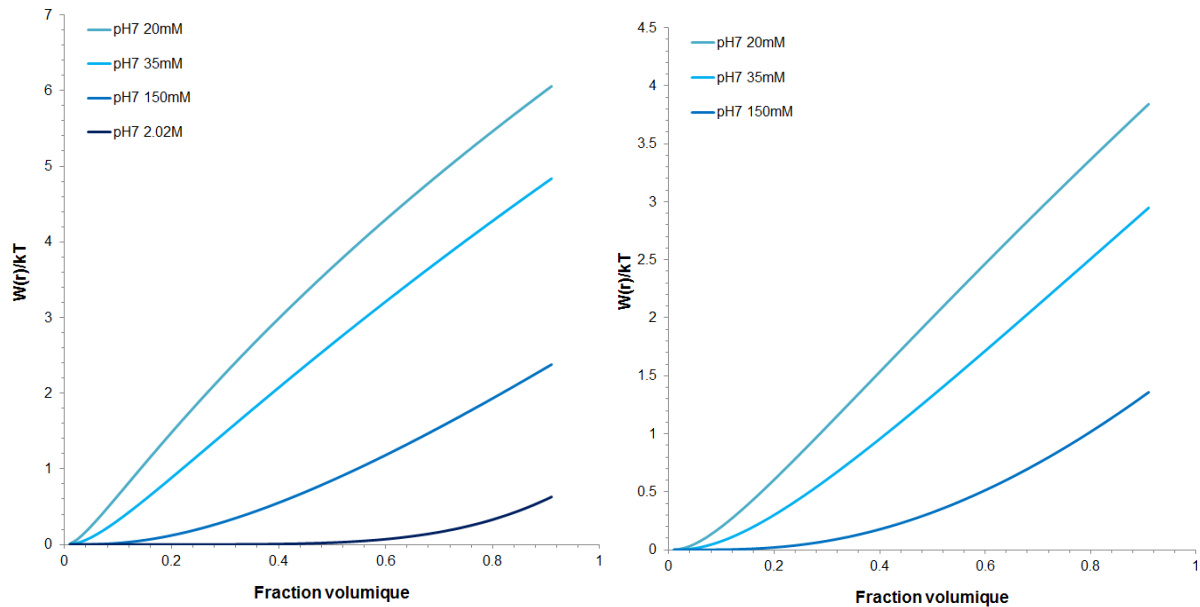


FIGURE 3.14 – Potentiel d'interaction électrostatique du lysozyme (gauche) et de l'ovalbumine (droite) à pH 7 et différentes forces ioniques, en fonction de la fraction volumique

Dans le cas de l'ovalbumine, les équations d'état à toutes les forces ioniques (20 à 150 mM) sont superposées sur toute la gamme de pressions osmotiques. La comparaison avec les données de Yousef et coll. (Yousef et coll., 2001), effectuées sur des solutions d'ovalbumine dans l'eau à pH 7 et différentes concentrations en NaCl, nous permet de constater que nos points et ceux de Yousef et coll. à 150 mM et 500 mM de force ionique sont superposables (figure 3.16).

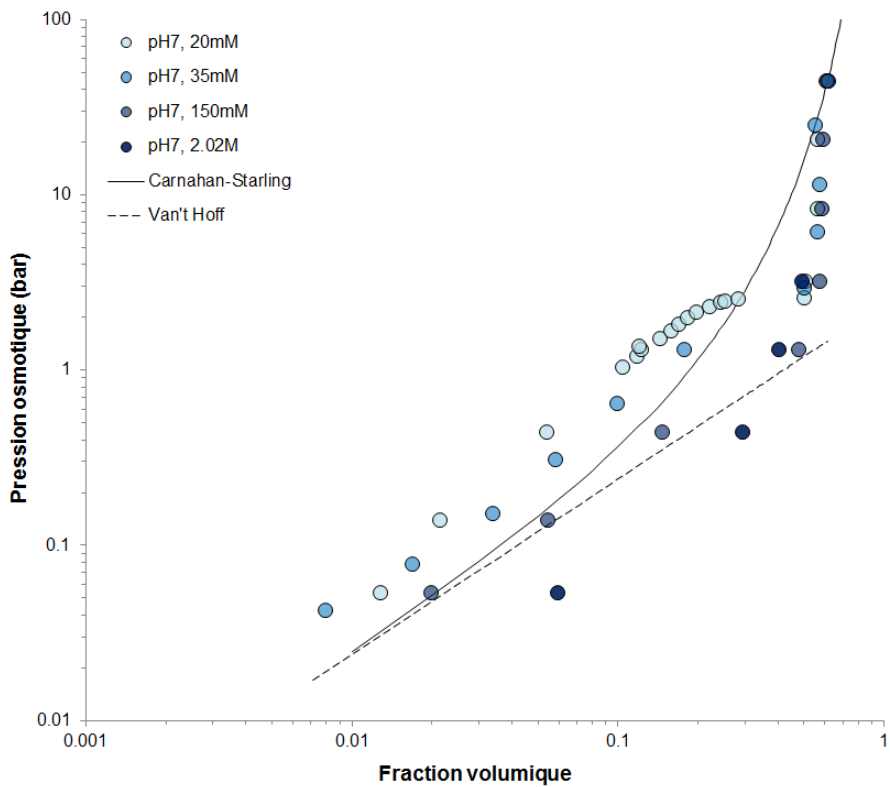
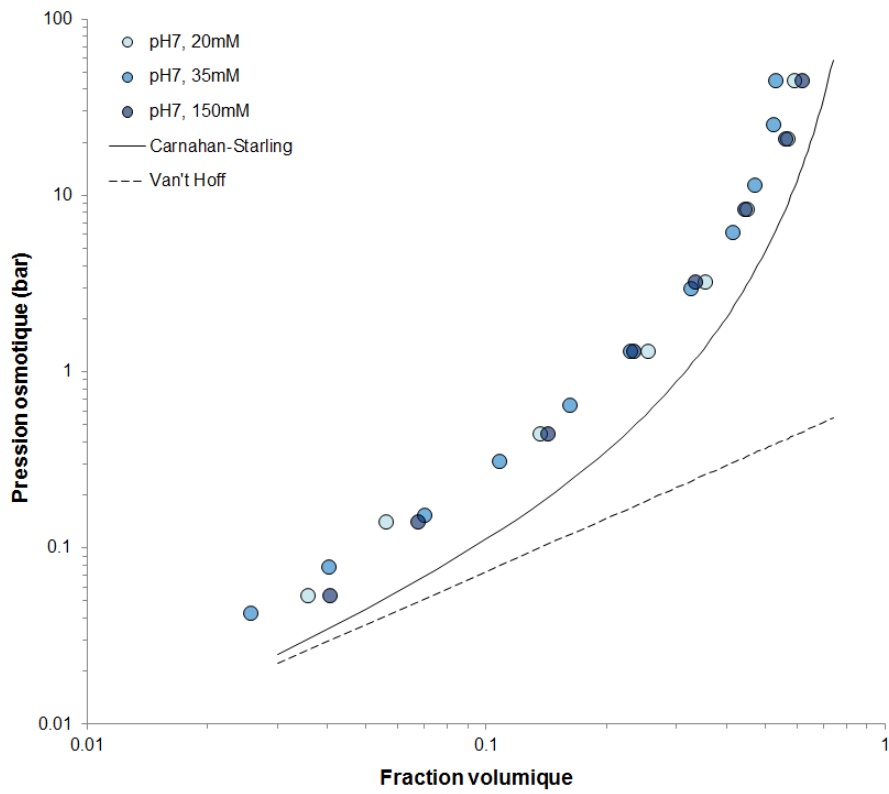


FIGURE 3.15 – Equations d'état de l'ovalbumine à pH 7 et force ionique de 20 mM, 35 mM et 150 mM (haut) et du lysozyme à pH 7 et force ionique de 20 mM, 35 mM, 150 mM et 2,02 M (bas)

En revanche, les points de Yousef et coll. à 10 mM de NaCl sont situés à des pressions osmotiques supérieures à celles de nos équations d'état, à même fraction volumique. Yousef et ses collaborateurs interprètent la différence entre les points à 10 mM de NaCl d'une part, et ceux à 150 mM et 500 mM d'autre part comme un signe qu'à 10 mM, la force ionique n'est pas suffisante pour écranter totalement les charges des molécules d'ovalbumine, générant une forte répulsion, en particulier dans la zone semi-diluée où les distances entre protéines sont plus faibles.

En revanche, une force ionique de 150 mM est suffisante pour écranter totalement les charges, ce qui explique que la pression osmotique n'évolue plus à force ionique supérieure (500 mM). Nous pourrions donc supposer que 20 mM de force ionique sont suffisants pour écranter totalement les charges des molécules d'ovalbumine, expliquant l'absence de différence entre les équations d'état à 20, 35 et 150 mM de force ionique. Cependant, les pressions osmotiques des solutions d'ovalbumine restent, même à 500 mM de force ionique, beaucoup plus fortes que celles du modèle de Carnahan-Starling, contredisant l'hypothèse de l'écrantage total des répulsions.

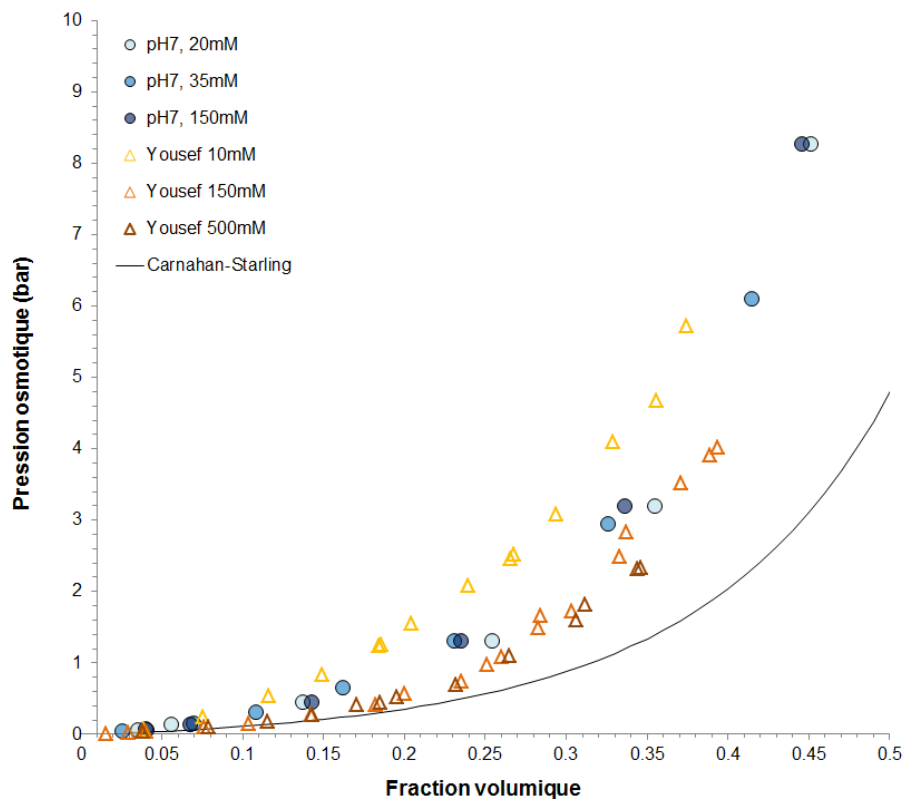


FIGURE 3.16 – Equations d'état de l'ovalbumine à pH 7 et 20, 35 et 150 mM de force ionique (ronds bleus) et données de Yousef et coll. (Yousef et coll., 2001) obtenues par osmométrie à membrane pour des solutions d'ovalbumine à pH 7 et 10, 150 et 500 mM de force ionique (triangles oranges).

Dans le cas du lysozyme en revanche, la force ionique possède une forte influence sur l'emplacement des équations d'état, jusqu'à 2,02 M de force ionique. L'augmentation de force ionique déplace les équations d'état vers les plus basses pressions, à fraction volumique égale, témoignant d'une diminution des répulsions entre objets. Contrairement à l'impression donnée par la représentation log-log, le déplacement n'est cependant pas constant sur la gamme de fractions volumiques correspondant à la zone diluée. Les équations pour des forces ioniques de 20 à 150 mM révèlent des compressibilités différentes, qui sont de plus en plus élevées à mesure que la force ionique augmente (figure 3.17).

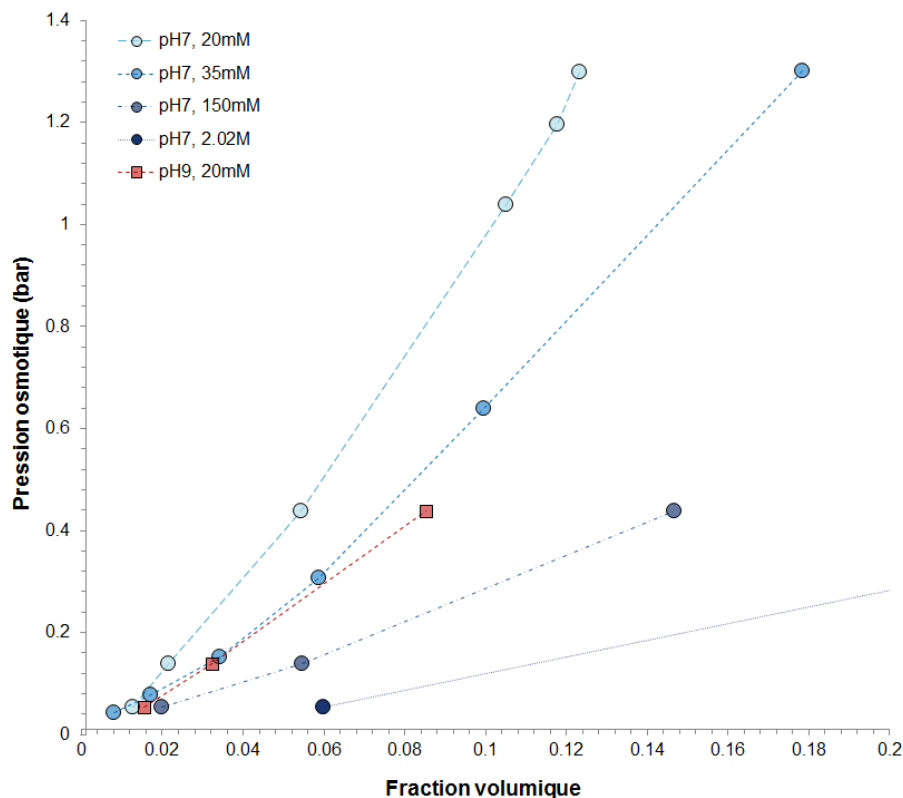


FIGURE 3.17 – Zoom sur la zone diluée des équations d'état mettant en évidence la différence de pente initiale

Cela peut s'expliquer par la faible importance des répulsions électrostatiques à très faible fraction volumique, du fait du grand éloignement des protéines (ex. à une fraction volumique de 0,01, la distance moyenne inter-particules, calculée par la formule  $d = \left( \frac{1}{\text{densité numérique}} \right)^{\frac{1}{3}}$  est d'approximativement 12 Å, soit environ 6 fois la longueur de Debye pour une force ionique de 20 mM). Lorsque la fraction volumique augmente, les répulsions électrostatiques deviennent de plus en plus sensibles et la force ionique joue un rôle de plus en plus important dans l'écrantage des interactions. Ceci est illustré par le tracé du potentiel d'interaction électrostatique en fonction de la fraction volumique, pour les différentes forces

ioniques (figure 3.14).

On remarque également que la valeur de pression osmotique correspondant au plateau diminue lors de l'ajout de NaCl, jusqu'à disparaître à une force ionique de 2,02 M. Cela peut s'expliquer par le fait que l'on a, au niveau de cette transition, passage d'un système dominé par les répulsions à un système dominé par les attractions. Nous pouvons supposer que la diminution des répulsions par ajout de NaCl augmente le poids des interactions attractives et génère la transition vers un système dominé par les attractions à une fraction volumique plus faible.

En revanche, les fractions volumiques atteintes dans la zone concentrée sont similaires pour toutes les conditions, suggérant que le système final est unique, quelles que soient les conditions physico-chimiques de départ, du moins dans nos gammes de pH et de force ionique.

Moon et ses collaborateurs (Moon et coll., 2000) ont réalisé, par osmométrie à membrane, des mesures de pression osmotique de solutions de lysozyme à pH 7 en présence de sulfate d'ammonium, à différentes fractions volumiques. Leurs résultats sont présentés avec les nôtres sur la figure 3.18.

Cette comparaison, à laquelle s'ajoutent les conclusions sur l'ovalbumine, met en avant la spécificité de chaque protéine quant à sa sensibilité aux différents sels (Collins, 2004 ; Kunz et Ninham, 2004 ; Boström et coll., 2005 ; Zhang et Cremer, 2006 et 2009 ; Lo Nostro et Ninham, 2012 ; Paterova et coll., 2012 ; Rembert et coll., 2012 ; Kurut et Lund, 2013). En effet, nous avons pu voir dans le cas de l'ovalbumine à pH 7 qu'au-delà d'une force ionique de 20 mM, la position des équations d'état ne varie plus (Yousef et coll., 2001). En revanche, l'influence du bis-tris propane et du NaCl sur le lysozyme est tout autre : une concentration croissante en NaCl à pH 7 déplace les équations d'état vers les plus faibles pressions, témoignant d'une action de ce sel sur les interactions entre protéines jusqu'à une concentration supérieure à 150 mM. D'autre part, les données de Moon et coll. (Moon et coll., 2000) montrent que l'influence du sulfate d'ammonium sur les interactions entre molécules de lysozyme à pH 7 n'est probablement effective que jusqu'à 1 M de sulfate d'ammonium, et que 2 M de NaCl génèrent une pression plus faible que 3 M de sulfate d'ammonium.

Pour les deux protéines, l'évolution de la morphologie des échantillons est similaire à celle observée à pH 7 et 20 mM de force ionique, présentée dans la section 3.1.1, à la seule exception du lysozyme à pH 7 et 2,02 M de force ionique, dont la morphologie sera commentée section 3.2.3. L'effet de la force ionique sur le décalage, en termes de pression osmotique et de fraction volumique, des trois zones définies pour les équations d'état du lysozyme se retrouve dans le décalage des changements d'état morphologiques des échantillons. En particulier, la solidification des échantillons s'effectue toujours au niveau

du « saut » de concentration.

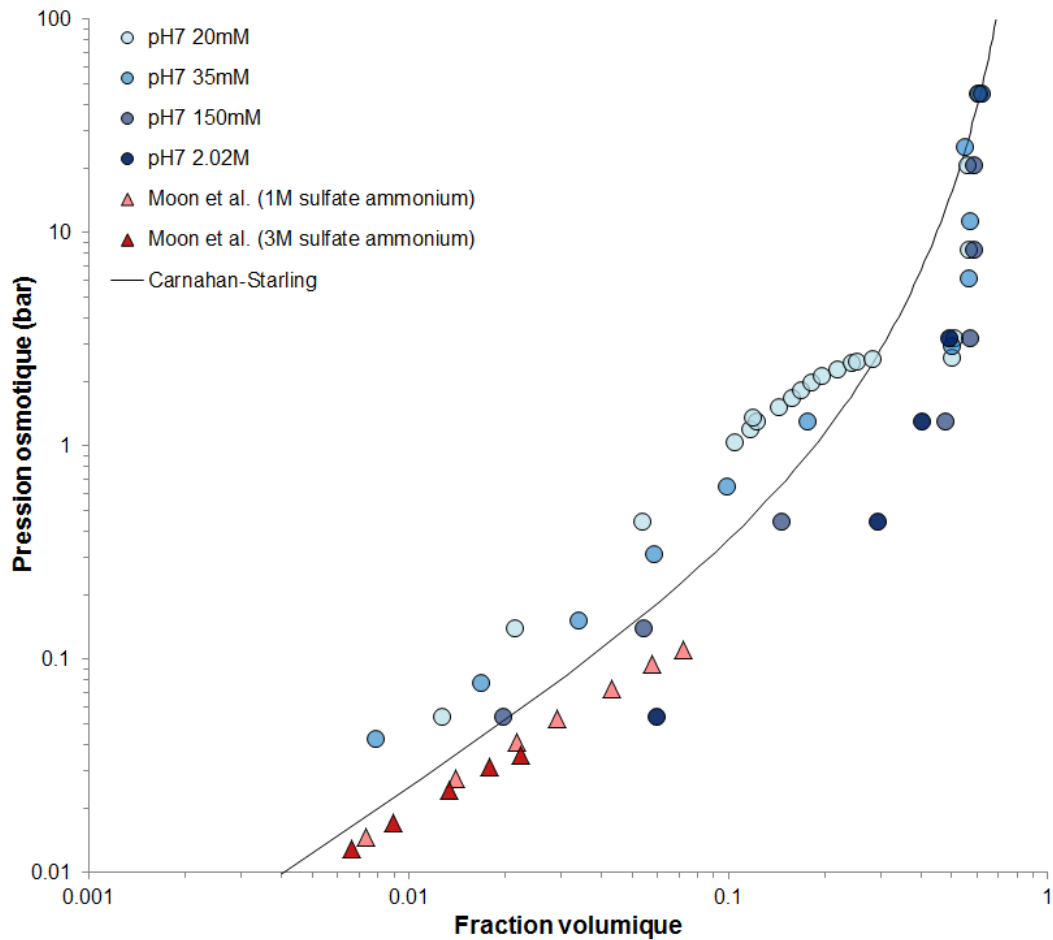


FIGURE 3.18 – Pressions osmotiques de solutions de lysozyme à pH 7 en présence de NaCl (ronds bleus) et de sulfate d’ammonium (tiré de (Moon et coll., 2000), triangles rouges)

### 3.2.3 Cas particulier du lysozyme à pH7 et $I=2,02M$

Le diagramme ( $\Phi$ ,  $\Pi$ ) du lysozyme à pH 7 et 2,02 M de force ionique présente une apparence différente de celle des équations d’état dans les autres conditions. En effet, on ne trouve pas trace des trois zones précédemment définies, mais une augmentation progressive de la pression avec la fraction volumique. Il n’existe pas de plateau dans la gamme de fractions volumiques étudiées. Les phénomènes intervenant lors de la concentration d’une solution de lysozyme à pH 7 et 2,02 M de force ionique semblent différents de ceux intervenant pour les autres conditions.

Un premier indice permettant de comprendre le devenir d’une solution de lysozyme concentrée à à pH 7 et 2,02 M de force ionique nous est donnée par l’apparence des

échantillons, lorsque les sacs de dialyse sont remplis avec la solution-mère à  $50 \text{ g L}^{-1}$  puis laissés sous compression osmotique toute la nuit. Au matin, les échantillons à 0,44 et 1,3 bar présentent l'aspect montré sur la figure 3.19. Des billes blanches, possédant un diamètre de l'ordre de la centaine de micromètres, se sont formées spontanément et ont sédimenté au fond du sac (0,44 bar) ou l'ont totalement rempli (1,3 bar). Ces billes sont fragiles et se redispersent aisément lorsqu'on les écrase.

Les travaux de Grigsby et coll. (Grigsby et coll., 2001) ont montré que le *cloud point* du lysozyme (à  $c = 87 \text{ g L}^{-1}$ ) à pH 7 et 2 M de NaCl se situait au-dessus de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , ce qui est bien supérieur à notre température de travail. Par conséquent, il est probable qu'un phénomène de séparation de phases liquide-liquide intervienne dans nos échantillons. Les billes obtenues seraient alors des « fossiles » des gouttelettes de phase dense, dans lesquelles, du fait de la poursuite de la concentration durant leur formation, la limite d'agrégation aurait été dépassée. Les gouttelettes auraient donc été figées avant que ne se produise une éventuelle séparation de phases totale et auraient sédimenté au fond des sacs.

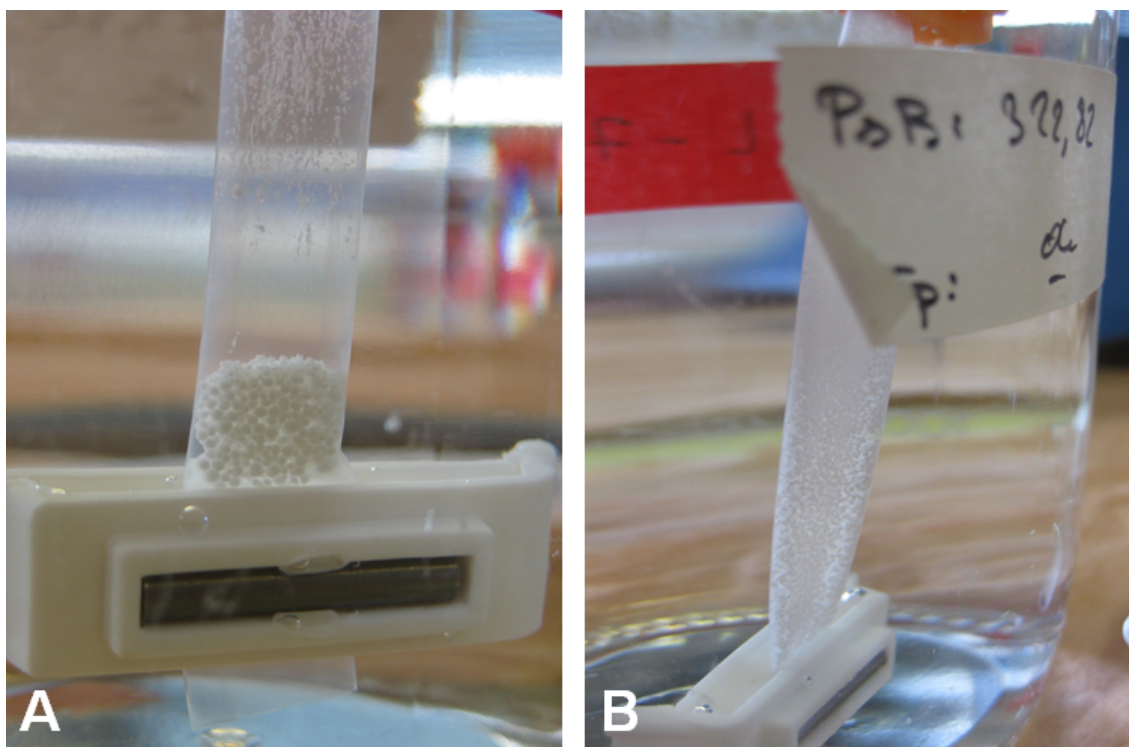


FIGURE 3.19 – Photographies d'échantillons de lysozyme à pH 7 et 2,02 M de force ionique, soumis à une pression de 0,44 bar (A) et 1,3 bar (B) durant une nuit

Cette hypothèse devra être vérifiée par des expériences futures, comme l'observation microscopique et des mesures de turbidité de la solution à différents temps au cours de sa concentration. La variation de la température, qui déplace la transition liquide-liquide,

apporterait également des éléments pour confirmer ou infirmer notre hypothèse, cependant la relation entre concentration massique en PEG 20 000 et pression osmotique n'est connue qu'à 20 °C pour la gamme de pressions que nous utilisons. L'utilisation d'un autre polymère stresser (dextran, PEG de masse molaire différente) serait donc obligatoire.

### 3.2.4 Réversibilité

La réversibilité thermodynamique de la compression a été testée pour les autres conditions, de deux façons différentes. La réversibilité à pH 7 et 150 mM de force ionique, et pH 9 et 20 mM a été testée de la même façon que pour pH 7 et 20 mM de force ionique. En revanche, la réversibilité à pH 7 et 35 mM de force ionique a été testée en comprimant des échantillons de lysozyme à différentes pressions osmotiques (1,3 et 44,3 bar), puis en les décompressant à une même pression (0,64 bar). Les résultats pour pH 7 à 35 et 150 mM de force ionique sont présentés sur la figure 3.20.

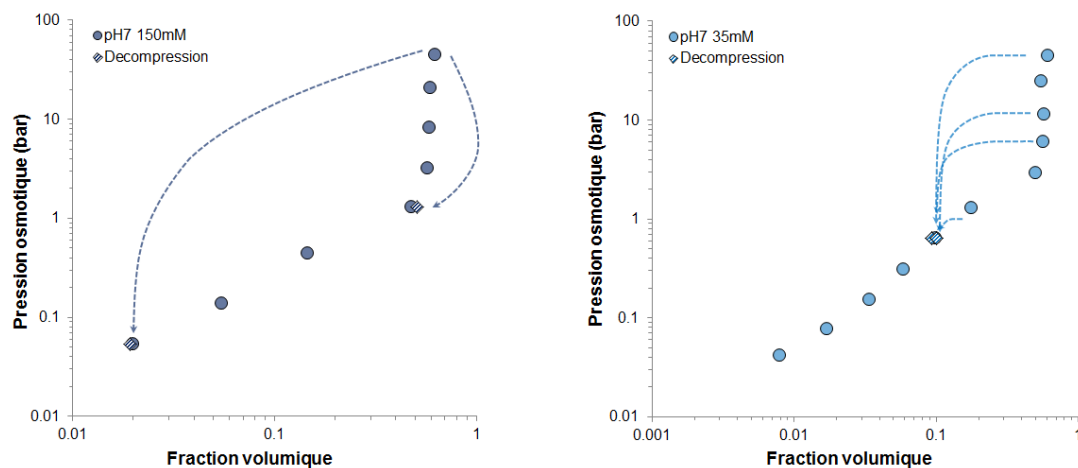


FIGURE 3.20 – *Equations d'état du lysozyme à pH 7 et 150 mM de force ionique (gauche) et à pH 7 et 35 mM de force ionique (droite), avec les points obtenus par compression puis décompression (losanges rayés). Le chemin de décompression est symbolisé par les flèches pointillées.*

Les expériences de décompression pour pH 9 et  $I = 20$  mM n'ont été effectués que pour une décompression à 0,05 bar. L'accord avec le point de compression simple est bon, comme montré sur la figure 3.21.

Les phénomènes intervenant lors de la concentration de la solution à pH 9 étant similaires à ceux à pH 7 et à une force ionique inférieure ou égale à 150 mM, comme montré dans la section 4.1, et la réversibilité thermodynamique par compression osmotique ayant été montrée à pH 7 dans cette gamme de forces ioniques, nous pouvons considérer, même en



l'absence de points supplémentaires, que le diagramme  $(\Phi, \Pi)$  à pH 9 et 20 mM de force ionique est une équation d'état.

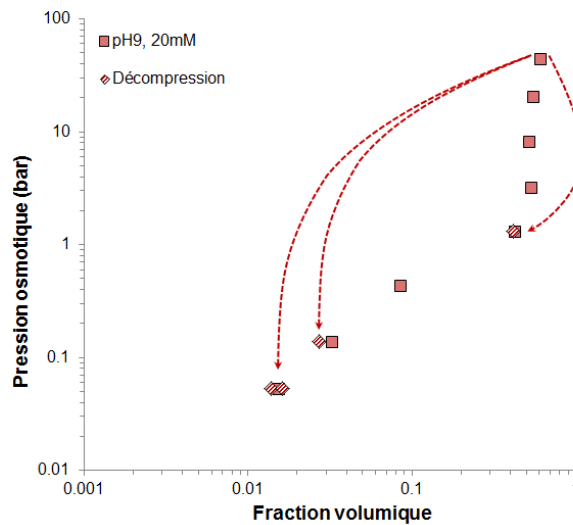


FIGURE 3.21 – Equation d'état du lysozyme à pH 9 et 20 mM de force ionique, avec les points obtenus par compression puis décompression (losanges rayés). Le chemin de décompression est symbolisé par la flèche pointillée.

Aucune expérience de réversibilité n'ayant été menée sur des échantillons à pH 7 et 2,02 M de force ionique et le phénomène intervenant (séparation de phases liquide-liquide) possédant une forte composante métastable, nous ne pouvons en revanche pas affirmer de façon certaine que le diagramme  $(\Phi, \Pi)$  obtenu dans ces conditions physico-chimiques est une équation d'état.

### 3.2.5 Importance de la prise en compte des contre-ions

Le calcul des coefficients du viriel, et en particulier du second coefficient du viriel  $B_{22}$ , est un moyen communément utilisé pour qualifier les interactions dans les solutions de protéines (George et Wilson, 1994; Rosenbaum et Zukoski, 1996; Neal et coll., 1999; Velev et coll., 1999, Curtis et coll., 2002; Tessier et coll., 2002; Dumetz 2008a et 2008b; Mehta et coll., 2012). L'expression de la pression osmotique en fonction des coefficients du viriel et de la concentration est (Neal et coll., 1999) :

$$\frac{\Pi}{RT} = \frac{C}{M_m} + B_{22} C^2 + B_{23} C^3 + \dots \quad (3.1)$$

avec  $R$  la constante des gaz parfaits ( $8.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  la température (en K),  $C$  la

concentration (en  $\text{g m}^{-3}$ ),  $M_m$  la masse molaire de la protéine (en  $\text{g mol}^{-1}$ ) et  $B_{ij}$  les coefficients du viriel (en  $\text{mol m}^3 \text{g}^{-2}$ ).

Dans notre calcul, l'expansion du viriel a été limitée aux interactions de paire :

$$\frac{\Pi}{RT} = \frac{C}{M_m} + B_{22} C^2 \quad (3.2)$$

d'où

$$B_{22} = \left( \frac{\Pi}{RT} - \frac{C}{M_m} \right) \left( \frac{1}{C^2} \right) \quad (3.3)$$

Le tracé des valeurs du  $B_{22}$  en fonction de la force ionique, en considérant cette dernière égale à la force ionique du tampon, est présentée sur la figure 3.22 pour les différentes conditions. Les valeurs de  $B_{22}$  situées au-delà du « saut » ne sont pas représentées, car incohérentes de par l'état solide du système. Les valeurs à pH 7 et 2 M de NaCl ne sont également pas représentées, du fait de l'incertitude sur l'état d'équilibre du système au niveau de ces points.

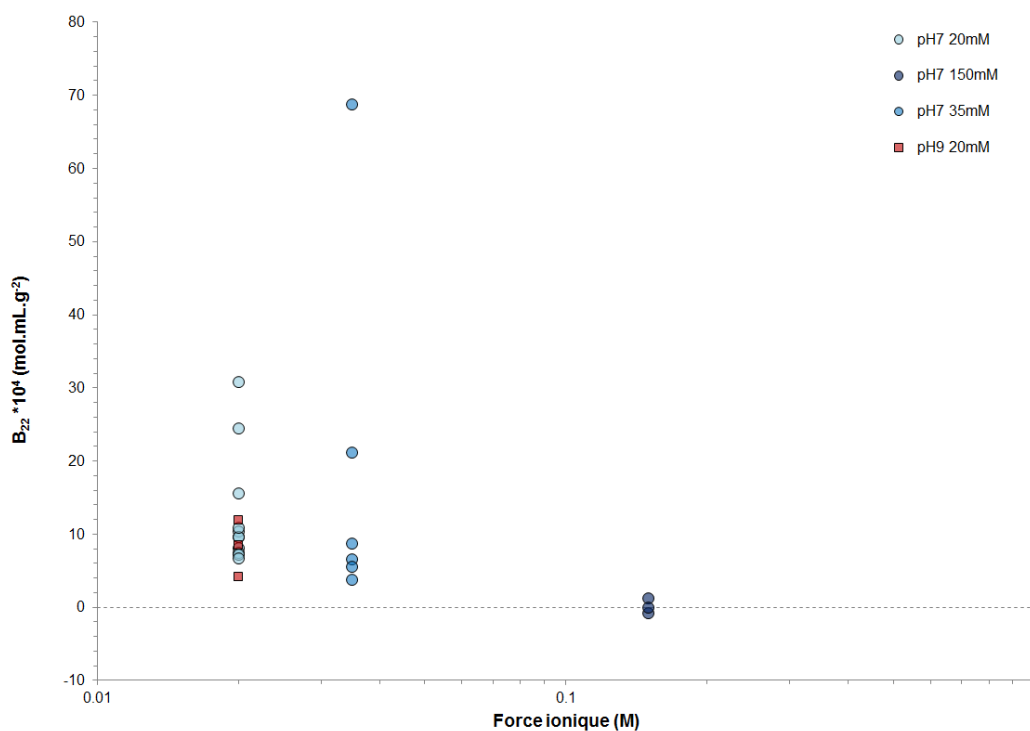


FIGURE 3.22 – *Second coefficient du viriel ( $B_{22}$ ) du lysozyme en fonction de la force ionique, à partir de l'équation d'état*

Pour une force ionique donnée, nous trouvons une large gamme de valeurs de  $B_{22}$ , ce qui ne permet pas de déterminer une tendance. De plus, la gamme de  $B_{22}$  pour 20 mM de

force ionique est différente aux deux pH considérés (pH 7 et pH 9).

