

Université de Cergy Pontoise

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

**Docteur de
l'Université de Cergy Pontoise**

Spécialité :

Biophysique

**Protéolyse enzymatique d'un gel :
microrhéologie et mécanisme de dégradation**

par

Giulia Fadda

Soutenue le 18 Septembre 2002 devant la Commission d'examen composée de :

Mme M. Djabourov	rapporteur
Mme V. Larreta-Garde	directrice de thèse
M. A. Coniglio	rapporteur
M. H.T. Diep	président
M. D. Durand	examinateur
M. D. Lairez	coordinateur CEA
M. D. Thomas	invité

à mes parents et à nonna

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au Laboratoire Léon Brillouin. Je tiens ici à remercier Charles Henri de Novion et Jose Texeira qui m'ont accueillie, ainsi que Pierre Monceau et Michel Alba qui leur ont succédé à la direction du laboratoire.

Cette thèse a été effectuée en collaboration avec le Laboratoire ERRMECe de l'Université de Cergy Pontoise. Je tiens ici à remercier Jean Marie Imhoff pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et Veronique Larreta Garde qui lui a succédé à la direction du laboratoire.

Je souhaite exprimer ma plus sincère reconnaissance et toute ma sympathie à Didier Lairez qui a dirigé mes recherches. Ses compétences scientifiques ainsi que son enthousiasme ont été une source de soutien et de motivation permanente. Il me tient à cœur d'insister sur ses qualités humaines et son sens aigu du savoir vivre qui ont rendu nos relations si agréables et détendues.

Je tiens à remercier Véronique Larreta Garde, qui a été la directrice officielle de cette thèse, pour toutes les discussions scientifiques très importantes, surtout pour ce qui concerne l'aspect biologique. Je veux la remercier aussi pour sa disponibilité et sa gentillesse.

J'exprime ma gratitude à tous les membres du jury pour avoir accepté d'y participer : Mme Djabourov, M. Coniglio, M. Diepp, M. Durand, M. Thomas, Mme Llarreta Garde et M. Lairez.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe du LLB qui a toujours été très disponible pour toute aide et discussions.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire ERRMECe. Un remerciement particulier va à Juan Pelta pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues (mais aussi pour la belle musique qu'il m'a fait découvrir) et à Hugues Berry pour ses qualités scientifiques, sa disponibilité, sa gentillesse et sa sympathie.

Je remercie Bernard Arrio pour sa disponibilité lors des mesures de corrélation de fluorescence.

Je remercie Andrea Donini pour toutes les discussions de physique très utiles que l'on a eu pendant ces trois ans de thèse.

Il faut que je remercie (très chaleureusement !) Ingo Köper. Sans lui je serais encore en train de résoudre mes problèmes d'informatique...et je n'aurais jamais su comment aménager mon bureau...

Je remercie d'une façon particulière Fabrice Cousin pour avoir lu et corrigé soigneusement ce manuscrit (et les remerciements).

Je tiens à remercier Xavier Agostini pour son aide et sa sollicitude pour tous les aspects techniques liés au développement de la manip de diffusion de la lumière.

Je remercie Chantal Marais et Karel Jiguet pour leur professionnalité, leur disponibilité et leurs sourires.

Je remercie tous les thésards, post docs et permanents du LLB pour l'aide, le soutien et la sympathie (l'ordre est aléatoire) : Serge, Daniela, Francesco, Caroline, Stéphanie, Abdeslam, Jean Marc, Julian, Ingo, Fabrice, Camille, Stéphane,

Bouchra, Olga, Geraldine, Aziz, Marie Sousai, Olivier, Marcus, Naïma, Sophie, Paula, Vincent.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mes parents pour le soutien qu'ils m'ont toujours donné.

Pour le soutien et l'encouragement que j'ai toujours eu de sa part, je remercie avec beaucoup de chaleur Andrea Donini.

Je remercie énormément Alberta Congeduti pour le soutien moral et physique qu'elle m'a donné constamment.

Je tiens à remercier également Paolo Postorino pour son soutien et sa présence.

Je remercie encore Xavier Agostini pour son aide indispensable pour ma petite *Fadda mobile*. Et je remercie ma petite Panda de m'avoir accompagnée tous les jours au labo pendant trois longues années.

.....il en faut des gens pour faire une thèse.....!!!

Résumé de la thèse

La matrice extracellulaire est un réseau complexe de macromolécules qui enveloppe les cellules et isole les organes. Cette matrice est composée d'un ensemble de protéines et de polysaccharides variés qui sont sécrétés localement par les cellules et assemblés en un réseau organisé, en association étroite avec la cellule qui les a produits.

Certains processus biologiques comme l'invasion cellulaire, impliquée notamment dans les métastases, nécessite que la cellule traverse cette barrière physique. Pour cela la cellule produit des enzymes (protéinases) catalysant l'hydrolyse des protéines et provoquant la dégradation et la liquéfaction du gel. L'étude de ce phénomène a été entreprise sous deux aspects différents. Le premier volet de ce travail concerne le développement d'un outil expérimental permettant de sonder les propriétés rhéologiques d'un gel à une échelle proche de celle d'une cellule. Pour cela nous avons réalisé des expériences de diffusion quasi-élastique de la lumière sur des particules sondes d'un diamètre de 0.5 micron dans des solutions de gélatine (collagène dénaturé). Nous avons étudié la façon dont la dynamique de ces particules est affectée par la gélification de la solution et notamment par le comportement critique des grandeurs rhéologiques (viscosité et module élastique). Certains aspects techniques liés à la non-ergodicité du gel sont discutés. Le second volet concerne l'étude expérimentale du mécanisme de dégradation d'un gel de gélatine par la thermolysine. Sous l'action de cette enzyme une transition inverse de la gélification est observée. Au moyen de la technique de microrhéologie préalablement développée, nous avons montré que pour de très faibles concentrations en enzyme ($[E]$ de l'ordre du nanomolaire) la vitesse de dégradation enzymatique varie comme $[E]^2$, alors qu'un mécanisme classique laisse prévoir un comportement linéaire. Ce résultat s'interprète en envisageant un mécanisme de dégradation limité par une diffusion anormale et sous-diffusive de l'enzyme dans le gel. Cette diffusion anormale a été mise en évidence par des mesures de corrélation de fluorescence en microscopie biphotonique sur des enzymes marquées.

Table des matières

Introduction	11
1. Diffusion de la lumière	17
1.1. Brève introduction à la diffusion de la lumière	18
1.2. Diffusion élastique de la lumière par une solution	19
1.3. Diffusion quasi élastique de la lumière par une solution	21
1.4. Techniques en diffusion quasi élastique de la lumière	25
1.4.1. Technique d'autobattement	26
1.4.2. Technique hétérodyne	28
1.5. QELS par un système non ergodique	29
1.6. Cinétique de gélification par QELS	32
1.6.1. Diffusion par les gels	32
1.6.2. Diffusion de particules sondes dans un gel	36
1.7. Conclusion	38
2. QELS et microrhéologie : application à l'étude de la gélification	41
2.1. La gélatine	42
2.1.1. Théorie de la gélification	42
2.2. Cas de la gélatine	45
2.3. Préparation de l'échantillon	45
2.4. Viscosité intrinsèque et concentration de recouvrement de la gélatine étudiée	46
2.5. Appareillage	46
2.6. Mesure de diffusion statique de la lumière	47
2.7. Mesures de diffusion quasi élastique de la lumière	51
2.8. Traitement des données	52
2.9. Gélification : problèmes inhérents à la non ergodicité	53
2.10. Temps de gélification, t_{gel}	61
2.11. Etat liquide	62
2.11.1. Comportement à temps court	62
2.11.2. Comportement à temps long	65
2.12. Etat solide	67
2.13. Conclusion	68

3. Dégradation enzymatique d'un gel de gélatine	71
3.1. La Thermolysine	71
3.2. Préparation de l'échantillon	72
3.3. Stabilité de la thermolysine	73
3.4. Microrhéologie	74
3.4.1. Détermination du temps de dégradation	74
3.4.2. Cinétique enzymatique de Michaelis-Menten	77
3.4.3. Analyse des résultats	78
3.5. Mesures de Corrélation de Fluorescence	82
3.5.1. Marquage de la thermolysine	82
3.5.2. Préparation de l'échantillon	82
3.5.3. La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence	83
3.6. Mesures de corrélation de fluorescence	84
3.6.1. Mesures de diffusion des billes de latex	85
3.6.2. Mesures de diffusion de la thermolysine	85
3.6.3. Mécanisme proposé	88
3.7. Conclusion	89
4. Les fausses pistes	91
4.1. Conformation de la fibronectine en solution diluée : étude par dif- fusion de lumière et diffusion de neutron aux petits angles	93
4.2. Gels BSA-Glutaraldéhyde : diagramme de phase	103
4.3. Structure rigide des agrégats de lysozyme	104
5. Publications	113
6. Conclusion et perspectives	129
A. Annexe 1	131
A.1. Diffusion de particules	131
A.1.1. Mouvement brownien dans un potentiel harmonique	132
B. Annexe 2 :	
Méthode d'analyse des données	135
B.1. Développement en cumulants	135

Introduction

La majorité des cellules des animaux pluricellulaires sont organisées en ensembles coopératifs appelés tissus, qui s'associent à leur tour selon diverses combinaisons en unités fonctionnelles de plus grandes dimensions, les organes. Les cellules des tissus sont habituellement en contact avec un réseau complexe de macromolécules extracellulaires sécrétées localement par les cellules mêmes : la *matrice extracellulaire*. Cette matrice aide à assurer l'adhérence cellulaire ainsi que celle du tissu. La matrice extracellulaire est composée d'un ensemble de protéines et de polysaccharides variés assemblés en un réseau organisé, en association étroite avec la cellule qui les a produits. La composition des macromolécules varie selon le tissu auquel elles appartiennent. Les variations relatives des différents types de macromolécules matricielles et leur mode d'organisation dans la matrice extracellulaire engendrent une multiplicité de formes, chacune hautement adaptée aux besoins fonctionnels du tissu particulier.

La matrice extracellulaire joue un rôle essentiel au niveau structural car elle stabilise la structure physique des tissus. En même temps, elle joue un rôle actif dans la régulation des cellules qui sont à son contact, influant sur leur développement, leur migration, leur prolifération, leur forme et leur fonction. Les caractéristiques de la matrice sont constamment sous contrôle cellulaire. Les cellules modifient la composition de la matrice extracellulaire à travers un mécanisme d'équilibre dynamique continu entre la *dégradation* de la matrice, régulée par des protéinases spécifiques, et sa *régénération*. Cet équilibre dynamique dépend de l'état physiologique de l'organe ou du tissu en question. C'est en particulier le cas de la formation des organes et des tissus pendant l'embryogenèse ou, chez les adultes, la modification de certains organes et la réparation de blessures par exemple, ou encore des événements pathologiques tels que la formation de tumeurs et la dissémination de métastases.

La matrice extracellulaire est composée d'un nombre important de molécules variées, ayant chacune des rôles structuraux et fonctionnels différents, qui s'organisent de façon à former un **gel**.

Les deux principales classes de macromolécules extracellulaires qui composent la matrice sont des longues chaînes polysaccharides généralement reliées de façon covalente à une protéine pour former des protéoglycanes et des protéines fibreuses de deux types fonctionnels : principalement structurales (par exemple le *collagène*) et adhésives (par exemple la *fibronectine*).