Si nous faisons l'hypothèse que la force ionique « effective » à prendre en compte dans les calculs d'interactions protéine-protéine devait inclure celle induite par les contre-ions des protéines, alors elle est égale à :

$$I_{effective} = I_{tampon} + \frac{1}{2}C_{contre-ions} = I_{tampon} + \frac{1}{2}Z_p C_p \quad (3.4)$$

avec  $I_{tampon}$  la force ionique induite par le tampon,  $C_{contre-ions}$  la concentration molaire en contre-ions monovalents ( $Cl^-$ ),  $Z_p$  la charge nette de la protéine et  $C_p$  la concentration molaire de la protéine.

Un nouveau tracé de  $B_{22}$  en fonction de la force ionique « effective », prenant en compte les contre-ions, est présenté sur la figure 3.23. Les données de Velev (Velev et coll., 1998) sur des solutions de lysozyme à pH 7 et 9, en présence de 1 et 3 M de NaCl, sont représentées sur la même figure pour comparaison.

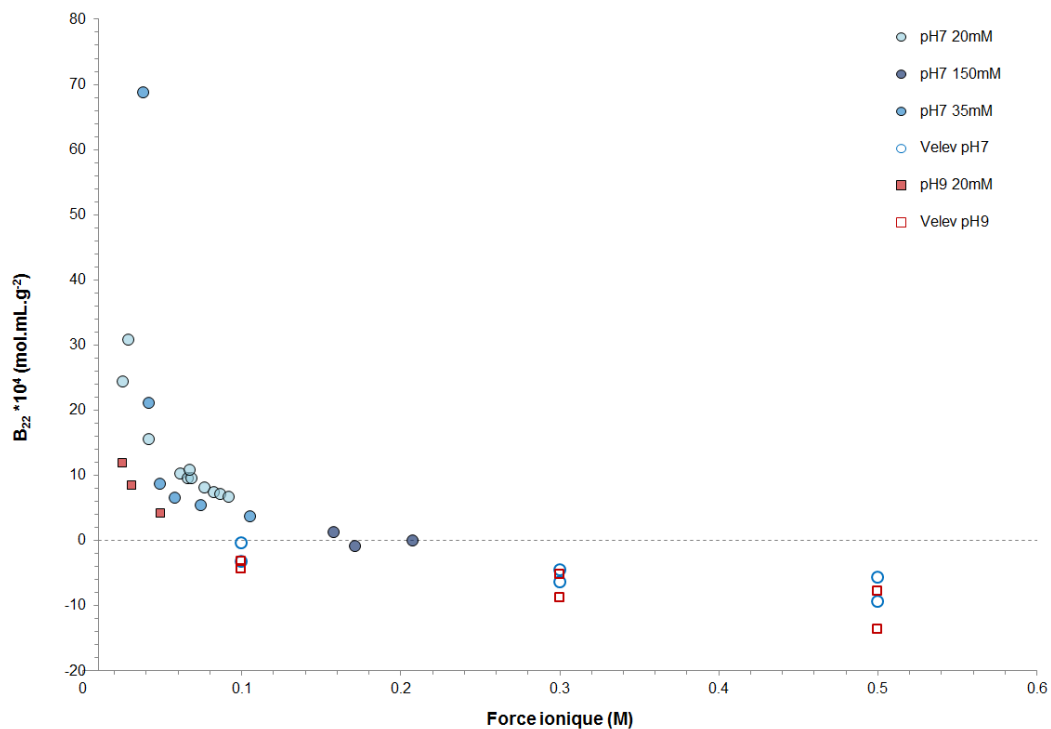


FIGURE 3.23 – *Second coefficient du viriel ( $B_{22}$ ) du lysozyme en fonction de la force ionique, avec prise en compte des contre-ions. Les données extraites des équations d'état du lysozyme sont représentées en symboles pleins ; les données tirées des travaux de Velev [Velev et coll., 1998] sont représentées en symboles creux.*

L'adéquation de la forme des courbes avec celles classiquement connues pour des protéines

ainsi qu'avec les données de la littérature, suggèrent que dans nos gammes de concentrations, la prise en compte des contre-ions dans le calcul de la force ionique est indispensable pour rendre compte des interactions. Ces contre-ions, participant à l'environnement ionique de la protéine, ne sont classiquement pas pris en compte dans les tracés de  $B_{22}$  en fonction de la force ionique, cependant les concentrations en protéine utilisées dans la littérature sont très faibles en regard des nôtres (0-20 g L<sup>-1</sup> (George et Wilson, 1994; Rosenbaum et Zukoski, 1996; Velez et coll., 1998; Moon et coll., 2000; Curtis et coll., 2002)). La force ionique induite par les contre-ions dans ces expériences est donc faible, en particulier en comparaison des concentrations en sels utilisées (plusieurs molaires). Dans notre cas en revanche, les concentrations en sel n'excèdent pas 150 mM et les fortes concentrations en protéine, associées à leur charge non négligeable, impliquent une concentration significative en contre-ions.

Un autre argument jouant en faveur de la prise en compte des contre-ions dans le calcul de la force ionique découle du calcul théorique de la pression osmotique à partir des potentiels d'interaction protéine-protéine. La théorie de van der Waals généralisée permet d'obtenir une relation entre pression et potentiel d'interaction en utilisant une approche champ moyen. Soit un système comprenant  $N$  molécules de rayon  $a$  et de volume  $v = \frac{4}{3}\pi a^3$ , dispersées dans un volume  $V$ , la pression osmotique s'écrit alors :

$$\beta\Pi_{gdW} = \frac{N}{V - Nv} + 2\pi\rho^2 \int_{2a}^{\infty} \beta w(r) r^2 dr \quad (3.5)$$

avec  $\rho = \frac{N}{V}$  la densité numérique des particules,  $r$  la distance centre-à-centre des particules,  $\beta = \frac{1}{k_B T}$  et  $w(r)$  un potentiel d'interaction effectif.

Le premier terme est une composante de volume exclu, tandis que le second terme contient l'énergie moyenne par particule, de façon similaire à l'expression de van der Waals originale (voir section 1.3.5.2).

Nous avons chois de remplacer le terme de volume exclu,  $\frac{N}{V - Nv}$ , par l'expression de la pression selon le modèle de Carnahan-Starling. En effet, ce modèle décrit de manière plus précise les interactions stériques de sphères dures et décrit bien la tendance des données obtenues par Rickard et coll. (Rickard et coll., 2010) à très haute fraction volumique (voir figure 3.8) :

$$\Pi_{CS} = \frac{1 + \Phi + \Phi^2 - \Phi^3}{(1 - \Phi)^3} Nk_B T \quad (3.6)$$

Nous avons choisi un potentiel d'interaction effectif  $w(r)$  composé d'un potentiel de Hamaker  $w_H(r)$  et d'un potentiel de Debye-Hückel  $w_{DH}(r)$  :

$$w_H(r) = -\frac{H}{12} \left[ \frac{d^2}{r^2} + \frac{d^2}{r^2 - d^2} + 2 \ln \left( \frac{r^2 - d^2}{r^2} \right) \right] \quad (3.7)$$

$$w_{DH}(r) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \left( \frac{Ze}{1 + \kappa a} \right)^2 \frac{\exp(-\kappa(r - 2a))}{r} \quad (3.8)$$

$$w(r) = w_H(r) + w_{DH}(r) \quad (3.9)$$

Le potentiel de dispersion de Hamaker ajoute une composante attractive au modèle, tandis que le potentiel de Debye-Hückel ajoute une composante électrostatique répulsive écrantée.

avec  $H$  la constante de Hamaker,  $d$  la distance minimale d'approche des particules (couramment prise comme étant égale à  $2a$ ),  $\kappa$  l'inverse de la longueur de Debye,  $\epsilon_0$  la permittivité du vide,  $\epsilon_r$  la permittivité relative du milieu,  $e$  la charge élémentaire.

Des tests d'ajustement de ce modèle, avec et sans prise en compte des contre-ions dans l'expression de la force ionique ont tout d'abord été réalisés sur l'équation à pH 7 et  $I = 20$  mM du lysozyme, pour des fractions volumiques situées avant le « saut » de l'équation d'état. Comme montré sur la figure 3.24, même après ajustement, le modèle ne prenant pas en compte les contre-ions dans l'expression de la force ionique ne reproduit pas la tendance de l'équation d'état. Le modèle prenant en compte les contre-ions dans l'expression de la force ionique reproduit en revanche bien mieux la tendance de l'équation d'état.

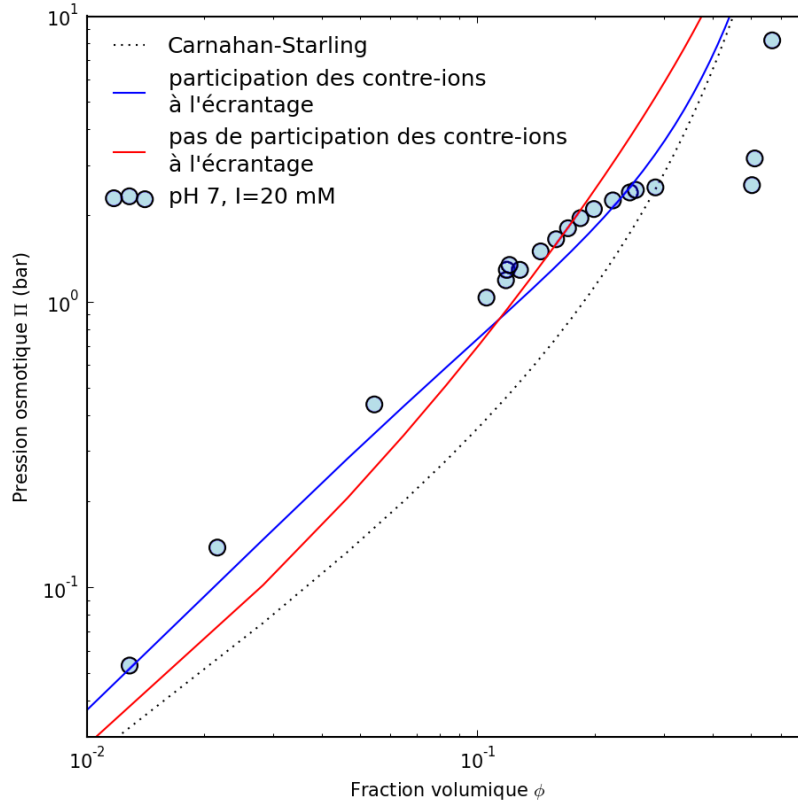


FIGURE 3.24 – Modèles d'équations d'état établis en considérant une composante de répulsion stérique (Carnahan-Starling), une composante de répulsion électrostatique écrantée (Debye-Hückel) et une composante de dispersion (Hamaker). Les forces ioniques utilisées pour le potentiel de Debye-Hückel ont été calculées avec (courbe bleue) et sans (courbe rouge) prise en compte des contre-ions de la protéine. La charge nette de la protéine est de  $+8,3 e$  et les valeurs de la constante de Hamaker correspondant au meilleur ajustement sont de  $1,963 k_B T$  (courbe bleue) et  $40,4 k_B T$  (courbe rouge).

Nous avons ensuite comparé notre modèle aux équations d'état du lysozyme à pH 7 et  $I = 20$  mM, pH 7 et  $I = 150$  mM et pH 9 et  $I = 20$  mM en effectuant un ajustement simultané sur les trois conditions, dans la même gamme de fractions volumiques que précédemment, en prenant en compte les contre-ions dans la force ionique, en utilisant les charges nettes théoriques du lysozyme ( $+8,3 e$  à pH 7 et  $+6,3 e$  à pH 9) et en gardant une valeur commune de la constante d'Hamaker pour les trois conditions. Le meilleur ajustement global a été obtenu pour  $H = 1,963 k_B T$  et est présenté sur la figure 3.25.

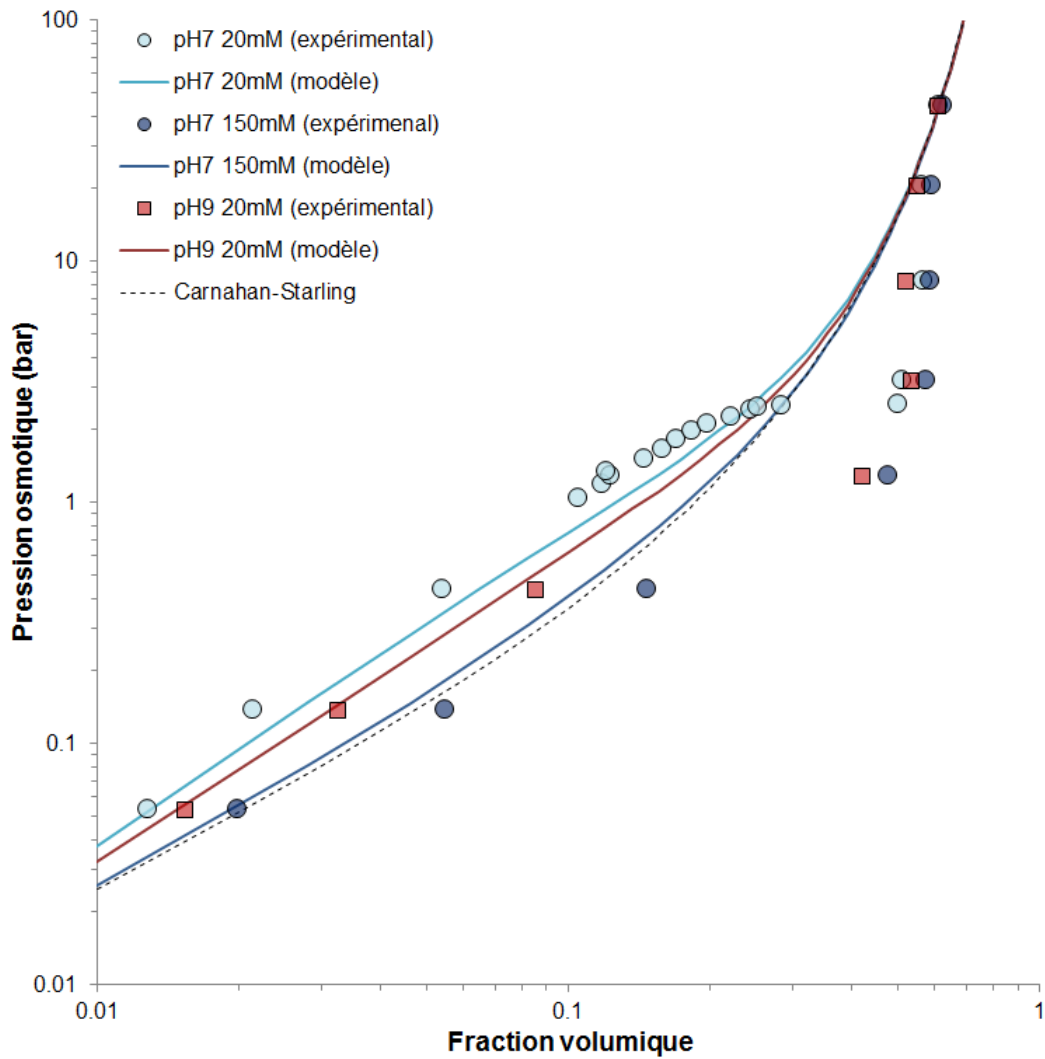


FIGURE 3.25 – Modèles d'équations d'état établis à  $pH\ 7$  et  $I = 20\ mM$ ,  $pH\ 7$  et  $I = 150\ mM$  et  $pH\ 9$  et  $I = 20\ mM$ , en considérant une composante de répulsion stérique (Carnahan-Starling), une composante de répulsion électrostatique écrantée (Debye-Hückel) et une composante de dispersion (Hamaker). La constante d'Hamaker est de  $1,963\ k_B T$  et les charges nettes utilisées sont les charges théoriques ( $+8,3\ e$  à  $pH\ 7$  et  $+6,3\ e$  à  $pH\ 9$ ).

Il est à noter cependant que le potentiel de Hamaker diverge à la distance minimale d'approche entre les protéines ( $2a$ ). Afin de pouvoir effectuer l'intégration numériquement, nous avons dû utiliser une borne d'intégration inférieure de  $2a + \delta$  au lieu de  $2a$  (Wu et Prausnitz, 1999), avec  $\delta$  choisi comme étant égal à  $2 \cdot 10^{-11}\ m$ . Même si la qualité de l'ajustement du modèle aux données expérimentales reste la même en faisant varier  $\delta$ , cette variation influe sur la valeur de  $H$  tirée de l'ajustement global. La valeur de  $1,963\ k_B T$  doit donc être considérée comme une valeur empirique liée aux bornes d'intégration et non comme une valeur absolue.

Les équations d'état issues de notre modèle reproduisent qualitativement l'allure de nos équations d'état expérimentales. En particulier, l'ajustement à l'équation d'état à pH 9 et  $I = 20$  mM est très bon. Cependant, nous constatons que la position, en termes de pression osmotique, est imparfaite dans les deux autres conditions. A même fraction volumique, la pression osmotique du modèle est inférieure à la pression expérimentale pour pH 7 et  $I = 20$  mM et supérieure à la pression expérimentale pour pH 7 et  $I = 150$  mM. La seule manière d'ajuster notre modèle parfaitement aux valeurs expérimentales pour les trois conditions serait d'attribuer une taille de protéine ou une valeur de la constante de Hamaker différentes pour chaque condition, ou de considérer des charges très éloignées de leur valeur théorique (jusqu'à  $\Delta Z = 4e$ ). Ne possédant aucun élément qui permettrait de justifier l'une ou l'autre de ces modifications, nous ne pouvons que supposer que les écarts entre les données expérimentales et issues du modèle sont dus à la non-sphéricité de la protéine et à l'anisotropie de répartition des charges et des patches hydrophobes sur la surface de la protéine. En effet, notre modèle est basé sur des objets sphériques, rigides et dont la charge est homogène.

### 3.3 Conclusion

La compression osmotique est une méthode de concentration avantageuse car simple, permettant de contrôler aisément les conditions physico-chimiques du milieu et de couvrir une large gamme de pressions osmotiques. Notre protocole a permis d'établir des équations d'état, reliant la pression osmotique imposée à la fraction volumique en protéine, de deux protéines globulaires, le lysozyme et l'ovalbumine. Ces équations d'état, établies sur une gamme étendue de fractions volumiques ( $\Phi = 0,01 - 0,62$ ), correspondent à une succession d'états en équilibre thermodynamique.

Ces équations ont fait apparaître des différences dans la nature et l'évolution des interactions intermoléculaires lors de la concentration du lysozyme et de l'ovalbumine. Le lysozyme montre en effet la présence conjointe d'interactions répulsives et attractives, dont l'équilibre est déplacé vers les attractions lors de l'ajout de sel, réduction de la charge de la protéine ou concentration des protéines (de par l'augmentation de la densité en contre-ions). L'ajout de sel et la réduction de charge de la protéine jouent particulièrement sur la position de la zone diluée, occasionnant une diminution de la pression osmotique à même fraction volumique. L'influence des contre-ions se fait davantage ressentir au niveau de la zone de transition, causant la courbure de l'équation d'état puis une transition de phases brusque vers un état peu compressible (zone concentrée).

Les interactions entre les molécules d'ovalbumine semblent en revanche être uniquement de nature répulsive à pH 7 et ne pas être sensibles à l'ajout de sel (NaCl) au bis-tris pro-



pane à 20 mM de force ionique. Comme pour le lysozyme en revanche, la diminution de la charge de la protéine via le pH va de pair avec une diminution de la pression osmotique à même fraction volumique. Il n'existe pas de transition de phases claire pour l'ovalbumine, même si les échantillons possèdent la texture d'un solide souple aux plus hautes fractions volumiques et que l'évolution de la fraction volumique en fonction de la pression osmotique montre un état final peu compressible ( $\Phi_{max} \sim 0,62$ ). L'équation d'état ne dévie apparemment pas d'un comportement liquide analogue à celui de sphères dures, même si l'écart systématique avec Carnahan-Starling, témoignant d'un comportement répulsif maintenu jusqu'aux fractions volumiques les plus élevées, reste à expliquer.

Un certain nombre de questions restent en suspens afin de compléter l'interprétation de ces équations d'état :

Quelle est la nature de la transition de phases vue pour le lysozyme (transition vitreuse, clusters, cristallisation)? Quelle est la nature de la solution dense obtenue pour les solutions d'ovalbumine les plus concentrées? Quelle différence avec celle obtenue dans le cas du lysozyme? Comment expliquer l'incompressibilité du système aux plus hautes pressions osmotiques?

Les analyses structurales des protéines et des solutions concentrées de protéines obtenues par compression osmotique, présentées dans le chapitre suivant, apportent des données pour comprendre les différences entre les équations d'état du lysozyme et de l'ovalbumine et éclairent la nature des phases observées.

## Chapitre 4

Les analyses structurales indiquent  
l'état physique des phases de  
protéines



Les équations d'état ont fait apparaître de nombreuses différences dans le comportement de deux protéines globulaires, le lysozyme et l'ovalbumine, montrant ainsi la spécificité de leur comportement. En particulier, nous avons montré que la nature de la transition solide-liquide est différente pour ces deux protéines, bien que les équations d'état n'aient pas permis à elles seules de déterminer la nature de ces transitions. Pour cela, nous avons besoin de techniques d'analyse donnant directement accès aux informations structurales du système.

La diffusion des rayons X aux petits angles est une méthode donnant accès à la fois à la structure d'une solution et à celle des particules dispersées. Elle a en outre été utilisée pour la caractérisation structurale de solutions de protéines concentrées (Zhang et coll., 2007, Zhou et Bilsel, 2014), dont le lysozyme (Stradner et coll., 2004 et 2006, Shukla 2008a) et l'ovalbumine (Ianeselli et coll., 2010). Cependant, la gamme de concentrations étudiée pour ces deux protéines ( $\Phi < 0,22$ ) a toujours été inférieure à celles rencontrées dans la zone des équations d'état où les échantillons sont sous forme solide. Les mesures que nous avons réalisées sur des solutions de lysozyme et d'ovalbumine à haute fraction volumique ( $\Phi > 0,33$ ), dans plusieurs conditions physico-chimiques, nous ont permis de déterminer la nature des transitions liquide-solide pour ces deux protéines et leur devenir dans la zone la plus concentrée de nos équations d'état.

## 4.1 Le plateau est un signe de la cristallisation du lysozyme

Les échantillons de lysozyme ont été analysés en diffusion des rayons X aux petits angles à partir de 3,19 bar pour les conditions suivantes : pH 7 et 20 mM de force ionique, pH 7 et 150 mM de force ionique, pH 9 et 20 mM de force ionique. Dans le cas de pH 7 et pH 9 à 20 mM de force ionique, une analyse supplémentaire a été réalisée à 1,3 bar. Tous les spectres concernent des échantillons solidifiés, sauf celui de l'échantillon à pH 7, 20 mM de force ionique, 1,3 bar.

Le facteur de structure obtenu à partir de ce dernier échantillon est présenté sur la figure 4.1. Dans ces conditions, soit pH 7, 20 mM de force ionique, 20 °C et 1,3 bar de pression osmotique, la fraction volumique en protéine est de 0,123. Or, l'un des facteurs de structure présentés par Stradner et coll. sur des solutions de lysozyme à pH 7,8, 20 mM de force ionique et 25 °C correspond à une concentration en protéine de 169 g L<sup>-1</sup>, soit  $\Phi = 0,12$  avec un volume spécifique partiel  $\bar{v} = 0,712$  mL g<sup>-1</sup> (Stradner et coll., 2004). La concentration en lysozyme et les conditions physico-chimiques étant proches des nôtres, le facteur de structure obtenu par Stradner et coll. est également reporté sur la figure 4.1 pour comparaison.

On constate que le pic situé à plus petits  $q$  et correspondant, selon Stradner et coll., aux distances inter-clusters, est situé à une position très proche, mais non identique, sur nos spectres de SAXS ( $q = 0,091 \text{ \AA}^{-1}$ , soit  $d \sim 69 \text{ \AA}$ ) et sur ceux de Stradner et coll. ( $q \sim 0,096 \text{ \AA}^{-1}$ , soit  $d \sim 65 \text{ \AA}$ ). Ceci peut être expliqué par la plus faible température ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) dans nos expériences que dans celles de Stradner et coll. ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). En effet, les positions  $q_c^*$  du pic inter-clusters déterminées par Stradner et coll. à  $15$  et  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  situeraient celui à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  vers  $0,09 \text{ \AA}^{-1}$  pour une fraction volumique  $\Phi = 0,122$  (Stradner et coll., 2006), ce qui est cohérent avec nos observations.

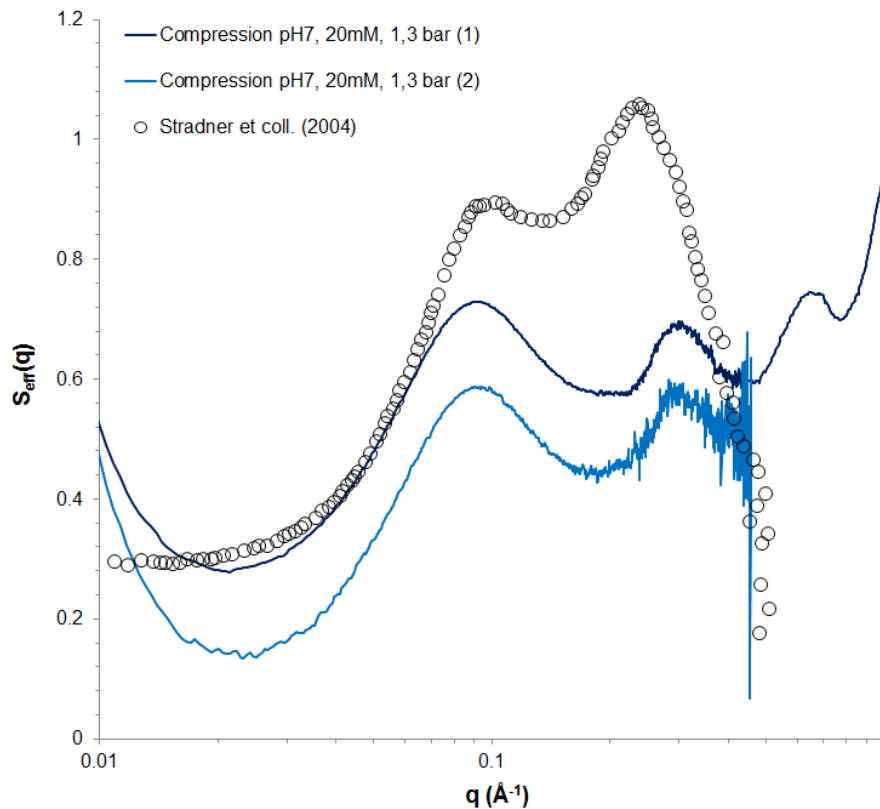


FIGURE 4.1 – Facteurs de structure des échantillons de lysozyme comprimés à pH 7, 20 mM de force ionique et 1,3 bar de pression osmotique (lignes bleues) et des échantillons de lysozyme concentrés à pH 7,8 et 20 mM de force ionique par Stradner et coll. (Stradner et coll., 2004) (cercles vides). Les spectres ont été ajustés verticalement pour permettre une meilleure lecture.

En revanche, le second pic est situé à des valeurs de  $q$  légèrement plus élevées dans notre cas ( $q = 0,3 \text{ \AA}^{-1}$ , soit  $d \sim 21 \text{ \AA}$ ) que dans celui de Stradner et coll. ( $q = 0,24 \text{ \AA}^{-1}$ , soit  $d \sim 26 \text{ \AA}$ ). Ce pic correspondrait aux distance inter-monomères dans les clusters. Cette différence est en contradiction avec les résultats de Stradner et coll., qui montrent que la position de ce pic est indépendante de la température, de la concentration en protéine et

de la concentration en sel (Stradner et coll., 2006).

Les facteurs de structure obtenus sur des échantillons solidifiés présentent un aspect totalement différent. Le premier constat, frappant, est la présence de nombreux pics de Bragg pour des valeurs de  $q$  supérieures à  $0,8 \text{ \AA}^{-1}$ . La figure 4.2 donne un exemple pour pH 7 et 20 mM de force ionique. Ces pics dominent totalement les spectres et il n'est plus possible de distinguer de bosses de structure.

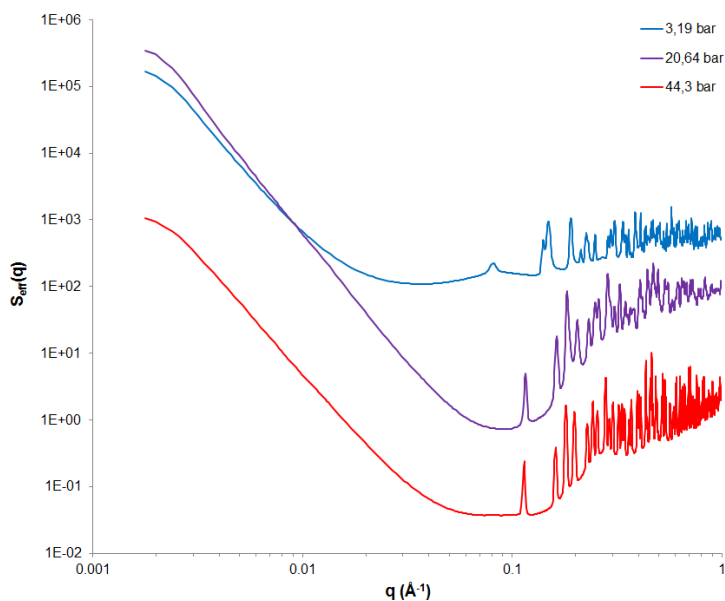


FIGURE 4.2 – *Facteurs de structure obtenus sur des échantillons de lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique, comprimés à 3,19 bar (ligne bleue), 20,64 bar (ligne violette) et 44,3 bar (ligne rouge). Les spectres ont été ajustés verticalement pour permettre une meilleure lecture.*

Ces pics de Bragg sont le signe que les échantillons sont majoritairement, sinon totalement, composés de cristallites. Cette conclusion est cohérente avec les observations en microscopie confocale effectuées sur un échantillon de lysozyme comprimé à pH 7, 20 mM de force ionique et une pression osmotique de 44,3 bar (figure 4.3).

On observe en effet des objets de plusieurs micromètres de longueur, présentant de nombreuses lignes de clivage (probablement dues à la pose de l'échantillon sur la lame de microscope) et remplissant la majeure partie de l'échantillon. La matrice les entourant est très probablement de la solution de coloration qui s'est infiltrée dans l'échantillon.

La quantité de pics de Bragg et leur bonne définition nous a permis d'analyser plusieurs spectres SAXS comme des spectres de poudre. L'ajustement a été réalisé en utilisant un modèle de système tétragonal, de groupe d'espace  $P4_32_12$ , correspondant à une forme bien

connue des cristaux de lysozyme (Wilson et coll.,1992 ; Vaney et coll., 1996 ; Cipriani et coll., 2012 ; Grobelny et coll., 2014).

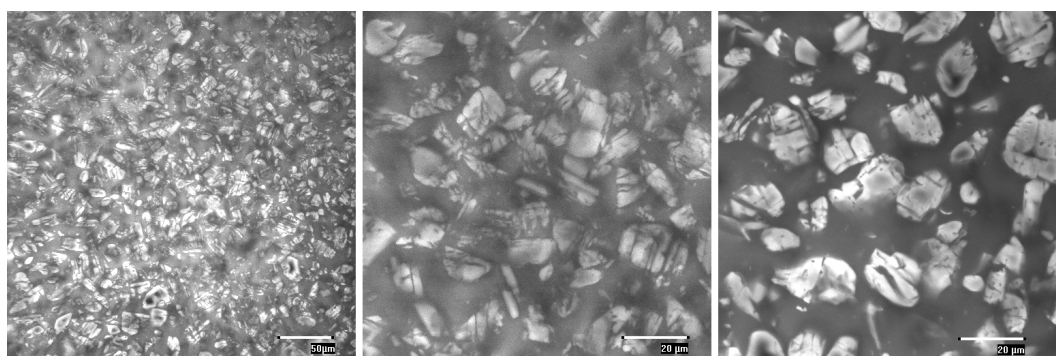
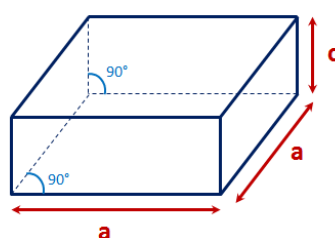


FIGURE 4.3 – Photographies en microscopie confocale d’un échantillon de lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique, comprimé à 44,3 bar. Les échelles sont de 50 µm (photo de gauche) et de 20 µm (photos du milieu et de droite).

Les paramètres de maille ( $a$ ,  $b$ ) étaient laissés flottants. L’ajustement nous a permis de déduire les fractions volumiques de lysozyme dans les cristaux, en utilisant la formule donnée par Drenth (Drenth, 2007) (voir section 1.4.1). Les résultats sont donnés dans le tableau 4.1.



Condition	$a$ (Å)	$c$ (Å)	Fraction volumique
pH7, I=20mM, 8,26 bar	78,26	38,98	0.567
pH7, I=20mM, 20,64 bar	77,77	38,64	0.579
pH7, I=20mM, 44,3 bar	78,01	39,00	0.570
pH7, I=20mM, 44,3 bar	78,02	39,00	0.570
pH7, I=150mM, 3,19bar	77,89	38,30	0.583
pH7, I=150mM, 3,19 bar	77,81	38,38	0.583
pH7, I=150mM, 8,26 bar	78,16	38,88	0.570
pH7, I=150mM, 8,26 bar	78,06	39,01	0.570
pH9, I=20mM, 44,3 bar	77,82	38,94	0.574
pH9, I=20mM, 44,3 bar	77,73	38,86	0.577

TABLE 4.1 – Valeurs de paramètres de maille obtenus par ajustement d’un modèle cristallin tétragonal de groupe d’espace  $P4_32_12$  aux données SAXS d’échantillons de lysozyme et fraction volumique en protéine dans le cristal déduite des paramètres de maille

En reportant les valeurs obtenues sur nos équations d'état, on constate que les fractions volumiques dans nos échantillons et déduites de l'analyse des spectres SAXS sont très proches (figure 4.4). Nous en déduisons que les échantillons sont entièrement cristallisés.

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le « plateau » vu sur nos équations d'état est le signe d'une transition liquide-cristal. Lorsque la solubilité a été dépassée (Retailleau et coll., 1997) et dès que la sursaturation est suffisante, la cristallisation (nucléation et croissance) se déroule sans barrière énergétique. Les molécules de lysozyme sont incorporées dans des cristallites, jusqu'à l'apparition d'une seule phase, cristalline, de même potentiel chimique, car générant la même pression osmotique, que le liquide original.