Les **collagènes** forment une famille de protéines fibreuses qui constituent le composant principal de la peau et de l'os. L'aspect caractéristique des molécules de

collagène est leur structure hélicoïdale rigide à trois brins. Trois chaînes polypeptidiques de collagène sont enroulées les unes autour des autres en une superhélice régulière. Les molécules de collagène s'assemblent entre elles dans l'espace extracellulaire pour former de structures différentes selon le type de collagène et selon le tissu. Ces structures sont caractérisées par une résistance mécanique élevée surtout à la tension. Les fibres de collagène renforcent la matrice et participent à son organisation.

La matrice extracellulaire contient un certain nombre de protéines adhérentes non collagéniques organisées en domaines multiples, chacun de ces domaines comportant un site de liaison spécifique pour d'autres macromolécules de la matrice et pour des récepteurs de la surface cellulaire. La **fibronectine** fait partie de cette classe de protéines. C'est une grande glycoprotéine constituée de deux sous-unités jointes par deux ponts disulfure près des extrémités carboxy-terminales. La fibronectine est caractérisée par une affinité élevée pour de nombreuses protéines. Elle est capable de réaliser une cohésion entre des protéines de la matrice extracellulaire au rôle spécifiquement structural, comme le collagène. En raison de son importante affinité pour les cellules, elle constitue un lien entre les cellules et le tissu sous-jacent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires appelés intégrines.

Une des caractéristiques importantes de la matrice extracellulaire est qu'elle se présente *in vivo* sous un état non soluble assimilable à un gel, ce qui conditionne ses propriétés structurales. Une dégradation des composants de la matrice est requise lors de certains processus biologiques, comme par exemple la dissémination de tumeurs. Pour que des cellules cancéreuses puissent créer des métastases, elles doivent migrer de leur site d'origine vers un organe distant, ce qui est réalisé par l'intermédiaire du flux sanguin. Un bref schéma est présenté dans la figure 0.1. Ce processus nécessite que les composants de la matrice soient dégradés. Des enzymes protéolytiques extracellulaires sont alors sécrétées localement par les cellules qui catalysent l'hydrolyse des protéines et provoquent la dégradation et la liquéfaction du gel.

Il est difficile d'établir un modèle décrivant l'invasion cellulaire car il doit intégrer les différents processus physiques impliqués (adhésion, transition de la matrice d'un état solide à un état liquide) et les échanges entre la cellule et la matrice (stimulation ou inhibition de l'expression de protéinases). **Nous nous sommes intéressés, pendant ce travail de thèse, au processus d'invasion cellulaire en abordant en particulier l'aspect relatif à la dégradation enzymatique.** Pour cette étude, nous avons utilisé un système physico-chimique plus simple pour la modélisation enzymatique, qui prend en compte le fait que l'invasion cellulaire est, par certains aspects, passive et dépend de processus purement physiques. Cette approche permet d'exploiter les progrès réalisés dans la compréhension théorique et l'étude expérimentale de la physique des polymères. Dans le cadre de la physique des polymères, la dégradation enzymatique peut être décrite en terme de **transition critique** d'un état solide à un état liquide (**tran-**

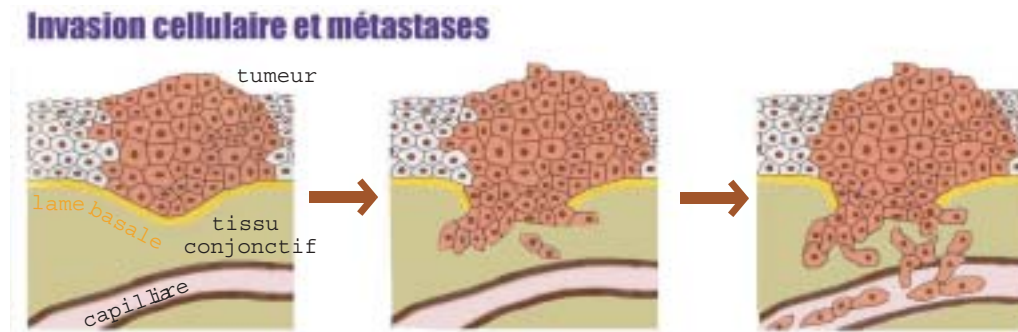


FIG. 0.1. – . *Bref schéma de la diffusion des tumeurs : des cellules cancéreuses (en gris foncé) sécrètent des protéases qui, en hydrolysant la matrice extracellulaire (tissu conjonctif dans ce schéma), permettent aux cellules de migrer jusqu'au capillaire. Elles peuvent ainsi migrer vers des organes distants.*

sition sol-gel). La description de ce processus en terme de transition critique sol-gel n'est pas nouvelle. Ainsi par exemple, une loi de comportement universelle a pu être dégagée pour décrire la solubilisation de différents types de gels modélisant la matrice lors de leur dégradation au moyen de protéinases ayant des spécificités différentes. Quel que soit le gel étudié et l'enzyme utilisée pour le dégrader, une courbe maîtresse est obtenue pour la fraction de protéine participant au gel (c'est à dire la fraction gel qui est le paramètre d'ordre de la transition) en fonction de l'écart au seuil de gélification [1].

Par rapport au problème de l'invasion cellulaire, ce résultat n'est pas suffisant car la compréhension du comportement cellulaire nécessite l'étude de grandeurs dynamiques comme par exemple la mobilité d'une cellule.

La transition sol-gel peut être suivie expérimentalement, par l'étude de l'évolution de propriétés dynamiques, notamment rhéologiques, tels que la **viscosité** et l'**élasticité** d'un système à l'approche du seuil de la transition. Si l'on considère un gel en cours de dégradation, à l'approche du seuil de gélification, le module élastique du réseau décroît en loi de puissance de l'écart au seuil. Au-delà du seuil, l'échantillon est un liquide dont la viscosité varie également en loi de puissance de l'écart au seuil. De façon générale, les lois d'échelles relient ces comportements en loi de puissance de la fonction de réponse du gel ou de la fonction de relaxation d'une perturbation imposée ou provenant de fluctuations spontanées.

Par diffusion quasi-élastique de la lumière nous avons accès précisément à la fonction de relaxation des fluctuations de concentration. Les fluctuations peuvent être, par exemple, les fluctuations de concentration de particules sondes introduites dans une solution macromoléculaire pour en étudier les propriétés dynamiques.

A priori l'étude, par diffusion quasi élastique de la lumière, de la dynamique de particules sondes, de la taille d'une cellule, introduites dans une solution de protéines de la matrice extracellulaire permet de sonder l'évolution du micro-

environnement (des propriétés rhéologiques) près de la cellule lors de la dégradation enzymatique.

La première partie de la thèse a consisté, principalement, au développement d'un outil expérimental de **microrhéologie**, qui consiste, justement, en l'étude de la diffusion de particules sondes par diffusion quasi-élastique de la lumière. Nous avons réalisé ces expériences sur des particules sondes d'un diamètre de $0.5\mu\text{m}$ dans des solutions de gélatine. La gélatine représente un bon système "modèle" : étant du collagène dénaturé, elle constitue un bon point de départ dans la démarche à la modélisation de la dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire. D'un point de vue plutôt physico-chimique, de nombreuses études rhéologiques ont permis de caractériser les propriétés dynamiques de la gélatine lors de la gélification, et notamment le comportement critique du module élastique et de la viscosité près du seuil de la transition sol-gel.

Nous avons étudié la façon dont la dynamique des particules sondes est affectée pendant la gélification de la solution et notamment le comportement critique de la viscosité et du module élastique. Les valeurs des exposants critiques que nous avons mesurés avec cette technique sont en très bon accord avec les valeurs mesurées par rhéologie.

Nous avons appliqué la technique que nous avons développée pour étudier la dégradation d'un gel de gélatine par une protéase, la **thermolysine**. Comme nous allons le voir dans la suite du manuscrit, cette technique s'est révélée un bon outil expérimental pour l'étude de la dégradation enzymatique. Une étude de la dégradation enzymatique en fonction de la concentration en enzyme donne une relation entre le temps de dégradation et la concentration en enzyme qui semble ouvrir de nouvelles perspectives, soit du point de vue physique en ce qui concerne le phénomène critique de la gélification, soit du point de vue biologique dans le cadre de la réorganisation de la matrice extracellulaire.

Plan de la thèse

Le manuscrit est organisé de la manière suivante : le chapitre 1 traite des outils théoriques nécessaires à la compréhension des données issues des expériences de diffusion de la lumière.

Le chapitre 2 illustre les outils expérimentaux utilisés pour les mesures sur la gélification. Le chapitre est organisé selon trois parties : dans la première partie sont présentées des généralités sur le phénomène critique de la gélification et les principaux résultats théoriques et expérimentaux concernant le comportement critique de la viscosité et du module élastique. Dans la deuxième partie les conditions expérimentales de mesure sont présentées. Les problèmes inhérents à l'analyse des résultats sont traités en détail. Dans la troisième partie sont exposés les résultats concernant le comportement du système près du seuil de transition.

Dans le chapitre 3 nous montrons les résultats obtenus, en utilisant la technique décrite dans le chapitre précédent, sur la dégradation enzymatique d'un gel de

gélatine.

Le chapitre 4 est dédié à la présentation de résultats obtenus au cours de la première partie de la thèse qui a consisté en la recherche d'un système physico-chimique suffisamment proche des systèmes biologiques permettant notre étude.

1. Diffusion de la lumière

La diffusion de la lumière est la principale technique qui a été utilisée au cours de ce travail. Dans ce chapitre, nous exposons les principes généraux de cette technique nécessaires à la compréhension de nos études.

Le chapitre est organisé en deux parties : dans un premier temps la technique et les grandeurs physiques caractéristiques de la diffusion de la lumière par des solutions de polymères sont introduites. Les différents modes d'utilisation (autobattement et hétérodyne) sont aussi décrits.

Dans un second temps l'application de la diffusion de la lumière à l'étude de gels de polymères est discutée. Les principales théories sont décrites ainsi que les problèmes inhérents à l'étude de ces systèmes par diffusion quasi élastique de la lumière.

1.1. Brève introduction à la diffusion de la lumière

Dans une expérience de diffusion de la lumière une onde incidente est envoyée dans un milieu diffusant. La mesure de l'intensité, du moment (direction) et de l'énergie (fréquence) de la radiation diffusée permet d'obtenir des informations sur la structure et la dynamique des particules qui composent le système. Dans une expérience idéale, la lumière incidente est une onde électromagnétique plane [2] :

$$\vec{E}_i(\vec{r}, t) = \vec{n}_i E_0 e^{i[\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t]} \quad (1.1)$$

de longueur d'onde λ et fréquence ω_i ; \vec{n}_i est un vecteur unitaire dans la direction du champ électrique, E_0 est l'amplitude du champ électrique et \vec{k}_i le vecteur d'onde. Quand cette onde entre dans un milieu diélectrique ayant une constante diélectrique locale dépendant du temps (pour simplifier on considère la constante diélectrique comme une grandeur scalaire) :

$$\epsilon(\vec{r}, t) = \epsilon + \delta\epsilon(\vec{r}, t) \quad (1.2)$$

elle diffuse du fait des fluctuations de la constante diélectrique $\delta\epsilon(\vec{r}, t)$. Il est possible de démontrer que la composante du champ électrique diffusée à une distance R du volume de diffusion est [2] :

$$E_s(R, t) = \frac{E_0}{4\pi\epsilon_0 R} e^{i(k_f R - \omega t)} \int_V d^3 r e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} \delta\epsilon(\vec{r}, t) \left[\vec{n}_f \cdot \left(\vec{k}_f \times (\vec{k}_f \times \vec{n}_i) \right) \right] \quad (1.3)$$

où ϵ_0 est la constante diélectrique dans le vide et $\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_f$ est le vecteur de diffusion. L'angle entre \vec{k}_i et \vec{k}_f est appelé angle de diffusion θ . $|\vec{k}_i| = \frac{2\pi}{\lambda_i}$ et $|\vec{k}_f| = \frac{2\pi}{\lambda_f}$, où λ_i et λ_f sont respectivement la longueur d'onde de la radiation incidente et de l'onde diffusée. On peut définir $\lambda_j = \frac{\lambda_0}{n_j}$ (avec $j = i, f$) où λ_0 est la longueur d'onde de la radiation dans le vide et n_j est l'indice de réfraction du milieu. En diffusion quasi-élastique de la lumière :

$$|\vec{k}_i| \cong |\vec{k}_f| \quad (1.4)$$

Par la loi de cosinus, $q^2 = |\vec{k}_f - \vec{k}_i|^2 = 4k_i^2 \sin^2 \frac{\theta}{2}$, on trouve que le vecteur de diffusion $|\vec{q}|$ est :

$$|\vec{q}| = q = \frac{4\pi n_i}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad (1.5)$$

Si le système est localement à l'équilibre la valeur absolue des fluctuations de la constante diélectrique peut être exprimée en fonction de la densité locale $\rho(\vec{r}, t)$ et de la température T [3] :

$$\delta\epsilon(\vec{r}, t) = d\epsilon(\rho(\vec{r}, t), T) = \left(\frac{\partial\epsilon}{\partial\rho} \right)_T \delta\rho(\vec{r}, t) + \left(\frac{\partial\epsilon}{\partial T} \right)_\rho \delta T(\vec{r}, t) \quad (1.6)$$

où $\delta\rho$ et δT sont des fluctuations statistiques locales. Dans la plupart des liquides la variation de la constante diélectrique avec la température est négligeable par rapport à la variation de la densité et $\delta\epsilon$ est directement proportionnel aux fluctuations de la densité.

Pour un système constitué de particules en solution, les fluctuations de la constante diélectrique sont principalement dues aux fluctuations de concentration du soluté (on néglige les fluctuations de densité du solvant).

Dans une expérience de diffusion de la lumière les valeurs de λ utilisées sont typiquement comprises entre 350 nm et 700 nm (spectre UV-visible) et les valeurs de q sont de l'ordre de 10^{-4} nm^{-1} à 10^{-2} nm^{-1} . La valeur de q détermine l'échelle spatiale L accessible par la technique :

$$L = \frac{2\pi}{q} \quad (1.7)$$

Cette technique nous permet, donc, de sonder des fluctuations de la constante diélectrique sur des échelles comprises entre 10^2 et 10^4 nm .

1.2. Diffusion élastique de la lumière par une solution

Considérons une expérience de diffusion élastique de la lumière par un système constitué de N particules en solution. Appelons I_0 l'intensité du rayonnement incident, $I(q)$ l'intensité de la radiation diffusée et R la distance entre le volume diffusant et le détecteur. Les propriétés de la diffusion sont décrites par la fonction de diffusion, ou *facteur de structure statique*

$$S(q) = \frac{1}{N^2} \left\langle \sum_{i,j=1}^N e^{i\vec{q}[\vec{r}_i - \vec{r}_j]} \right\rangle \quad (1.8)$$

où $\langle \dots \rangle$ représentent la moyenne calculée sur tous les états microscopiques possibles et \vec{r}_i est le vecteur position de la particule i . On peut montrer que dans le cas d'une solution [7] :

$$S(q) = \Sigma(q) C^{-1} \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)^{-1} \quad (1.9)$$

où C est la concentration en soluté, $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)$ est la section efficace différentielle de diffusion des particules de soluté et $\Sigma(q)$ est le rapport entre l'intensité de la radiation diffusée I_s à un angle θ et à une distance r du centre de diffusion et la radiation incidente I_0 ; il est appelé *rapport de Rayleigh*. La section efficace différentielle de diffusion de la particule est une quantité qui, en diffusion de la lumière, est associée à l'indice de réfraction de la particule diffusante. Si on appelle $\delta\alpha$ la différence de polarisabilité entre la particule diffusante et le solvant,

la section efficace différentielle de diffusion par particule de soluté $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_m$ est définie par :

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_m = \frac{\pi^2(\delta\alpha)^2}{\epsilon_0^2\lambda_0^4} \quad (1.10)$$

Pour une solution diluée, $\delta\alpha$ est lié à la différence de l'indice de réfraction du soluté, n , et celui du solvant, n_s :

$$C \delta\alpha = \epsilon_0(n^2 - n_s^2)$$

qui, substitué dans l'éq.1.10, donne :

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_m = \frac{\pi^2}{\lambda_0^4 C^2} (n^2 - n_s^2)^2 \quad (1.11)$$

On faisant l'approximation $(n^2 - n_s^2) \simeq \frac{\partial(n^2)}{\partial C} C = 2n_s \frac{\partial n}{\partial C} C$, on trouve :

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_m = \frac{4\pi^2 n_s^2}{\lambda_0^4} \left(\frac{\partial n}{\partial C}\right)_{n=n_s}^2 = K_l \quad (1.12)$$

K_l est appelé *facteur de contraste pour la lumière*. La quantité $\Sigma(q)$ dans l'éq.1.9 est la fonction que l'on mesure. On peut montrer [6] que le rapport de Rayleigh $\Sigma(q)$ pour une solution diluée de N particules de masse M a la forme :

$$\Sigma(q) = \frac{1}{V} \frac{I(q)R^2}{I_0} = K_l M C S(q) \quad (1.13)$$

où la concentration des particules en solution est $C = \frac{MN}{N_a V}$ (exprimée en $g_{\text{soluté}}/cm^3$), N_a est le numéro d'Avogadro, $I(q)$ est l'intensité diffusée :

$$I(q) \simeq \langle |E_s(q)|^2 \rangle \quad (1.14)$$

Pour une solution diluée on peut négliger les interactions intermoléculaires et on peut montrer que dans la limite $q \rightarrow 0$, pour un objet quelconque constitué de N diffuseurs élémentaires en solution très diluée :

$$\lim_{C \rightarrow 0} [S(q, C)]^{-1} \simeq N^{-1} \left(1 + \frac{q^2 R_g^2}{3} + \dots \right) \quad (1.15)$$

où $R_g^2 = \frac{1}{2N^2} \sum_{i,j=1}^N |\vec{r}_i - \vec{r}_j|^2$ est le *rayon de giration*, c'est à dire la moyenne quadratique sur toutes les configurations possibles des distances $[\vec{r}_i - \vec{r}_j]$ entre les monomères.

En outre la diffusion de la lumière permet de déterminer la *compressibilité osmotique* et le *second coefficient du viriel*. On peut, en effet montrer [6, 7] que :

$$[S(q, C)]^{-1} = \frac{1}{k_B T} \left(\frac{\partial \Pi}{\partial C} \right)_T \quad (1.16)$$

où $(\frac{\partial \Pi}{\partial C})_T$ est le module osmotique et k_B la constante de Boltzmann. Un développement de la pression osmotique limitée au second ordre mène à la relation suivante :

$$\lim_{q \rightarrow 0} [S(q, C)]^{-1} \simeq \frac{1}{M} + 2A_2C \quad (1.17)$$

Le second coefficient du viriel, A_2 , est une mesure des interactions à deux corps. La diffusion élastique de la lumière permet, en outre, de mesurer la masse des particules en solution :

$$\lim_{q \rightarrow 0, C \rightarrow 0} [S(q, C)]^{-1} = \frac{1}{M} \quad (1.18)$$

Dans le cas d'une solution diluée et pour $qR_g > 1$, $S(q) = P(q)$, où $P(q)$ est un terme intramoléculaire appelé *facteur de forme* de la molécule en solution :

$$P(q) = \frac{1}{N^2} \sum_{n,m}^{1,N} \langle e^{i(q|\vec{r}_m - \vec{r}_n|)} \rangle \quad (1.19)$$

où N est le nombre des particules constituant la molécule et \vec{r}_m est le vecteur position de la particule m . Le facteur de forme d'une sphère est :

$$P(q) = \left[\frac{3(\sin qR - qR \cos qR)}{(qR)^3} \right]^2 \quad (1.20)$$

1.3. Diffusion quasi élastique de la lumière par une solution

Quand une onde électromagnétique est envoyée dans une solution, les particules du soluté sont polarisées : un *moment de dipole induit* est créé. Si on appelle $\hat{\alpha}$ le tenseur de polarisation, $\vec{\mu}$ le moment du dipole induit et $\vec{E}(t)$ le champ électrique incident

$$\vec{\mu}(t) = \hat{\alpha} \cdot \vec{E}(t)$$

Considérons le cas de macromolécules en solution. Dans le cas le plus simple, on peut considérer les macromolécules du soluté de forme sphérique ; dans ce cas $\vec{\mu}$ est parallèle à $\vec{E}(t)$ et α est une quantité scalaire. En accord avec la théorie classique de la diffusion, un dipole oscillant dans le temps produit un rayonnement électromagnétique ; le champ électrique diffusé est, alors, proportionnel aux variations de la polarisation : $\alpha(t)e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}(t)}$ où $\vec{r}(t)$ est le vecteur position du centre de masse de la molécule. $\alpha(t)$ varie à cause des mouvements de vibrations et de rotations de la macromolécule et $e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}(t)}$ à cause de ses mouvements translationels. Jusqu'à présent nous avons négligé le mouvement des particules du solvant. Cette approximation est correcte dans la plupart des cas car la polarisabilité des macromolécules est typiquement beaucoup plus importante que celle des particules du solvant. De plus, les particules du solvant bougent beaucoup plus rapidement

que les macromolécules et on peut séparer les mouvements du polymère et ceux du solvant.

Quand la solution est assez diluée de façon qu'il est possible de négliger les interactions entre différentes molécules du soluté, si il y a N macromolécules présentes dans le volume de diffusion V , le champ électrique diffusé élastiquement (ou quasi élastiquement) au temps t est la superposition des champs électriques diffusés par les N particules et son amplitude peut être écrite :

$$E_s(q, t) = \sum_{j=1}^N E_j(q, t) = \sum_{j=1}^N b_j(t) e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_j(t)} \quad (1.21)$$

où $\vec{r}_j(t)$ est la position de la particule j et $b_j(t)$ est son amplitude de diffusion qui dépend de la polarisabilité moléculaire $\alpha_j(t)$. Dans ce cas la fonction de distribution de $E_s(q, t)$ est une gaussienne de valeur moyenne nulle dont l'écart type est :

$$\Delta E_s(q, t) = \langle E_s^2(q, t) \rangle - \langle E_s(q, t) \rangle^2 = \langle E_s^2(q, t) \rangle \quad (1.22)$$

Afin d'établir les temps caractéristiques de la dynamique de ce système, introduisons la fonction de corrélation du champ électrique diffusé :

$$G^{(1)}(q, t) = \langle E_s^*(q, 0) E_s(q, t) \rangle \quad (1.23)$$

où $\langle \dots \rangle$ représente la moyenne calculée sur tous les états microscopiques possibles, i.e. c'est la moyenne d'ensemble. Puisque les seules particules qui contribuent à la fonction (1.23) sont celles qui sont dans le volume de diffusion V au temps initial ($t = 0$), $b_j(t)$ peut être définie de façon que :

$$b_j(t) = \begin{cases} b_j(0) = 1 & \text{si la particule est dans le volume de diffusion} \\ 0 & \text{autrement} \end{cases} \quad (1.24)$$

Si la solution est très diluée les positions des différentes particules sont statistiquement indépendantes et l'éq.1.23 s'écrit :

$$G^{(1)}(q, t) = \left\langle \sum_{j,k=1}^N b_j(0) b_k(t) e^{i\vec{q} \cdot [\vec{r}_k(t) - \vec{r}_j(0)]} \right\rangle = \left\langle \sum_{j=1}^N b_j(0) b_j(t) e^{i\vec{q} \cdot \Delta \vec{r}_j(t)} \right\rangle \quad (1.25)$$

où $\Delta \vec{r}_j(t) = [\vec{r}_j(t) - \vec{r}_j(0)]$. Etant donné que $(b_j(t) b_j(0)) = b_j^2(0)$ à $t = 0$ et $(b_j(t) b_j(0)) = 0$ quand la particule j sort du volume de diffusion, l'échelle temporelle des variations de $b_j(t) \cdot b_j(0)$ est liée au temps nécessaire à la macromolécule j pour parcourir une distance $L = V^{1/3}$. Le temps caractéristique de diffusion de la particule est donc :

$$\tau = L^2 / D \quad (1.26)$$

où D est le coefficient de diffusion de la particule.