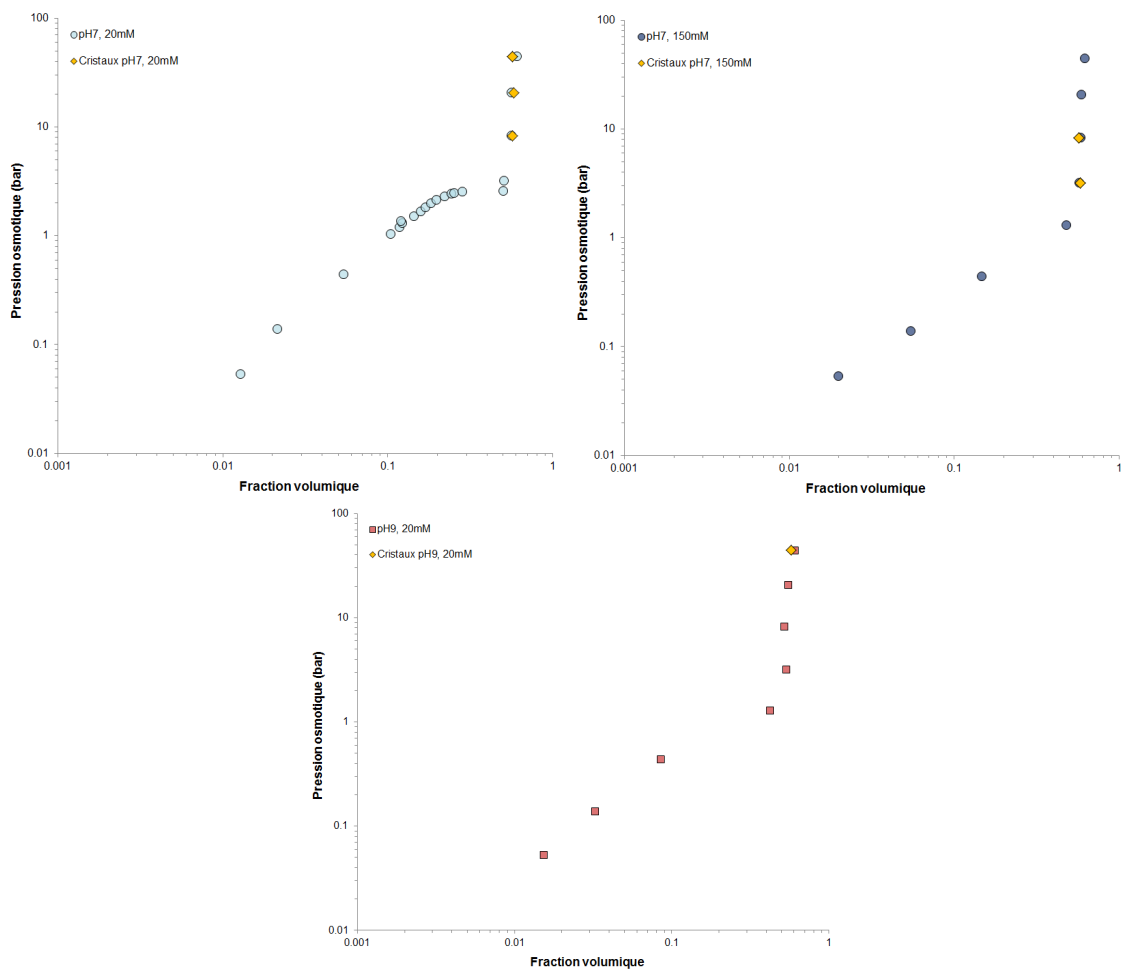


FIGURE 4.4 – Fractions volumiques déduites des spectres SAXS de cristaux de lysozyme dans les échantillons comprimés (losanges jaunes), reportés sur les équations d'état correspondantes

Nous pouvons ainsi proposer une interprétation pour l'évolution de nos équations d'état avec la fraction volumique. En effet, nous constatons que la gamme de fractions volumiques



favorables à la formation des clusters observés par Stradner et coll. (Stradner et coll., 2004) recouvre la zone de transition (figure 4.5), à savoir la zone où la courbure de l'équation d'état a lieu et où les interactions entre protéines, jusqu'alors dominées par les répulsions électrostatiques, basculent progressivement vers une prédominance des attractions du fait de l'écrantage par les contre-ions (voir section 3.2.5).

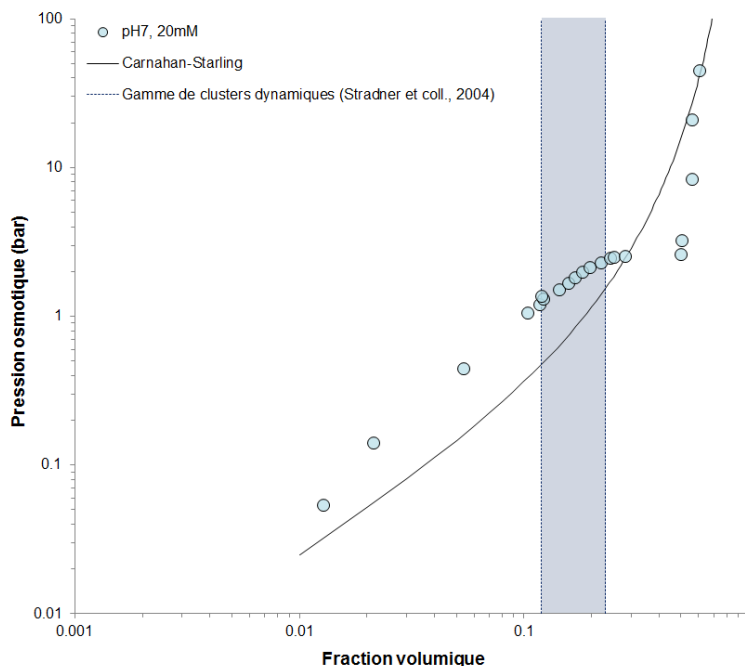


FIGURE 4.5 – Gamme de fractions volumiques où des clusters dynamiques de lysozyme ont été observés par Stradner et coll. (Stradner et coll., 2004), reportée sur l'équation d'état du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique

Nous pouvons supposer qu'aux fractions volumiques les plus faibles, à savoir dans la zone diluée, les répulsions sont trop fortes pour que les monomères de lysozyme puissent s'assembler en clusters. Puis, l'écrantage progressif par les contre-ions amène à un équilibre attraction/répulsion permettant la formation des clusters. Nous pouvons imaginer que les clusters deviennent de plus en plus grands avec l'augmentation de la fraction volumique et de la concentration en contre-ions, comme c'est le cas lors de l'augmentation de la teneur en sel dans les expériences de Stradner et coll. (Stradner et coll., 2006), jusqu'à ce que les répulsions soient si faibles qu'il n'existe plus de barrière à la cristallisation : la formation de clusters est préemptée par la cristallisation. La fraction volumique du système, cristallin, est alors déterminé par celle de la protéine dans les cristaux, les variations de fraction volumique étant causés par une variation des paramètres de maille avec la pression osmotique.

Cette hypothèse permet également d'expliquer la différence entre nos équations d'état et

les points mesurés par Rickard et coll. (Rickard et coll., 2010) (voir section 3.1.1). En effet, la cinétique de la concentration de leur solution de lysozyme est très rapide et aboutit à une phase qu'ils qualifient de « vitreuse ». Nous pouvons donc imaginer que dans leurs billes, les monomères de lysozyme n'ont pas eu le temps de s'organiser en cristaux et sont restés piégés dans un état métastable, probablement sous forme de verre. Le diagramme  $(\Phi, \Pi)$  de la solution de lysozyme suivrait alors une tendance liquide, parallèle à Carnahan-Starling (ce que semblent suggérer les points situés à  $\Phi < 0,53$ ). Un argument en faveur de cette hypothèse provient des spectres SAXS mesurés sur deux échantillons de lysozyme dont la compression a été très rapide et où l'équilibre n'a pas été atteint : un échantillon comprimé à 8,26 bar, pH 7 et 20 mM de force ionique et un échantillon comprimé à 20,64 bar, pH 9 et 20 mM de force ionique. Les spectres sont présentés sur la figure 4.6.

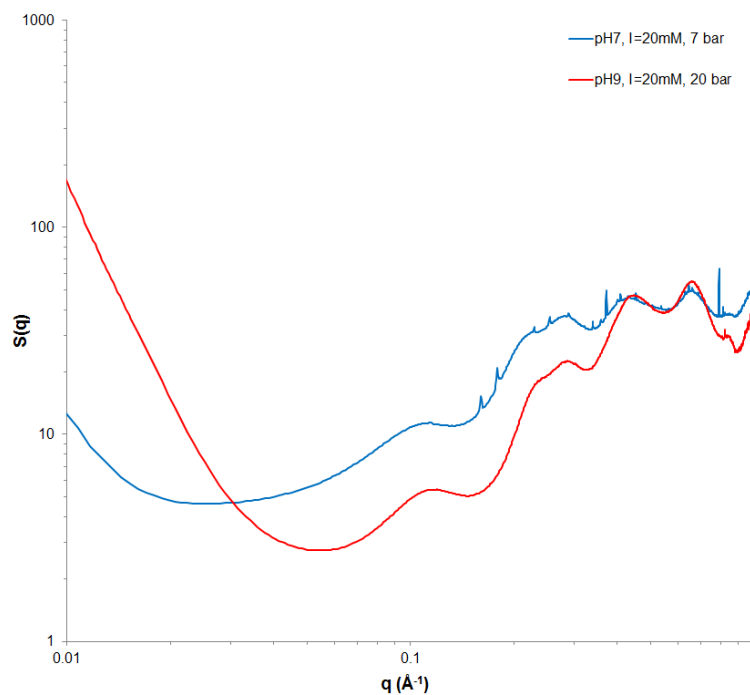


FIGURE 4.6 – *Facteurs de structure d'échantillons de lysozyme hors équilibre : 8,26 bar, pH 7 et 20 mM de force ionique (courbe bleue) et 20,64 bar, pH 9 et 20 mM de force ionique (courbe rouge)*

Les spectres obtenus sur ces échantillons ne présentent pas, ou très peu, de pics de Bragg. Les facteurs de structure présentent le même aspect général que ceux obtenus sur les échantillons d'ovalbumine, qui ont subi une transition relevant soit de la vitrification, soit de la gélification (voir section 4.2). La cinétique de concentration, permettant ou non l'équilibre à chaque étape, prédispose donc l'état final du système et sa situation sur le diagramme  $(\Phi, \Pi)$ .

## 4.2 L'ovalbumine subit une transition de type verre/gel

### 4.2.1 Evolution des facteurs de structure en fonction de la fraction volumique

Les échantillons d'ovalbumine ont été analysés en diffusion des rayons X aux petits angles à partir de 3,19 bar pour les conditions suivantes : pH 7 et 20 mM de force ionique, pH 7 et 150 mM de force ionique, pH 5 et 20 mM de force ionique. Les facteurs de structure obtenus à pH 7 et 20 mM de force ionique sont présentés sur la figure 4.7. Les facteurs de structure déterminés par Ianeselli et coll. (Ianeselli et coll., 2010) sur des solutions d'ovalbumine à pH 7 sans ajout de sel ou de tampon sont également représentés.

À la différence du lysozyme, les spectres SAXS de l'ovalbumine après solidification des échantillons ne présentent aucun pic de Bragg, et ce pour toutes les conditions (voir la section 4.2.2). Les échantillons ne sont donc pas cristallisés, mais sont plus probablement de type gel ou verre. La nature majoritairement répulsive des interactions entre molécules d'ovalbumine, montrée par les équations d'état, et les fractions volumiques élevées atteintes ( $\Phi > 0,62$ ) excluent la possibilité d'un gel de type DLCA (voir section 1.4.4). Afin de déterminer si les échantillons solides possèdent une structure de type verre répulsif ou de type gel (potentiellement créé par RLCA), des mesures de rhéologie seraient nécessaires (Mason et Weitz, 1995 ; Mattson et coll., 2009).

Cependant, la caractéristique la plus frappante de nos spectres est le « creux » affectant le facteur de structure  $S(q)$  jusqu'à  $q \sim 0,52 \text{ \AA}^{-1}$  à partir d'une pression de 8,26 bar. En effet, lors de la concentration de nos échantillons, nous nous attendions à ce qu'une structure plus ordonnée s'établisse, causant une augmentation de l'intensité et de la définition du pic principal. La variation théorique peut être représentée par la Mean Spherical Approximation (MSA), donnant le facteur de structure de sphères chargées avec des interactions coulombiennes écrantées (Hayter et Penfold, 1981 ; Zhang et coll., 2007 ; Ianeselli et coll., 2010).

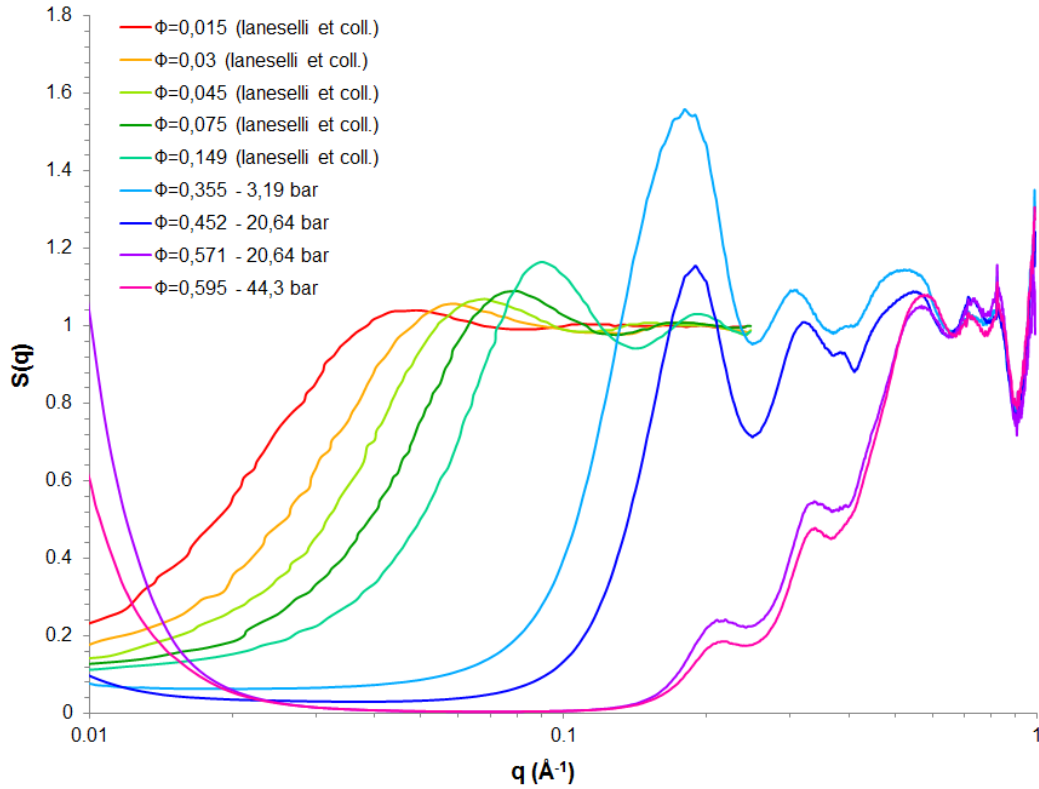


FIGURE 4.7 – Facteurs de structure de solutions d’ovalbumine à pH 7 et 20 mM de force ionique, comprimées à 3,19 bar (ligne bleue claire), 8,26 bar (ligne bleue foncée), 20,64 bar (ligne violette) et 44,3 bar (ligne rose). Sont également représentés les facteurs de structure déterminés par Ianeselli et coll. (Ianeselli et coll., 2010) sur des solutions d’ovalbumine à pH 7 sans ajout de sel ou de tampon à  $\Phi = 0,015$  (ligne rouge),  $\Phi = 0,03$  (ligne orange),  $\Phi = 0,045$  (ligne verte claire),  $\Phi = 0,075$  (ligne verte foncée) et  $\Phi = 0,149$  (ligne cyan)

La figure 4.8 présente les facteurs de structure de sphères possédant la charge nette théorique de l’ovalbumine à pH 7 ( $-9,5 e$ ), son rayon effectif (voir équation 4.1), dans un milieu à 20 °C, de constante diélectrique relative 80,1 (Weast, 1970) et imposant une force ionique de 20 mM, à différentes fractions volumiques ( $\Phi = 0,05 - 0,6$ ).

$$R = \left( \frac{3 M_m \bar{v}}{4 \pi N} \right)^{\frac{1}{3}} = 23,59 \text{ \AA} \quad (4.1)$$

avec  $M_m$  le volume molaire de l’ovalbumine ( $44400 \text{ g mol}^{-1}$ ),  $\bar{v}$  son volume spécifique partiel ( $0,746 \text{ mL g}^{-1}$  (Gekko et Noguchi, 1979)) et  $N_A$  le nombre d’Avogadro.

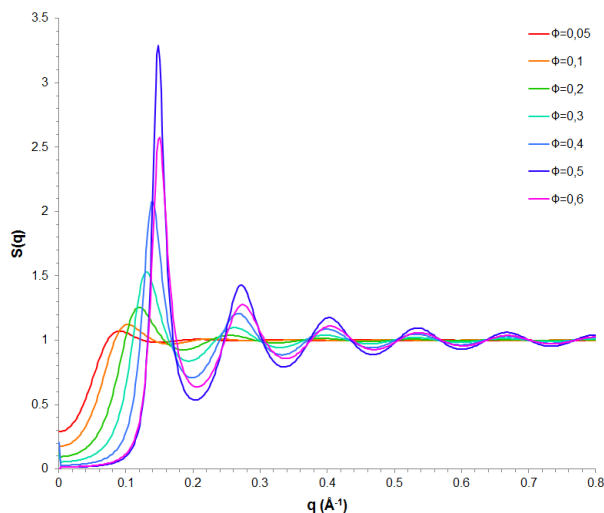


FIGURE 4.8 – *Facteurs de structure obtenus via la Mean Spherical Approximation, pour des sphères de charge  $-9,5 e$  et rayon  $23,59 \text{ \AA}$ , à une température de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  et dans un milieu de force ionique  $20 \text{ mM}$  et de constante diélectrique relative  $\varepsilon_r = 80,1$*

D'autre part, nous nous attendions à ce que le pic principal se déplace progressivement avec la concentration vers les grandes valeurs de  $q$ , correspondant à des distances plus petites, puis se stabilise à une distance correspondant à l'approche maximale des protéines. Or, les distances données par le pic principal à partir de 3,19 bar sont très inférieures au plus petit diamètre de l'ovalbumine ( $45 \text{ \AA}$ ), comme montré sur la figure 4.9. Les distances déduites des données de Ianeselli et coll. (Ianeselli et coll., 2010) sont également reportées et une loi puissance  $y$  a été ajustée ( $y = 39,7103 x^{-0,2856}$ ) afin de visualiser leur tendance. On constate que les distances extraites de nos données ne sont pas dans le prolongement de celles de Ianeselli et coll.

Nous avons modélisé, à l'aide du logiciel SasView (Butler et coll., 2012), l'intensité brute générée par des ellipsoïdes de dimensions similaires à celles de l'ovalbumine ( $70 \times 50 \times 45 \text{ \AA}$ ), avec des interactions de sphères dures (modèle de Percus-Yevick). Le rayon des sphères utilisées dans le modèle de Percus-Yevick était de  $27,00 \text{ \AA}$ , de façon à ce que leur volume soit le même que celui des ellipsoïdes modèles. Les intensités ainsi obtenues à deux fractions volumiques ( $\Phi = 0,355$  et  $0,452$ , soit celles correspondant à 3,19 et 8,26 bar, respectivement) sont représentées avec les intensités brutes expérimentales correspondantes sur la figure 4.10.

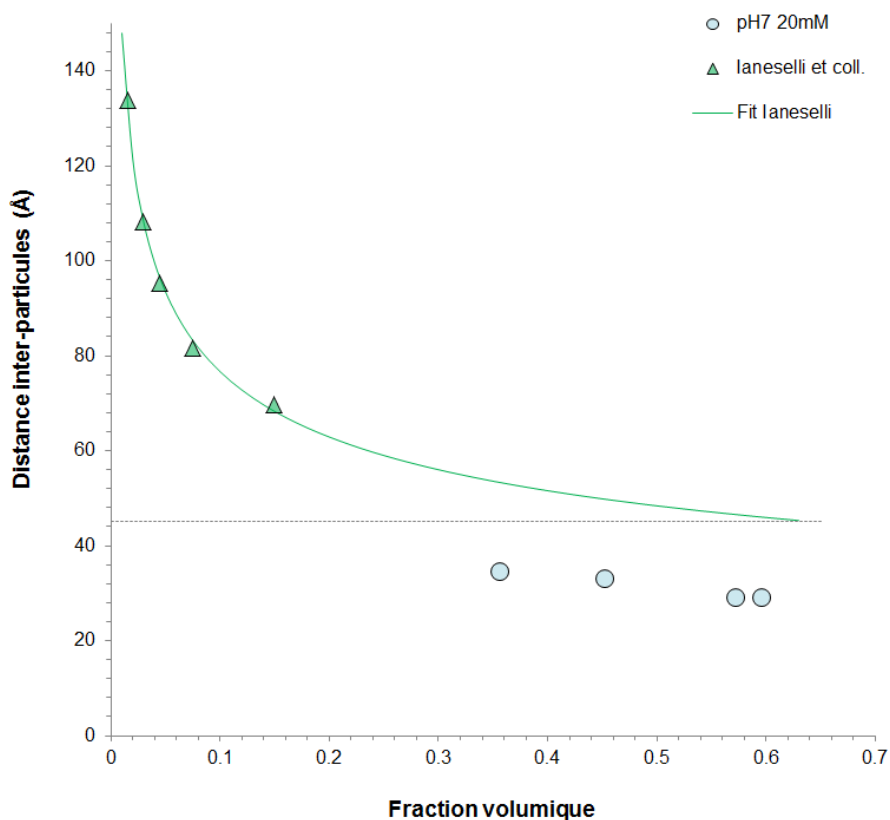


FIGURE 4.9 – Distances correspondant au pic principal des facteurs de structure de solutions d'ovalbumine comprimées à pH 7 et 20 mM de force ionique (cercles bleus) et de solutions d'ovalbumine obtenues par Ianeselli et coll. (Ianeselli et coll., 2010) à pH 7 sans ajout de sel (triangles verts). Le diamètre de la sphère équivalente à l'ovalbumine (47,18 Å) est représenté en pointillés gris.

On constate que la position du premier pic théorique et du premier pic expérimental sont très proches pour les deux fractions volumiques étudiées. La position du premier pic du facteur de structure expérimental, situé à une valeur de  $q$  très supérieure à celle du pic principal du facteur de structure théorique, est donc due à la formation du « creux » lors de la division de l'intensité brute par le facteur de forme. Ce « creux » se surimpose aux pics de structure et les décale, par conséquent, une analyse fine des positions du pic principal du facteur de structure en fonction de la fraction volumique n'est pas possible.

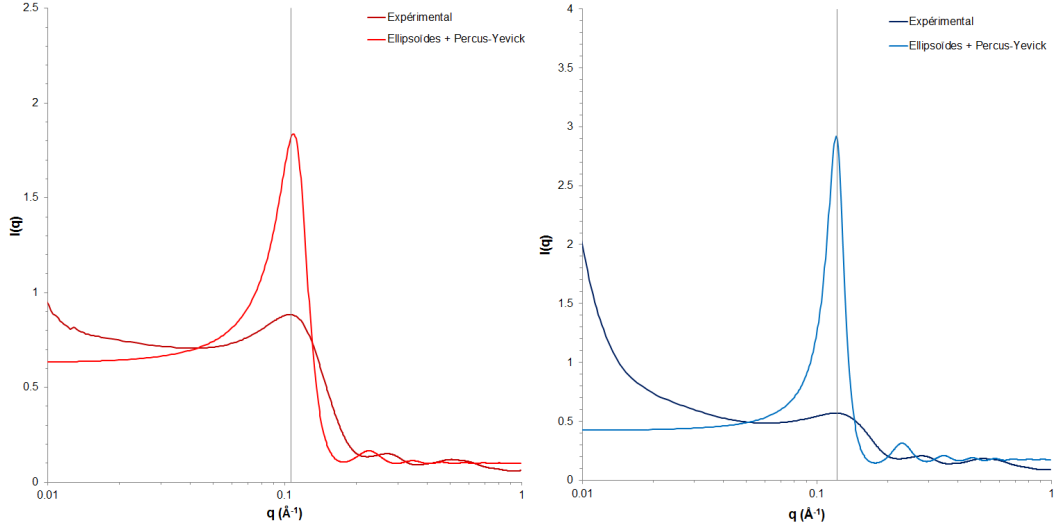


FIGURE 4.10 – Intensités brutes expérimentales (courbes foncées) et théoriques (courbes claires) de solutions d’ovalbumine à pH 7,  $I=20$  mM et  $\Phi = 0,355$  (courbes rouges, à gauche) ou  $\Phi = 0,452$  (courbes bleues, à droite). Les intensités expérimentales sont calculées pour des ellipsoïdes de dimensions  $70 \times 50 \times 45$  Å et un potentiel de sphères dures (modèle de Percus-Yevick, avec un rayon effectif de sphères =  $27,00$  Å)

L’hypothèse la plus pertinente est que le « creux » de  $S(q)$  résulte d’une perte de contraste entre les objets du fait de leur fusion. En outre, l’évolution de nos facteurs de structure avec la concentration possède des similitudes avec celle des facteurs de structure mesurés sur des solutions concentrées de particules déformables, comme des nanoémulsions de polydiméthylsiloxane (PDMS) (Mason et coll., 2006) (voir la figure 4.11) ou des dispersions de micelles de caséine (Bouchoux et coll., 2010). Cependant, les fractions volumiques auxquelles le « creux » de  $S(q)$  apparaît dans notre cas sont très inférieures à l’empilement compact de sphères ( $\Phi = 0,452 < 0.634$  (Song et coll., 2008)) et à celles pour lesquelles un « creux » similaire est reporté dans la littérature ( $\Phi > 0,60$  dans le cas de Mason et al.,  $\Phi > 0,65$  dans le cas de Bouchoux et al.). Les protéines ne sont donc très probablement pas déformées.

La distance moyenne entre les centres de sphères disposées selon un arrangement de type hexagonal peut être estimée par la formule 4.2 :

$$d_{hexagonal} = \left( \frac{\sqrt{2}}{n} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (4.2)$$

avec  $n$  la densité numérique des objets.

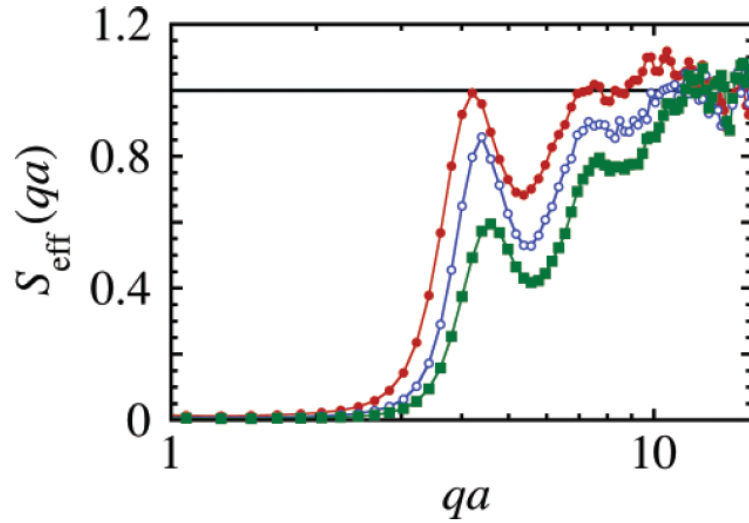


FIGURE 4.11 – *Facteurs de structure effectifs de nanoémulsions de polydimethylsiloxane (rayon des gouttelettes = a) à  $\Phi = 0,60$  (courbe rouge),  $\Phi = 0,67$  (courbe bleue) et  $\Phi = 0,72$  (courbe verte) (Mason et coll., 2006)*

Pour des sphères de rayon 23,59 Å et de propriétés similaires à l'ovalbumine (masse molaire de 44400 g mol<sup>-1</sup> et volume spécifique partiel de 0,746 mL g<sup>-1</sup>), nous trouvons des distances moyennes entre surfaces allant de 18,6 Å pour  $\Phi = 0,452$  ( $\Pi = 8,26$  bar) à 8,20 Å pour  $\Phi = 0,595$  ( $\Pi = 44,3$  bar). En considérant qu'une molécule d'eau possède un diamètre de 3 Å, nous pouvons estimer que le nombre de molécules d'eau correspondant à ces distances varie entre 6 et 3. Les travaux d'Ebbinghaus et coll. (Ebbinghaus et coll., 2007) montrent que les propriétés dynamiques de l'eau de solvation d'une protéine sont différentes de celles du solvant jusqu'à une distance d'environ 10 Å à partir de la surface de la protéine, soit approximativement l'épaisseur de trois molécules d'eau. Nous pouvons donc supposer qu'à partir de  $\Phi = 0,452$ , les couches de solvation des molécules d'ovalbumine s'interpénètrent. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la perte de contraste à l'origine du « creux » dans le facteur de structure est due à la fusion des enveloppes de solvation des protéines, possédant une densité électronique différente de celle du solvant, notamment de par la présence de contre-ions. Svergun et coll. ont notamment montré que la densité électronique de l'eau de la première couche d'hydratation de plusieurs protéines, d'une épaisseur approximative de 3 Å (soit une molécule d'eau), était approximativement égale à 1,1 fois celle du solvant (Svergun et coll., 1998), tandis que Merzel et coll. trouvent que cette couche est en moyenne 1,5 fois plus dense que le solvant (Merzel et Smith, 2002).



## 4.2.2 Influence des conditions physico-chimiques

La figure 4.12 présente les facteurs de structure de l'ovalbumine à pH 7 et deux différentes forces ioniques : 20 mM et 150 mM. La figure 4.13, quant à elle, présente les facteurs de structure de l'ovalbumine à une force ionique de 20 mM et deux pH différents : pH 5 et pH 7.

On constate que les facteurs de structure obtenus à pH 7 et 20 mM ou 150 mM de force ionique sont très similaires, que ce soit en termes de position, d'intensité ou de forme des pics, et ce à toutes les pressions osmotiques étudiées. Cette observation rejoint celle faite sur les équations d'état de l'ovalbumine dans ces deux conditions, qui ne montraient pas de différences malgré une diminution théorique du potentiel d'interaction électrostatique avec la force ionique (voir figure 3.14). Les solutions à pH 7 et 20 ou 150 mM de force ionique semblent donc être similaires en termes d'interactions et de structure.

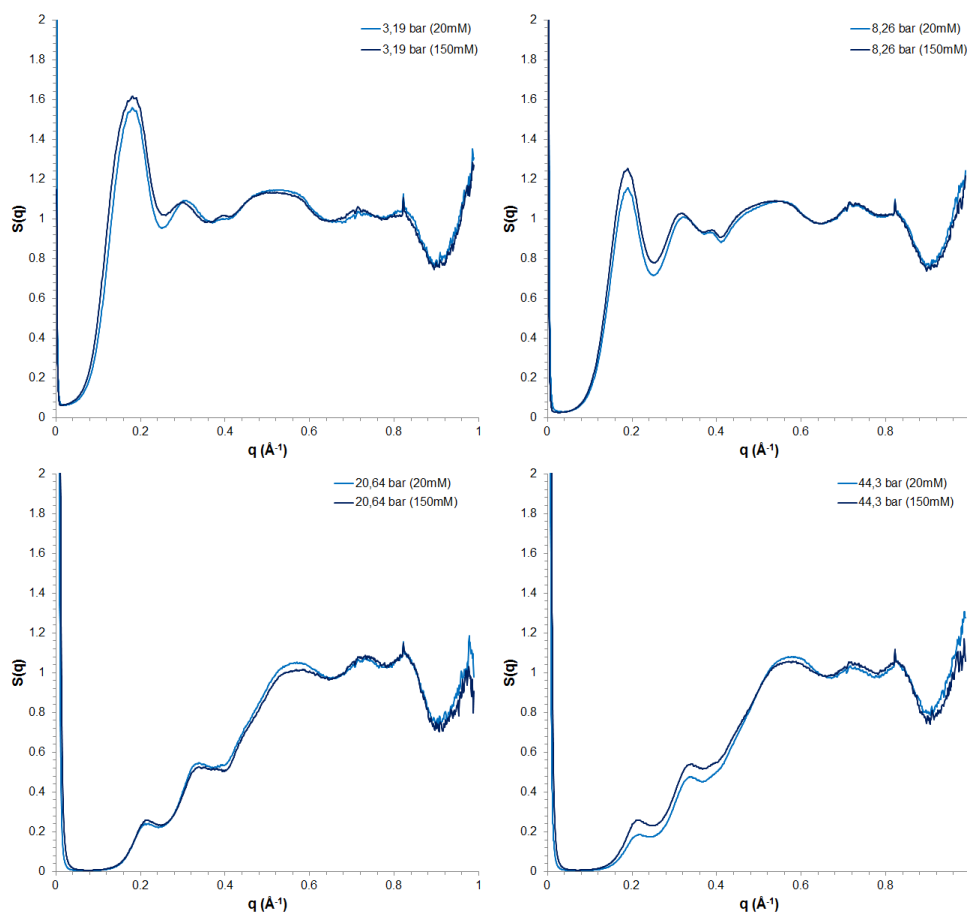


FIGURE 4.12 – Facteurs de structure de solutions d'ovalbumine à pH 7 et 20 mM (courbes bleues claires) ou 150 mM (courbes bleues foncées) de force ionique, comprimées à 3,19 bar, 8,26 bar, 20,64 bar et 44,3 bar

Les spectres à pH 5 semblent très différents de ceux à pH 7, cependant les fractions volumiques des échantillons à ces deux pH ne sont pas les mêmes pour une même pression. Il est donc difficile de comparer leur forme. Nous pouvons en revanche noter que le spectre à 44,3 bar est surprenant : l'intensité des pics et leur hauteur ré-augmente, les plaçant presque à la hauteur de ceux à 8,26 bar. Ceci peut témoigner d'une ré-organisation du système à un pH proche du point isoélectrique et à haute fraction volumique, mais est plus probablement dû à une hétérogénéité de l'échantillon lors de la mesure.

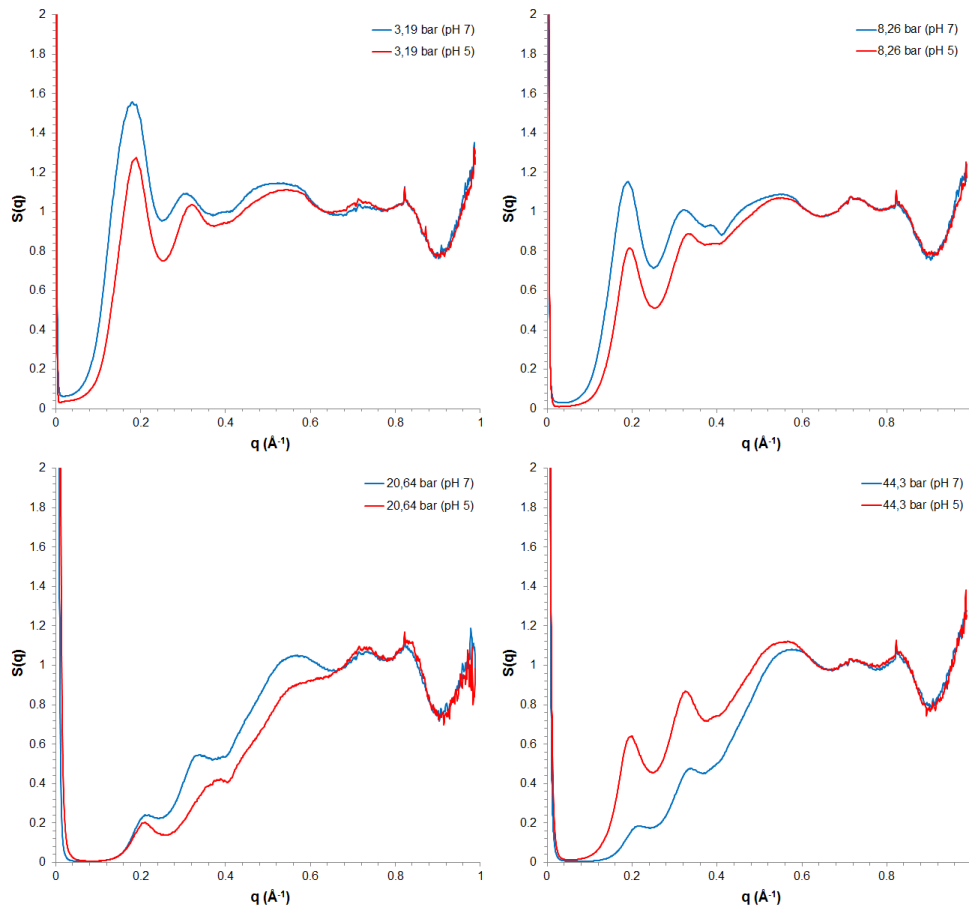


FIGURE 4.13 – *Facteurs de structure de solutions d'ovalbumine à 20 mM de force ionique et pH 7 (courbes bleues) ou pH 5 (courbes rouges), comprimées à 3,19 bar, 8,26 bar, 20,64 bar et 44,3 bar*

### 4.3 Conclusion

L'analyse des solutions concentrées de lysozyme et d'ovalbumine par diffusion des rayons X aux petits angles ont permis d'apporter un éclairage sur plusieurs caractéristiques des équations d'état, qui ne pouvaient être expliquées par la seule analyse de celles-ci.

Le plateau vu sur les équations d'état du lysozyme avait été interprété, dans la section 3.1.1, comme le signe d'une transition de phases qui pouvait être : un arrêt dynamique lié à des clusters ou une cristallisation. Les analyses par diffusion des rayons X aux petits angles de solutions de lysozyme ont montré que, si des clusters étaient effectivement présents dans une solution de concentration inférieure à celle du début du plateau, la transition n'était pas due à un arrêt dynamique. La présence massive de pics de Bragg sur les spectres SAXS mesurés à des concentrations supérieures à la fin du plateau ont en effet montré la présence majoritaire de cristallites dans les échantillons. La correspondance entre la fraction volumique en protéine dans les cristaux et dans les échantillons a confirmé que les échantillons sont uniquement composés de cristallites. Ces cristallites possèdent un groupe d'espace bien connu pour le lysozyme ( $P4_32_12$ ) et des paramètres de maille proches de ceux qui ont déjà été déterminés pour cette protéine dans des conditions différentes (Wilson et coll., 1992 ; Vaney et coll., 1996 ; Cipriani et coll., 2012 ; Grobelny et coll., 2014).

Les spectres SAXS des échantillons d'ovalbumine ne montrent en revanche la présence de pics de Bragg pour aucune des pressions et conditions physico-chimiques étudiées, ce qui exclut l'hypothèse d'une cristallisation et nous oriente vers une transition de type gélification ou vitrification. La caractéristique la plus intéressante des spectres SAXS de l'ovalbumine est la diminution de la hauteur du pic principal avec la concentration, jusqu'à devenir très inférieure à 1, associée à des distances caractéristiques très inférieures à la plus petite dimension de l'ovalbumine. L'évolution du pic principal peut être expliquée par une déformation anisotrope des protéines, potentiellement similaire à ce qui a été observé sur d'autres particules déformables comme les micelles de caséine (Bouchoux et coll., 2010).

Cependant, les analyses par diffusion des rayons X aux petits angles ont été effectuées uniquement sur des échantillons de lysozyme et d'ovalbumine concentrés ( $\Phi > 0,12$ ), ce qui ne nous a pas permis de caractériser plus finement les échantillons liquides. Afin d'aller plus loin dans la compréhension de l'organisation des échantillons et des interactions mises en jeu, il est donc nécessaire d'avoir recours à des modèles numériques de solutions de protéines.

## Chapitre 5

# Modélisation de systèmes concentrés de protéines par méthode Monte-Carlo



La combinaison des équations d'état et des informations structurales, données notamment par la diffusion des rayons X aux petits angles, a permis d'apporter un éclairage global sur les interactions mises en jeu lors de la concentration de solutions de lysozyme et d'ovalbumine jusqu'à de très hautes fractions volumiques ( $\Phi \sim 0,62$ ). Cependant, les modèles théoriques d'interactions construits jusqu'ici pour rendre compte de l'allure des zones diluées et de transition sur les équations d'état imposent des contraintes sur les objets qui ne rendent pas compte de toutes les spécificités des protéines : forme sphérique, charge centrale (donc uniforme), charge constante. D'autre part, l'effondrement des facteurs de structure SAXS des solutions les plus concentrées de protéines n'a pas été expliqué.

La modélisation de protéines à différents niveaux de détail est de plus en plus largement utilisée pour l'étude de leurs interactions. Notre protocole, utilisant le logiciel Faunus (Lund et coll., 2008) nous a permis de simuler des équations d'état et des spectres de SAXS, en utilisant des modèles mésoscopiques de protéines offrant un niveau de détail supérieur à celui des modèles de la section 3.2.5 : anisotropie de charge, anisotropie de forme et titration possible des acides aminés selon le principe de la capacitance (Lund et Jönsson, 2005 ; Lund, 2010).

Cependant, un tel niveau de détail dans la prise en compte des interactions et des caractéristiques morphologiques de protéines implique des temps et une puissance de calcul importants, qui limitent le nombre de protéines pouvant être utilisées dans une même simulation. Ces contraintes augmentent rapidement avec le nombre de résidus de la protéine, et donc du nombre d'interactions résidu-résidu : soit  $n$  le nombre de résidus et  $p$  le nombre de protéines, alors le nombre d'interactions de paire est de  $\frac{np(np-1)}{2}$ . Un exemple pour 50 protéines est donné sur la figure 5.1. Le nombre d'interactions de paire pour 50 molécules d'ovalbumine (385 résidus) est égal à neuf fois celui existant entre 50 molécules de lysozyme (129 résidus). Une autre façon de le concevoir est qu'en termes de nombre d'interactions de paire, et donc de puissance de calcul dédiée, 50 molécules d'ovalbumine équivalent à environ 150 molécules de lysozyme.

Pour cette raison, les résultats présentés ici concernent des simulations faites avec des molécules de lysozyme uniquement.

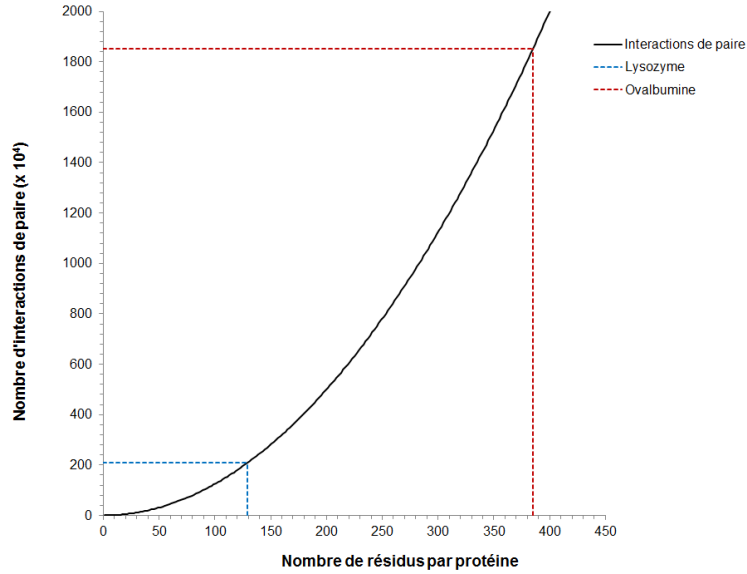


FIGURE 5.1 – Nombre d’interactions de paire en fonction du nombre de résidus par protéine, pour 50 protéines. Les points correspondant au lysozyme (129 résidus) et à l’ovalbumine (385 résidus) sont montrés par les pointillés bleus et rouges, respectivement.

## 5.1 Modélisation de spectres SAXS

### 5.1.1 Mise au point de la méthode

La mesure du facteur de structure  $S(q)$  dans les simulations a été testée selon différentes méthodes :

- en utilisant l’expression donnée par Hansen et McDonald (Hansen et McDonald, 1976) :

$$S(q) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \langle \exp(-i q r_i) \exp(i q r_j) \rangle \quad (5.1)$$

avec  $r_i$  et  $r_j$  les positions des centres de masses des molécules  $i$  et  $j$  dans un repère donné

- en utilisant l’expression donnée par Camp et Patey (Camp et Patey, 2000) :

$$S(q) = \frac{1}{N} \left\langle \left( \sum_{j=1}^N \cos(q r_j) \right)^2 + \left( \sum_{j=1}^N \sin(q r_j) \right)^2 \right\rangle \quad (5.2)$$

En réalité, la formule de Camp et Patey est dérivée de celle de Hansen et McDonald, et a effectivement montré les mêmes résultats dans les tests effectués sur nos systèmes. On

a donc utilisé la formule de Camp et Patey, nécessitant moins de puissance de calcul car faisant appel à des sommes simples.

Le facteur de forme obtenu par transformée de Fourier de la fonction de corrélation de paires  $g(r)$  n'a pas été utilisé car des tests ont montré que le « bruit » présent sur le  $g(r)$  obtenu par la simulation était encore amplifié par la transformée de Fourier.

Des conditions périodiques aux limites ayant été utilisées (voir section 2.7), seules les corrélations d'une longueur inférieure à la moitié de la longueur de la boîte peuvent être prises en compte. En effet, le calcul de  $g(r)$  et, par extension, de  $S(q)$  et de l'intensité brute  $I(q)$ , se fait par intégration radiale. Or, dans une boîte cubique, le plus grand cercle pouvant être considéré est celui dont le rayon est égal à la moitié du côté de la boîte. Les molécules se trouvant « dans les coins » de la boîte ne peuvent s'inscrire dans une sphère (figure 5.2) :

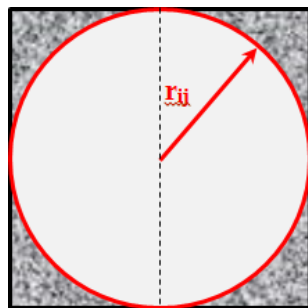


FIGURE 5.2 – Schéma 2D d'une boîte de simulation et de la zone accessible par intégration radiale (en rouge)

La partie du facteur de structure correspondant à des valeurs de  $q$  inférieures à  $\frac{2\pi}{0,5L}$ , avec  $L$  le côté de la boîte, n'est donc pas considéré comme valable, comme montré sur la figure 5.3 aux valeurs de  $q$  inférieures à  $0,11 \text{ \AA}^{-1}$ .

La courbe de référence présentée sur la figure est obtenue par l'approximation de Percus-Yevick pour les sphères dures (Hammadoua, 2013), qui donne une expression du facteur de structure en fonction de la fraction volumique  $\Phi$  et du diamètre  $D$  des sphères considérées :

$$S(q) = \frac{1}{1 - \bar{N}C(q)} \quad (5.3)$$

$$\lambda_1 = \frac{(1 + 2\Phi)^2}{(1 - \Phi)^4}$$

$$\lambda_2 = -\frac{\left(1 + \frac{\Phi}{2}\right)^2}{(1 - \Phi)^4}$$



et

$$\bar{N}C(q) = -24\Phi \left\{ \lambda_1 \left[ \frac{\sin(qD) - qD \cos(qD)}{(qD)^3} \right] - 6\Phi \lambda_2 \left[ \frac{(qD)^2 \cos(qD) - 2qD \sin(qD) - 2 \cos(qD) + 2}{(qD)^4} \right] \right.$$

$$\left. - \Phi \frac{\lambda_1}{2} \left[ \frac{(qD)^4 \cos(qD) - 4(qD)^3 \sin(qD) - 12(qD)^2 \cos(qD) + 24qD \sin(qD) + 24 \cos(qD) - 24}{(qD)^6} \right] \right\}$$

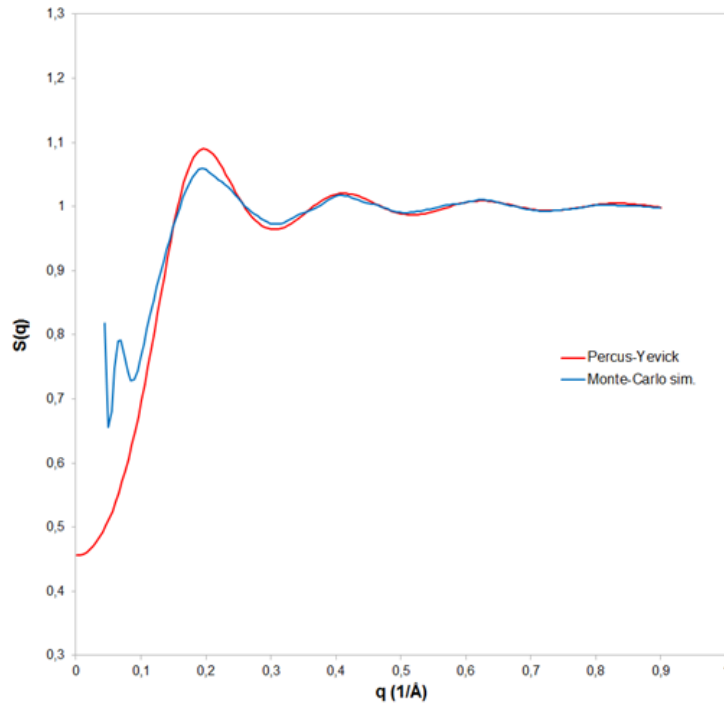


FIGURE 5.3 – Comparaison de facteurs de structure obtenus à partir du modèle de Percus-Yevick pour les sphères dures (courbe rouge) et des simulations Monte-Carlo (courbe bleue). La longueur de la boîte est de 141 Å

Il existe également une déviation du signal aux alentours de la limite inférieure en  $q$ , due à la présence des bords périodiques de la boîte. Une méthode pour minimiser ces deux problèmes est d'augmenter la taille de la boîte, afin de diminuer la valeur minimale de  $q$ . Cependant, la taille des boîtes nécessaires à l'obtention d'une gamme accessible de  $q$  qui soit comparable à la gamme expérimentale impliquait un nombre de protéines incompatible avec des temps de calcul raisonnables.

Les calculs de facteurs de structure ont donc été réalisés grâce au programme Debyer (Wojdyr, 2014), intégrant une correction de l'effet des bords périodiques. Ce programme applique un *cut-off*, d'une longueur inférieure à la moitié de la boîte, au-delà duquel le

milieu est considéré comme homogène et où le nombre d'atomes situés à la distance  $R$  est proportionnel à  $\rho R^2$ , avec  $\rho$  la densité numérique moyenne à l'intérieur du *cut-off*.

### 5.1.2 Modélisation de sphères non chargées

Afin de vérifier la validité de notre méthode, nous avons réalisé des simulations de sphères dures non chargées, que nous avons comparées au modèle de Percus-Yevick.

Pour cela, un potentiel classique de sphères dures a été choisi :

$$u_{ij} = \begin{cases} 0 & \text{si } r_{ij} \geq D \\ +\infty & \text{si } r_{ij} < D \end{cases} \quad (5.4)$$

avec  $r_{ij}$  la distance centre-à-centre entre sphères et  $D$  le diamètre des sphères.

Comme montré sur la figure 5.4, les résultats obtenus par notre méthode sont parfaitement en accord avec le modèle de Percus-Yevick, y compris la partie du spectre à faibles  $q$  corrigée par le programme Debyer.

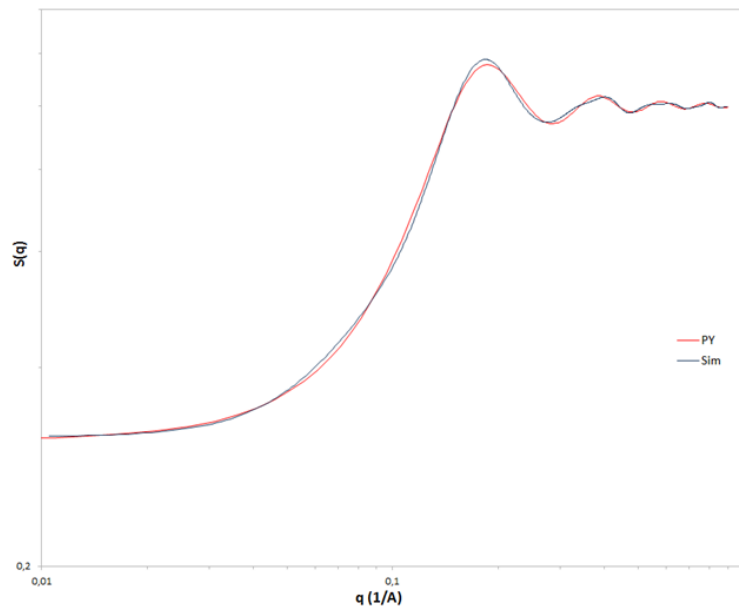


FIGURE 5.4 – Comparaison des facteurs de structure obtenus à partir de la méthode Monte-Carlo (courbe bleue) et de l'approximation de Percus-Yevick (courbe rouge). On a utilisé 1000 sphères de diamètre  $32,2 \text{ \AA}$ , à une fraction volumique de  $0,149$ . La boîte fait une longueur de  $489,5 \text{ \AA}$ .

### 5.1.3 Modélisation de sphères chargées

Le modèle a ensuite été expérimenté sur des systèmes de particules chargées, mais conservant une forme et une répartition de charges simple (particules sphériques à charge centrale). Pour cela, les résultats obtenus à partir de nos simulations ont été comparés aux résultats, expérimentaux et issus de modélisation, de Bareigts sur des particules de silice (Bareigts, 2013). Les simulations de Bareigts montrent une bonne corrélation avec les résultats expérimentaux, tant au niveau de la position des pics que de leur hauteur, et ont été effectuées suivant plusieurs méthodes, donnant des résultats similaires (particules monodisperses/polydisperses, ions explicites/implicites, Monte-Carlo/dynamique moléculaire). Elles ont servi de référence pour nos essais.

Les sphères (rayon de 8 nm, charge de -313,66 e) et les paramètres (température, pH, force ionique, constante diélectrique du milieu) utilisés dans nos modèles étaient similaires à celles utilisées par Bareigts et coll. Les résultats ont également été comparés à la Mean Spherical Approximation (MSA) sur des sphères équivalentes. Comme décrit précédemment, la théorie MSA concerne des systèmes de particules chargées, dans lesquels le potentiel d'interaction est de type coulombien écranté. En raison de la complexité de sa formulation, le calcul des facteurs de structure issus de la MSA a été effectué grâce au logiciel SasView (Butler et coll., 2012).

Le pic principal obtenu par notre méthode était situé à une trop petite distance et possédait une hauteur trop faible, comme présenté sur la figure 5.5 pour des dispersions de fraction volumique  $\Phi = 0.1$ .

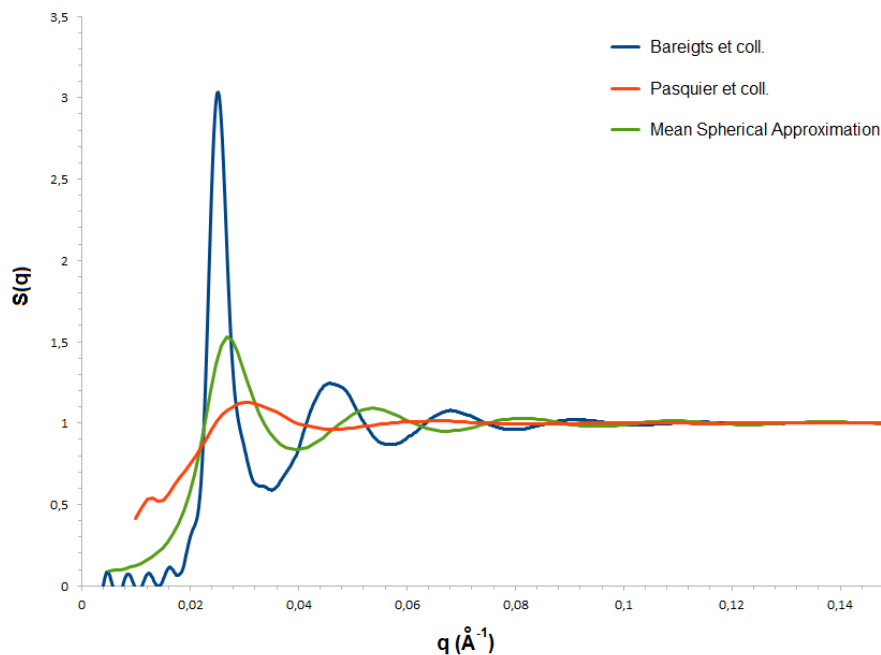


FIGURE 5.5 – *Facteurs de structure obtenus par nos simulations (orange), les simulations de Bareigts (Bareigts, 2013) (bleu) et par la Mean Spherical Approximation (vert) pour des sphères chargées de rayon 8 nm et charge de  $-313.66 e$ , à une fraction volumique de 0.1*

Le problème soulevé a été celui de la localisation des charges : dans les simulations de Bareigts, les charges étaient considérées comme situées à la surface des sphères, tandis que nous avons utilisé des charges situées au centre des sphères. La distance de 8 nm entre la localisation des charges dans les deux cas pouvait expliquer la différence constatée dans les facteurs de structure.

La charge centrale des sphères a donc été ajustée de façon à ce que le potentiel électrostatique en surface reproduise celui de Bareigts, grâce à la formule (Bareigts, 2013) :

$$Z_{eff} = Z \frac{\sinh(\kappa R)}{\kappa R} \quad (5.5)$$

avec, pour une sphère de rayon  $R$ , dans un milieu où l'inverse de la longueur de Debye serait  $\kappa$ ,  $Z_{eff}$  la charge centrale dont l'effet électrostatique équivaldrait à celui d'une charge  $Z$  disposée en surface.

Cette correction a permis d'obtenir une position du pic principal similaire à celle de Bareigts et coll., comme présenté sur la figure 5.6.

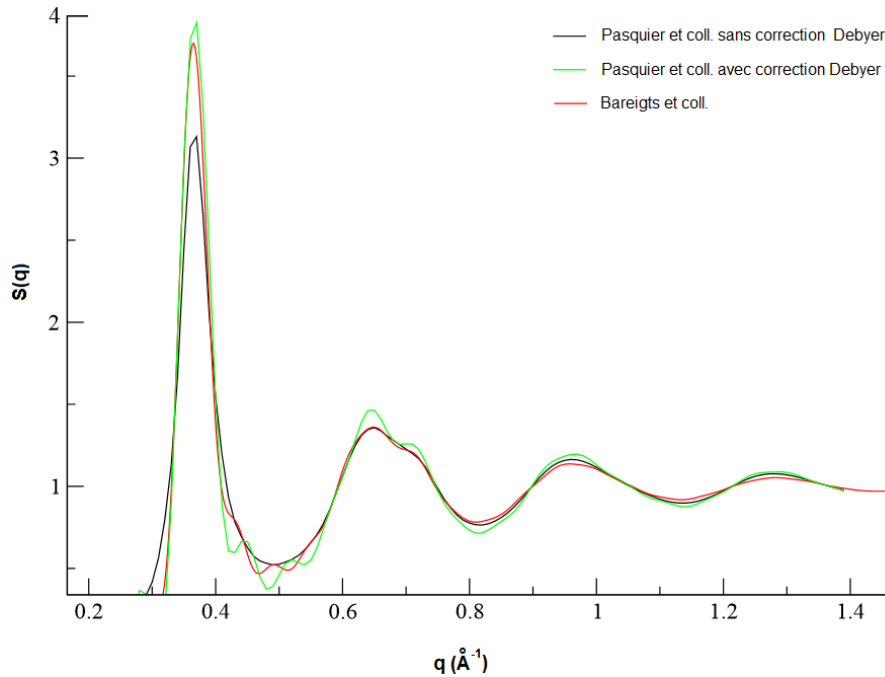


FIGURE 5.6 – *Facteurs de structure obtenus par nos simulations sans (noir) et avec (vert) correction de l’effet des bords périodiques par Debyer, et par les simulations de Bareigts (Bareigts, 2013) sur des dispersions de sphères de rayon 8 nm et densité de charge de surface de  $-0,39 e nm^{-2}$ , à fraction volumique de 0.3*

Les fluctuations des courbes obtenues par nos simulations sont dues au faible nombre d’étapes Monte-Carlo réalisées, d’où une moins bonne statistique que dans le cas de Bareigts et coll. Cependant, notre but ici était uniquement de réaliser des tests en vue de valider la méthode et nous considérons que l’objectif est atteint.

#### 5.1.4 Modélisation de systèmes de protéines

Les premiers essais ont été effectués avec des systèmes de 100 molécules de lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique, à une fraction volumique de 0,126, correspondant environ à une pression de 1,3 bar sur nos équations d’état. La température était fixée à 293,15 K et la constante diélectrique relative de l’eau à  $\epsilon_r = 80, 1$ . Le potentiel utilisé était un potentiel mixte Debye-Hückel/Lennard-Jones, permettant de simuler des répulsions électrostatiques modulées par la présence d’ions dans le milieu et des attractions à courte portée. Les ions du milieu étaient traités de manière implicite, à savoir qu’ils n’étaient pas ajoutés dans la boîte de simulation, mais intervenaient dans le potentiel à travers la force ionique et la longueur de Debye. Le paramètre de Lennard-Jones était fixé à  $\epsilon_{LJ} = 0,05 k_B T$ . Afin de réduire le besoin en termes de temps et de puissance de calcul, un *cut-off* égal à 4 fois la

longueur de Debye était appliqué. À des distances inter-particules supérieures au *cut-off*, le potentiel d'interaction était nul.

Les résultats des simulations sont présentées sur la figure 5.7.

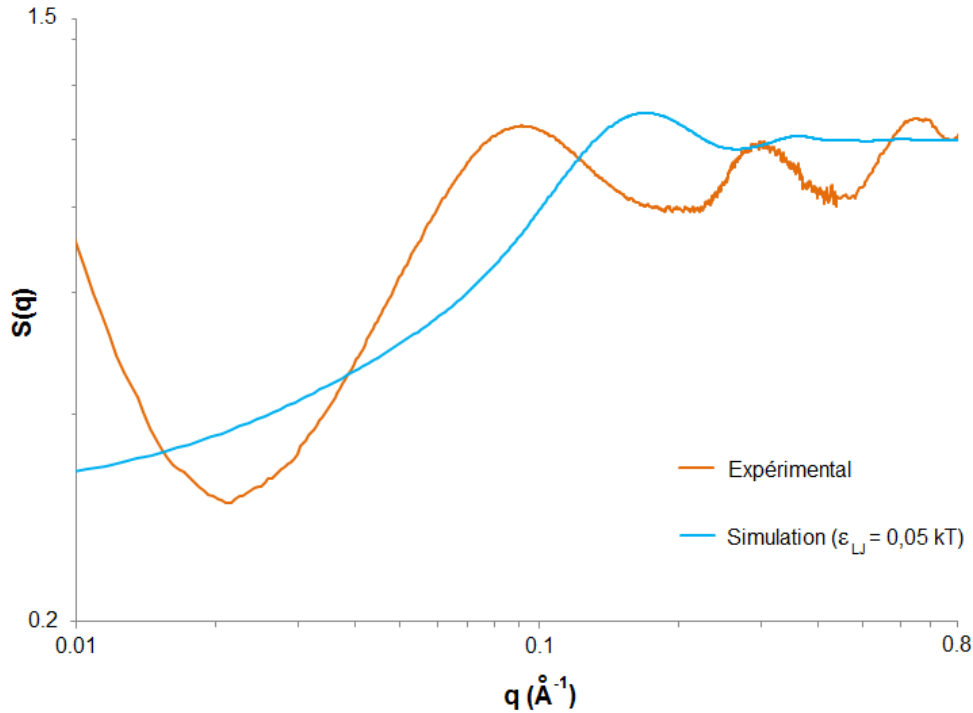


FIGURE 5.7 – *Facteurs de structures expérimentaux (orange) et obtenus par simulation (bleu) avec  $\epsilon_{LJ} = 0,05 kT$ , pour le lysozyme à pH 7, 20 mM de force ionique,  $\Phi = 0,126$*

Le système obtenu par simulation est composé uniquement de monomères, sans présence de *clusters*. Nous avons fait l'hypothèse que la différence, significative, entre la position des pics principaux expérimentaux et théoriques ( $q = 0,173 \text{ \AA}^{-1}$  pour le pic principal théorique, contre  $q = 0,092 \text{ \AA}^{-1}$  pour le premier pic expérimental) est liée à un potentiel attractif trop faible dans notre modèle, qui ne permet notamment pas d'obtenir un second pic principal comme vu dans nos expériences et dans les travaux de Stradner et coll. (Stradner et coll., 2004). Nous avons alors effectué plusieurs essais, en augmentant la valeur de  $\epsilon_{LJ}$  à 0,08 et 0,1  $k_B T$ . Les résultats sont présentés sur la figure 5.8.

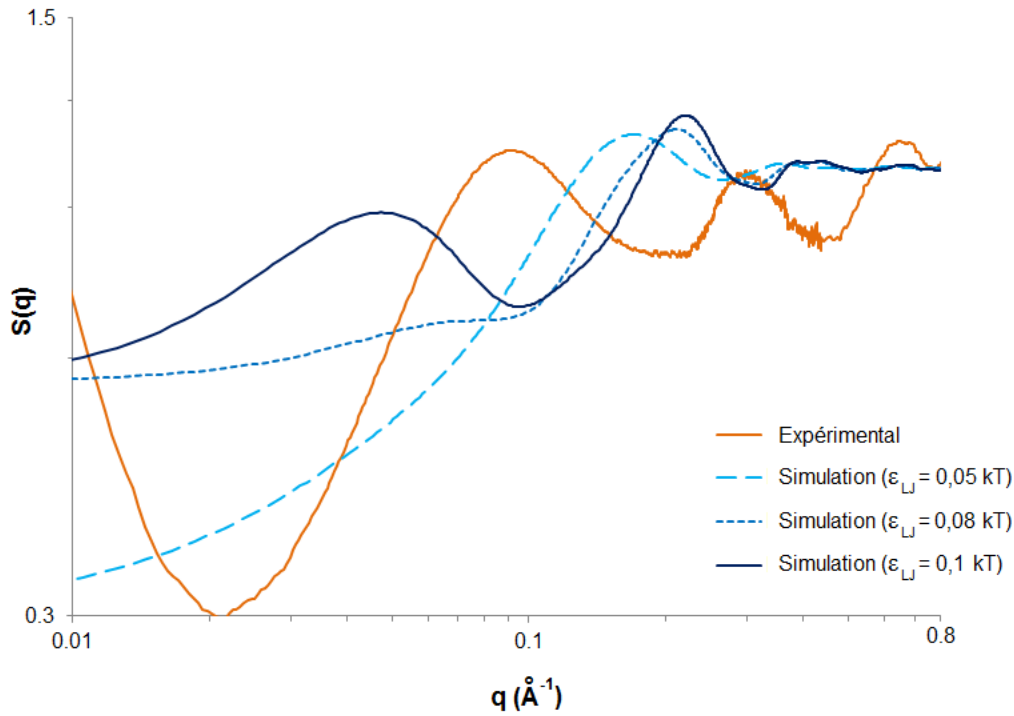


FIGURE 5.8 – Facteurs de structures expérimentaux (orange) et obtenus par simulation avec  $\epsilon_{LJ}$  égal à 0,05, 0,08 ou 0,1  $k_B T$  (courbes bleues), pour le lysozyme à pH 7, 20 mM de force ionique,  $\Phi = 0,126$

Les résultats montrent que, comme attendu, le pic principal se déplace vers les grands  $q$  lorsque l'on augmente le paramètre  $\epsilon_{LJ}$ . Nous pouvons noter l'apparition d'un second pic principal situé à plus faibles  $q$ , dont l'intensité augmente avec la valeur de  $\epsilon_{LJ}$ . Cependant, même à  $\epsilon_{LJ} = 0,1 k_B T$ , les deux pics théoriques restent à des valeurs de  $q$  plus faibles que leurs homologues expérimentaux. L'utilisation de valeurs de  $\epsilon_{LJ}$  plus élevées que 0,1  $k_B T$  ne déplace pas de manière significative les deux pics théoriques, de plus l'intensité du pic situé à plus faibles  $q$  (pic des corrélations entre clusters, selon Stradner et coll.) devient extrêmement grande en regard du pic expérimental.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences :

- la portée des répulsions électrostatiques incluse dans le modèle est trop importante, ce qui génère des distances inter-particules plus grandes que dans la réalité. Notamment, le fait de ne pas avoir inclus l'écrantage lié aux contre-ions peut avoir joué un rôle, comme détaillé dans la section 3.2.5;
- l'augmentation de la valeur de  $\epsilon_{LJ}$  dans les simulations a pour conséquence de générer des clusters de protéines qui ne peuvent se déplacer et dont les protéines ne peuvent se détacher (voir section 5.2.2.2). Un tel phénomène a bien entendu des conséquences sur les distances caractéristiques du système et sur l'équilibre clusters-monomères, inhérent

- au modèle des clusters dynamiques ;
- les potentiels utilisés ne rendent pas compte de la réalité. Les simulations effectuées par Cardinaux et coll. (Cardinaux et coll., 2007a) utilisent un potentiel de Lennard-Jones très modifié de façon à rendre compte des données expérimentales de Stradner et coll. :

$$V(r) = 4\epsilon_{LJ} \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{180} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{90} \right] \quad (5.6)$$

- avec  $\epsilon_{LJ} = 6,66 k_B T$ . Le parti pris de nos simulations a été de conserver une forme de potentiel à la signification physique établie, même si l'utilisation du potentiel de Cardinaux et coll. aurait pu donner de meilleurs résultats. Au regard des résultats de la section 3.2.5, il est cependant envisageable d'utiliser dans le futur un potentiel mixte Debye-Hückel/Hamaker ;
- l'anisotropie des protéines rend inexacte la décomposition des spectres d'intensité brute expérimentaux en produit du facteur de forme et du facteur de structure. Il faudrait donc comparer les intensités brutes expérimentales et simulées. Cependant, calculer les intensités brutes par simulation, en particulier avec un grand nombre de protéines, est extrêmement coûteux en temps de calcul. Une bonne alternative serait de calculer des intensités brutes, facteurs de forme et facteurs de structure à partir de simulations de systèmes de sphères et d' « haltères » de même volume total (figure 5.9). Cela nous permettrait de vérifier, sur des systèmes simples, si l'intensité brute générée par l'illumination d'un système de particules anisotropes est décomposable en un simple produit des facteurs de forme et de structure, et si l'évolution du facteur de structure à haute fraction volumique suit ce qui a été observé expérimentalement.

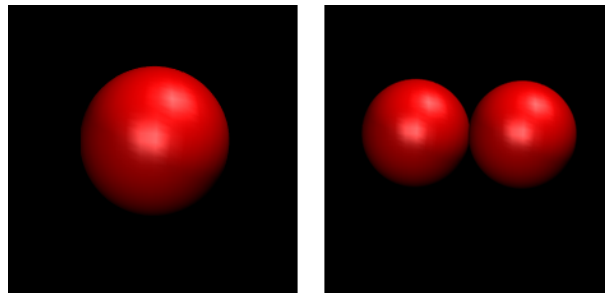


FIGURE 5.9 – Sphères (rayon :  $50 \text{ \AA}$ ) et « haltères » (rayon de chaque sphère :  $39,99 \text{ \AA}$ ) utilisables dans les tests de l'influence de l'anisotropie sur la décomposition des intensités brutes



## 5.2 Modélisation d'équations d'état

La boîte virtuelle utilisée pour les simulations d'équations d'état possédait les mêmes caractéristiques que celle utilisée pour les simulations de spectres SAXS, auxquelles était ajouté une possibilité de fluctuation de volume. La pression extérieure était utilisée comme paramètre d'entrée et la taille de la boîte fluctuait jusqu'à ce que la pression du système soit égale à la pression de consigne. Le nombre de particules dans la boîte étant constant, ses dimensions permettaient de calculer une fraction volumique comme valeur de sortie.

Le potentiel utilisé était un potentiel mixte Debye-Huckel/Lennard-Jones, où les ions du milieu étaient traités de manière implicite et où le paramètre de Lennard-Jones était fixé à  $\epsilon_{LJ} = 0,05 k_B T$ . Le *cut-off* était de 4 fois la longueur de Debye.

### 5.2.1 pH 7, $I=20$ mM

#### 5.2.1.1 Essais préliminaires

Une équation d'état complète a été réalisée sur la gamme de pressions 0,05 bar-50 bar, avec des systèmes de 50 particules. Les résultats sont présentés sur la figure 5.10.

Le premier constat est que l'équation d'état obtenue par simulation est relativement proche de nos données expérimentales et du modèle de Carahan-Starling. La méthode semble donc pertinente.

Cependant, on remarque que la simulation ne rend pas compte de la transition de cristallisation : l'équation d'état suit une tendance similaire au modèle de Carnahan-Starling sur toute la gamme de pression osmotique. La première explication provient probablement du rôle prépondérant de l'eau dans le mécanisme de cristallisation. En effet, il a été montré qu'une partie de la variation d'entropie lors de la cristallisation provenait de la réorganisation des molécules d'eau entourant les protéines, lors de l'assemblage de ces dernières (Vekilov et coll., 2002) :

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ_{protein} - T \Delta S^\circ_{solvent} \quad (5.7)$$

avec  $\Delta G^\circ$  l'énergie libre standard de cristallisation,  $\Delta H^\circ$  l'enthalpie standard de cristallisation,  $T$  la température,  $\Delta S^\circ$  la variation globale d'entropie durant la cristallisation,  $\Delta S^\circ_{protein}$  la variation d'entropie liée à l'attachement de protéines sur le cristal et  $\Delta S^\circ_{solvent}$  la variation d'entropie liée à la réorganisation des molécules d'eau autour des protéines.