La quantité $e^{i\vec{q} \cdot \Delta \vec{r}_j(t)}$ devient sensiblement différente de 1 pour des temps tels que $\Delta \vec{r}_j(t) \simeq (\vec{q})^{-1}$. Son temps caractéristique est donc :

$$\tau_q = (q^2 D)^{-1} \quad (1.27)$$

Si nous comparons ces deux temps caractéristiques (eq.1.26 et eq.1.27) nous trouvons :

$$\frac{\tau}{\tau_q} = (qL)^2$$

Dans une expérience de diffusion de lumière $q \sim 10^5 \text{ cm}^{-1}$ et $L \simeq 10^{-2} \text{ cm}$; $\frac{\tau}{\tau_q} \sim 10^6$ et donc on peut faire l'approximation suivante :

$$b_j(0) b_j(t) \simeq b_j(0) b_j(0) = b_j(0)$$

Puisque la quantité $e^{i\vec{q} \cdot \Delta \vec{r}_j(t)}$ fluctue beaucoup plus rapidement que $(b_j(0) b_j(t))$ on peut considérer ces deux quantités statistiquement indépendantes et on peut remplacer $(b_j(0) b_j(t))$ par sa valeur au temps initial $b_j(0)$:

$$G^{(1)}(q, t) = \left\langle \sum_{j=1}^N b_j(0) e^{i\vec{q} \cdot [\vec{r}_j(0) - \vec{r}_j(t)]} \right\rangle$$

En outre, $e^{i\vec{q} \cdot \Delta \vec{r}_j(t)}$ étant dépendant seulement du déplacement $\Delta \vec{r}_j(t)$, cette quantité doit avoir les mêmes propriétés statistiques indépendamment de la particule j . On peut, donc, écrire :

$$G^{(1)}(q, t) = \langle e^{i\vec{q} \cdot [\vec{r}_j(0) - \vec{r}_j(t)]} \rangle \left\langle \sum_{j=1}^N b_j(0) \right\rangle \quad (1.28)$$

Si on définit la fonction :

$$F_s(q, t) = \langle e^{i\vec{q} \cdot [\vec{r}_j(0) - \vec{r}_j(t)]} \rangle \quad (1.29)$$

et puisque $\langle \sum_{j=1}^N b_j(0) \rangle = \langle N \rangle$, l'équation 1.23 devient :

$$G^{(1)}(q, t) = \langle N \rangle F_s(q, t) \quad (1.30)$$

La fonction $F_s(q, t)$ est appelée *Fonction Intermédiaire de Diffusion*. Il est possible de démontrer que $F_s(\vec{q}, t)$ est la transformée de Fourier de la *Fonction de Distribution de Probabilité* $G_s(\vec{R}, t)$:

$$G_s(\vec{R}, t) = \left\langle \delta \left[\vec{R} - (\vec{r}_j(0) - \vec{r}_j(t)) \right] \right\rangle \quad (1.31)$$

$G_s(\vec{R}, t) d^3 R$ peut être vue comme la probabilité de trouver une particule dans les alentours $d^3 R$ de \vec{R} au temps t si elle était en $\vec{R} = 0$ à l'instant de temps $t = 0$. Pour une particule en mouvement brownien cette probabilité suit une fonction de distribution gaussienne [2] :

$$G_s(\vec{R}, t) = \left[\frac{2\pi}{3} \langle \Delta R^2(t) \rangle \right]^{-3/2} e^{\frac{-3R^2}{2\langle \Delta R^2(t) \rangle}}$$

où $\langle \Delta R^2(t) \rangle$ est le déplacement moyen carré de la particule. $F_s(\vec{q}, t)$ étant la transformé de Fourier de $G_s(\vec{R}, t)$, on trouve :

$$F_s(\vec{q}, t) = e^{\frac{-q^2 \langle \Delta R^2(t) \rangle}{6}} \quad (1.32)$$

Pour une particule qui *diffuse* sous l'effet de l'agitation thermique :

$$\langle \Delta R^2(t) \rangle = 6Dt \quad (1.33)$$

où D est le *coefficient de diffusion* de la particule. Ce coefficient de diffusion est lié au *rayon hydrodynamique* R_H par la relation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (1.34)$$

où T est la température et η est la viscosité du solvant. R_H peut être défini de la manière suivante : une particule en solution a des interactions hydrodynamiques avec les molécules du solvant et, à cause de ces interactions, lorsque la particule se déplace, elle entraîne avec elle tout ou partie du solvant contenu dans son volume. Son déplacement est équivalent à celui d'une sphère impénétrable (sphère hydrodynamique) de rayon R_H . Ce rayon est caractéristique de la particule et il est proportionnel à sa taille R . Au cours du déplacement l'écoulement du solvant s'effectue autour de cette sphère qui rencontre une friction $f = 6\pi\eta R_H$. En substituant cette expression dans l'éq.1.34 on peut écrire le coefficient de diffusion de la particule :

$$D = \frac{k_B T}{f} \quad (1.35)$$

La fonction intermédiaire de diffusion (eq.1.29) dans le cas d'une solution de particules en mouvement brownien a la même forme que dans les équations 1.32 et 1.33.

Considérons, maintenant, le cas de la diffusion par des macromolécules (par exemple des polymères) dans une solution très diluée de façon que l'on puisse négliger les interactions intermoléculaires. Si chaque molécule est constituée de N segments identiques de longueur l , on peut montrer [2] que la fonction de corrélation du champ électrique diffusé est :

$$G^{(1)}(q, t) = (\vec{n}_i \cdot \vec{n}_f) \langle N \rangle \alpha_M^2 S(q, t) \quad (1.36)$$

où α_M est la polarisabilité moléculaire et $S(q, t)$ est appelé *facteur de structure dynamique*. Il est défini par :

$$S(q, t) = \frac{1}{N^2} \left\langle \sum_{l,m=1}^N e^{i\vec{q} \cdot [\vec{r}_l(t) - \vec{r}_m(0)]} \right\rangle \quad (1.37)$$

où $\vec{r}_l(t)$ est la position du segment l à l'instant t . Si on appelle $\vec{r}_G(t)$ la position du centre de gravité de la macromolécule à l'instant t , on peut écrire :

$$S(q, t) = \frac{1}{N^2} \left\langle \sum_{l,m=1}^N e^{i\vec{q} \cdot [\vec{r}_G(t) - \vec{r}_G(0)] + i\vec{q} \cdot [\vec{r}_l(t) - \vec{r}_G(t)] - i\vec{q} \cdot [\vec{r}_m(0) - \vec{r}_G(0)]} \right\rangle \quad (1.38)$$

Les deux derniers termes sont négligeables pour $qR \ll 1$, où R est la taille de la macromolécule (on n'est pas sensible aux fluctuations internes de la chaîne). Dans ce cas :

$$F_s(q, t) = \langle e^{i\vec{q} \cdot [\vec{r}_G(t) - \vec{r}_G(0)]} \rangle = S(q, t) \quad (1.39)$$

Pour une solution diluée de macromolécules en mouvement brownien on peut alors écrire :

$$S(q, t) = e^{-q^2 D_G t} \quad (1.40)$$

où D_G est le coefficient de diffusion translationnel relatif au centre de gravité de la macromolécule.

1.4. Techniques en diffusion quasi élastique de la lumière

En diffusion quasi élastique de la lumière nous mesurons les fonctions de corrélation *temporelles* du champ électrique et de l'intensité diffusée, la moyenne temporelle d'une grandeur quelconque $X(t)$ étant définie :

$$\langle X \rangle_T = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T X(t) dt \quad (1.41)$$

Le rayonnement diffusé est envoyé dans un *photomultiplicateur* (P.M.) qui mesure l'intensité de la lumière. Les photons qui arrivent dans le photomultiplicateur produisent des impulsions de courant par effet photoélectrique (photocourant). L'intensité diffusée est mesurée par le détecteur en terme de nombre de photocourant ; ce nombre est donc proportionnel au carré du champ électrique qui y arrive. La relation entre le spectre de courant photoélectrique et le spectre optique dépend très fortement de la nature statistique du signal optique ainsi que du processus de détection. Pour un détecteur idéal la distribution de probabilité d'enregistrer $n(t)$ impulsions de photocourant dans un temps d'échantillonnage T est une fonction de Poisson [6]. Il est possible de démontrer que :

$$\langle I(t)I(t + \tau) \rangle \propto \langle n(t)n(t + \tau) \rangle \quad (1.42)$$

Les techniques de détection de la lumière diffusée peuvent être subdivisées en trois catégories selon que :

- la lumière diffusée qui arrive au photomultiplicateur est convoluée avec elle même (technique *d'autobattement* ou *self-beating technique*)
- la lumière diffusée qui arrive au photomultiplicateur est convoluée avec avec un intense faisceau de référence, généralement une portion de la radiation incidente qui agit comme Oscillateur Local. Selon que la fréquence de l'oscillateur local est la même que la fréquence de la radiation incidente, cette technique est appelée *homodyne* ou *hétérodyne*. La technique homodyne peut être considérée comme un cas particulier de la technique hétérodyne.