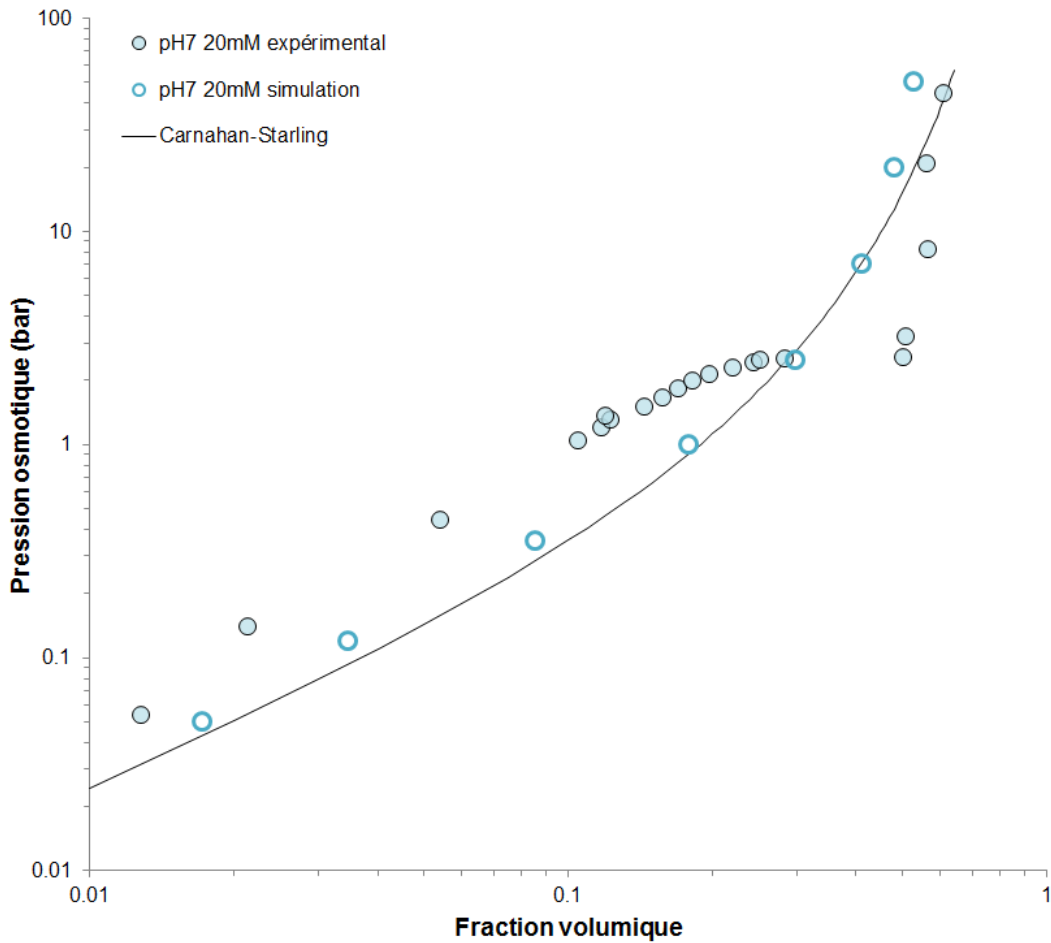


FIGURE 5.10 – Equation d'état du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique, obtenue expérimentalement (cercles pleins) et par simulation Monte-Carlo avec contre-ions implicites et  $\epsilon_{LJ} = 0,05 kT$  (cercles vides)

Selon ces auteurs, dans le cas du lysozyme à pH 4,5 et 0,48 M de force ionique,  $\Delta S^\circ_{\text{solvent}}$  est négatif ( $-190 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), ce qui est interprété comme une conséquence de l'incorporation de molécules d'eau dans le cristal. Ainsi, chaque molécule de lysozyme emènerait avec elle 8 ou 9 molécules d'eau, en plus de celles déjà liées à la protéine en solution. Pour tenter de rendre compte correctement de la thermodynamique de cristallisation, il faudrait donc intégrer des molécules d'eau de manière explicite dans notre modèle, et non pas seulement par le biais de la constante diélectrique.

D'autre part, il est admis que la cristallisation se compose d'une première phase de nucléation, aboutissant à la formation d'un petit groupe de molécules, un nucléus, suivie d'une phase de croissance par addition de protéines. Il a été récemment avancé (Vekilov, 2004 ; Filobelo et coll., 2005 ; Vekilov et Vorontsova, 2014) que la nucléation s'effectuait en deux étapes : la formation de *clusters* denses mésoscopiques (plusieurs centaines de nm de

rayon), puis la formation de nucléi à l'intérieur de ces *clusters*. Les *clusters*, métastables, possèdent une forte concentration en protéines ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) dont une partie est sous forme de monomères et l'autre sous forme d'oligomères, sont de type liquide et diffusent librement dans le milieu (Vekilov et Vorontsova, 2014). Les *clusters* de lysozyme déterminés par Stradner et coll. (Stradner et coll., 2004) correspondraient à ce type d'objets. Dans le cas de nos simulations, il n'est cependant pas possible de générer ce type de *clusters*, pour des raisons de déplacement qui seront détaillées dans la section 5.2.2.2. L'étape de nucléation ne peut donc être modélisée correctement, ce qui contribue à l'absence de cristallisation dans nos simulations, sans en être toutefois totalement responsable. En effet, des modélisations en dynamique moléculaire de sphères chargées représentant des molécules de lysozyme ont été effectuées par Cardinaux et coll. (Cardinaux et coll., 2011) et ont permis de générer des *clusters* mobiles. Cependant, ces auteurs n'ont pas obtenu de cristallisation lors de l'augmentation en concentration des molécules modèles de lysozyme, aboutissant à la place à un état d'arrêt dynamique semblable à un verre ou un gel de *clusters*.

Un second point de désaccord entre l'équation d'état expérimentale et celle obtenue par simulation concerne la zone diluée. En effet, pour une même fraction volumique, les pressions osmotiques calculées par simulation sont nettement inférieures aux pressions expérimentales. Cette différence peut être interprétée comme une répulsion insuffisante entre les protéines dans nos simulations. Les deux hypothèses avancées ont été : une trop faible portée des répulsions électrostatiques (section 5.2.1.2) et la prise en compte des contre-ions de façon implicite (section 5.2.1.3).

### 5.2.1.2 Influence du cut-off

Le *cut-off* avait initialement été fixé à quatre fois la longueur de Debye, car durant nos tests, c'était le *cut-off* minimal pour lequel les facteurs de structure obtenus sur les systèmes de molécules de lysozyme étaient similaires à ceux obtenus sans *cut-off*.

Pour une force ionique constante de 20 mM, si l'on considère les distances moyennes inter-particules pour un système cubique ou cubique face centrée, soit  $d = \left(\frac{1}{n}\right)^{\frac{1}{3}}$  et  $d = \left(\frac{\sqrt{2}}{n}\right)^{\frac{1}{3}}$ , respectivement, avec  $d$  la distance inter-particules (centre à centre) et  $n$  la densité numérique des particules, on constate que le *cut-off* est inférieur à  $d$  pour les deux pressions les plus faibles (0,05 et 0,12 bar). Dans ces conditions, la portée des répulsions est insuffisante pour induire une interaction entre protéines.

Différents cut-off ont été testés, en les faisant varier de 3 à 10 fois la longueur de Debye, en considérant la force ionique constante et égale à 20 mM. Les résultats pour les deux pressions où la différence entre données expérimentales et issues de la simulation était initialement la plus forte, 0,05 et 0,12 bar, sont présentés sur la figure 5.11.

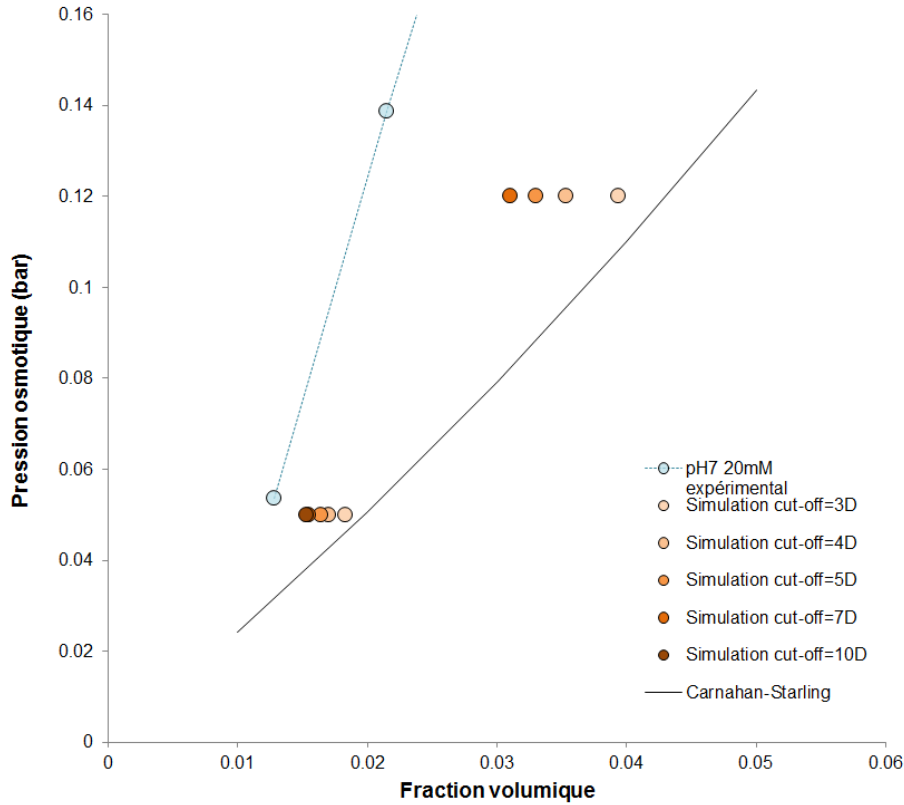


FIGURE 5.11 – Fractions volumiques pour des pressions osmotiques de 0,05 et 0,12 bar, obtenues expérimentalement (cercles bleus clair) et par simulation, avec un cut-off de 3, 4, 5, 7 et 10 fois la longueur de Debye (cercles orange) et  $\epsilon_{LJ} = 0,05 k_B T$

Nous constatons que l'augmentation de la distance de *cut-off* va de pair avec une augmentation de pression et un rapprochement des données expérimentales avec celles issues des simulations. Théoriquement, la distance moyenne inter-particules  $d$  devient inférieure au cut-off pour toutes les pressions à partir de 6 fois la longueur de Debye. Pourtant, même en utilisant un *cut-off* égal à 10 fois la longueur de Debye, les données issues de simulation sont toujours restées à des pressions inférieures aux données expérimentales.

### 5.2.1.3 Influence des contre-ions

Nous avons supposé que le manque de répulsions pouvait être dû à l'absence d'ions chargés dans le milieu, car traités de manière implicite à travers la force ionique seule. Pour tester l'influence de contre-ions traités de manière explicite, le nombre de protéines a été réduit à 30, afin de ne pas augmenter le temps de calcul, tout en gardant une bonne statistique. Les contre-ions ( $\text{Cl}^-$ ) étaient composés d'une sphère de 1,7 Å de rayon, portant une charge centrale de -1 e. Ils ont été traités, en termes de déplacement et de potentiel d'interaction, comme les protéines.

Les résultats avec des nombres différents de contre-ions pour une pression de 0,12 bar sont montrés sur la figure 5.12. La valeur de 7,23 contre-ions par protéine (217 contre-ions dans la boîte de simulation) a été déterminée en considérant qu'il existait un contre-ion par charge, en prenant en compte la charge nette. La valeur de 1,67 contre-ions par protéine (50 contre-ions dans la boîte de simulation) a ensuite été prise arbitrairement comme intermédiaire entre 217 et 0 contre-ions dans la boîte de simulation.

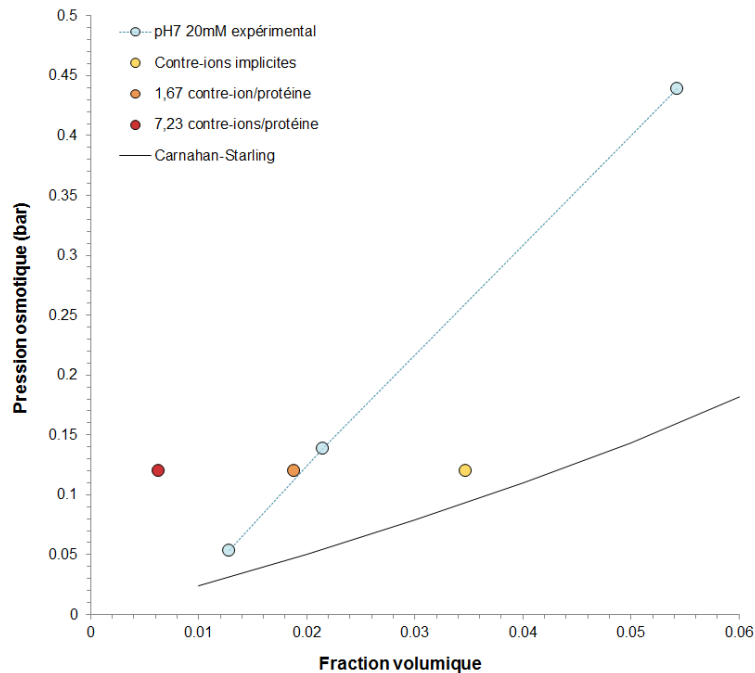


FIGURE 5.12 – Equation d'état expérimentale du lysozyme à pH7 et 20mM de force ionique (cercles bleus) et valeurs de fraction volumique obtenues pour une pression de 0,12 bar par simulation avec contre-ions implicites (cercles jaunes) ou explicites (cercles orange et rouge)

On voit que 7,23 contre-ions par protéine imposent une pression beaucoup plus importante que dans le cas expérimental. En revanche, la prise en compte de 1,67 contre-ions par protéine donne un résultat proche des données expérimentales. Ces résultats suggèrent que la prise en compte des ions joue un rôle important dans la valeur de la pression osmotique et qu'elle ne doit donc pas être négligée. La poursuite des simulations devrait prendre en compte de façon explicite au minimum les contre-ions négatifs correspondant à la charge nette, mais nous pouvons supposer que la prise en compte de la totalité des ions (contre-ions de charge positive et négative, sels) donnerait encore de meilleurs résultats.

Le modèle théorique développé dans la section 3.2.5 et rendant correctement compte de nos données expérimentales, ne prenait en compte que les protéines, en ne faisant intervenir les contre-ions et les ions du tampon qu'à travers la longueur de Debye utilisée dans

le potentiel électrostatique. Par conséquent, nous pouvons considérer qu'il est l'équivalent d'un système avec contre-ions implicites et *cut-off* infini, en notant toutefois que l'augmentation de la distance de *cut-off* dans nos simulations ne permet pas de rejoindre les données expérimentales pour autant.

## 5.2.2 pH 7, $I=150$ mM

### 5.2.2.1 Essais préliminaires

Une équation d'état complète a été réalisée sur la gamme de pressions 0,05 bar-50 bar, avec des systèmes de 50 particules. Les résultats sont présentés sur la figure 5.13.

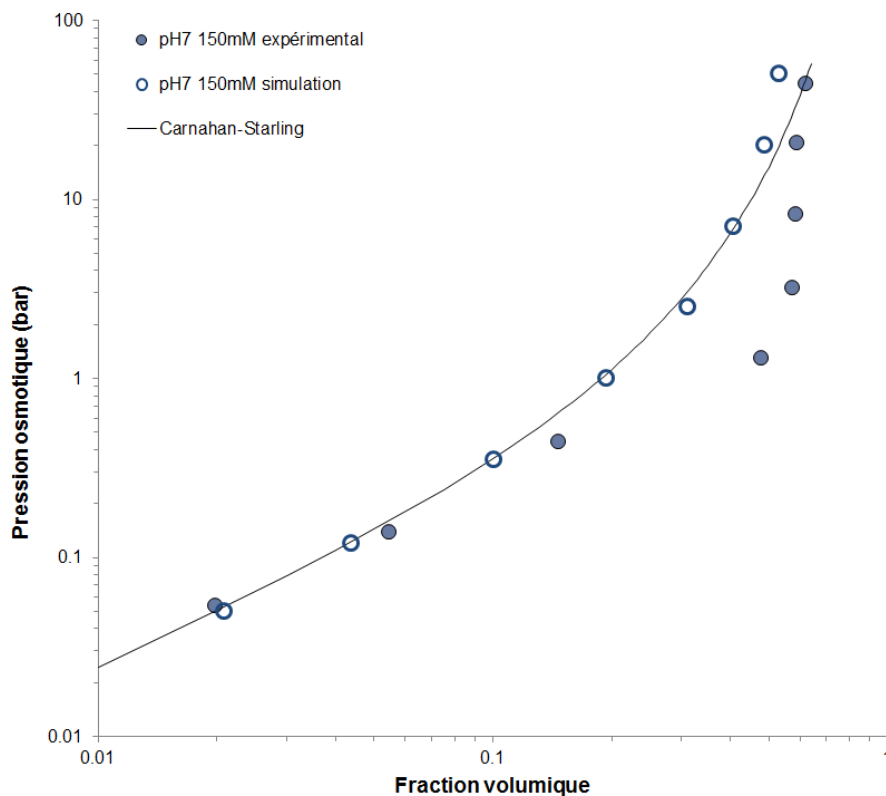


FIGURE 5.13 – Equation d'état du lysozyme à pH 7 et 150 mM de force ionique, obtenue expérimentalement (cercles pleins) et par simulation Monte-Carlo avec contre-ions implicites et  $\epsilon_{LJ} = 0,05 kT$  (cercles vides)

Les résultats de simulation montrent encore une fois une tendance très proche du modèle de Carnahan-Starling. Les points issus de simulation sont très proches des données expérimentales jusqu'à une pression de 0,12 bar, puis en divergent. À la différence des

résultats à pH 7 et 20 mM de force ionique, les points de l'équation d'état issue de simulation sont situés alors à des pressions supérieures aux données expérimentales, témoignant d'une trop faible attraction ou d'une trop grande répulsion avant même la transition de cristallisation.

L'écrantage des charges des protéines par les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  peut favoriser les attractions à courte portée, par exemple de type hydrophobe. Afin de visualiser l'effet d'une augmentation du potentiel attractif sur l'équation d'état, le paramètre de Lennard-Jones  $\epsilon_{LJ}$  a été modulé.

### 5.2.2.2 Influence du paramètre de Lennard-Jones

Différentes valeurs du paramètre  $\epsilon_{LJ}$  ont été testées :  $0,05 k_B T$ ,  $0,075 k_B T$ ,  $0,1 k_B T$  et  $0,15 k_B T$ . Les autres paramètres étaient gardés constants. Les résultats sont présentés sur la figure 5.14.

À fraction volumique similaire, l'équation d'état avec  $\epsilon_{LJ} = 0,075 k_B T$  est située à des pressions osmotiques inférieures à celles de l'équation avec  $\epsilon_{LJ} = 0,05 k_B T$ , ce qui suit ce qui était attendu : l'augmentation de la part attractive des interactions protéine-protéine occasionne une diminution de pression osmotique. Les points ne rejoignent cependant pas encore les points expérimentaux.

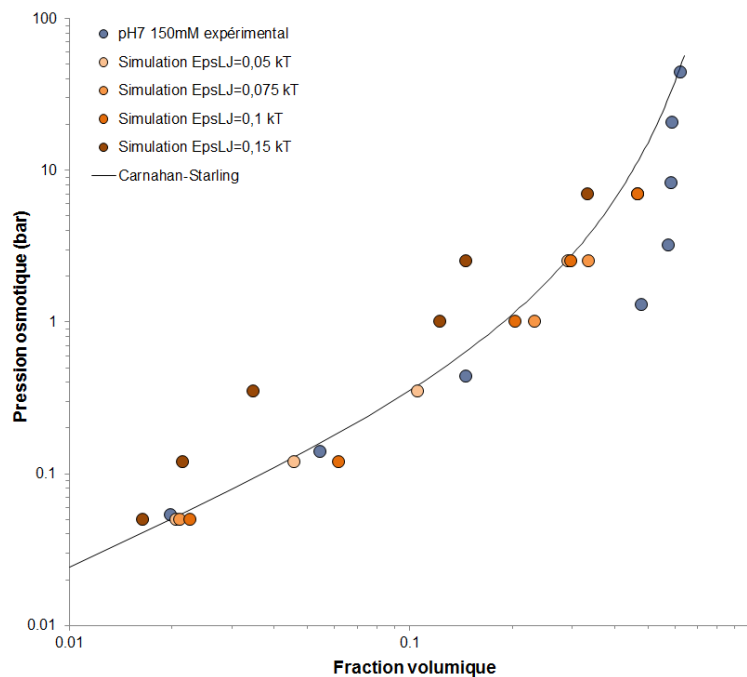


FIGURE 5.14 – Equations d'état du lysozyme à pH 7 et 150 mM de force ionique, expérimentale (cercles bleus) et issues de simulation (cercles oranges), en faisant varier le paramètre de Lennard-Jones  $\epsilon_{LJ}$  (noté EpsLJ) de  $0,05$  à  $0,15 k_B T$

L'équation avec  $\epsilon_{LJ} = 0,1 k_B T$  est également située à des pressions inférieures à celles avec  $\epsilon_{LJ} = 0,05 k_B T$  et  $0,075 k_B T$ , mais cela ne concerne que la zone diluée. Lorsque la fraction volumique augmente ( $\Phi > 0,1$ ), les points à  $\epsilon_{LJ} = 0,1 k_B T$  sont situés à des pressions supérieures à ceux avec  $\epsilon_{LJ} = 0,075 k_B T$ , et sont proches de ceux à  $\epsilon_{LJ} = 0,05 k_B T$ .

L'équation avec  $\epsilon_{LJ} = 0,15 k_B T$  présente pour sa part une tendance surprenante : à fraction volumique similaire, les pressions osmotiques de cette équation sont très élevées en regard des pressions expérimentales ou issues de simulations avec un paramètre d'attraction inférieur. De plus, elle présente une tendance fluctuante, avec des ruptures de pente abruptes dans la zone diluée, ce qui ne correspond pas à ce qui est observé pour les autres équations.

L'observation du système à l'aide du logiciel VMD (Humphrey et coll., 1996) permet de constater que des agrégats de protéines se sont formés dans notre boîte de simulation, même aux plus faibles pressions (figure 5.15).

En suivant les déplacements des protéines dans la boîte, on constate qu'elles deviennent immobiles dès lors qu'elles s'associent à un agrégat. Le potentiel attractif à courte portée est tellement fort qu'une fois associées, deux protéines ne peuvent plus se séparer. Or, le programme ne prend en charge que le déplacement de protéines individuelles et ne peut effectuer celui d'un groupe de protéines. Une fois formé, un agrégat ne peut donc pas être déplacé et bloque le rétrécissement de la boîte de simulation, ce qui explique que les fractions volumiques, à pression osmotique constante, soient beaucoup plus faibles dans le cas où  $\epsilon_{LJ} = 0,15 k_B T$  que dans les autres simulations ou dans le cas expérimental. Un phénomène similaire peut expliquer les pressions plus hautes à  $0,1 k_B T$  qu'à  $0,075 k_B T$  pour les hautes fractions volumiques, favorisant la formation de clusters.

Le déplacement de groupes de protéines devra donc à l'avenir être envisagé afin de poursuivre l'étude de l'influence des attractions à courte portée sur le déplacement des équations d'état. L'inclusion de patches hydrophobes dans les modèles de protéines pourra également être envisagé, afin de limiter le nombre de zones disponibles pour l'association entre protéines et réduire l'agrégation en masse. En affectant un potentiel de type Lennard-Jones à ces zones exclusivement, nous pourrions rendre compte plus précisément des modalités d'association et découpler les effets des interactions électrostatiques et des attractions à courte portée, sans aller jusqu'à l'utilisation de molécules d'eau explicites.



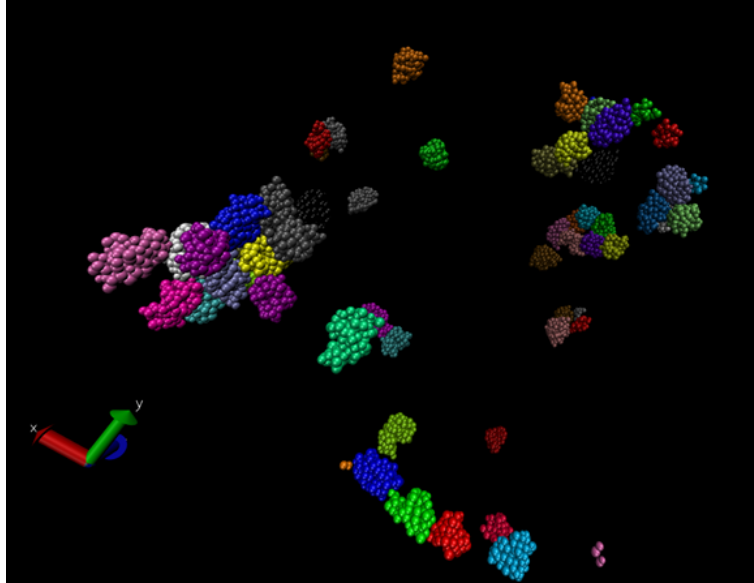


FIGURE 5.15 – Capture d'écran du système à 0,05 bar, pH 7, 150 mM de force ionique avec  $\epsilon_{LJ} = 0,15 k_B T$

### 5.2.3 pH 7, $I=2,02$ M

Une équation d'état complète a été réalisée sur la gamme de pressions 0,05 bar-50 bar, avec des systèmes de 50 particules. Les résultats sont présentés sur la figure 5.16

La différence entre l'équation d'état expérimentale et l'équation d'état issue de simulation est très importante : les fractions volumiques sont 2 à 3,3 fois plus élevées dans le cas expérimental que dans le cas de la simulation, à pression osmotique constante.

Nous avons précédemment émis l'hypothèse qu'un phénomène de séparation de phases liquide-liquide avait lieu dans nos échantillons à pH 7 et 2,02 M de force ionique (voir section 3.2.3). Nous supposons que les gouttelettes de phase dense, résultant d'attractions entre les protéines, ne peuvent être modélisées par notre programme, pour la même raison que les clusters précédemment cités. De plus, la formation de gouttelettes dépend fortement de la tension superficielle de ces objets, qui n'est pas encore prise en compte dans notre programme.

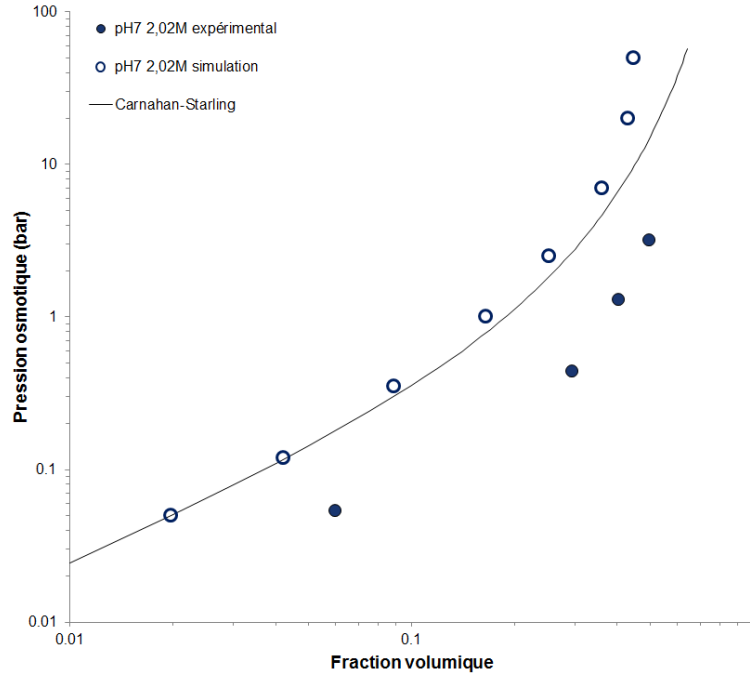


FIGURE 5.16 – Equation d’état du lysozyme à pH 7 et 2,02M de force ionique, obtenue expérimentalement (cercles pleins) et par simulation Monte-Carlo avec contre-ions implicites et  $\epsilon_{LJ} = 0,05 k_B T$  (cercles vides)

### 5.3 Conclusion

Le protocole de simulation mis en place prend en compte à la fois les caractéristiques morphologiques des protéines considérées (forme, répartition des charges, titration des acides aminés) et les interactions électrostatiques, stériques ou attractives à courte portée. Il permet de simuler des dispersions de protéines dans des conditions physico-chimiques données (pH, force ionique, température, pression, constante diélectrique du milieu), puis de générer des spectres de diffusion des rayons X aux petits angles ou des équations d’état. L’accord de ces données issues de simulation avec les données expérimentales est bon, quoiqu’imparfait. Les équations d’état obtenues par simulation sont proches des équations expérimentales, mais restent très similaires au modèle de Carnahan-Starling, en dépit de l’anisotropie de forme des objets et des répulsions électrostatiques intégrées dans le modèle. L’analyse des différences entre les équations d’état théoriques et expérimentales fait apparaître le rôle prépondérant de l’eau, et plus spécifiquement la nécessité d’utiliser dans de prochaines simulations un solvant explicite (eau et ions), pour rendre compte de la formation de cristaux ou de l’influence des contre-ions. Cependant, l’ajout de molécules d’eau explicites dans les simulations numériques contenant déjà plusieurs dizaines de protéines demande une puissance de calcul importante. Des méthodes permettant de

réduire ce coût ont été développées, mais impliquent tout de même des simplifications dans la prise en compte des interactions eau/solutés, généralement en définissant une zone réduite de l'espace de simulation où les molécules sont prises en compte de façon explicite, l'extérieur étant traité de façon implicite (Lee et coll., 2004; Fennell et coll., 2011).

L'importance d'intégrer une composante attractive pour rendre compte du comportement du lysozyme à forte force ionique et/ou à forte fraction volumique a également été mise en évidence, même si ce point n'a pas pu être totalement exploré du fait de la formation de clusters immobiles. Le déplacement des clusters de protéines formés lorsqu'on augmente l'attraction (via  $\epsilon_{LJ}$ ), ainsi que la possibilité de dissociation, devront être mis en place, ce qui devrait améliorer l'accord des données simulées et expérimentales aux fortes forces ioniques et/ou aux fortes fractions volumiques. Ce dernier point concerne également les profils SAXS. En effet, les spectres de SAXS obtenus par simulation sur des dispersions peuvent, si l'attraction est suffisamment forte ( $\epsilon_{LJ} \geq 0,08 k_B T$ ), présenter les deux pics caractéristiques des clusters dynamiques vus par Stradner et coll. (Stradner et coll., 2004), mais leur position diffère des données expérimentales : la différence, pour du lysozyme à pH 7, 20 mM de force ionique et  $\Phi = 0,126$ , entre les distances caractéristiques issues de simulation (à  $\epsilon_{LJ} = 0,15 k_B T$ ) et des expériences est de 7 Å pour le pic inter-clusters et de 67 Å pour le pic inter-monomères dans un cluster. Des clusters se forment donc dans certaines conditions, mais les distances caractéristiques ne sont pas réalistes. Tous ces points soulignent la complexité des mécanismes mis en jeu et la nécessité d'une description précise de toutes les espèces présentes et de la thermodynamique des transitions de phase éventuelles (cristallisation, séparation de phases liquide-liquide, clustering).

Les conclusions tirées des simulations de systèmes de molécules de lysozyme dans des conditions de haute concentration confirment malgré tout certaines conclusions formulées à partir des données expérimentales : la coexistence d'un potentiel mixte répulsif/attractif, l'importance des contre-ions dans les interactions, l'attribution du bending et du saut de concentration des équations d'état à la cristallisation. Ces conclusions découlent cependant de l'analyse d'un système « en *bulk* », en trois dimensions, ne subissant pas d'autre contrainte extérieure que le retrait d'eau. Nous pouvons considérer que le seul moteur des changements d'état du système est la concentration, si l'on y inclut l'effet des contre-ions associés à chaque protéine. Cependant, dans nombre de systèmes concentrés de protéines rencontrés en industrie, d'autres forces influencent le comportement des protéines, en sus de la simple concentration : température (poudres), interface avec un compartiment hydrophobe (mousses, encapsulation)... Nous pouvons alors nous interroger : les interactions inhérentes au phénomène de concentration, mises en évidence en *bulk*, se retrouvent-elles dans des systèmes où d'autres forces extérieures sont en jeu ? Quelle rôle jouent-elles dans le comportement des protéines dans ces autres systèmes ? Peut-on isoler l'effet concentra-

tion dans ces systèmes ?

L'étude par réflectométrie de neutrons des profils de concentration de couches de lysozyme et d'ovalbumine à l'interface eau-air, ainsi que l'étude par ellipsométrie à l'interface eau-air, présentées dans le chapitre suivant, apportent quelques éléments de réponse à ces questions. En particulier, elles permettent de mettre en relation certaines caractéristiques des équations d'état des deux protéines avec la nature des couches interfaciales formées.



## Chapitre 6

# Rôle du confinement dans le comportement interfacial



Comme nous l'avons précédemment évoqué, les systèmes où la concentration en protéines atteint plusieurs centaines de grammes par litre sont nombreux. Parmi eux, les mousses de mélanges de protéines (lait, oeuf...) revêtent une importance particulière dans l'industrie agroalimentaire et ont été largement étudiées, notamment grâce à des mesures de propriétés interfaciales de protéines pures ou en mélange (Wierenga et Gruppen, 2010). Nous proposerons ici, grâce aux apports des équations d'état que nous avons établies pour le lysozyme et l'ovalbumine, de nouvelles hypothèses quant à la part de la concentration dans le comportement interfacial de ces deux protéines. En particulier, nous apporterons des éléments suggérant que deux facteurs, la présence d'évaporation et des interactions attractives entre protéines, sont nécessaires à l'existence de multicouches de protéines à l'interface air/eau.

## **6.1 Une partie du comportement interfacial du lysozyme et de l'ovalbumine est imputable à l'effet concentration**

Les travaux de Le Floch-Fouéré (Le Floch-Fouéré, 2008) ont notamment porté sur le comportement du lysozyme et de l'ovalbumine à l'interface air/eau. Les résultats de tensiométrie et d'ellipsométrie ont montré un comportement différent dans les mêmes conditions physico-chimiques (pH 7, force ionique proche de 40 mM et température de 19 °C), en utilisant une solution de départ de même concentration ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ). En effet, dans le cas de l'ovalbumine, les valeurs de pression de surface et d'angle ellipsométrique atteignent en quelques minutes une valeur stable, tandis que dans le cas du lysozyme, l'angle ellipsométrique mesuré augmente continûment durant les 8 h de suivi de cinétique. Pour le lysozyme, seule la pression de surface arrive à saturation dans le temps de l'expérience (8 h) (voir figure 6.1).

Ces résultats ont montré que, dans ces conditions physico-chimiques, l'ovalbumine forme des monocouches à l'interface air-eau, tandis que le lysozyme forme des couches d'épaisseur plurimoléculaires, que nous nommerons par la suite multicouches. La concentration de surface déterminée pour l'ovalbumine est de l'ordre de  $2 \text{ mg m}^{-2}$ . Dans le cas du lysozyme, la valeur de concentration de surface de  $4,2 \text{ mg m}^{-2}$ , estimée à partir des résultats d'ellipsométrie après 8 h de cinétique, doit être utilisé avec précaution en raison de la présence d'une multicouche. Dans ce cas, la correspondance entre angle ellipsométrique et concentration de surface n'est pas aussi directe que dans le cas d'une monocouche et la conversion en fraction volumique est également plus complexe, bien que l'on puisse dire que de fortes valeurs de l'angle ellipsométrique correspondent à des fractions volumiques élevées.



Cette différence de comportement a également été reportée par de Feijter et coll. (de Feijter et Benjamins, 1987) pour des solutions d'ovalbumine à pH 6,4 et I=20 mM, et des solutions de lysozyme à pH 6,7 et I=20 mM. En effet, les auteurs estiment la densité de surface correspondant à une monocouche saturée à  $1,8 \text{ mg m}^{-2}$  pour le lysozyme et  $2,2 \text{ mg m}^{-2}$  pour l'ovalbumine. Or, en 17 h la densité de surface de la couche interfaciale de lysozyme avoisine les  $2,5 \text{ mg m}^{-2}$  pour une concentration en solution de 0,1 % massiques (soit environ  $1 \text{ g L}^{-1}$ ), ce qui est interprété comme la formation de multicouches. En revanche, à la même concentration en solution, la densité de surface de la couche interfaciale d'ovalbumine avoisine les  $1,5 \text{ mg m}^{-2}$ .

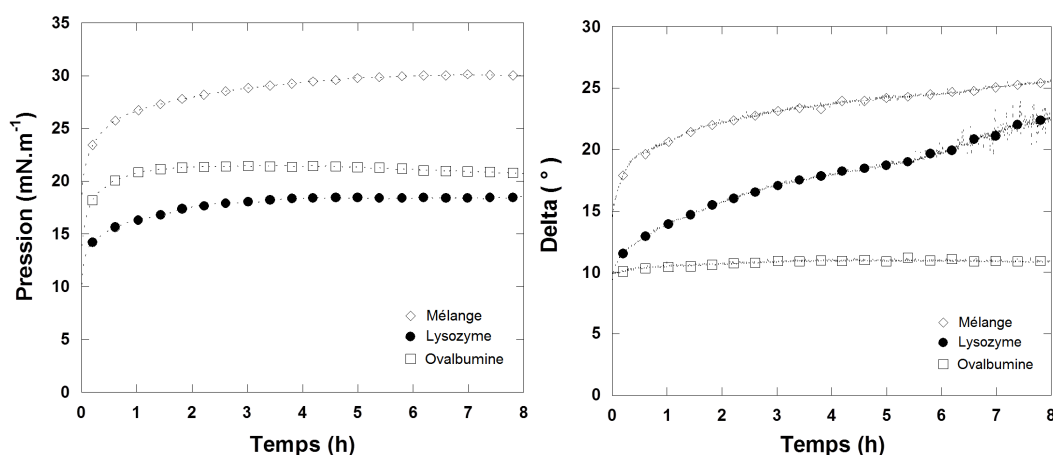


FIGURE 6.1 – *Pression de surface (gauche) et angle ellipsométrique (droite) au cours des cinétiques d'adsorption de l'ovalbumine (carrés vides) et du lysozyme (ronds pleins) à une concentration de  $5 \text{ g L}^{-1}$ , dans une solution à pH 7, 40 mM de force ionique et  $19 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Figures extraites de (Le Floch-Fouéré, 2008)*

Nous pouvons émettre l'hypothèse que, dans le cas des multicouches, la première couche de lysozyme est saturée. En utilisant la valeur donnée par de Feijters et coll., nous obtenons alors une fraction volumique dans la gamme 0,28-0,43, selon l'orientation de la protéine à la surface de la solution. Pour une monocouche saturée d'ovalbumine, nous trouvons de la même manière une fraction volumique comprise entre 0,23 et 0,36.