1.4.1. Technique d'autobattement

Dans une expérience de diffusion de la lumière "classique" on utilise la plupart du temps un montage expérimental dit "d'autobattement" pour lequel c'est la fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée qui est mesurée :

$$\begin{aligned}
 G^{(2)}(q, \tau) &= \langle I_s(q, t) I_s(q, t + \tau) \rangle_T & (1.43) \\
 &= \langle E_s^*(q, t) E_s(q, t) E_s^*(q, t + \tau) E_s(q, t + \tau) \rangle_T \\
 &= \langle |E_s(q, t)|^2 |E_s(q, t + \tau)|^2 \rangle_T
 \end{aligned}$$

Si le volume de diffusion V est assez grand, on peut imaginer de le subdiviser en sous-régions qui sont petites par rapport à la longueur d'onde du rayon incident ($L = V^{1/3} < \lambda$), mais qui sont suffisamment grandes pour que l'on puisse considérer indépendant le mouvement des particules dans les différentes sous-régions. L'amplitude du champ électrique diffusé total $E_s(q, t)$ peut, alors, être écrite comme la superposition de N variables indépendantes $E_s^{(n)}(q, t)$, où $E_s^{(n)}(q, t)$ est le champ électrique diffusé par chaque sous-volume :

$$E_s(q, t) = \sum_{n=1}^N E_s^{(n)}(q, t)$$

Pour $N \rightarrow \infty$ le théorème de la *limite centrale* permet de traiter $E_s(q, t)$ comme une variable aléatoire dont la fonction de distribution est une gaussienne de valeur moyenne nulle. On utilisant les propriétés statistiques de $E_s(q, t)$ on obtient :

$$G^{(2)}(q, t) = \langle E_s^*(q, t) E_s(q, t) \rangle^2 + | \langle E_s^*(q, t) E_s(q, t + \tau) \rangle |^2 \quad (1.44)$$

Si on introduit la fonction de corrélation de l'intensité et du champ électrique diffusé normalisé :

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t) I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (1.45)$$

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\langle E(t) E(t + \tau) \rangle}{\langle E \rangle^2} \quad (1.46)$$

l'éq.1.44 devient :

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta^2 |g^{(1)}(\tau)|^2 \quad (1.47)$$

où on a introduit le paramètre β^2 , qui est appelé facteur de cohérence. Le facteur de cohérence est une grandeur expérimentale, ayant une valeur comprise entre 0 et 1, qui dépend du nombre d'aires de cohérence A_{coh} . Si A est la surface du photocatode du P.M., $\beta \propto A_{coh}/A$. L'aire de cohérence peut être définie comme l'image sur le P.M. du volume diffusant. L'équation 1.47, qui est appelée *relation de Siegert*, est très importante car elle relie la fonction de corrélation de l'intensité diffusée $G^{(2)}(t)$ (eq.1.43) à la fonction de corrélation du champ électrique diffusé $G^{(1)}(t)$ (eq.1.25). On peut montrer [5] que pour un système dont le champ électrique diffusé est une variable qui suit une distribution gaussienne, la distribution de probabilité de l'intensité diffusée est :

$$P(I_s(q, t)) = \frac{1}{\langle I_s(q, t) \rangle} e^{-\frac{I_s(q, t)}{\langle I_s(q, t) \rangle}} \quad (1.48)$$

Pour des temps de corrélation courts, la fonction de corrélation de l'intensité diffusée vaut :

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} g^{(2)}(\tau) = g^{(2)}(0) = \frac{\langle I^2 \rangle}{\langle I \rangle^2} = 2$$

Pour des temps de corrélation t plus grand que le temps caractéristique des fluctuations de la lumière diffusée $I(0)$ et $I(t)$ deviennent non corrélées et donc :

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2} = 1$$

La forme de $g^{(2)}(t)$ en fonction du temps de corrélation t est montré dans la Fig. 1.1.

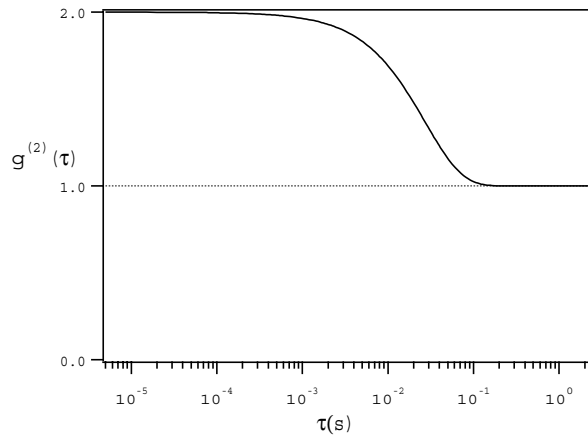


FIG. 1.1. – Fonction d'autocorrélation temporelle de l'intensité diffusée.

1.4.2. Technique hétérodyne

Dans une expérience de diffusion *hétérodyne*, le photomultiplicateur est illuminé simultanément par le faisceau diffusé par le système que l'on étudie et par un faisceau de référence constant (Oscillateur Local) qui, dans la pratique, est souvent une fraction de la radiation incidente. Si le champ électrique de l'oscillateur local est $E_{LO}(t)$, l'amplitude du champ électrique total qui arrive au détecteur à l'instant t est [2] :

$$E_{tot}(t) = E_s(t) + E_{LO}(t) \quad (1.49)$$

La fonction de corrélation de l'intensité diffusée devient, donc :

$$\begin{aligned} \langle I(t) I(t + \tau) \rangle = & \langle (E_s(t) + E_{LO}(t)) (E_s^*(t) + E_{LO}(t)) \cdot \\ & \cdot (E_s(t + \tau) + E_{LO}(t + \tau)) (E_s^*(t + \tau) + E_{LO}^*(t + \tau)) \rangle \end{aligned} \quad (1.50)$$

La fonction de corrélation de l'intensité diffusée est composée de 16 termes. Mais si on choisie les conditions expérimentales de façon que :

- les fluctuations de l'oscillateur local sont négligeables
- le champ de l'oscillateur local et le champ électrique diffusé sont statistiquement indépendants

on peut séparer le signal provenant de l'oscillateur local de celui provenant du système étudié. Dans ces conditions, parmi les 16 termes de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée (eq.1.50), huit sont nuls parce que $\langle E_{LO} \rangle = \langle E_s \rangle = 0$, et deux sont des termes de courant continu. La fonction de corrélation de l'intensité diffusée $G^{(2)}(\tau)$ [6] devient :

$$G^{(2)}(\tau) = \langle I \rangle^2 + |G^{(1)}(\tau)|^2 + 2\langle I_{LO} \rangle Re(G^{(1)}(\tau)) \quad (1.51)$$

où $\langle I_s \rangle$ est l'intensité diffusée par le système que l'on étudie, $\langle I_{LO} \rangle$ est l'intensité diffusée par la partie statique et $\langle I \rangle$ est l'intensité diffusée totale ($I_{LO} + I_s$). I_{LO}^2 est un terme de photocourant continu.

Si on peut réaliser la condition suivante :

$$\langle I_{LO} \rangle \gg \langle I_s \rangle \quad (1.52)$$

l'éq.1.50 dévient :

$$\langle I(t) I(t + \tau) \rangle \simeq I_{LO}^2 + 2I_{LO} Re(G^{(1)}(\tau)) \quad (1.53)$$

où $G^{(1)}(\tau) \propto F_s(\tau)$.

Avec la technique hétérodyne (eq. 1.53) nous pouvons mesurer la dynamique de systèmes ayant des temps de relaxation τ grands par rapport aux temps caractéristiques des fluctuations de l'intensité de la radiation incidente.

L'avantage de cette technique par rapport à la technique d'autobattement est que dans le cas hétérodyne il n'est pas nécessaire de supposer que le champ électrique

diffusé total suit une distribution gaussienne. Par contre l'inconvénient de cette technique est le suivant : pour que l'on puisse mesurer correctement $g^{(1)}(\tau)$ il faut que la relation 1.52 soit réalisée, sans quoi il est très difficile de séparer la contribution hétérodyne de la contribution d'autobatteement (eq.1.51).

1.5. QELS par un système non ergodique

En mécanique statistique un système est dit *ergodique* s'il traverse dans un temps fini toutes les configurations possibles de l'espace des phases accessibles. Pour un système ainsi défini le *théorème de l'ergodicité* montre que la moyenne temporelle est égale à la moyenne calculée sur l'ensemble de ses configurations possibles [4]. Par diffusion quasi élastique de la lumière nous mesurons une fonction (1.43) :

$$G_T^{(2)}(\tau) = \langle I(t) I(t + \tau) \rangle_T \quad (1.54)$$

qui est la *moyenne temporelle* de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée. Si le système que nous étudions est constitué de particules qui sont libres de diffuser dans un volume V (par exemple une solution de particules qui diffusent par effet de l'agitation thermique), si l'on moyenne pendant un temps assez long pour que le système puisse évoluer à travers une fraction importante de toutes les configurations possibles de l'espace des phases, la moyenne temporelle de la propriété qu'on mesure donne une bonne estimation de sa moyenne d'ensemble [8]. En vertu du théorème de l'ergodicité nous pouvons écrire :

$$G_T^{(2)}(\tau) = G_E^{(2)}(\tau) = \langle I \rangle^2 + | \beta F(q, \tau) |^2 \quad (1.55)$$

où $F(q, \tau)$ est le facteur de structure dynamique (équation 1.38).

Toutefois, lorsque nous étudions un système dont les particules qui le composent sont localisées autour de positions fixes, pendant le temps d'échantillonnage elles ne peuvent explorer qu'une région limitée du volume et donc qu'une fraction de toutes les configurations possibles de l'espace des phases.

On définit un tel système comme *non ergodique*. Pour ces systèmes la fonction $G_{T,p}^{(2)}(\tau)$ mesurée sur un sous-volume p est différente d'une région à l'autre et une mesure sur un seul sous-volume n'est pas représentative du système total :

$$G_{T,p}^{(2)}(\tau) \neq G_E^{(2)}(\tau)$$

Dans ces systèmes la relation de Siegert (eq.1.55) n'est pas applicable et le facteur de structure, qui est une propriété d'ensemble, ne peut pas être extrait à partir d'une seule mesure de $G_T^{(2)}(\tau)$.

Différentes méthodes ont été proposées pour analyser ces systèmes. La méthode la plus sûre est de réaliser expérimentalement une moyenne d'ensemble, ce qui peut être effectué en mesurant la fonction de corrélation temporelle de l'intensité

diffusée dans un grand nombre de sous-régions de l'échantillon et de calculer la moyenne de ces fonctions : si les sous-régions ainsi explorées sont assez nombreuses on construit, ce faisant, une moyenne d'ensemble.

On peut en fait montrer [8] que la moyenne d'ensemble de la moyenne temporelle d'une variable dynamique $A_p(t)$ (où $p = 1, \dots, P$ sont P différentes positions de l'échantillon où bien P différents points de l'espace des phases accessibles au système) est égal à sa moyenne d'ensemble :

$$\begin{aligned}\langle A_p \rangle_T &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T dt A_p(t) \\ \langle A \rangle_E &= \lim_{P \rightarrow \infty} \frac{1}{P} \sum_{p=1}^P A_p(t) \\ \langle \langle A_p \rangle_T \rangle_E &= \lim_{P \rightarrow \infty} \frac{1}{P} \left(\sum_{p=1}^P \left(\lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T dt A_p(t) \right) \right) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T \langle A \rangle_E dt = \\ &= \langle \langle A \rangle_E \rangle_T = \langle A \rangle_E\end{aligned}\quad (1.56)$$

Nous avons deux manières possibles pour réaliser expérimentalement la moyenne d'ensemble de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée :

- on mesure la fonction de corrélation de l'intensité diffusée non normalisée dans différentes régions de l'échantillon et on en fait la moyenne :

$$g_E^{(2)}(q, t) = \frac{\langle \langle I_p(q, 0) I_p(q, t) \rangle \rangle_T}{\langle \langle I_p(q, t) \rangle \rangle_T^2} = \frac{\frac{1}{P} \sum_{p=1}^P \langle I_p(q, 0) I_p(q, t) \rangle_T}{\left[\frac{1}{P} \sum_{p=1}^P \langle I_p(q) \rangle_T \right]^2} \quad (1.57)$$

- on fait une seule mesure de $G_T^{(2)}(\tau)$ pendant laquelle on fait translater ou tourner lentement l'échantillon de façon que différents volumes soient illuminés :

$$g_E^{(2)}(q, t) = \frac{\langle \langle I_p(q, 0) I_p(q, t) \rangle \rangle_T}{\langle \langle I_p(q, t) \rangle \rangle_T^2} = \frac{\frac{1}{P} \langle \sum_{p=1}^P I_p(q, 0) I_p(q, t) \rangle_T}{\left[\frac{1}{P} \langle \sum_{p=1}^P I_p(q) \rangle_T \right]^2} \quad (1.58)$$

Pour ce deuxième cas il faut distinguer deux situations différentes [9] :

- * si le volume de diffusion est beaucoup plus petit que la largeur du faisceau incident et si l'échantillon est translaté continûment le signal ne change pas ;
- * si le volume de l'échantillon est très grand par rapport à la largeur du faisceau incident, pendant la translation où la rotation de l'échantillon une partie des particules qui sont initialement dans le volume de diffusion vont sortir et d'autres qui n'y sont pas vont y entrer. L'intensité diffusée est, alors, corrélée jusqu'à ce que la majeure partie des particules qui étaient initialement dans le volume de diffusion soient remplacées. Si le système est

ergodique, traduire l'échantillon d'une distance $\frac{2\pi}{q}$ pendant une durée au moins égale au temps nécessaire à une particule pour parcourir une distance $\frac{2\pi}{q}$, donne le même résultat.

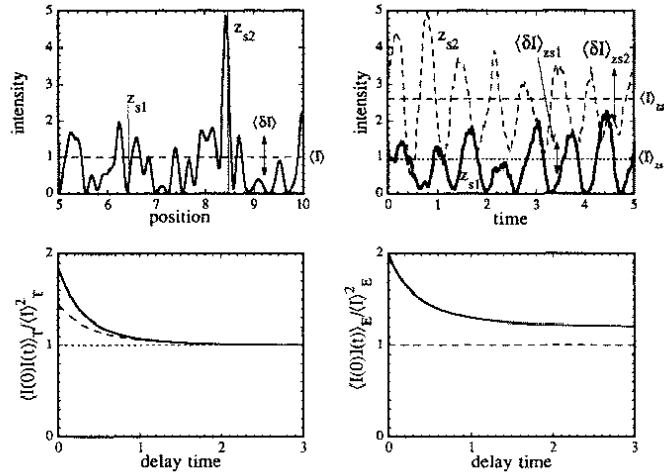


FIG. 1.2. – *Système non ergodique. En haut : à gauche variation de l'intensité diffusée avec la position d'échantillonnage et à droite son évolution dans le temps pour deux différents points dans le détecteur (z_{s1}, z_{s2}). $\langle I \rangle$ et $\langle \delta I \rangle$ représentent la valeur moyenne de l'intensité diffusée et sa variance respectivement. En bas : à gauche $g_T^2(q, \tau)$; à droite $g_E^2(q, \tau)$ [9].*

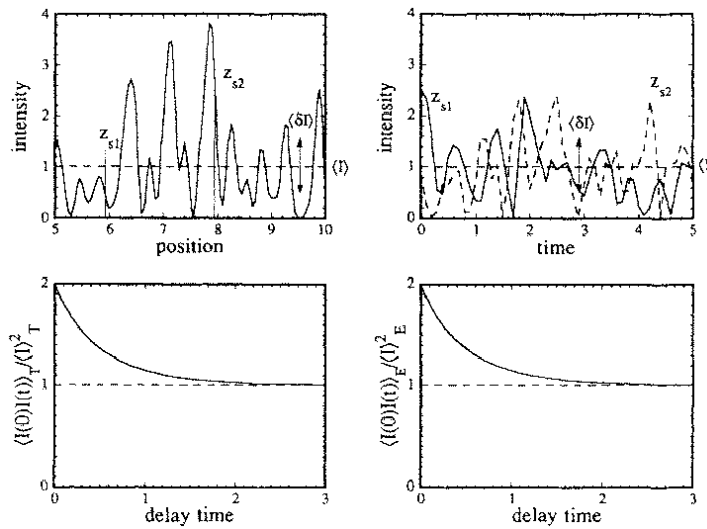


FIG. 1.3. – *Système ergodique. Même fonctions que dans la Fig. 1.2 [9].*

Théoriquement ces deux méthodes donnent le même résultat (eq.1.56) à condition que P soit suffisamment grand ou, dans la deuxième méthode, qu'on passe un nombre suffisamment élevé de fois par les mêmes sous-volumes.

Dans les figures 1.2 et 1.3 sont représentées respectivement pour un système non ergodique et pour un système ergodique, la variation de l'intensité diffusée en fonction de la position d'échantillonnage et, pour deux endroits de l'échantillon, l'évolution temporelle de l'intensité diffusée. Les moyennes temporelles et d'ensemble des fonctions de corrélation de l'intensité diffusée sont aussi présentées pour les deux systèmes.

Il est importante d'observer sur la figure 1.2 en bas à gauche, que la moyenne temporelle de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée est différente pour deux endroits distincts de l'échantillon.

1.6. Cinétique de gélification par QELS

1.6.1. Diffusion par les gels

D'un point de vue dynamique, une solution semi-diluée de polymère forme un réseau transitoire qui est liquide au delà du temps de reptation des chaînes [46]. La gélification d'une telle solution est une transition de connectivité : des liens se forment entre chaînes de polymère et le réseau devient permanent au delà d'un certain nombre de liens. La solution a alors une élasticité permanente.

Les chaînes, qui sont libres de diffuser dans tout le volume V dans la phase sol, sont contraintes dans la phase gel à fluctuer autour de positions fixes à cause des liens entre les chaînes.

Les forces qui agissent sur un gel sont au nombre de deux : une force *osmotique* qui essaye d'équilibrer la concentration et une force *élastique* qui essaye de maintenir le réseau dans sa position d'équilibre.

Les expériences de diffusion de la lumière sont sensibles aux propriétés visco-élastiques de ces systèmes.

Premières études : approche classique

Tanaka [10] a montré le premier qu'il est possible mesurer par QELS les propriétés élastiques du réseau et les interactions entre le polymère et le solvant.

Dans son modèle, un gel en présence du solvant (gel "gonflé") est présenté comme un réseau continu de polymères (ce qui confère au gel les propriétés élastiques) dans lequel le solvant remplit l'espace non occupé par le polymère. Le polymère et le solvant ayant des fluctuations thermiques, celles-ci confèrent au gel quatre différents modes selon que le réseau polymérique et le solvant bougent en phase ou en opposition de phase : deux modes *longitudinaux* et deux modes *transversaux*, chacun de ces modes ayant son propre temps caractéristique. Seuls les modes correspondant aux mouvements entre le réseau et le solvant en opposition de phase

peuvent être mesurés par QELS, le mode longitudinal pouvant être détecté par diffusion polarisée de la lumière et le mode transversal par diffusion dépolarisée. Nous nous intéressons ici seulement aux modes longitudinaux.

Tanaka [10] a montré que si $qL \gg 1$ (où $L = V^{1/3}$ est la taille de l'échantillon) la fonction d'autocorrélation du champ électrique diffusé (pour la diffusion polarisée) pour un gel peut être écrite :

$$\langle E_s(q, t) E_s(q, 0) \rangle = \frac{I_0}{c} \left(\frac{\omega_0}{c} \right)^4 \frac{\sin^2 \phi}{4\pi R^2} \left(\frac{\partial \epsilon}{\partial \rho} \right)_T^2 \rho^2 \frac{L k_B T}{K + (4/3)G} e^{-\frac{(K+(4/3)G)q^2 t}{f}} \quad (1.59)$$

où ρ est la densité du polymère, K le module de compression, G le module de cisaillement, f le coefficient de friction entre le polymère et le solvant et ϕ l'angle entre la direction du faisceau incident et diffusé.

Cette équation est valable uniquement pour les systèmes dont le champ électrique diffusé $E_s(q, t)$ a une distribution gaussienne. L'équation 1.59 peut être réécrite en fonction du *coefficient de diffusion collectif* et du *module longitudinal* M :

$$\langle E_s(q, t) E_s(q, 0) \rangle = a \left(\frac{\partial \epsilon}{\partial \rho} \right)^2 \left(\frac{\phi^2 L K_B T}{M} \right) e^{(-D_c q^2 t)} \quad (1.60)$$

a est une constante.

Le coefficient de diffusion collectif

$$D_c = \frac{K_{os} + \frac{4G}{3}}{f} \quad (1.61)$$

décrit le mouvement coopératif du réseau. Il est différent du coefficient d'auto-diffusion D (eq.1.40) qui décrit les mouvements individuels de la chaîne. Les mouvements coopératifs impliquent des gonflements et dégonflements temporaires de régions du réseau et sont appelés modes du gel.

Le module longitudinal est défini :

$$M = K_{os} + \frac{4G}{3} \quad (1.62)$$

où $K_{os} = C \left(\frac{d\pi}{dC} \right)$ est le *module osmotique*, π est la pression osmotique, C la concentration en polymère et G est le module de cisaillement (équation 1.59).

En utilisant la relation de Siegert (eq.1.47), la fonction de corrélation normalisée de l'intensité diffusée peut être écrite :

$$g^{(2)}(\tau) - 1 = \sigma_I^2 e^{-2D_c q^2 \tau} \quad (1.63)$$

où

$$\sigma_I^2 = \frac{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2} \quad (1.64)$$

Le module longitudinal M est lié à l'intensité diffusée totale à $q = 0$ par la relation suivante [16] :

$$I_s = A_0 \frac{I_0 K_B T}{M} C^2 \left(\frac{\partial \epsilon}{\partial C} \right)^2 \quad (1.65)$$

où A_0 est une constante qui dépend de la longueur d'onde de la radiation incidente, de la géométrie et des caractéristiques du P.M..

Ces relations, nous permettent de déterminer *a priori* le coefficient de diffusion collectif et le module osmotique à partir des mesures de diffusion quasi élastique de la lumière.

Expérimentalement les spectres de diffusion de la lumière sur des systèmes en cours de gélification montrent des caractéristiques communes :

- une importante diminution, dans la phase gel, de l'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée à $\tau \rightarrow 0$, σ_I^2 ;
- $\langle I_{gel} \rangle > \langle I_{sol} \rangle$, où I_{gel} est l'intensité diffusée par le gel et I_{sol} est l'intensité diffusée par la solution correspondante ;
- $g^{(2)}(\tau)$ est différent pour différents endroits de l'échantillon illuminés.

Deux différentes approches sont communément utilisées pour interpréter ces résultats : l'approche hétérodyne et l'approche non ergodique.

Approche hétérodyne

Dans l'approche hétérodyne, la variation de σ_I^2 au cours de la gélification est expliquée en supposant que le gel ne se forme pas de façon homogène. L'intensité diffusée par les inhomogénéités $\langle I_c \rangle$ est beaucoup plus importante que l'intensité diffusée par les fluctuations de la concentration $\langle I_s \rangle$. Les temps caractéristiques des fluctuations de concentrations des inhomogénéités sont très longs par rapport aux fluctuations de concentration du polymère dans le gel et elle peuvent être considérées comme de particules "immobiles". Les inhomogénéités donnent lieu à un signal statique et la fonction de corrélation de l'intensité diffusée est composée par un terme d'autobattement (qui vient de la diffusion du gel) et par un terme hétérodyne (qui vient des inhomogénéités équation 1.51).