En reportant ces valeurs sur l'équation d'état du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique, nous remarquons que nous nous trouvons dans la zone où les attractions entre molécules deviennent prédominantes et initient la cristallisation. En revanche, dans le cas de l'ovalbumine, les interactions prédominantes sont de nature répulsives, même au-delà de  $\Phi = 0,36$  (voir figure 6.2).

Des mesures ellipsométriques ont été réalisées sur des couches interfaciales d'ovalbumine formées à pH 3,6 et 10 mM de force ionique et une concentration initiale de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  (Lechevalier et coll., non publié). Dans ces conditions de tampon, nous avons montré

précédemment que les équations d'état de l'ovalbumine à pH 3,6 étaient situées sous le modèle de Carnahan-Starling, dénotant la prédominance de la composante attractive des interactions entre protéines (voir section 3.2.1).

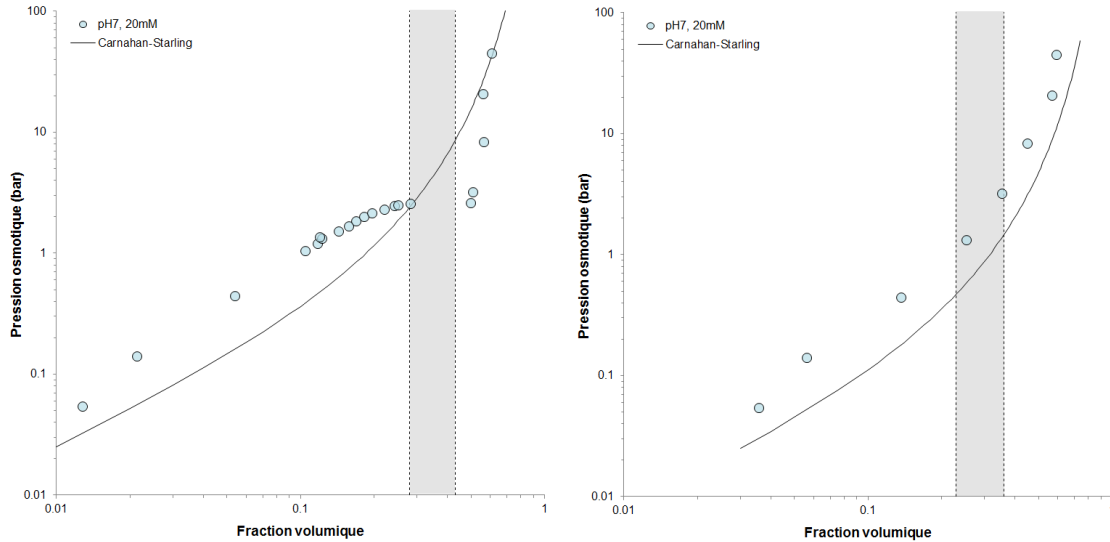


FIGURE 6.2 – Concentration de surface minimale estimée pour la première couche interfaciale du lysozyme (gauche) et de l'ovalbumine (droite) à pH 7 et 40 mM de force ionique, reportée en pointillés sur les équations d'état respectives des deux protéines à pH 7 et 35 mM de force ionique.

Or, les mesures interfaciales à pH 3,6 montrent que l'angle ellipsométrique augmente de façon continue sur toute la durée de l'expérience, sans atteindre de valeur saturante en plusieurs dizaines d'heures (voir figure 6.3). En outre, l'angle ellipsométrique atteint avec du tampon acétate à pH 3,6 est supérieur à  $30^\circ$  au bout de 66,5 h, montrant de façon non ambiguë la formation de multicouches, contrairement à ce qui peut être observé avec un tampon bis-tris propane à pH 7, pour lequel une monocouche est obtenue.

À partir de ces résultats, nous pouvons imaginer qu'après formation de la première couche interfaciale, le lysozyme et l'ovalbumine sont présentes à une fraction volumique supérieure à  $\Phi = 0,2$ . La nature, attractive ou répulsive, des interactions protéine-protéine à cette fraction volumique déterminerait alors la formation -ou non- d'assemblages moléculaires, à savoir les multicouches de protéines. Il est à noter, à cet égard, que les observations de Yano et coll. (Yano et coll., 2011 ; Yano et Uruga, 2013) sur le lysozyme à l'interface air/eau montrent des similitudes avec les observations que nous avons pu faire en solution. En effet, ces auteurs montrent qu'il se produit un phénomène de salting-out dans les films interfaciaux de lysozyme formés à pH 7 et en présence de 2 M de NaCl, tout comme nous l'avons observé lors de l'établissement de notre diagramme  $(\Phi, \Pi)$  dans les mêmes conditions (Yano et coll., 2011). D'autre part, lors de l'injection de NaCl (concentration

finale  $\sim 85$  mM) sous un film interfacial de lysozyme pré-formé en l'absence de NaCl, ils observent la formation de cristaux à la surface du film (Yano 2013 et Uruga, 2013). Ceci est également cohérent avec le déplacement de la transition de cristallisation lors de l'ajout de NaCl observée sur nos équations d'état.

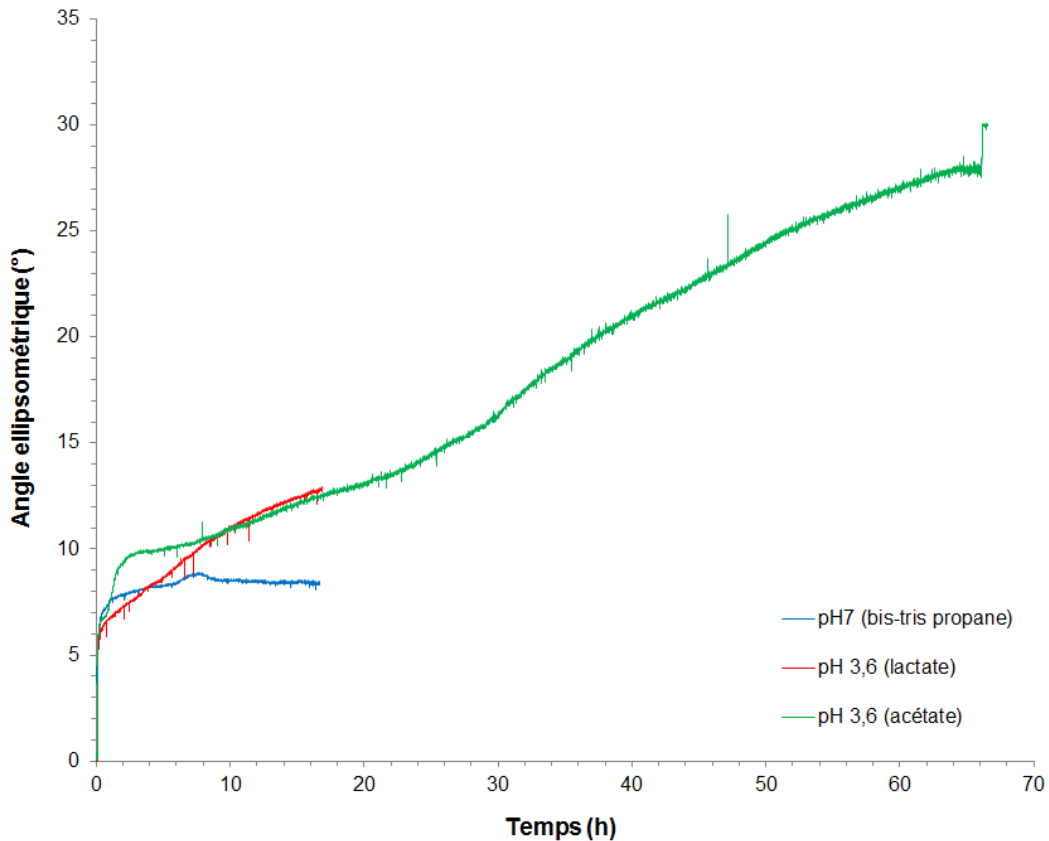


FIGURE 6.3 – Suivi de l'angle ellipsométrique des cinétiques d'adsorption de l'ovalbumine à une concentration de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  dans un tampon bis-tris propane à pH 7,  $I=10 \text{ mM}$  (courbe bleue), un tampon lactate à pH 3,6,  $I=10 \text{ mM}$  (courbe rouge) ou un tampon acétate à pH 3,6,  $I=10 \text{ mM}$  (courbe verte) (Lechevalier et coll., non publié)

## 6.2 L'évaporation de l'eau à travers la couche interfaciale est nécessaire à la formation de multicouches

Afin de caractériser la structure des films interfaciaux de façon plus complète, nous avons mené des expériences de réflectivité de neutrons sur des couches interfaciales de lysozyme et d'ovalbumine, dans différentes conditions : pD 7 et 20 ou 170 mM de force ionique pour les deux protéines et pD 3,6 et 20 ou 170 mM de force ionique en plus pour l'ovalbumine.

Des mesures ont également été effectuées en utilisant des mélanges équimolaires lysozyme-ovalbumine à pD 7 et 20 ou 170 mM de force ionique, ainsi qu'en effectuant une adsorption séquentielle des deux protéines en proportion équimolaire, dans les mêmes conditions physico-chimiques. Dans tous les cas, la concentration totale en protéine dans la solution de départ était de  $1 \text{ gL}^{-1}$ . Afin de limiter les échanges  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  entre la solution et l'atmosphère, un capot hermétique était installé au-dessus de la cuve de Langmuir, sauf pour une série de mesures effectuée sans capot sur du lysozyme à pH 7 et  $I=20 \text{ mM}$ .

Les densités d'adsorption dans les couches interfaciales formées par l'ovalbumine en fonction du temps sont présentées sur la figure 6.4.

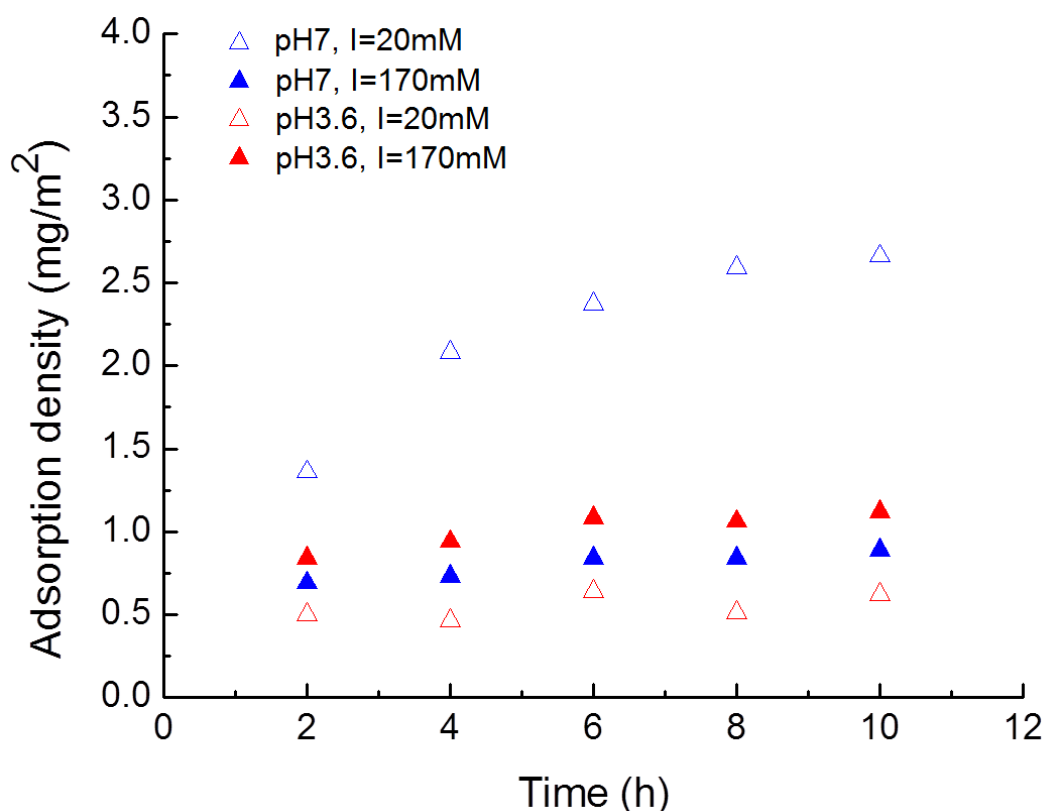


FIGURE 6.4 – Densités d'adsorption à l'interface air/eau en fonction du temps, pour des solutions d'ovalbumine à  $1 \text{ gL}^{-1}$ . Les conditions présentées, testées en présence du capot hermétique, sont : pH 7,  $I=20 \text{ mM}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (triangles bleus vides) ; pH 7,  $I=170 \text{ mM}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (triangles bleus pleins) ; pH 3,6,  $I=20 \text{ mM}$ ,  $20^\circ\text{C}$  (triangles rouges vides) ; pH 3,6,  $I=170 \text{ mM}$ ,  $20^\circ\text{C}$  (triangles rouges pleins).

Dans le cas où le pD est de 7 et la force ionique de 20 mM, nous remarquons une augmentation progressive de la densité d'adsorption puis une stabilisation à une valeur plateau de l'ordre de  $2,5 \text{ mg m}^{-2}$  à partir de 8 h de mesure. Cette valeur est cohérente avec les  $2 \text{ mg m}^{-2}$  mesurés par ellipsométrie sur une solution d'ovalbumine à  $10 \text{ gL}^{-1}$ , dans des

conditions proches (pH 7,  $I = 40$  mM) (Le Floch-Fouéré, 2008) et dénote l'organisation en une monocouche saturée de protéines à l'interface air/eau.

En revanche, les densités d'adsorption maximales pour les autres conditions sont de l'ordre de  $1 \text{ mg m}^{-2}$ , soit très inférieures à celles mesurées à pH 7 et 20 mM de force ionique, ou en ellipsométrie à pH 7 et 20 mM de force ionique. Elles sont également plus faibles que celles, de l'ordre de  $1,5\text{-}1,6 \text{ mg m}^{-2}$ , mesurées par Wierenga et coll. (Wierenga et coll., 2003 et 2005a) avec des solutions d'ovalbumine à  $0,1$  ou  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  (pH 7,  $I=10$  mM). Une hypothèse pour expliquer les densités d'adsorption plus faibles à pH 3,6 est la forte charge des protéines ( $+31 e$ ), qui peut être à l'origine d'une répulsion à longue portée entre protéines (Wierenga et coll., 2005a) mais surtout entre les protéines et l'interface, suivant le principe de « miroir de charge » (*image charge*), ce qui limiterait l'adsorption : la protéine ressentirait en effet de la part de l'interface l'équivalent d'une charge  $Z' = Z \frac{\varepsilon - \varepsilon_1}{\varepsilon + \varepsilon_1}$ , avec  $Z$  la charge de la protéine et  $\varepsilon$ ,  $\varepsilon_1$  les constantes diélectriques du solvant et de l'air, respectivement (si  $\varepsilon_1 < \varepsilon$ ). Le potentiel de répulsion électrostatique ainsi généré s'oppose au potentiel attractif hydrophobe (Xu et Damodaran, 1992 ; Damodaran et Xu, 1996). Le fait que les données d'ellipsométrie ne montrent pas le même phénomène peut être attribuable à l'action un troisième facteur, détaillé plus loin. La faible valeur des densités d'adsorption maximales à pH 7 et 170 mM de force ionique est plus difficile à expliquer. En effet, l'ajout de sel diminue en théorie les répulsions électrostatiques et devrait favoriser l'adsorption, comme montré par Wierenga et coll. (Wierenga et coll., 2005a).

Les densités d'adsorption dans les couches interfaciales formées par le lysozyme, sont quant à elles présentées sur la figure 6.5.

Pour toutes les conditions en présence du capot hermétique, les valeurs de densité d'adsorption augmentent rapidement dans les premières heures, atteignant  $1,2$  à  $1,5 \text{ mg m}^{-2}$  au bout de deux heures. Puis, la pente des courbes décroît et une valeur maximale est atteinte au alentours de 8 h après le dépôt de la solution dans la cuve. Cette valeur est similaire pour toutes les conditions et est de l'ordre de  $2\text{-}2,3 \text{ mg m}^{-2}$ , ce qui est très inférieur aux valeurs précédemment mesurées par ellipsométrie à pH 7 et 40 mM de force ionique (autour de  $4,2 \text{ mg m}^{-2}$ ) (Le Floch-Fouéré, 2008). Cela montre que, dans nos conditions de mesure, le lysozyme forme des monocouches pour les trois couples (pH, force ionique) testés. La fraction volumique en protéine  $\Phi$  varie de  $\Phi = 0,32$  (pH 7,  $I=20$  mM,  $20^\circ\text{C}$ ) à  $\Phi = 0,36$  (pH 7,  $I=170$  mM,  $20^\circ\text{C}$ ) si les protéines sont orientées avec leur plus petit axe parallèlement à la surface, et de  $\Phi = 0,47$  (pH 7,  $I=20$  mM,  $20^\circ\text{C}$ ) à  $\Phi = 0,54$  (pH 7,  $I=170$  mM,  $20^\circ\text{C}$ ) si les protéines sont orientées avec leur plus grand axe parallèlement à la surface.

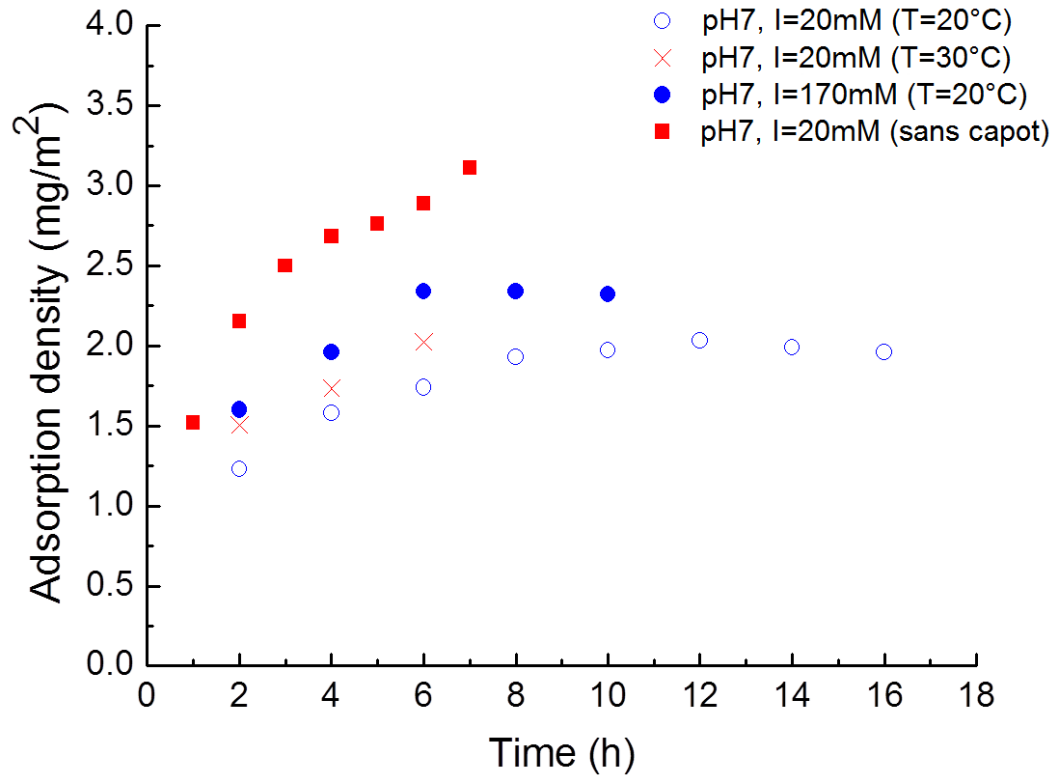


FIGURE 6.5 – Densités d'adsorption à l'interface air/eau en fonction du temps, pour des solutions de lysozyme à  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Les expériences avec présence du capot hermétique ont été effectuées à pH 7,  $I=20 \text{ mM}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (ronds bleus vides); pH 7,  $I=170 \text{ mM}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (ronds bleus pleins); pH 7,  $I=20 \text{ mM}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (croix rouges). Une expérience sans capot hermétique a été réalisée à pH 7,  $I=20 \text{ mM}$  (carrés rouges).

Une série de mesures a également été effectuée sans capot hermétique, en utilisant une solution de lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique. La figure 6.5 montre que la cinétique d'adsorption est plus rapide que pour les conditions avec capot hermétique et que les valeurs de densité d'adsorption atteintes au bout de 7 h sont supérieures à  $3 \text{ mg m}^{-2}$ . Les points au-delà de 7 h de mesure n'ont pas été reportés car l'échange  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  était important, comme montré sur les profils de réflectivité de la figure 6.6. Cependant, la tendance de la seconde partie de la courbe (après 5 h de mesure) semble montrer une reprise de l'augmentation de la densité d'adsorption.

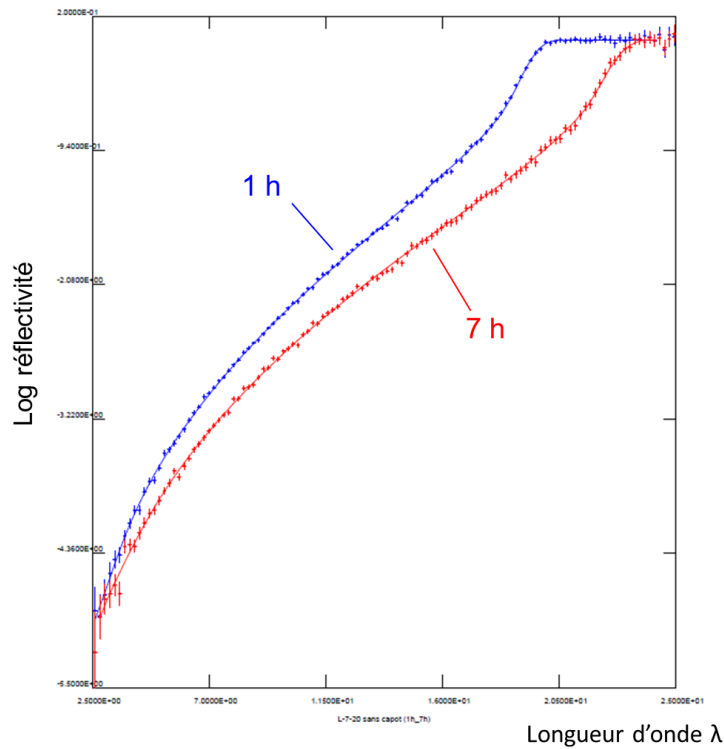


FIGURE 6.6 – *Profils de réflectivité en fonction de la longueur d'onde, pour les mesures effectuées à 1 h et 7 h d'adsorption sur des interfaces de lysozyme à pH 7 et 20 mM, sans capot hermétique.*

La courbe de la densité d'adsorption en fonction du temps montre donc que, sans capot hermétique, le lysozyme forme des multicouches. Cette courbe présente deux parties, séparées par une inflexion située vers 5 h après le début de l'adsorption. Cette inflexion est également présente sur les profils d'ellipsométrie à pH 7 et 40 mM de force ionique, à un temps similaire (voir figure 6.7).

Nous avons émis l'hypothèse que l'évaporation, présente dans le cas des expériences d'ellipsométrie et de réflectivité de neutrons sans capot hermétique, était nécessaire à la formation de multicouches de protéine à l'interface air/eau. Afin de la vérifier, nous avons effectué de nouvelles mesures d'ellipsométrie en utilisant les mêmes conditions physico-chimiques que dans les expériences de réflectivité de neutrons (lysozyme à  $1 \text{ g L}^{-1}$  dans un tampon bis-tris propane à pH 7 et 20 mM de force ionique) et en bloquant ou non l'évaporation.

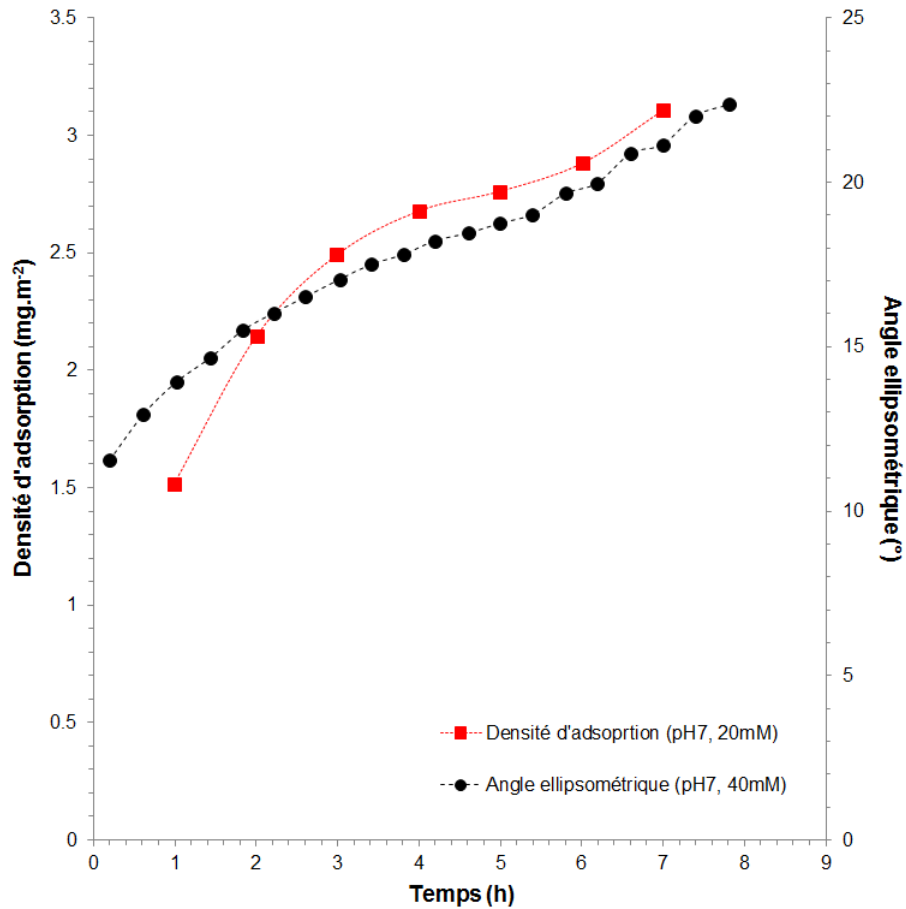


FIGURE 6.7 – Densité d'adsorption obtenue par réflectivité de neutrons sans capot hermétique (pH 7,  $I=20$  mM) et angle ellipsométrique (pH 7, 40 mM) mesurés à l'interface air/eau d'une solution de lysozyme à 1 et 5  $g L^{-1}$ , respectivement, en fonction du temps. Les valeurs d'angle ellipsométrique sont extraites de (Le Floch-Fouéré, 2008)

L'expérience « avec évaporation » était en effet réalisée à l'air libre, tandis que dans le cas « sans évaporation », la solution de lysozyme était placée dans une bouteille hermétique, dont l'air avait été auparavant saturé en vapeur d'eau. Les résultats, présentés sur la figure 6.8, montrent que la formation de multicouches, visible par la forte augmentation de l'angle ellipsométrique au cours du temps (supérieur à  $50^\circ$  au bout de 40 h), n'intervient que dans le cas où l'évaporation est permise. En revanche, lorsque la solution est placée dans une bouteille hermétique empêchant l'évaporation, seule une monocouche se forme (l'angle ellipsométrique atteint une valeur saturante proche de  $12^\circ$  dès 10 h d'adsorption).



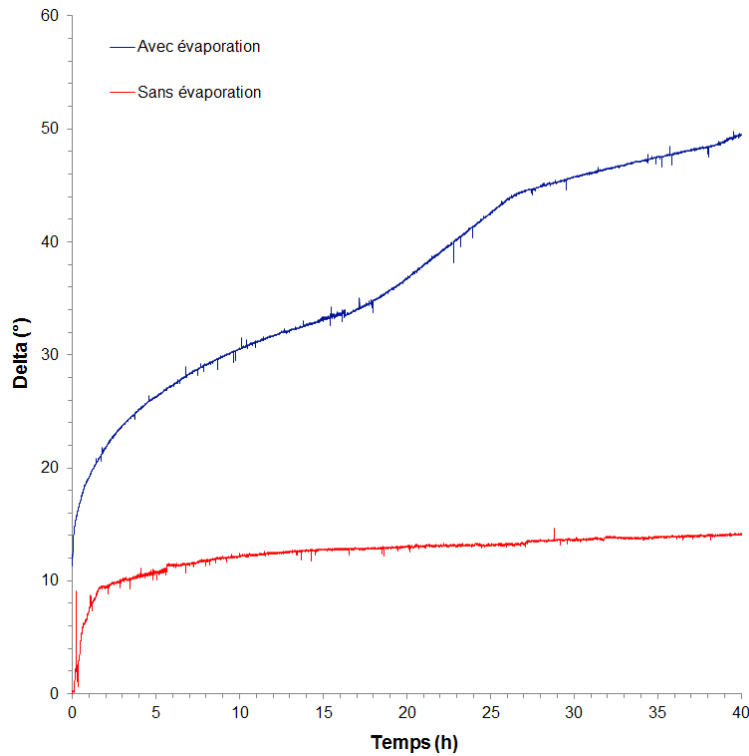


FIGURE 6.8 – Angle ellipsométrique pour une solution de lysozyme à  $1 \text{ g L}^{-1}$  dans un tampon bis-tris propane à pH 7 et 20 mM de force ionique, avec évaporation (courbe bleue) ou sans évaporation (courbe rouge)

Nous pouvons supposer que la première couche est formée par l'adsorption spontanée des protéines à l'interface hydrophobe avec l'air, son existence ne dépendant donc pas de la présence d'un flux d'évaporation à travers la couche interfaciale. Cependant, étant donné la cinétique d'adsorption plus lente de la première couche dans le cas où l'évaporation est nulle, nous pouvons imaginer que l'advection causée par l'évaporation accélère tout de même la montée des protéines à l'interface et donc la formation de la première couche.

Les couches supplémentaires, observées dans le cas du lysozyme lorsque l'évaporation est permise (mesures d'ellipsométrie et mesures de réflectivité de neutrons sans capot hermétique) semblent être formées par advection des protéines lors de l'évaporation. Les protéines seraient entraînées par le flux d'eau et concentrées sous la première couche interfaciale, comme décrit dans le cas de la formation de « peau » ou de « croûte » lors du séchage de films de polymères ou de colloïdes (Guigner et coll., 2001 ; Köning et coll., 2008 ; Routh, 2013). Le devenir de la couche interfaciale serait ainsi le résultat de la compétition entre le flux d'advection, sous l'effet de l'évaporation de l'eau, et la diffusion placée, elle, sous le contrôle de la concentration locale et des interactions intermoléculaires. Si les interactions sont majoritairement attractives, comme dans le cas du lysozyme à fractions volumiques moyennes à élevées, les protéines déplacées par advection auront

plus de facilité à s'associer à la première couche interfaciale et formeront des couches supplémentaires ; si les interactions sont majoritairement répulsives, comme dans le cas de l'ovalbumine, les protéines entraînées par l'évaporation seront repoussées de la première couche et seront plus susceptibles de retourner dans la sous-phase.

## 6.3 Conclusion

La mesure par réflectivité de neutrons des propriétés des couches de lysozyme et d'ovalbumine adsorbées à l'interface air/eau ont permis, en association avec des mesures d'ellipsométrie et l'analyse des équations d'état, d'émettre deux hypothèses importantes quant au mécanisme d'association des protéines à l'interface :

- L'advection résultant de l'évaporation de l'eau à la surface de la solution est un moteur majeur de la formation des couches interfaciales de protéines. Elle accélère la formation de la première couche de protéines, due cependant aux interactions hydrophobes avec l'interface, et est l'unique moteur de l'adsorption de couches supplémentaires sous la première.
- La formation de multicouches est en partie une résultante de la nature des interactions entre protéines à fraction volumique élevée ( $\Phi > 0,2$ ). Si ces interactions sont principalement attractives, comme dans le cas du lysozyme à pH 7 ou de l'ovalbumine à pH 3,6 (voir les équations d'état), les protéines concentrées par advection sous la première couche interfaciale vont s'y associer et former des multicouches. En revanche, si ces interactions sont principalement répulsives, comme dans le cas de l'ovalbumine à pH 7, les protéines amenées par advection au voisinage de la première couche interfaciale en seront repoussées et retourneront au *bulk*, ne permettant pas la formation de multicouches.

Ces résultats doivent à présent être validés et complétés par des expériences supplémentaires : des mesures de réflectivité de neutrons avec des atmosphères composées d'air sec ou saturées en eau permettront par exemple de borner la contribution de l'évaporation dans l'adsorption du lysozyme et de l'ovalbumine à l'interface air/eau. Cela permettra, par la suite, d'orienter les travaux vers l'utilisation de modèles, afin de quantifier le rôle de l'évaporation dans les propriétés interfaciales.

Les propriétés du lysozyme et de l'ovalbumine que nous avons pu déduire de l'analyse des équations d'état permettent d'expliquer en partie celles mesurées à l'interface air/eau. Elles pourront également, à l'avenir, être mises en relation avec des modèles de couches interfaciales faisant intervenir des gradients de pression osmotiques, comme ceux développés par Bouchoux et coll. (Bouchoux et coll., 2014). Les équations d'état offrent donc une potentialité intéressante pour la compréhension des phénomènes intervenant dans

les systèmes concentrés en protéines, tels que les mousses, les poudres ou les solutions médicamenteuses.

# Conclusion générale - Perspectives



Les systèmes concentrés de protéines font partie des éléments fondamentaux de la transformation alimentaire depuis des milliers d'années, à l'instar des films interfaciaux stabilisant la mousse de la bière ou les alvéoles du pain. Ils interviennent également dans de nombreux autres types d'environnements, tels que le milieu intracellulaire ou les produits pharmaceutiques. Pourtant, l'intérêt pour les aspects les plus fondamentaux des interactions entre protéines dans des conditions de forte concentration est relativement récent et a connu une rapide expansion depuis 10 ans, s'appuyant notamment sur des techniques de rayonnement et de modélisations numériques. Ces travaux ont débouché sur des modèles d'interactions hérités de la physique des colloïdes, qui, bien que de plus en plus précis, ne parviennent encore pas, à l'heure actuelle, à rendre compte de toutes les modalités d'interactions des protéines.

À travers ce travail, nous avons cherché à décrire les variations d'état physique et les interactions intervenant dans des solutions de deux protéines globulaires modèles, le lysozyme et l'ovalbumine, sur une large gamme de concentrations. L'originalité de ce travail réside dans la gamme étendue de concentrations étudiées, allant d'une phase diluée ( $18 \text{ g L}^{-1}$ , soit  $\Phi \sim 0,01$ ) jusqu'à une phase solide concentrée ( $870 \text{ g L}^{-1}$ , soit  $\Phi \sim 0,62$ ), et la mise en relation avec les pressions osmotiques correspondantes, qui nous a permis de valider, d'infirmier et de proposer plusieurs modèles d'interactions.