Dans cet approche [13], le facteur de structure dynamique, qui est associé seulement à la fraction de particules "mobiles", s'écrit :

$$f_M(q, \tau) = \frac{\langle E_F(q, 0) E_F^*(q, \tau) \rangle_T}{\langle I_F(q) \rangle_T} = 1 + \frac{1}{X} \left[\left(g_T^{(2)}(q, \tau) - \sigma_I^2 \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (1.66)$$

où $(1 - X)$ est la fraction des "particules immobiles". X est défini :

$$X = \frac{\langle I_F(q) \rangle_T}{\langle I(q) \rangle_T} = 1 - (1 - \sigma_I^2)^{1/2} \quad (1.67)$$

Approche non ergodique

Dans le 1989, Pusey et Van Megen [8] ont attiré l'attention sur le fait que les gels sont des systèmes intrinsèquement non ergodiques. L'origine de cette non ergodicité vient du fait que les liaisons qui se créent entre les chaînes du polymère dans la phase gel permettent des mouvements browniens limités autour de positions fixes. La non ergodicité est révélée, entre outre, par le fait qu'une mesure sur différentes positions de l'échantillon donne lieu à des spectres différents.

Pusey et al. [8] ont montré que le champ électrique diffusé $E(q, t)$ par un système non ergodique n'est pas une variable gaussienne. Il est composé d'une partie constante, $E_c(q)$, et d'une partie qui dépend du temps, $E_F(q, t)$.

Pour un système amorphe (c'est à dire pour un système dont la longueur de corrélation entre les particules $R \ll V^{1/3}$) et tel que la longueur de corrélation des déplacements des particules autour de leurs positions d'équilibre $\Delta_j(t) \ll V^{1/3}$, on peut montrer que $E_F(t)$ est une variable gaussienne de valeur moyenne nulle, ce qui n'est pas le cas pour $E_c(q)$:

$$\begin{aligned}\langle E(q, t) \rangle &= 0 \\ \langle E(q) \rangle_T &= \langle E_F(q) \rangle_T + \langle E_c(q) \rangle_T = E_c(q)\end{aligned}\quad (1.68)$$

Le théorème de l'ergodicité est violé.

On peut montrer que l'intensité diffusée est, elle aussi, composée de la somme d'une partie constante et d'une partie qui dépend du temps :

$$I(q) = \langle I(q) \rangle_T = I_c(q) + \langle I_F(q) \rangle_T \quad (1.69)$$

où $I_c(q) = |E_c|^2$ dépend de la position de l'échantillon, c'est à dire de la configuration des particules dans un particulier sous-volume ; $I_F(q, t) = |E_F(q, t)|^2$. La fonction de corrélation de l'intensité diffusée temporelle peut être écrite, pour ces systèmes [12] :

$$g_T^{(2)}(q, \tau) - 1 = \frac{\langle E_F(q, 0) E_F^*(q, \tau) \rangle_T^2 + 2I_c(q) \langle E_F(q, 0) E_F^*(q, \tau) \rangle_T}{\langle I(q, 0) \rangle_T^2} \quad (1.70)$$

et la fonction de corrélation du champ électrique diffusé :

$$\langle E_F(q, 0) E_F^*(q, \tau) \rangle_T = \langle E_F(q, 0) E_F^*(q, \tau) \rangle_E = \langle I(q) \rangle_E \left[g_E^{(1)}(q, \tau) - g_E^{(1)}(q, \infty) \right] \quad (1.71)$$

Cette expression devient, pour $\tau \rightarrow 0$:

$$\langle I_F(q) \rangle_T = \langle I(q) \rangle_E [1 - f(q, \infty)] \quad (1.72)$$

On peut alors réécrire la fonction de corrélation de l'intensité diffusée [8] :

$$g^{(2)}(q, \tau) = 1 + Y^2 \{ [f(q, \tau)]^2 - [f(q, \infty)]^2 \} + 2Y(1 - Y)[f(q, \tau) - f(q, \infty)] \quad (1.73)$$

où

$$Y = \frac{\langle I(q) \rangle}{\langle I(q) \rangle_T} \quad (1.74)$$

Y est un paramètre qui donne une mesure de la déviation à l'ergodicité. Pour $Y = 1$ on retrouve la relation 1.43 d'un système ergodique.

$f(q, \infty) = \lim_{\tau \rightarrow \infty} f(q, \tau)$, $f(q, \tau)$ étant le facteur de structure normalisé $\frac{F(q, \tau)}{F(q, 0)}$. Dans un système ergodique $f(q, \infty) = 0$: dans un tel système les particules peuvent bouger librement et après un temps suffisamment long il n'existe plus de corrélation entre elles.

Dans un système non ergodique, au contraire, les particules restent corrélées même pour des temps très longs et $f(q, \infty) \neq 0$ est la signature d'une telle corrélation. On peut encore montrer que :

$$\sigma_I^2 = Y^2 [1 - f(q, \infty)] [2Y^{-1} - 1 + f(q, \infty)] \quad (1.75)$$

Pour finir, nous pouvons montrer que le facteur de structure dynamique $f(q, \tau)$ peut être écrit :

$$f(q, \tau) = 1 + \frac{1}{Y} \left[\left(g_T^{(2)}(q, \tau) - \sigma_I^2 \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (1.76)$$

Une comparaison entre les approches hétérodyne et non ergodique révèle une similitude entre ces deux approches : en particulier nous pouvons observer que l'équation 1.70 a la même forme que l'équation 1.51 pour un système dont la fonction de corrélation de l'intensité diffusée est constituée d'une partie hétérodyne et d'une partie d'autobattement. Nous pouvons aussi observer que les équations 1.66 et l'éq.1.76 sont formellement identiques. Cette similitude n'est, cependant, que formelle, l'approche du problème étant tout à fait différente. Cette différence est évidente dans la définition de X et Y .

1.6.2. Diffusion de particules sondes dans un gel

Depuis une dizaine d'années une nouvelle technique de QELS a été développée qui consiste en l'étude de la diffusion de particules sondes dispersées dans le gel [17]-[32]. Les billes bougent par effet de l'agitation thermique et si elles diffusent la lumière davantage que le gel, la fonction de corrélation de l'intensité diffusée par ce système est dominée par les particules. Les billes ressentent le milieu environnant lors de leur diffusion et la fonction de corrélation de l'intensité diffusée peut être reliée aux propriétés visco-élastiques du milieu, dans le cas de la diffusion dans une solution de polymère. Nous pouvons ainsi étudier la transition de gélification.

Les billes qui dans la phase sol peuvent bouger dans tout le volume, restent "piégées" dans les mailles du réseau dans la phase gel.

Les paramètres qui gouvernent le mécanisme sont la taille des billes R , la longueur de corrélation des fluctuations de concentration du réseau ξ (qui est une quantité qui décrit la distance moyenne entre deux nœuds du réseau) et le vecteur de diffusion q . Il faut distinguer deux situations selon que $q\xi < 1$ ou que $q\xi \simeq 1$.

($q\xi < 1$) : si $R < \xi$ les particules se comportent comme des "particules libres" en mouvement brownien et leur dynamique est la même qu'en solution.

Si $R > \xi$ les billes sont piégées dans le gel et leur dynamique est liée à la dynamique du réseau.

($q\xi \simeq 1$) : dans ce cas on sonde des mouvements locaux des billes : si $R \geq \xi$ la dynamique des particules à temps long est gouvernée par la viscosité macroscopique du système plutôt que par la viscosité du solvant.

Plusieurs études de QELS ont été effectuées sur des gels de nature différente (gel physique et gel chimique de polymères ou protéines) en présence de billes sondes ou pendant la transition de gélification. Comme dans le cas de la diffusion par un gel, la transition de gélification est accompagnée par une importante diminution de l'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée à $\tau \rightarrow 0$ et les principales interprétations de ce phénomène sont, comme pour la diffusion dans les gels, l'approche hétérodyne et l'approche non ergodique.

Dans le premier cas [18], si on néglige les mouvements des chaînes, on peut imaginer qu'après la gélification, une partie des billes reste confinée dans les mailles du réseau telles que $R < \xi$ où elles restent immobilisées. Ces particules immobiles diffusent la lumière statiquement et contribuent de façon hétérodyne à la fonction de corrélation de l'intensité diffusée.

Dans le deuxième cas, nous pouvons imaginer que les billes restent piégées dans les mailles du réseau où elles fluctuent autour de positions d'équilibre. Les particules ne pouvant pas explorer toutes les configurations spatiales, le système est non ergodique.

Les équations du paragraphe 1.6.1 relatives à l'analyse des données dans le cas de la diffusion de la lumière dans les gels, restent les mêmes dans le cas de la diffusion des billes dans le gel.

Pour conclure, Mason et Weitz [33] ont proposée, en 1995, une nouvelle application de cette méthode : ils montrent que cette technique permet de mesurer le module de cisaillement dépendant de la fréquence $G(\omega)$ d'un fluide complexe (une solution de polymères et billes de latex, par exemple). Ils appellent cette technique *microrhéologie*.

La technique exploite le *théorème de fluctuations et dissipation* [3] qui permet de relier la relaxation des excitations thermiques des particules sondes aux propriétés visco-élastiques du milieu environnant.

Le principe de cette technique est le suivant : la diffusion quasi élastique de la lumière permet de mesurer l'évolution temporelle du *déplacement moyen carré* $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ de particules sondes dispersées dans le fluide. Le déplacement moyen

carré reflète directement, dans un système complexe, la réponse du système : soit la dissipation de l'énergie due à la réponse visqueuse, soit l'emmagasinage de l'énergie due à la réponse élastique.

Dans le cas limite de la diffusion dans un fluide purement visqueux, pour lequel les particules diffusent librement, $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ augmente linéairement avec le temps. A l'inverse, dans la limite d'un fluide purement élastique, $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ augmente avec le temps jusqu'à atteindre une valeur limite $\langle \Delta r^2(t) \rangle_{\max}$. Dans ce cas l'énergie thermique des particules est équilibrée par l'énergie élastique. Mason et al. [34] ont alors montré que le module élastique statique G' est lié à $\langle \Delta r^2(t) \rangle_{\max}$ parmi la relation :

$$G' \propto \frac{k_B T}{R \langle \Delta r^2(t) \rangle_{\max}} \quad (1.77)$$

Cette relation peut être extrapolée pour le module élastique complexe $\tilde{G}(\omega)$ en supposant que la relation de Stokes Einstein (eq.1.34) reste valable pour des fréquences non nulles.

Mason et al. [33]-[35] ont étudié, par *Diffusion Wave spectroscopy* (DWS), le module élastique de différents systèmes : ils mesurent des valeurs de $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ en très bon accord avec les valeurs trouvées par rhéologie sur les mêmes systèmes.

L'avantage de la microrhéologie par rapport à la rhéologie est qu'elle permet l'étude du comportement élastique des systèmes visco-élastiques pour une large gamme de fréquences : $10^{-2} < \omega < 10^6 \text{ sec}^{-1}$ (les fréquences accessibles par rhéologie sont inférieures à 10^2); la microrhéologie est, en outre, beaucoup moins invasive que la rhéologie. La microrhéologie, et plus en général la diffusion de la lumière, sont donc des techniques très puissantes pour l'étude de systèmes fragiles tels que les gels.

1.7. Conclusion

Dans ce chapitre j'ai résumé les principales théories et les principaux problèmes qu'on rencontre lorsque nous étudions les gels de polymère en diffusion quasi élastique de la lumière.

La diffusion de la lumière est une technique qui en principe permet de mesurer le module osmotique et le module de cisaillement, puisqu'elle est sensible aux modes longitudinaux.

Les études sur les gels montrent que l'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée à $\tau \rightarrow 0$ est beaucoup plus petite dans le gel que dans la solution correspondante et que l'intensité diffusée par le gel est plus grande que l'intensité diffusée par la solution.