Notre raisonnement a suivi quatre grandes étapes. Dans un premier temps, nous avons établi les diagrammes mettant en relation la fraction volumique et la pression osmotique de solutions de lysozyme et d'ovalbumine, dans différentes conditions physico-chimiques (pH, force ionique), ce qui nous a permis d'étudier l'évolution des diagrammes en fonction de l'intensité et de la portée des interactions électrostatiques. Nous avons pu, à travers des expériences de réversibilité thermodynamique et morphologique, montrer que ces diagrammes sont des équations d'état et présentent des états d'équilibre thermodynamique des solutions dans les conditions choisies. Nous avons pu mettre en évidence la différence de comportement des deux protéines lors de l'augmentation de la fraction volumique, que ce soit en termes de morphologie et d'état physique des échantillons ou des équations d'état. En effet, les équations d'état du lysozyme se découpent en trois parties (zones diluée, de transition et concentrée), dont les positions et les limites en termes de fraction volumique et de pression osmotique varient en fonction des conditions du milieu : une charge plus faible ou plus écrantée induira un déplacement des zones diluées et de transition vers les plus faibles pressions osmotiques et un déplacement des limites de zones vers les plus faibles fractions volumiques. Nous avons établi un modèle d'interactions combinant répulsion stérique (Carnahan-Starling), répulsion électrostatique écrantée (Debye-Hückel) et attractions de type van der Waals (Hamaker) qui rend compte de façon efficace de la tendance des zones diluées et de transition des équations d'état du lysozyme. Nous avons également montré, à travers ce modèle et le calcul des valeurs du second coefficient du

viriel ( $B_{22}$ ), que la prise en compte des contre-ions dans la force ionique est essentielle pour la description des interactions entre protéines, en particulier à des fractions volumiques aussi élevées que celles que nous étudions. Cependant, l'accord n'est pas parfait et montre les limites d'un modèle théorique ne prenant pas en compte la forme réelle, ellipsoïdale, du lysozyme, ni l'anisotropie de répartition de charges à sa surface. Par ailleurs, les équations d'état de l'ovalbumine à pH 7 et 9 montrent une tendance croissante continue et les pressions osmotiques restent constamment supérieures au modèle de sphères dures de Carnahan-Starling. Elles ne sont sensibles qu'à la variation de l'intensité de la charge, le rapprochement de la charge du point isoélectrique induisant un décalage vers les plus faibles pressions osmotiques, mais pas à l'influence de la force ionique induite par le NaCl. Nous en avons déduit que les interactions répulsives sont dominantes chez l'ovalbumine sur toute la gamme de concentrations étudiées. En revanche, les équations d'état partielles établies à pH 3,6 montrent des points situés dans la zone attractive de l'espace ( $\Phi$ ,  $\Pi$ ), malgré une charge nette absolue plus forte qu'à pH 7. Ces équations nécessitent d'être reproduites et complétées dans le futur, mais pointent vers de nouvelles propriétés, inhabituelles, des protéines : comment expliquer que les interactions entre des protéines à très forte charge nette (+ 31 e) soient attractives, tandis que celles entre des protéines à charge nette plus faible (- 10 e) sont répulsives ? Des hypothèses ont été mises en avant (capacitance, anisotropie de charge) pour expliquer ce phénomène, mais nécessiteront très probablement la confrontation de modèles numériques aux données expérimentales afin d'être validées ou infirmées.

La seconde étape de ce travail a consisté à répondre à quelques-unes des questions restées en suspens après analyse des équations d'état, à savoir la nature de la zone de transition des équations du lysozyme et le devenir des protéines dans la zone concentrée. Pour cela, nous nous sommes servis de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), une technique de plus en plus largement utilisée pour caractériser les solutions concentrées de protéines. Les résultats ont montré de nouvelles différences dans le comportement du lysozyme et de l'ovalbumine lors de la concentration. Les spectres SAXS ont en effet montré que le plateau de pression osmotique observé dans la zone de transition des équations d'état du lysozyme est causé par la cristallisation massive des échantillons et que la fraction volumique des échantillons dans la zone concentrée de ces équations est uniquement contrôlée par la fraction volumique en protéine dans les cristaux. Les caractéristiques de ces cristaux se sont par ailleurs révélées semblables à celles décrites pour le lysozyme dans de nombreux autres travaux. Les spectres SAXS mesurés sur les échantillons d'ovalbumine ont au contraire montré l'absence totale de cristallisation dans les échantillons de cette protéine, nous amenant à supposer que la transition liquide-solide observée dans les échantillons d'ovalbumine est causée par une vitrification, ou une gélification. Des expériences de rhéologie réalisées sur des échantillons d'ovalbumine à différentes fractions volumiques, avant

et après solidification, permettront certainement de trancher entre ces deux hypothèses. Une caractéristique intéressante des spectres réalisés sur des échantillons d'ovalbumine à très haute fraction volumique ( $\Phi > 0,44$ ) est l'effondrement du pic principal du facteur de structure, puis du second pic situé à des valeurs plus hautes de  $q$ . Ce phénomène, jusqu'ici observé uniquement sur des suspensions concentrées de particules déformables (nanoémulsions de polydiméthylsiloxane, micelles de caséine), a été interprété comme le signe d'une fusion des couches d'hydratations des protéines, qui possèderaient une plus forte densité électronique que l'eau du *bulk*. Ce serait cette perte de contraste entre objets qui causerait l'effondrement du facteur de structure. Afin de valider cette hypothèse, il serait pertinent d'effectuer des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS) en faisant varier la densité de longueur de diffusion du *bulk*, ce qui permettrait de vérifier l'existence d'une couche de densité supérieure au tampon aux alentours de la protéine et d'en déterminer la densité de longueur de diffusion.

La troisième étape a consisté en l'utilisation de modèles numériques, de type Monte-Carlo, pour comprendre les interactions mises en jeu dans les solutions de lysozyme, en détaillant plus finement la morphologie des protéines (forme, répartition des charges, possibilité de titration acido-basique des résidus) que dans le modèle utilisé précédemment. Cette méthode a fait apparaître l'importance de prendre en compte la totalité des aspects thermodynamiques des phénomènes intervenant lors de la concentration, tels que la cristallisation des solutions de lysozyme ou la formation de *clusters* dynamiques. Elle a également montré le rôle prépondérant de l'eau et des ions dans les interactions entre protéines, que ce soit à travers les interactions protéines-ions et ions-ions, la tension superficielle des assemblages de protéines (cristaux, gouttelettes de liquide dense) ou l'établissement d'interactions hydrophobes orientées. La prise en compte progressive de ces éléments dans un but d'amélioration du modèle numérique devra être envisagée, à commencer par l'utilisation d'ions, voire de molécules d'eau, explicites dans les simulations.

Enfin, la dernière étape de notre cheminement a consisté à confronter nos observations et hypothèses, issues de l'analyse du seul effet de la concentration des protéines, à un système plus complexe faisant intervenir à la fois l'effet concentration et l'interaction avec une surface hydrophobe, l'interface air-eau. Nous avons, à travers la mise en parallèle de nos équations d'état et des résultats de mesures interfaciales, pu montrer des similitudes dans le comportement des protéines en *bulk* et à l'interface air/eau, dénotant de l'importance de l'effet concentration dans les propriétés interfaciales du lysozyme et de l'ovalbumine. En particulier, dans la gamme de concentrations correspondant à la couche interfaciale, la prédominance des interactions attractives entre molécules de lysozyme à pH 7 ou entre molécules d'ovalbumine à pH 3,6, montrée via les équations d'état, a été mise en relation avec les propriétés d'auto-assemblage des protéines en multicouches à l'interface air/eau, tandis que la prédominance des interactions répulsives entre molécules d'ovalbumine à



pH 7 a été reliée à l'absence de multicouches. D'autre part, nous avons fait apparaître l'importance de l'advection liée à l'évaporation de l'eau dans le mécanisme de formation des couches interfaciales de protéines, comme accélérateur de la formation de la première couche, mais surtout comme moteur de la concentration des protéines sous la première couche, donnant lieu, le cas échéant, à la formation des couches supplémentaires décrites précédemment. Ces observations nécessiteront de poursuivre l'étude de l'influence du taux d'évaporation sur la cinétique de formation des couches interfaciales de protéines, à la fois d'un point de vue expérimental, mais également en confrontant nos données à des modèles développés sur des systèmes similaires, comme les films de polymère sous séchage ou la filtration membranaire. La perspective est de relier les équations d'état des protéines et leur profil de concentration dans les couches d'adsorption.

Ce travail a permis d'apporter de nouvelles connaissances dans le domaine des systèmes concentrés de protéines, en éclairant sous plusieurs angles les interactions et les phénomènes mis en jeu lors de la concentration de solutions de deux protéines globulaires modèles, le lysozyme et l'ovalbumine. Les équations d'état obtenues par la méthode de compression osmotique offrent en effet l'avantage de se présenter sous une forme pouvant être mise directement en parallèle avec de nombreux modèles théoriques d'interactions et donnant des informations précises sur le déroulement des transitions de phases et leur emplacement dans le diagramme ( $\Phi$ ,  $\Pi$ ). L'étude de l'effet des conditions physico-chimiques est également relativement aisée, la compression osmotique ne présentant pas le désavantage de concentrer les sels en même temps que les protéines, à la différence de techniques comme le séchage. Ces connaissances sont d'une grande importance pour la formulation raisonnée de produits à forte concentration en protéine et nécessitant de se trouver dans un état physique particulier (ex. liquide pour les médicaments injectables). Outre ces aspects, un prochain objectif sera d'utiliser ces équations d'état pour la description de systèmes faisant intervenir des gradients de concentration et de pression osmotique, comme les couches interfaciales de protéines ou les couches de rétentat générées en filtration membranaire. La connaissance du gradient de pression osmotique dans ces systèmes permettra de déduire la répartition des concentrations en protéine dans les différentes régions et leur état physique (liquide, gel...). Cela permettra également de savoir comment moduler les interactions existant dans ces systèmes en variant les conditions physico-chimiques, afin d'en modifier l'état selon des besoins technologiques (diminution de l'encrassement des membranes de filtration, mousses plus stables...) pour aboutir ainsi à un savoir-faire opérationnel vis-à-vis des propriétés des systèmes.

# Références bibliographiques



- Asherie, N., **2004**. Protein crystallization and phase diagrams. *Methods* 34, 266–272.
- Atkins, P., De Paula, J., **2008**. *Chimie physique*. De Boeck, Bruxelles.
- Azzam, R.M.A., Bashara, N.M., **1977**. *Ellipsometry and polarized light*. North Holland, Amsterdam.
- Baglioni, P., Fratini, E., Lonetti, B., Chen, S.-H., **2004**. Structural arrest in concentrated cytochrome C solutions : The effect of pH and salts. *J Phys Condens Matter* 16, S5003–S5022.
- Barboy, B., **1974**. On a representation of the equation of state of fluids in terms of the adhesive hard spheres model. *J Chem Phys* 61, 3194–3196.
- Bareigts, G., **2013**. *Structure et transition liquide-solide de dispersions de silice colloïdale* (Rapport de stage dans le cadre du Diplôme Supérieur d’Etudes et de Recherche). Université de Bourgogne, Dijon.
- Baxter, R.J., **1968**. Percus–Yevick equation for hard spheres with surface adhesion. *J Chem Phys* 49, 2770–2774. doi :10.1063/1.1670482
- Benjamins, J., de Feijter, J.A., Evans, M.T.A., Graham, D.E., Phillips, M.C., **1975**. Dynamic and static properties of proteins adsorbed at the air/water interface. *Faraday Discuss Chem Soc* 59, 218–229.
- Blank, M., Lee, B.B., Britten, J.S., **1975**. Adsorption kinetics of ovalbumin monolayers. *J Colloid Interf Sci* 50, 215–222.
- Bonneté, F., Finet, S., Tardieu, A., **1999**. Second virial coefficient : variations with lysozyme crystallization conditions. *J Cryst Growth* 196, 403–414.
- Bonnet-Gonnet, C., Belloni, L., Cabane, B., **1994**. Osmotic pressure of latex dispersions. *Langmuir* 10, 4012–4021.
- Bosse, J., Wilke, S.D., **1998**. Low-density ionic glass. *Phys Rev Lett* 80, 1260–1263.
- Boström, M., Tavares, F.W., Finet, S., Skouri-Panet, F., Tardieu, A., Ninham, B.W., **2005**. Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI. *Biophys Chem* 117, 217–224.
- Bouchoux, A., Cayemite, P.-E., Jardin, J., Gésan-Guiziou, G., Cabane, B., **2009**. Casein micelle dispersions under osmotic stress. *Biophys J* 96, 693–706.
- Bouchoux, A., Gésan-Guiziou, G., Pérez, J., Cabane, B., **2010**. How to squeeze a sponge : Casein micelles under osmotic stress, a SAXS study. *Biophys J* 99, 3754–3762.
- Bouchoux, A., Qu, P., Bacchin, P., Gésan-Guiziou, G., **2014**. A general approach for predicting the filtration of soft and permeable colloids : The milk example. *Langmuir* 30, 22–34.

- Broide, M.L., Berland, C.R., Pande, J., Ogun, O.O., Benedek, G.B., **1991**. Binary-liquid phase separation of lens protein solutions. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5660–5664.
- Broide, M.L., Tominc, T.M., Saxowsky, M.D., **1996**. Using phase transitions to investigate the effect of salts on protein interactions. *Phys Rev E* 53, 6325–6335.
- Brownsey, G.J., Noel, T.R., Parker, R., Ring, S.G., **2003**. The glass transition behavior of the globular protein bovine serum albumin. *Biophys J* 85, 3943–3950.
- Butler, P., Doucet, M., Jackson, A., King, S., **2012**. *SasView*. Accessible à : <http://www.sasview.org/>
- Cabane, B., Hénon, S., **2007**. *Liquides - Solutions, dispersions, émulsions, gels*. Belin, Paris.
- Camp, P.J., Patey, G.N., **2000**. Structure and scattering in colloidal ferrofluids. *Phys Rev E* 62, 5403–5408.
- Cardinaux, F., Stradner, A., Schurtenberger, P., Sciortino, F., Zaccarelli, E., **2007a**. Modeling equilibrium clusters in lysozyme solutions. *Europhys Lett* 77, 48004.
- Cardinaux, F., Gibaud, T., Stradner, A., Schurtenberger, P., **2007b**. Interplay between spinodal decomposition and glass formation in proteins exhibiting short-range attractions. *Phys Rev Lett* 99, 118301.
- Cardinaux, F., Zaccarelli, E., Stradner, A., Bucciarelli, S., Farago, B., Egelhaaf, S.U., Sciortino, F., Schurtenberger, P., **2011**. Cluster-driven dynamical arrest in concentrated lysozyme solutions. *J Phys Chem B* 115, 7227–7237.
- Carnahan, N.F., Starling, K.E., **1969**. Equation of state for nonattracting rigid spheres. *J Chem Phys* 51, 635–636.
- Cipriani, F., Röwer, M., Landret, C., Zander, U., Felisaz, F., Marquez, J.A., **2012**. CrystalDirect : a new method for automated crystal harvesting based on laser-induced photoablation of thin films. *Acta Cryst D* 68, 1393–1399.
- Cohen, J.A., Podgornik, R., Hansen, P.L., Parsegian, V.A., **2009**. A phenomenological one-parameter equation of state for osmotic pressures of PEG and other neutral flexible polymers in good solvents. *J Phys Chem B* 113, 3709–3714.
- Collins, K.D., **2004**. Ions from the Hofmeister series and osmolytes : effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods* 34, 300–311.
- Colman, P.M., Matthews, B.W., **1971**. Symmetry, molecular weight and crystallographic data for sweet potato beta-amylase. *J Mol Biol* 60, 163–168.
- Croguennec, T., Nau, F., Pezenec, S., Brule, G., **2000**. Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. *J Agric Food Chem* 48, 4883–4889.

- Curtis, R.A., Ulrich, J., Montaser, A., Prausnitz, J.M., Blanch, H.W., **2002**. Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions. *Biotechnol Bioeng* 79, 367–380. doi :10.1002/bit.10342
- Damodaran, S., Xu, S., **1996**. The role of electrostatic forces in anomalous adsorption behavior of phosvitin at the air/water interface. *J Colloid Interf Sci* 178, 426–435.
- De Feijter, J.A., Benjamins, J., **1987**. Adsorption kinetics of proteins at the air-water interface, in : *Food Emulsions and Foams*. TRSo Chemistry, London, pp. 72–85.
- De Feijter, J.A., Benjamins, J., Veer, F.A., **1978**. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* 17, 1759–1772.
- Demoruelle, K., Guo, B., Kao, S., McDonald, H.M., Nikic, D.B., Holman, S.C., Wilson, W.W., **2002**. Correlation between the osmotic second virial coefficient and solubility for equine serum albumin and ovalbumin. *Acta Cryst D* 58, 1544–1548.
- Dickinson, E., **2011**. Mixed biopolymers at interfaces : Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloid* 25, 1966–1983.
- Dickinson, E., McClements, D.J., **1996**. *Advances in food colloids*. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Diu, B., Guthmann, C., Lederer, D., Roulet, B., **1996**. *Éléments de physique statistique*. Hermann, Paris.
- Drenth, J., **2007**. *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer, New York.
- Dumetz, A.C., Chockla, A.M., Kaler, E.W., Lenhoff, A.M., **2008a**. Protein phase behavior in aqueous solutions : crystallization, liquid-liquid phase separation, gels, and aggregates. *Biophys J* 94, 570–583.
- Dumetz, A.C., Chockla, A.M., Kaler, E.W., Lenhoff, A.M., **2008b**. Effects of pH on protein–protein interactions and implications for protein phase behavior. *Biochim Biophys Acta* 1784, 600–610.
- Ebbinghaus, S., Kim, S.J., Heyden, M., Yu, X., Heugen, U., Gruebele, M., Leitner, D.M., Havenith, M., **2007**. An extended dynamical hydration shell around proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20749–20752.
- Farrer, D., Lips, A., **1999**. On the self-assembly of sodium caseinate. *Int Dairy J* 9, 281–286.
- Fennell, C.J., Kehoe, C.W., Dill, K.A., **2011**. Modeling aqueous solvation with semi-explicit assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 3234–3239.
- Filobelo, L.F., Galkin, O., Vekilov, P.G., **2005**. Spinodal for the solution-to-crystal phase transformation. *J Chem Phys* 123, 014904.

- Flory, P.J., **1941**. Molecular size distribution in three dimensional polymers. I. Gelation. *J Am Chem Soc* 63, 3083–3090.
- Foffi, G., De Michele, C., Sciortino, F., Tartaglia, P., **2005**. Arrested phase separation in a short-ranged attractive colloidal system : A numerical study. *J Chem Phys* 122, 224903.
- Garcia-Ruiz, J.M., **2003**. Nucleation of protein crystals. *J Struct Biol* 142, 22–31. Gekko, K., Noguchi, H., 1979. Compressibility of globular proteins in water at 25 °C. *J Phys Chem* 83, 2706–2714.
- George, A., Wilson, W.W., **1994**. Predicting protein crystallization from a dilute solution property. *Acta Cryst D* 50, 361–365.
- Giegé, R., **2013**. A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *FEBS J* 280, 6456–6497.
- Gögelein, C., Nägele, G., Tuinier, R., Gibaud, T., Stradner, A., Schurtenberger, P., **2008**. A simple patchy colloid model for the phase behavior of lysozyme dispersions. *J Chem Phys* 129, 085102.
- Graham, D.E., Phillips, P.C., **1979**. Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *J Colloid Interf Sci* 70, 403–414.
- Grigsby, J.J., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M., **2001**. Cloud-point temperatures for lysozyme in electrolyte solutions : Effect of salt type, salt concentration and pH. *Biophys Chem* 91, 231–243.
- Grimsley, G.R., Scholtz, J.M., Pace, C.N., **2008**. A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Sci* 18, 247–251.
- Gripon, C., Legrand, L., Rosenman, I., Vidal, O., Robert, M.C., Boué, F., **1997**. Lysozyme-lysozyme interactions in under- and super-saturated solutions : a simple relation between the second virial coefficients in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. *J Cryst Growth* 178, 575–584.
- Grobelny, S., Erlkamp, M., Möller, J., Tolan, M., Winter, R., **2014**. Intermolecular interactions in highly concentrated protein solutions upon compression and the role of the solvent. *J Chem Phys* 141, 22D506.
- Groenewold, J., Kegel, W.K., **2001**. Anomalously large equilibrium clusters of colloids. *J Phys Chem B* 105, 11702–11709.
- Grosse-Kunstleve, R.W., Sauter, N.K., Moriarty, N.W., Adams, P.D., **2002**. The Computational Crystallography Toolbox : crystallographic algorithms in a reusable software framework. *J Appl Crystallogr* 35, 126–136.
- Guigner, D., Fischer, C., Holl, Y., **2001**. Film formation from concentrated reactive silicone emulsions. 1. Drying mechanism. *Langmuir* 17, 3598–3606.

- Hammadoua, B., **2013**. *NIST Center for Neutron Research - Distance learning course*. Accessible à : [http://www.ncnr.nist.gov/staff/hammadoua/distance\\_learning/](http://www.ncnr.nist.gov/staff/hammadoua/distance_learning/)
- Hansen, J.P., McDonald, I.R., **2006**. *Theory of simple liquids*, 3rd ed. Elsevier, London.
- Hayter, J.B., Penfold, J., 1981. An analytic structure factor for macroion solutions. *Mol Phys* 42, 109–118.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., **1996**. VMD : Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph* 14, 33–38.
- Ianeselli, L., Zhang, F., Skoda, M.W.A., Jacobs, R.M.J., Martin, R.A., Callow, S., Prévost, S., Schreiber, F., **2010**. Protein-protein interactions in ovalbumin solutions studied by Small-Angle Scattering : Effect of ionic strength and the chemical nature of cations. *J Phys Chem B* 114, 3776–3783.
- Ishimoto, C., Tanaka, T., **1977**. Critical behavior of a binary mixture of protein and salt water. *Phys Rev Lett* 39, 474–477.
- Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J., Svergun, D.I., **2003**. PRIMUS : A Windows-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* 36, 1277–1282.
- Köning, A.M., Weerakkody, T.G., Keddie, J.L., Johannsmann, D., **2008**. Heterogeneous drying of colloidal polymer films : Dependence on added salt. *Langmuir* 24, 7580–7589.
- Kowalczyk, P., Ciach, A., Gauden, P.A., Terzyk, A.P., **2011**. Equilibrium clusters in concentrated lysozyme protein solutions. *J Colloid Interf Sci* 363, 579–584.
- Kratochvil, P., **1987**. *Classical light scattering from polymer solutions*. Elsevier Science Ltd, Amsterdam.
- Kunz, W., Ninham, B.W., **2004**. “Zur Lehre von der Wirkung der Salze” (about the science of the effect of salts) : Franz Hofmeister’s historical papers. *Curr Opin Colloid In* 9, 19–37.
- Kurut, A., Lund, M., **2013**. Solution electrostatics beyond pH : a coarse grained approach to ion specific interactions between macromolecules. *Faraday Discuss* 160, 271–278.
- Lee, M.S., Salsbury, F.R., Olson, M.A., **2004**. An efficient hybrid explicit/implicit solvent method for biomolecular simulations. *J Comput Chem* 25, 1967–1978.
- Le Floch-Fouéré, C., **2008**. *Comportement interfacial et propriétés moussantes de protéines de blanc d’oeuf* (Thèse de doctorat). Université de Rennes 1, Rennes.
- Leung, A.K.W., Park, M.M.V., Borhani, D.W., **1999**. An improved method for protein crystal density measurements. *J Appl Crystallogr* 32, 1006–1009.



- Li, H., Robertson, A.D., Jensen, J.H., **2005**. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins* 61, 704–721.
- Li, J., Rajagopalan, R., Jiang, J., **2008**. Role of solvent in protein phase behavior : Influence of temperature dependent potential. *J Chem Phys* 128, 235104.
- Li, J., Turesson, M., Cabane, B., Sanson, N., Skepö, M., **2014**. Equation of state of PEG in water : A combined theoretical and experimental study. *Non Publié*.
- Liu, Y., Fratini, E., Baglioni, P., Chen, W.-R., Chen, S.-H., **2005**. Effective long-range attraction between protein molecules in solutions studied by Small Angle Neutron Scattering. *Phys Rev Lett* 95, 118102.
- Liu, Y., Fratini, E., Baglioni, P., Chen, W.-R., Porcar, L., Chen, S.-H., **2006**. Liu et al. Reply. *Phys Rev Lett* 96, 219802.
- Lo Nostro, P., Ninham, B.W., **2012**. Hofmeister phenomena : An update on ion specificity in biology. *Chem Rev* 112, 2286–2322.
- Low, B.W., Richards, F.M., **1952**. The use of the gradient tube for the determination of crystal densities. *J Am Chem Soc* 74, 1660–1666.
- Lu, J.R., Su, T.J., Thomas, R.K., Penfold, J., Webster, J., **1998**. Structural conformation of lysozyme layers at the air/water interface studied by neutron reflection. *J Chem Soc Faraday Trans* 94, 3279–3287.
- Lund, M., **2010**. Electrostatic chameleons in biological systems. *J Am Chem Soc* 132, 17337–17339.
- Lund, M., Jönsson, B., **2005**. On the charge regulation of proteins. *Biochemistry* 44, 5722–5727.
- Lund, M., Trulsson, M., Persson, B., **2008**. Faunus : An object oriented framework for molecular simulation. *Source Code Biol Med* 3, 1.
- Lu, P.J., Weitz, D.A., **2013**. Colloidal particles : Crystals, glasses, and gels. *Annu Rev Condens Matter Phys* 4, 217–233.
- MacRitchie, F., Alexander, A.E., **1963**. Kinetics of adsorption of proteins at interfaces. Part II. The role of pressure barriers in adsorption. *J Colloid Sci* 18, 458–463.
- Marenduzzo, D., Finan, K., Cook, P.R., **2006**. The depletion attraction : an underappreciated force driving cellular organization. *J Cell Biol* 175, 681–686.
- Martin, C., Pignon, F., Magnin, A., Meireles, M., Lelièvre, V., Lindner, P., Cabane, B., **2006**. Osmotic compression and expansion of highly ordered clay dispersions. *Langmuir* 22, 4065–4075.

Mason, T.G., Weitz, D.A., **1995**. Linear viscoelasticity of colloidal hard sphere suspensions near the glass transition. *Phys Rev Lett* 75, 2770–2773.

Mason, T.G., Graves, S.M., Wilking, J.N., Lin, M.Y., **2006**. Effective structure factor of osmotically deformed nanoemulsions. *J Phys Chem B* 110, 22097–22102.

Mattson, J., Wyss, H.M., Fernandez-Nieves, A., Miyazaki, K., Hu, Z., Reichman, D.R., Weitz, D.A., **2009**. Soft colloids make strong glasses. *Nature* 462, 83–86.

Mehta, C., White, E.T., Litster, J.D., **2012**. Correlation of second virial coefficient with solubility for proteins in salt solutions. *Biotechnol Prog* 28, 163–170.

Merzel, F., Smith, J.C., **2002**. Is the first hydration shell of lysozyme of higher density than bulk water? *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5378–5383.

Mezzenga, R., Fischer, P., **2013**. The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. *Rep Prog Phys* 76, 046601.

Moon, Y.U., Curtis, R.A., Anderson, C.O., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M., **2000**. Protein–protein interactions in aqueous ammonium sulfate solutions. Lysozyme and bovine serum albumin (BSA). *J Solut. Chem* 29, 699–717.

Mourchid, A., Delville, A., Lambard, J., Lécolier, E., Levitz, P., **1995**. Phase diagram of colloidal dispersions of anisotropic charged particles : Equilibrium properties, structure, and rheology of laponite suspensions. *Langmuir* 11, 1942–1950.

Muschol, M., Rosenberger, F., **1997**. Liquid–liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization. *J Chem Phys* 107, 1953–1962.

Nau, F., Guérin-Dubiard, C., Baron, F., Thapon, J.-L., **2010**. *Science et technologie de l’oeuf. Vol.2 : De l’oeuf aux ovoproduits*. Lavoisier, Paris.

Neal, B.L., Asthagiri, D., Velez, O.D., Lenhoff, A.M., Kaler, E.W., **1999**. Why is the osmotic second virial coefficient related to protein crystallization? *J Cryst Growth* 196, 377–387.

Park, E.J., Bae, Y.C., **2004**. Cloud-point temperatures of lysozyme in electrolyte solutions by thermo-optical analysis technique. *Biophys Chem* 109, 169–188.

Parker, R., Noel, T.R., Brownsey, G.J., Laos, K., Ring, S.G., **2005**. The nonequilibrium phase and glass transition behavior of beta-lactoglobulin. *Biophys J* 89, 1227–1236.

Paterova, J., Rembert, K.B., Heyda, J., Kurra, Y., Okur, H.I., Liu, W.R., Hilty, C., Cremer, P.S., Jungwirth, P., **2013**. Reversal of the Hofmeister series : specific ion effects on peptides. *J Phys Chem B* 117, 8150–8158.

Pauling, L., Corey, R.B., **1951**. Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds : Two new pleated sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 37, 729–740.

- Pawley, G.S., **1981**. Unit-cell refinement from powder diffraction scans. *J. Appl. Crystallogr.* 14, 357–361.
- Pellicane, G., **2012**. Colloidal model of lysozyme aqueous solutions : A computer simulation and theoretical study. *J Phys Chem B* 116, 2114–2120.
- Pellicane, G., Costa, D., Caccamo, C., **2004**. Theory and simulation of short-range models of globular protein solutions. *J Phys Condens Matter* 16, S4923–S4936.
- Pham, K.N., Puertas, A.M., Bergenholtz, J., Egelhaaf, S.U., Moussaïd, A., Pusey, P.N., Schofield, A.B., Cates, M.E., Fuchs, M., Poon, W.C.K., **2002**. Multiple glassy states in a simple model system. *Science* 296, 104–106.
- Phillips, L.G., Whitehead, D.N., Kinsella, J., **1994**. *Structure-function properties of food proteins*. Academic Press, San Diego.
- Piazza, R., Peyre, V., Degiorgio, V., **1998**. “Sticky hard spheres” model of proteins near crystallization : A test based on the osmotic compressibility of lysozyme solutions. *Phys Rev E* 58, R2733–R2736.
- Piazza, R., Pierno, M., **2000**. Protein interactions near crystallization : a microscopic approach to the Hofmeister series. *J Phys Condens Matter* 12, A443–A449.
- Poon, W.C.K., **1997**. Crystallization of globular proteins. *Phys Rev E* 55, 3762–3764.
- Porcar, L., Falus, P., Chen, W.-R., Faraone, A., Fratini, E., Hong, K., Baglioni, P., Liu, Y., **2010**. Formation of the dynamic clusters in concentrated lysozyme protein solutions. *J Phys Chem Lett* 1, 126–129.
- R Development Core Team, **2008**. *R : A language and environment for statistical computing*. Accessible à : <http://www.R-project.org>
- Ree, F.H., Hoover, W.G., **1964**. Fifth and sixth virial coefficients for hard spheres and hard disks. *J Chem Phys* 40, 939–950.
- Rembert, K.B., Paterova, J., Heyda, J., Hilty, C., Jungwirth, P., Cremer, P.S., **2012**. Molecular mechanisms of ion-specific effects on proteins. *J Am Chem Soc* 134, 10039–10046.
- Retailleau, P., Riès-Kautt, M., Ducruix, A., **1997**. No salting-in of lysozyme chloride observed at low ionic strength over a large range of pH. *Biophys J* 73, 2156–2163.
- Rickard, D., Duncan, P.B., Needham, D., **2010**. Hydration potential of lysozyme : Protein dehydration using a single microparticle technique. *Biophys J* 98, 1075–1084.
- Rosenbaum, D.F., Zukoski, C.F., **1996**. Protein interactions and crystallization. *J Cryst Growth* 169, 752–758. Routh, A.F., 2013. Drying of thin colloidal films. *Rep Prog Phys* 76, 046603.

- Rubinstein, M., Dobrynin, A.V., **1999**. Associations leading to formation of reversible networks and gels. *Curr Opin Colloid In* 4, 83–87.
- Sciortino, F., Mossa, S., Zaccarelli, E., Tartaglia, P., **2004**. Equilibrium cluster phases and low-density arrested disordered states : The role of short-range attraction and long-range repulsion. *Phys Rev Lett* 93, 055701.
- Sciortino, F., Tartaglia, P., **2005**. Glassy colloidal systems. *Adv Phys* 54, 471–524.
- Sengupta, T., Razumovsky, L., Damodaran, S., **1999**. Energetics of protein-interface interactions and its effect on protein adsorption. *Langmuir* 15, 6991–7001.
- Shah, M., Galkin, O., Vekilov, P.G., **2004**. Smooth transition from metastability to instability in phase separating protein solutions. *J Chem Phys* 121, 7505–7512.
- Shukla, A., Mylonas, E., Di Cola, E., Finet, S., Timmins, P., Narayanan, T., Svergun, D.I., **2008a**. Absence of equilibrium cluster phase in concentrated lysozyme solutions. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 5075–5080.
- Shukla, A., Mylonas, E., Di Cola, E., Finet, S., Timmins, P., Narayanan, T., Svergun, D.I., **2008b**. Reply to Stradner et al. : Equilibrium clusters are absent in concentrated lysozyme solutions. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, E76.
- Sirotkin, V.A., Komissarov, I.A., Khadiullina, A.V., **2012**. Hydration of proteins : Excess partial volumes of water and proteins. *J Phys Chem B* 116, 4098–4105.
- Song, C., Wang, P., Makse, H.A., **2008**. A phase diagram for jammed matter. *Nature* 453, 629–632.
- Stein, P.E., Leslie, A.G.W., Finch, J.T., Carrell, R.W., **1991**. Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *J Mol Biol* 221, 941–959.
- Stradner, A., Cardinaux, F., Schurtenberger, P., **2006**. A small-angle scattering study on equilibrium clusters in lysozyme solutions. *J Phys Chem B* 110, 21222–21231.
- Stradner, A., Sedgwick, H., Cardinaux, F., Poon, W.C.K., Egelhaaf, S.U., Schurtenberger, P., **2004**. Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature* 432, 492–495.
- Stradner, A., Thurston, G.M., Schurtenberger, P., **2005**. Tuning short-range attractions in protein solutions : from attractive glasses to equilibrium clusters. *J Phys Condens Matter* 17, S2805–S2816.
- Svergun, D.I., Barberato, C., Koch, M.H.J., **1995**. CRY SOL - a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Crystallogr* 28, 768–773.
- Svergun, D.I., Richard, S., Koch, M.H.J., Sayers, Z., Kuprin, S., Zaccai, G., **1998**. Protein hydration in solution : Experimental observation by x-ray and neutron scattering. *Proc*

*Natl Acad Sci USA* 95, 2267–2272.

Tanaka, S., Yamamoto, M., Ito, K., Hayakawa, R., Ataka, M., **1997**. Relation between the phase separation and the crystallization in protein solutions. *Phys Rev E* 56, R67–R69.

Taratuta, V.G., Holschbach, A., Thurston, G.M., Blankschtein, D., Benedek, G.B., **1990**. Liquid-liquid phase separation of aqueous lysozyme solutions : Effects of pH and salt identity. *J Phys Chem* 94, 2140–2144.

Tavares, F.W., Prausnitz, J.M., **2004**. Analytic calculation of phase diagrams for solutions containing colloids or globular proteins. *Colloid Polym Sci* 282, 620–632.

Ten Wolde, P.R., Frenkel, D., **1997**. Enhancement of Protein Crystal Nucleation by Critical Density Fluctuations. *Science* 277, 1975–1978.

Ter-Minassian-Saraga, L., **1981**. Protein denaturation on adsorption and water activity at interfaces : An analysis and suggestion. *J Colloid Interf Sci* 80, 393–401.

Tessier, P.M., Lenhoff, A.M., Sandler, S.I., **2002**. Rapid measurement of protein osmotic second virial coefficients by self-interaction chromatography. *Biophys J* 82, 1620–1631.

Thomson, J.A., Schurtenberger, P., Thurston, G.M., Benedek, G.B., **1987**. Binary liquid phase separation and critical phenomena in a protein/water solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7079–7083.

To, B., Lenhoff, A.M., **2007**. Hydrophobic interaction chromatography of proteins : II. Solution thermodynamic properties as a determinant of retention. *J Chromatogr A* 1141, 235–243.

Trappe, V., Prasad, V., Cipelletti, L., Segre, P.N., Weitz, D.A., **2001**. Jamming phase diagram for attractive particles. *Nature* 411, 772–775.

Valadez-Pérez, N.E., Castaneda-Priego, R., Liu, Y., **2013**. Percolation in colloidal systems with competing interactions : the role of long-range repulsion. *RSC Adv* 3, 25110–25119.

Vaney, M.C., Maignan, S., Riès-Kautt, M., Ducruix, A., **1996**. High-resolution structure (1.33 Å) of a HEW lysozyme tetragonal crystal grown in the APCF apparatus. Data and structural comparison with a crystal grown under microgravity from SpaceHab-01 mission. *Acta Cryst D* 52, 505–517.

Vauthier, C., Cabane, B., Labarre, D., **2008**. How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation? *Eur J Pharm Biopharm* 69, 466–475.

Vekilov, P.G., **2004**. Dense liquid precursor for the nucleation of ordered solid phases from solution. *Cryst Growth Des* 4, 671–685.

Vekilov, P.G., **2010**. Phase transitions of folded proteins. *Soft Matter* 6, 5254–5272.

- Vekilov, P.G., Feeling-Taylor, A.R., Yau, S.-T., Petsev, D., **2002**. Solvent entropy contribution to the free energy of protein crystallization. *Acta Cryst D* 58, 1611–1616.
- Vekilov, P.G., Vorontsova, M.A., **2014**. Nucleation precursors in protein crystallization. *Acta Cryst F* 70, 271–282.
- Velev, O.D., Kaler, E.W., Lenhoff, A.M., **1998**. Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering : Comparison of lysozyme and chymotrypsinogen. *Biophys J* 75, 2682–2697.
- Vliegthart, G.A., Lodge, J.F.M., Lekkerkerker, H.N.W., **1999**. Strong, weak and metastable liquids. Structural and dynamical aspects of the liquid state. *Physica A* 263, 378–388.
- Wang, J., Dauter, M., Alkire, R., Joachimiak, A., Dauter, Z., **2007**. Triclinic lysozyme at 0.65 Å resolution. *Acta Cryst D* 63, 1254–1268.
- Ward, A.F.H., Tordai, L., **1946**. Time-dependence of boundary tensions of solutions I. The role of diffusion in time-effects. *J Chem Phys* 14, 453–461.
- Weast, R.C., **1970**. *CRC Handbook of chemistry and physics*, 51st ed. The Chemical Rubber Company, Cleveland.
- Westbrook, E.M., **1976**. Characterization of a hexagonal crystal form of an enzyme of steroid metabolism, d5-3-ketosteroid isomerase : A new method of crystal density measurement. *J Mol Biol* 103, 659–664.
- Wierenga, P.A., Meinders, M.B.J., Egmond, M.R., Voragen, F.A.G.J., de Jongh, H.H.J., **2003**. Protein exposed hydrophobicity reduces the kinetic barrier for adsorption of ovalbumin to the air-water interface. *Langmuir* 19, 8964–8970.
- Wierenga, P.A., **2005**. *Basics of macroscopic properties of adsorbed protein layers, formed at air-water interfaces, based on molecular parameters* (Thèse de doctorat). Wageningen University, Wageningen.
- Wierenga, P.A., Meinders, M.B.J., Egmond, M.R., Voragen, A.G.J., de Jongh, H.H.J., **2005**. Quantitative description of the relation between protein net charge and protein adsorption to air-water interfaces. *J Phys Chem B* 109, 16946–16952.
- Wierenga, P.A., Egmond, M.R., Voragen, A.G.J., de Jongh, H.H.J., **2006**. The adsorption and unfolding kinetics determines the folding state of proteins at the air–water interface and thereby the equation of state. *J Colloid Interf Sci* 299, 850–857.
- Wierenga, P.A., Gruppen, H., **2010**. New views on foams from protein solutions. *Curr Opin Colloid In* 15, 365–373.
- Wilson, K.P., Malcolm, B.A., Matthews, B.W., **1992**. Structural and thermodynamic analysis of compensating mutations within the core of chicken egg white lysozyme. *J Biol*

*Chem* 267, 10842–10849.

Wojdyr, M., **2010**. Fityk : a general-purpose peak fitting program. *J Appl Crystallogr* 43, 1126–1128.

Wojdyr, M., **2014**. *Debyer*. Accessible à : <https://github.com/wojdyr/debyer>

Wu, J., Prausnitz, J.M., **1999**. Osmotic pressures of aqueous bovine serum albumin solutions at high ionic strength. *Fluid Phase Equilib* 155, 139–154.

Xu, S., Damodaran, S., **1992**. The role of chemical potential in the adsorption of lysozyme at the air-water interface. *Langmuir* 8, 2021–2027.

Yan, L.-T., Xie, X.-M., **2006**. Numerical simulation of surface effects on spinodal decomposition in polymer binary mixture : Quench depth dependence. *Macromolecules* 39, 2388–2397.

Yano, Y.F., Uruga, T., Tanida, H., Toyokawa, H., Terada, Y., Takagaki, M., Yamada, H., **2009**. Driving force behind adsorption-induced protein unfolding : A time-resolved X-ray reflectivity study on lysozyme adsorbed at an air/water interface. *Langmuir* 25, 32–35.

Yano, Y.F., Uruga, T., Tanida, H., Terada, Y., Yamada, H., **2011**. Protein salting out observed at an air-water interface. *J Phys Chem Lett* 2, 995–999.

Yano, Y.F., **2012**. Kinetics of protein unfolding at interfaces. *J Phys Condens Matter* 24, 503101.

Yano, Y.F., Uruga, T., **2013**. Effect of salt ions on protein layers at the air–water interface under a crystallization condition. *Chem Phys* 419, 153–155.

Yousef, M.A., Datta, R., Rodgers, V.G.J., **1998**. Understanding nonidealities of the osmotic pressure of concentrated bovine serum albumin. *J Colloid Interf Sci* 207, 273–282.

Yousef, M.A., Datta, R., Rodgers, V.G.J., **2001**. Confirmation of free solvent model assumptions in predicting the osmotic pressure of concentrated globular proteins. *J Colloid Interf Sci* 243, 321–325.

Zaccarelli, E., **2007**. Colloidal gels : equilibrium and non-equilibrium routes. *J Phys Condens Matter* 19, 323101.

Zhang, F., Skoda, M.W.A., Jacobs, R.M.J., Martin, R.A., Martin, C.M., Schreiber, F., **2007**. Protein interactions studied by SAXS : Effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions. *J Phys Chem B* 111, 251–259.

Zhang, Y., Cremer, P.S., **2006**. Interactions between macromolecules and ions : the Hofmeister series. *Curr Opin Chem Biol* 10, 658–663.

Zhang, Y., Cremer, P.S., **2009**. The inverse and direct Hofmeister series for lysozyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 15249–15253.

Zhou, H.-X., Bilsel, O., **2014**. SAXS/SANS probe of intermolecular interactions in concentrated protein solutions. *Biophys J* 106, 1–3.





## Annexe : Valeur des constantes

Constante de Boltzmann :  $k_B = 1,3806488 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$

Permittivité du vide :  $\varepsilon_0 = 8,85418782 \cdot 10^{-12} \text{ m}^{-3} \text{ kg}^{-1} \text{ s}^4 \text{ A}^2$

Constante diélectrique de l'eau (20 °C) :  $\varepsilon_r = 80,1$

Nombre d'Avogadro :  $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

Charge élémentaire :  $e = 1,60217657 \cdot 10^{-19} \text{ C}$

Constante des gaz parfaits :  $R = 8,3144621 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

Constante de Planck :  $h = 6,62606957 \cdot 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$

Volume molaire de l'eau :  $\nu_a = 1,8 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$



# Table des figures

1.1	<i>Structure générale d'un acide aminé . . . . .</i>	19
1.2	<i>Acides aminés entrant dans la composition des protéines . . . . .</i>	20
1.3	<i>Formation de la liaison peptidique (a) et configurations possibles par délocalisation du doublet de l'azote (b) . . . . .</i>	20
1.4	<i>Assemblage des acides aminés dans une chaîne polypeptidique . . . . .</i>	21
1.5	<i>Hélice <math>\alpha</math> . . . . .</i>	22
1.6	<i>Feuillet <math>\beta</math> . . . . .</i>	22
1.7	<i>Feuillets <math>\beta</math> antiparallèles (haut) et parallèles (bas). D'après (Pauling et Corey, 1951) . . . . .</i>	23
1.8	<i>Double couche électrique . . . . .</i>	26
1.9	<i>Structure tridimensionnelle du lysozyme, visualisée à l'aide du logiciel VMD (Humphrey et coll., 1996). Les feuillets <math>\beta</math> sont représentés par des flèches bleues, les hélices par des boucles oranges. . . . .</i>	27
1.10	<i>Structure tridimensionnelle de l'ovalbumine, visualisée à l'aide du logiciel VMD (Humphrey et coll., 1996). Les feuillets <math>\beta</math> sont représentés par des flèches bleues, les hélices par des boucles oranges. . . . .</i>	28
1.11	<i>Volume exclu dans le cas de deux molécules sphériques . . . . .</i>	29
1.12	<i>Schéma des interactions de déplétion (extrait de (Marenduzzo et coll., 2006)) . . . . .</i>	31
1.13	<i>Potentiel de sphères dures adhésives, en fonction de la distance inter-particules . . . . .</i>	32
1.14	<i>Potentiel de Lennard-Jones, en fonction de la distance inter-particules . . . . .</i>	33
1.15	<i>Valeurs de <math>B_{22}</math> mesurées par diffusion statique de la lumière dans des solutions de lysozyme à 4°C (extrait de (Velev et coll., 1998)) . . . . .</i>	36
1.16	<i><math>b_2</math> mesurés sur des solutions d'ovalbumine en présence de chlorure de sodium (A) et de sulfate d'ammonium (B) à différents pH (d'après (Dumetz et coll., 2008b)) . . . . .</i>	37

1.17	<i>Diagramme de phases d'une solution de lysozyme en tampon acétate 0.05 M, à pH 4.5 et 4 % de NaCl (Vekilov, 2010)</i> . . . . .	39
1.18	<i>Schéma des différentes zones dans des conditions de sursaturation d'une solution de protéine (Asherie, 2004)</i> . . . . .	40
1.19	<i>Variation de l'énergie libre de nucléation en fonction du rayon du cluster (Garcia-Ruiz, 2003)</i> . . . . .	41
1.20	<i>Séparations de phases liquide-liquide dans une solution de <math>\gamma</math>E-cristalline bovine (A) et une solution de thaumatine de concentration initiale 229 g/L (B) (d'après Asherie, 2004)</i> . . . . .	43
1.21	<i>Schéma de la zone de séparation liquide-liquide sur un diagramme de phases (c, T)</i> . . . . .	43
1.22	<i>Evolution d'une décomposition spinodale (d'après (Yan et Xie, 2006))</i> . . .	44
1.23	<i>Diagramme de phases du lysozyme à pH 7,8 (tampon Hepes 20mM) et 0,5 M de NaCl (d'après (Cardinaux et coll., 2007b))</i> . . . . .	46
1.24	<i>Images, en microscopie électronique à transmission, de clusters typiques formés de particules d'or (haut) et de silice (bas), issus d'agrégation DLCA (gauche) ou RLCA (droite). Extrait de (Lu et Weitz, 2013).</i> . . . . .	47
1.25	<i>Schéma présentant les quatre grandes étapes de la formation d'une couche interfaciale de protéines : transport par diffusion (1), adsorption (2), dépliement (3), saturation de la couche interfaciale et formation d'un réseau (4). Extrait de (Wierenga, 2005b)</i> . . . . .	50
1.26	<i>Concentration (haut) et pression de surface pour des solutions d'ovalbumine dont la concentration (gauche, pH 6,4 et I = 20 mM) ou la charge (droite, pH 7, I = 10 mM) varient. Les concentrations sont, de la courbe la plus haute vers la plus basse : <math>10^{-4}</math>, <math>10^{-3}</math>, <math>10^{-2}</math> et <math>10^{-1}</math> % en termes massiques ; les charges nettes sont, de la courbe la plus haute vers la plus basse : -12 e, -18 e, -20 e, -22 e, -24 e et -26 e. Les figures sont extraites de (de Feijter et Benjamins, 1987) et (Wierenga et coll., 2005a)</i> . . . . .	53
2.1	<i>Schéma de principe d'une résine échangeuse d'anions (extrait de (Le Floch-Fouéré, 2008))</i> . . . . .	58
2.2	<i>Chromatogramme-type obtenu lors de la purification d'ovalbumine à partir de blanc d'oeuf démuçiné</i> . . . . .	59
2.3	<i>Schéma du principe de la compression osmotique</i> . . . . .	61

2.4	<i>Nombre de charges net (rouge), de charges positives (bleu), de charges négatives (vert) et nombre total de charges (noir) du lysozyme (gauche) et de l'ovalbumine (droite) en fonction du pH, calculées grâce au programme PropKa (Li et coll., 2005)</i> . . . . .	62
2.5	<i>Longueur de Debye en nm, en fonction de la force ionique du milieu</i> . . . . .	63
2.6	<i>Principe général de la diffusion des rayons X aux petits angles</i> . . . . .	67
2.7	<i>Vecteur de diffusion</i> . . . . .	67
2.8	<i>Décomposition de l'intensité brute en facteurs de forme et de structure</i> . . . . .	68
2.9	<i>Exemple de dérive de signal du aux dégâts d'irradiation, obtenu sur du tampon bis-tris propane à pH 9 et 20 mM de force ionique</i> . . . . .	70
2.10	<i>Exemple de facteur de structure obtenu par simple division de l'intensité brute par le facteur de forme, sans soustraction du « background »</i> . . . . .	72
2.11	<i>Facteur de structure précédemment présenté sur la figure 2.10, après soustraction du « background »</i> . . . . .	74
2.12	<i>Modèles AAM du lysozyme (gauche) et de l'ovalbumine (droite) à pH 7. Chaque sphère représente un résidu. Ceux chargés positivement sont colorés en bleu, ceux chargés négativement en rouge. Les deux modèles ne sont pas présentés à l'échelle.</i> . . . . .	76
2.13	<i>Réalisation d'une étape de simulation Monte-Carlo. La variation d'énergie totale du système est notée <math>dU</math>, rnd est un nombre aléatoire généré par le programme</i> . . . . .	77
2.14	<i>Schéma du montage du réflectomètre G3 bis du Laboratoire Léon Brillouin. D'après la fiche de présentation disponible à <a href="http://www-llb.cea.fr/fr-en/pdf/eros-llb.pdf">http://www-llb.cea.fr/fr-en/pdf/eros-llb.pdf</a></i> . . . . .	79
2.15	<i>Logarithme de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde pour une solution pure de <math>D_2O</math></i> . . . . .	80
2.16	<i>Schéma du modèle « en boîtes » utilisé pour l'ajustement aux données expérimentales de réflectivité de neutrons sur des interfaces air/eau de protéines. <math>Nb_i</math> et <math>d_i</math> représentent la densité de longueur de diffusion et l'épaisseur des couches, respectivement, et <math>\sigma_j</math> la rugosité des interfaces.</i> . . . . .	81
2.17	<i>Schéma du montage d'un ellipsomètre</i> . . . . .	82
2.18	<i>Géométrie du système d'ellipsométrie</i> . . . . .	83
3.1	<i>Schéma des zones d'interaction délimitées par Carnahan-Starling</i> . . . . .	90

3.2	<i>Equations d'état de l'ovalbumine (haut) et du lysozyme (bas) avec un tampon bis-tris propane à pH 7 et <math>I = 20</math> mM . . . . .</i>	91
3.3	<i>Photographies des échantillons d'ovalbumine soumis à une pression osmotique de 0,05 à 44,3 bar, en tampon pH 7 et <math>I = 20</math> mM. Les pressions osmotiques correspondantes, en bar, sont notées en bas de chaque photographie. . . . .</i>	92
3.4	<i>Zones de l'équation d'état à pH 7 et <math>I = 20</math> mM du lysozyme . . . . .</i>	93
3.5	<i>Photographies des échantillons de lysozyme soumis à une pression osmotique de 0,05 à 44,3 bar, en tampon pH 7 et 20 mM de force ionique. Les pressions osmotiques correspondantes, en bar, sont notées en bas de chaque photographie. . . . .</i>	94
3.6	<i>Modèles de Van der Waals (VdW) à différentes valeurs de <math>a'</math> et <math>b'</math>, pour une température de 293,15 K . . . . .</i>	95
3.7	<i>Modèles de sphères dures adhésives (AHS) à deux valeurs de <math>\tau</math> (0,8 et 50), pour une température de 293,15 K . . . . .</i>	96
3.8	<i>Données obtenues par diverses méthodes par Rickard et coll. (Rickard et coll., 2010) (losanges verts et triangles violets) représentées avec le diagramme <math>(\Phi, \Pi)</math> du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique (cercles bleus clairs) et les données de DVS du lysozyme à pH 7 et 35 mM de force ionique (cercles bleus plus foncés). . . . .</i>	97
3.9	<i>Equation d'état du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique et solubilités du lysozyme à pH 6,5 et 8,4 déterminées par Retailleau et coll. (Retailleau et coll., 1997) pour des concentrations de NaCl de 0 et 50 mM (droites pointillées) . . . . .</i>	98
3.10	<i>Equation d'état du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique, avec les points obtenus par compression à 44,3 bar et décompression à une pression inférieure (losanges rayés) et par compression à partir d'une solution de concentration égale à <math>150 \text{ g L}^{-1}</math> (triangles mouchetés). Les chemins de décompression sont symbolisés par les flèches pointillées. . . . .</i>	99
3.11	<i>Equations d'état de l'ovalbumine à pH 7 et pH 5, <math>I = 20</math> mM (haut) et du lysozyme à pH 7 et pH 9, <math>I = 20</math> mM (bas) . . . . .</i>	101
3.12	<i>Potentiel d'interaction électrostatique en fonction de la fraction volumique. Figure de gauche : lysozyme à 20 mM de force ionique, et pH 7 (ligne bleue, <math>Z = 8,3 e</math>) et 9 (ligne rouge, <math>Z = 6,3 e</math>). Figure de droite : ovalbumine à 20 mM de force ionique, et pH 7 (ligne bleue, <math>Z = -9,5 e</math>) et 5 (ligne rouge, <math>Z = 3,5 e</math>). . . . .</i>	102

3.13	<i>Equations d'état de l'ovalbumine à pH 3,6 et 20 mM (cercles verts clairs), 150 mM (cercles verts moyens) et 2,02 M de force ionique (cercles verts foncés). L'équation d'état à pH 7 et 20mM de force ionique est rappelé pour comparaison (cercles bleus vides).</i> . . . . .	103
3.14	<i>Potentiel d'interaction électrostatique du lysozyme (gauche) et de l'ovalbumine (droite) à pH 7 et différentes forces ioniques, en fonction de la fraction volumique</i> . . . . .	104
3.15	<i>Equations d'état de l'ovalbumine à pH 7 et force ionique de 20 mM, 35 mM et 150 mM(haut) et du lysozyme à pH 7 et force ionique de 20 mM, 35 mM, 150 mM et 2,02 M(bas)</i> . . . . .	105
3.16	<i>Equations d'état de l'ovalbumine à pH 7 et 20, 35 et 150 mM de force ionique (ronds bleus) et données de Yousef et coll. (Yousef et coll., 2001) obtenues par osmométrie à membrane pour des solutions d'ovalbumine à pH 7 et 10, 150 et 500 mM de force ionique (triangles oranges).</i> . . . . .	106
3.17	<i>Zoom sur la zone diluée des équations d'état mettant en évidence la différence de pente initiale</i> . . . . .	107
3.18	<i>Pressions osmotiques de solutions de lysozyme à pH 7 en présence de NaCl (ronds bleus) et de sulfate d'ammonium (tiré de (Moon et coll., 2000), triangles rouges)</i> . . . . .	109
3.19	<i>Photographies d'échantillons de lysozyme à pH 7 et 2,02 M de force ionique, soumis à une pression de 0,44 bar (A) et 1,3 bar (B) durant une nuit</i> . . .	110
3.20	<i>Equations d'état du lysozyme à pH 7 et 150 mM de force ionique (gauche) et à pH 7 et 35 mM de force ionique (droite), avec les points obtenus par compression puis décompression (losanges rayés). Le chemin de décompression est symbolisé par les flèches pointillées.</i> . . . . .	111
3.21	<i>Equation d'état du lysozyme à pH 9 et 20 mM de force ionique, avec les points obtenus par compression puis décompression (losanges rayés). Le chemin de décompression est symbolisé par la flèche pointillée.</i> . . . . .	112
3.22	<i>Second coefficient du viriel (<math>B_{22}</math>) du lysozyme en fonction de la force ionique, à partir de l'équation d'état</i> . . . . .	113
3.23	<i>Second coefficient du viriel (<math>B_{22}</math>) du lysozyme en fonction de la force ionique, avec prise en compte des contre-ions. Les données extraites des équations d'état du lysozyme sont représentées en symboles pleins; les données tirées des travaux de Velev [Velev et coll., 1998] sont représentées en symboles creux.</i> . . . . .	114



3.24	<i>Modèles d'équations d'état établis en considérant une composante de répulsion stérique (Carnahan-Starling), une composante de répulsion électrostatique écrantée (Debye-Hückel) et une composante de dispersion (Hamaker). Les forces ioniques utilisées pour le potentiel de Debye-Hückel ont été calculées avec (courbe bleue) et sans (courbe rouge) prise en compte des contre-ions de la protéine. La charge nette de la protéine est de +8,3 e et les valeurs de la constante de Hamaker correspondant au meilleur ajustement sont de 1,963 <math>k_B T</math> (courbe bleue) et 40,4 <math>k_B T</math> (courbe rouge).</i> . . . . .	117
3.25	<i>Modèles d'équations d'état établis à pH 7 et I = 20 mM, pH 7 et I = 150 mM et pH 9 et I = 20 mM, en considérant une composante de répulsion stérique (Carnahan-Starling), une composante de répulsion électrostatique écrantée (Debye-Hückel) et une composante de dispersion (Hamaker). La constante d'Hamaker est de 1,963 <math>k_B T</math> et les charges nettes utilisées sont les charges théoriques (+8,3 e à pH 7 et +6,3 e à pH 9).</i> . . . . .	118
4.1	<i>Facteurs de structure des échantillons de lysozyme comprimés à pH 7, 20 mM de force ionique et 1,3 bar de pression osmotique (lignes bleues) et des échantillons de lysozyme concentrés à pH 7,8 et 20 mM de force ionique par Stradner et coll. (Stradner et coll., 2004) (cercles vides). Les spectres ont été ajustés verticalement pour permettre une meilleure lecture.</i> . . . . .	124
4.2	<i>Facteurs de structure obtenus sur des échantillons de lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique, comprimés à 3,19 bar (ligne bleue), 20,64 bar (ligne violette) et 44,3 bar (ligne rouge). Les spectres ont été ajustés verticalement pour permettre une meilleure lecture.</i> . . . . .	125
4.3	<i>Photographies en microscopie confocale d'un échantillon de lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique, comprimé à 44,3 bar. Les échelles sont de 50 <math>\mu m</math> (photo de gauche) et de 20 <math>\mu m</math> (photos du milieu et de droite).</i> . . . . .	126
4.4	<i>Fractions volumiques déduites des spectres SAXS de cristaux de lysozyme dans les échantillons comprimés (losanges jaunes), reportés sur les équations d'état correspondantes</i> . . . . .	127
4.5	<i>Gamme de fractions volumiques où des clusters dynamiques de lysozyme ont été observés par Stradner et coll. (Stradner et coll., 2004), reportée sur l'équation d'état du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique</i> . . . . .	128
4.6	<i>Facteurs de structure d'échantillons de lysozyme hors équilibre : 8,26 bar, pH 7 et 20 mM de force ionique (courbe bleue) et 20,64 bar, pH 9 et 20 mM de force ionique (courbe rouge)</i> . . . . .	129

4.7	<i>Facteurs de structure de solutions d'ovalbumine à pH 7 et 20 mM de force ionique, comprimées à 3,19 bar (ligne bleue claire), 8,26 bar (ligne bleue foncée), 20,64 bar (ligne violette) et 44,3 bar (ligne rose). Sont également représentés les facteurs de structure déterminés par Ianeselli et coll. (Ianeselli et coll., 2010) sur des solutions d'ovalbumine à pH 7 sans ajout de sel ou de tampon à <math>\Phi = 0,015</math> (ligne rouge), <math>\Phi = 0,03</math> (ligne orange), <math>\Phi = 0,045</math> (ligne verte claire), <math>\Phi = 0,075</math> (ligne verte foncée) et <math>\Phi = 0,149</math> (ligne cyan) . . . . .</i>	131
4.8	<i>Facteurs de structure obtenus via la Mean Spherical Approximation, pour des sphères de charge -9,5 e et rayon 23,59 Å, à une température de 20 °C et dans un milieu de force ionique 20 mM et de constante diélectrique relative <math>\epsilon_r = 80,1</math> . . . . .</i>	132
4.9	<i>Distances correspondant au pic principal des facteurs de structure de solutions d'ovalbumine comprimées à pH 7 et 20 mM de force ionique (cercles bleus) et de solutions d'ovalbumine obtenues par Ianeselli et coll. (Ianeselli et coll., 2010) à pH 7 sans ajout de sel (triangles verts). Le diamètre de la sphère équivalente à l'ovalbumine (47,18 Å) est représenté en pointillés gris. . . . .</i>	133
4.10	<i>Intensités brutes expérimentales (courbes foncées) et théoriques (courbes claires) de solutions d'ovalbumine à pH 7, <math>I = 20</math> mM et <math>\Phi = 0,355</math> (courbes rouges, à gauche) ou <math>\Phi = 0,452</math> (courbes bleues, à droite). Les intensités expérimentales sont calculées pour des ellipsoïdes de dimensions 70 x 50 x 45 Å et un potentiel de sphères dures (modèle de Percus-Yevick, avec un rayon effectif de sphères = 27,00 Å) . . . . .</i>	134
4.11	<i>Facteurs de structure effectifs de nanoémulsions de polydiméthylsiloxane (rayon des gouttelettes = a) à <math>\Phi = 0,60</math> (courbe rouge), <math>\Phi = 0,67</math> (courbe bleue) et <math>\Phi = 0,72</math> (courbe verte) (Mason et coll., 2006) . . . . .</i>	135
4.12	<i>Facteurs de structure de solutions d'ovalbumine à pH 7 et 20 mM (courbes bleues claires) ou 150 mM (courbes bleues foncées) de force ionique, comprimées à 3,19 bar, 8,26 bar, 20,64 bar et 44,3 bar . . . . .</i>	136
4.13	<i>Facteurs de structure de solutions d'ovalbumine à 20 mM de force ionique et pH 7 (courbes bleues) ou pH 5 (courbes rouges), comprimées à 3,19 bar, 8,26 bar, 20,64 bar et 44,3 bar . . . . .</i>	137
5.1	<i>Nombre d'interactions de paire en fonction du nombre de résidus par protéine, pour 50 protéines. Les points correspondant au lysozyme (129 résidus) et à l'ovalbumine (385 résidus) sont montrés par les pointillés bleus et rouges, respectivement. . . . .</i>	142

5.2	<i>Schéma 2D d'une boîte de simulation et de la zone accessible par intégration radiale (en rouge)</i> . . . . .	143
5.3	<i>Comparaison de facteurs de structure obtenus à partir du modèle de Percus-Yevick pour les sphères dures (courbe rouge) et des simulations Monte-Carlo (courbe bleue). La longueur de la boîte est de 141 Å</i> . . . . .	144
5.4	<i>Comparaison des facteurs de structure obtenus à partir de la méthode Monte-Carlo (courbe bleue) et de l'approximation de Percus-Yevick (courbe rouge). On a utilisé 1000 sphères de diamètre 32,2 Å, à une fraction volumique de 0,149. La boîte fait une longueur de 489,5 Å.</i> . . . . .	145
5.5	<i>Facteurs de structure obtenus par nos simulations (orange), les simulations de Bareigts (Bareigts, 2013) (bleu) et par la Mean Spherical Approximation (vert) pour des sphères chargées de rayon 8 nm et charge de -313.66 e, à une fraction volumique de 0.1</i> . . . . .	147
5.6	<i>Facteurs de structure obtenus par nos simulations sans (noir) et avec (vert) correction de l'effet des bords périodiques par Debyer, et par les simulations de Bareigts (Bareigts, 2013) sur des dispersions de sphères de rayon 8 nm et densité de charge de surface de -0,39 e nm<sup>-2</sup>, à fraction volumique de 0.3</i> . . . . .	148
5.7	<i>Facteurs de structures expérimentaux (orange) et obtenus par simulation (bleu) avec <math>\epsilon_{LJ} = 0,05 kT</math>, pour le lysozyme à pH 7, 20 mM de force ionique, <math>\Phi = 0,126</math></i> . . . . .	149
5.8	<i>Facteurs de structures expérimentaux (orange) et obtenus par simulation avec <math>\epsilon_{LJ}</math> égal à 0,05, 0,08 ou 0,1 <math>k_B T</math> (courbes bleues), pour le lysozyme à pH 7, 20 mM de force ionique, <math>\Phi = 0,126</math></i> . . . . .	150
5.9	<i>Sphères (rayon : 50 Å) et « haltères » (rayon de chaque sphère : 39,99 Å) utilisables dans les tests de l'influence de l'anisotropie sur la décomposition des intensités brutes</i> . . . . .	151
5.10	<i>Equation d'état du lysozyme à pH 7 et 20 mM de force ionique, obtenue expérimentalement (cercles pleins) et par simulation Monte-Carlo avec contre-ions implicites et <math>\epsilon_{LJ} = 0,05 kT</math> (cercles vides)</i> . . . . .	153
5.11	<i>Fractions volumiques pour des pressions osmotiques de 0,05 et 0,12 bar, obtenues expérimentalement (cercles bleus clair) et par simulation, avec un cut-off de 3, 4, 5, 7 et 10 fois la longueur de Debye (cercles orange) et <math>\epsilon_{LJ} = 0,05 k_B T</math></i> . . . . .	155

5.12	<i>Equation d'état expérimentale du lysozyme à pH7 et 20mM de force ionique (cercles bleus) et valeurs de fraction volumique obtenues pour une pression de 0,12 bar par simulation avec contre-ions implicites (cercles jaunes) ou explicites (cercles orange et rouge)</i> . . . . .	156
5.13	<i>Equation d'état du lysozyme à pH 7 et 150 mM de force ionique, obtenue expérimentalement (cercles pleins) et par simulation Monte-Carlo avec contre-ions implicites et <math>\epsilon_{LJ} = 0,05 k_B T</math> (cercles vides)</i> . . . . .	157
5.14	<i>Equations d'état du lysozyme à pH 7 et 150 mM de force ionique, expérimentale (cercles bleus) et issues de simulation (cercles oranges), en faisant varier le paramètre de Lennard-Jones <math>\epsilon_{LJ}</math> (noté <math>E_{psLJ}</math>) de 0,05 à 0,15 <math>k_B T</math></i> . . . . .	158
5.15	<i>Capture d'écran du système à 0,05 bar, pH 7, 150 mM de force ionique avec <math>\epsilon_{LJ} = 0,15 k_B T</math></i> . . . . .	160
5.16	<i>Equation d'état du lysozyme à pH 7 et 2,02 M de force ionique, obtenue expérimentalement (cercles pleins) et par simulation Monte-Carlo avec contre-ions implicites et <math>\epsilon_{LJ} = 0,05 k_B T</math> (cercles vides)</i> . . . . .	161
6.1	<i>Pression de surface (gauche) et angle ellipsométrique (droite) au cours des cinétiques d'adsorption de l'ovalbumine (carrés vides) et du lysozyme (ronds pleins) à une concentration de 5 g L<sup>-1</sup>, dans une solution à pH 7, 40 mM de force ionique et 19 °C. Figures extraites de (Le Floch-Fouéré, 2008)</i> . . . . .	168
6.2	<i>Concentration de surface minimale estimée pour la première couche interfaciale du lysozyme (gauche) et de l'ovalbumine (droite) à pH 7 et 40 mM de force ionique, reportée en pointillés sur les équations d'état respectives des deux protéines à pH 7 et 35 mM de force ionique.</i> . . . . .	169
6.3	<i>Suivi de l'angle ellipsométrique des cinétiques d'adsorption de l'ovalbumine à une concentration de 0,1 g L<sup>-1</sup> dans un tampon bis-tris propane à pH 7, I=10 mM (courbe bleue), un tampon lactate à pH 3,6, I=10 mM (courbe rouge) ou un tampon acétate à pH 3,6, I=10 mM (courbe verte) (Lechevalier et coll., non publié)</i> . . . . .	170
6.4	<i>Densités d'adsorption à l'interface air/eau en fonction du temps, pour des solutions d'ovalbumine à 1 g L<sup>-1</sup>. Les conditions présentées, testées en présence du capot hermétique, sont : pH 7, I=20 mM, 20 °C (triangles bleus vides); pH 7, I=170 mM, 20 °C (triangles bleus pleins); pH 3,6, I=20 mM, 20°C (triangles rouges vides); pH 3,6, I=170 mM, 20°C (triangles rouges pleins).</i> . . . . .	171

6.5	<i>Densités d'adsorption à l'interface air/eau en fonction du temps, pour des solutions de lysozyme à 1 g L<sup>-1</sup>. Les expériences avec présence du capot hermétique ont été effectuées à pH 7, I=20 mM, 20 °C (ronds bleus vides); pH 7, I=170 mM, 20 °C (ronds bleus pleins); pH 7, I=20 mM, 30°C (croix rouges). Une expérience sans capot hermétique a été réalisée à pH 7, I=20 mM (carrés rouges).</i>	173
6.6	<i>Profils de réflectivité en fonction de la longueur d'onde, pour les mesures effectuées à 1 h et 7 h d'adsorption sur des interfaces de lysozyme à pH 7 et 20 mM, sans capot hermétique.</i>	174
6.7	<i>Densité d'adsorption obtenue par réflectivité de neutrons sans capot hermétique (pH 7, I=20 mM) et angle ellipsométrique (pH 7, 40 mM) mesurés à l'interface air/eau d'une solution de lysozyme à 1 et 5 g L<sup>-1</sup>, respectivement, en fonction du temps. Les valeurs d'angle ellipsométrique sont extraites de (Le Floch-Fouéré, 2008)</i>	175
6.8	<i>Angle ellipsométrique pour une solution de lysozyme à 1 g L<sup>-1</sup> dans un tampon bis-tris propane à pH 7 et 20 mM de force ionique, avec évaporation (courbe bleue) ou sans évaporation (courbe rouge)</i>	176





## **Interactions et structures dans les solutions hautement concentrées de protéines globulaires**

### **Etude du lysozyme et de l'ovalbumine**

**Résumé :** Les phases concentrées de protéines sont au centre de nombreuses études visant à identifier et caractériser les interactions et transitions de phases mises en jeu, en utilisant le large corpus de connaissances acquis sur les phases concentrées de colloïdes. Ces phases concentrées de protéines possèdent en outre une grande importance dans des domaines aussi variés que l'industrie agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique et la médecine. L'établissement d'équations d'état présentant la pression osmotique ( $\Pi$ ) en fonction de la fraction volumique ( $\Phi$ ) est une méthode efficace de caractérisation des interactions entre les composants d'un système. Nous l'avons appliquée à des solutions de deux protéines globulaires, le lysozyme et l'ovalbumine, en balayant une gamme de fractions volumiques allant d'une phase diluée ( $\Phi < 0,01$ ) à une phase concentrée, solide ( $\Phi > 0,62$ ). Les équations d'état obtenues, couplées à d'autres techniques (SAXS, simulations numériques), ont permis de mettre en évidence un comportement très différent des deux protéines lors de la concentration et ont montré leur complexité en comparaison avec des colloïdes modèles. La mise en relation des équations d'état et du comportement interfacial de ces deux protéines a montré des points de convergence et permis de formuler une nouvelle hypothèse expliquant certaines observations portant sur l'adsorption des protéines à l'interface air-eau.

*Mots-clés : Protéines, concentration, lysozyme, ovalbumine, compression osmotique, interactions, diffusion des rayons X aux petits angles, réflectivité de neutrons, simulations Monte-Carlo*

## **Interactions and structures in highly concentrated solutions of globular proteins**

### **Study of lysozyme and ovalbumin**

**Abstract :** Concentrated phases of proteins are the subject of numerous studies aiming at identifying and characterizing the interactions and phase transitions at play, using the large corpus of knowledge in the field of concentrated colloids. Those concentrated phases of proteins have, in addition, a great importance in various fields, such as food industry, pharmaceutical industry and medicine. The establishment of equations of state relating osmotic pressure ( $\Pi$ ) and volume fraction ( $\Phi$ ) is an efficient way of characterization of the interactions between the components of a system. We applied this method to solutions of two globular proteins, lysozyme and ovalbumin, spanning volume fractions ranging from a dilute phase ( $\Phi < 0,01$ ) to a concentrated, solid phase ( $\Phi > 0,62$ ). The equations of state, coupled to other methods (SAXS, numerical simulations), enabled us to show that the two proteins carry a very different behavior when submitted to concentration and that their complexity is beyond that of colloids. Relating equations of state and interfacial behavior of these two proteins also showed points of convergence and enabled us to formulate a new hypothesis which explains some of the results obtained in the study of adsorption of proteins at the air-water interface.

*Keywords: Proteins, concentration, lysozyme, ovalbumin, osmotic compression, interactions, small angle X-ray scattering, neutron reflectivity, Monte-Carlo simulations*