Trois modèles sont communément utilisés pour analyser les données relatives à la diffusion quasi élastique dans les gels. Un modèle classique qui relie directement le coefficient de diffusion et l'intensité diffusée aux modules de cisaillement et

osmotique, le modèle que j'ai appelé "approche hétérodyne" et le modèle que j'ai appelé "approche non ergodique". Le principe de base de ces deux derniers modèles est le même : une partie des fluctuations qui sont présentes dans la solution sont gelées lorsque le système est gélifié.

Dans le modèle "hétérodyne" les fluctuations gelées diffusent statiquement la lumière et contribuent à l'intensité diffusée à $\tau \rightarrow \infty$. La fonction de corrélation de l'intensité diffusée est un mélange d'hétérodyne et d'autobatteement. En mesurant et en soustrayant la contribution hétérodyne, nous pouvons extraire le facteur de structure des "particules mobiles" à partir d'une mesure de $g_T^{(2)}(q, \tau)$.

Le modèle non ergodique est basé sur le fait que les liens qui se forment entre les chaînes du polymère dans la phase gel, forcent les chaînes à fluctuer autour de positions fixes. Le système devient non ergodique car il ne peut plus explorer tout l'espace des phases. Le théorème de l'ergodicité, qui établit l'égalité entre la moyenne temporelle et la moyenne d'ensemble, n'est plus valable. Il faut alors calculer la moyenne sur l'ensemble en mesurant, par exemple, la fonction de corrélation pour un nombre élevé de positions de l'échantillon et en en faisant la moyenne. Ceci peut être réalisé en faisant translater ou tourner doucement l'échantillon pendant la mesure.

Une méthode astucieuse a été proposée par Pusey et al. [8] qui permet, à partir de la mesure de la moyenne d'ensemble de l'intensité diffusée par le gel $\langle I \rangle_E$, de recalculer la fonction de corrélation temporelle de l'intensité diffusée $g_T^{(2)}(q, \tau)$ en fonction du paramètre $Y = \frac{\langle I \rangle_E}{\langle I \rangle_T}$. Nous pouvons ainsi extraire le facteur de structure à partir de $g_T^{(2)}(q, \tau, Y)$.

Les équations qui permettent de calculer le facteur de structure à partir des données expérimentales de $g_T^{(2)}(q, \tau)$ par le modèle hétérodyne et celui de Pusey (équations 1.66 et 1.76) sont très différentes, même si elles montrent une égalité formelle.

Pour finir j'ai introduit une application de la diffusion de la lumière à l'étude des gels, qui consiste en l'étude de la diffusion par effet de l'agitation thermique de particules sondes dans le gel. La dynamique des billes reflète les propriétés visco-élastiques du milieu environnant et, selon le type de gel et selon la taille des billes par rapport au vecteur de diffusion et à la taille des mailles du réseau, nous pouvons, par exemple, mesurer les propriétés visco-élastiques du système. Cette technique étant beaucoup moins invasive par rapport à la rhéologie, permet l'étude de systèmes tels que les gels. Les problèmes inhérents à la non ergodicité ou à un partial heterodyning de la lumière sont les mêmes que pour la diffusion de la lumière dans les gels.

2. QELS et microrhéologie : application à l'étude de la gélification

Dans ce chapitre nous discutons les résultats concernant des mesures de diffusion de la lumière sur une solution de gélatine et de billes de latex en cours de gélification. Nous montrerons que nous pouvons relier la dynamique des billes de latex au comportement critique de la gélification, dans les conditions expérimentales choisies.

Le chapitre est organisé de la manière suivante : après quelques généralités sur la gélatine, le phénomène critique de la gélification et les principaux résultats théoriques et expérimentaux concernant le comportement critique de la viscosité et du module de cisaillement, la première partie de ce chapitre est dédiée à la présentation des conditions expérimentales de mesure. Dans la partie centrale de ce chapitre, nous exposons l'interprétation que nous avons faite des spectres de diffusion quasi élastique de la lumière. Dans la dernière partie nous exposons les résultats concernant le comportement du système près du seuil de transition, dans la phase sol ainsi que dans la phase gel.

2.1. La gélatine

La *gélatine* est du *collagène* dénaturé. Le collagène, en tant qu'élément principal de la peau, des os, des tendons etc., est la protéine la plus abondante chez les mammifères. Il se présente sous la forme de fibres caractérisées par une forte résistance mécanique. La fibre de collagène est composée d'un assemblage de trois chaînes polypeptidiques enroulées les unes autour des autres en conformation de triple hélice. Des liaisons faibles s'établissent entre les différentes chaînes et en maintiennent la structure à triple hélice. Des ponts covalents rendent la structure peu extensible. Chaque chaîne polypeptidique a une composition en acides aminés caractérisée de la façon suivante :

- la proportion de glycine est d'environ un tiers ; elle apparaît une fois sur trois le long de la chaîne.
- la proline et l'hydroxyproline sont présentes en quantité d'environ 20%, ce qui confère à la chaîne une certaine rigidité (dans le collagène de la peau de veau Pro et HyPro sont présents en quantité $\sim 23\%$ [37]).
- les séquences Gly-Pro-X et Gly-Pro-HyPro sont fréquentes.
- les acides aminés ayant des résidus hydrophobes tels que Ile, Leu, Val sont présents, au total, en quantité d'environ 10% .

La transformation en gélatine est le résultat de la destruction de la structure fibreuse du collagène. La gélatine est soluble dans l'eau à une température d'environ 40°C . Par abaissement de la température, si la concentration initiale en gélatine est assez forte (supérieure ou égale à 0.01 g/cm^3) on obtient un gel physique. La gélification est liée à une transition conformationnelle pelote-hélice. L'association des chaînes entre elles en triples hélices entraîne la formation du réseau tridimensionnel. La transition sol gel correspond à un changement de comportement du milieu : il passe d'un état fluide à un état solide. Des travaux théoriques ont été proposés pour décrire la transition sol-gel (*percolation, champ moyen*). Ces modèles permettent de prédire le comportement critique de différentes grandeurs physiques (par exemple la viscosité, l'élasticité) au voisinage de la transition et de définir un point de gel. Des nombreuses expériences de rhéologie ont été effectuées, en fonction de la température et de la concentration, sur des solutions de gélatine en cours de gélification. Ces mesures ont permis de déterminer les valeurs des exposants critiques qui décrivent la transition de gélification. Ces études ont montrées que le modèle théorique qui décrit le mieux la transition dans le cas de la gélatine est le modèle de la percolation.

2.1.1. Théorie de la gélification

Les gels sont des réseaux macromoléculaires. Leur formation provient de la connexion aléatoire de molécules (monomères) susceptibles de se lier à au moins trois de leurs voisines. La population des molécules tridimensionnelles résultantes est soluble (d'où le terme de *sol*) jusqu'à l'apparition d'une molécule de taille infi-

nie : le *gel*. L'apparition de cette molécule marque une transition dite gélification. Il ne s'agit pas d'une transition thermodynamique, mais d'une transition critique de connectivité. Pour beaucoup de processus physiques, chimiques ou biologiques, l'association de molécules élémentaires séparées initialement les unes des autres conduit à la formation d'amas de grandes tailles, puis à celle de phases macroscopiques. La gélification en est un exemple. Par ailleurs, le terme de gélification se réfère à des systèmes différents du point de vue de la chimie ou des liaisons qui unissent les molécules élémentaires les unes aux autres. D'où la nécessité de dégager des classes d'universalité regroupant chacune tous les phénomènes de croissance et d'agrégation qui relève d'un modèle fondamental identique, indépendant des aspects locaux qui régissent la connectivité. De la même façon qu'en thermodynamique l'écart à la température critique T_c est définie par $|T - T_c|/T_c$, dans le cas de la gélification cet écart correspond au rapport $\varepsilon = |p - p_c|/p_c$, où p est le degré de connectivité c'est-à-dire la fraction de liens réalisés et p_c sa valeur au seuil de gélification. Près du seuil de gélification, beaucoup de grandeurs mesurables ont un comportement en loi de puissance lors qu'elles sont exprimées en fonction de l'écart au seuil ou l'une en fonction de l'autre. C'est le cas des grandeurs qui permettent de décrire la population des amas présents (propriétés statiques) mais aussi de celles qui décrivent leurs mouvements (propriétés dynamiques). Chacune de ces lois de comportement introduit donc un exposant différent. La réussite de la physique des phénomènes critiques est d'avoir montré l'existence d'un certain nombre de lois, reliant les exposants entre eux et réduisant le nombre d'exposants indépendants à trois. Ces lois sont dites lois d'échelle et permettent, lorsque trois exposants ont pu être mesurés, d'établir la classe d'universalité à laquelle appartient le système étudié. Ces lois d'échelle reflètent l'autosimilarité de chaque amas pris individuellement mais aussi celle de la population dans son ensemble. Du point de vue de l'expérimentateur, elles sont très importantes car elles se manifestent concrètement par l'existence de variables réduites qui conduisent pour une grandeur mesurable donnée à une loi de comportement universelle, indépendante de l'écart au seuil ou du système considéré. Ces deux aspects, relation entre les exposants et comportement universel, sont liés et donc souvent employés de façon synonyme. À l'approche du seuil de gélification, le changement des propriétés dynamiques du système est l'aspect le plus immédiatement perceptible. Avant le seuil de gélification, la viscosité newtonienne¹ augmente au fur et à mesure de la croissance des amas, pour devenir infinie au seuil, c'est-à-dire lors de l'apparition d'une molécule qui connecte entre-elles les limites de l'échantillon lui conférant ainsi une élasticité permanente. De ce point de vue, la gélification est une transition liquide-solide. La description théorique de son comportement critique est plus difficile que celle des propriétés statiques, car elle requiert un double postulat. Le premier concerne les lois d'échelle et le deuxième le type d'interactions hydrodynamiques qui s'exercent entre amas. Le premier aspect est la base des

¹c'est à dire la viscosité mesurée en régime stationnaire et extrapolée à gradient de cisaillement nul.

différents modèles qui sont proposés. Il part du principe d'une relation d'échelle entre la masse des polymères et leur temps de relaxation. Le deuxième aspect est moins immédiat car s'il est usuellement admis que les interactions hydrodynamiques sont écrantées dans le cas des fondus de polymères, la polydispersité complique le problème dans le cas de polymères branchés au seuil de gélification, les petits amas pouvant gonfler les plus gros. Il s'ensuit que pour une théorie donnée, telle que la percolation, des valeurs d'exposants différentes sont obtenues selon les *a priori* sur le type d'interactions hydrodynamiques. Notons :

$$\begin{aligned} G &\propto \epsilon^f \\ \eta &\propto \epsilon^{-s} \end{aligned} \tag{2.1}$$

les comportements critiques respectifs du module élastique et de la viscosité. Une analogie électrique proposée par de Gennes [38] conduit à $s \cong 0.7$ et $f \cong 2$ [39]. Un modèle de Rouse pour lequel les interactions hydrodynamiques sont écrantés conduit à $s \cong 1.3$ et $f \cong 2.7$ [40]. Daoud [41] propose de remplacer la dynamique d'un amas de taille finie par celle d'une chaîne élastique dans le calcul de ces exposants et retrouve de façon unifiée ces résultats. Très récemment deux résultats apparemment contradictoires viennent d'être publiés sur cette question. Une approche théorique prenant en compte la nature entropique de l'élasticité (nature entropique qui n'est contenue dans une analogie électrique) conduit toutefois fortuitement à la même valeur $f \cong 2$ [42]. Des simulations numériques d'un modèle de percolation dynamique ont permis de calculer la fonction de corrélation des fluctuations d'un amas donné en tenant compte des interactions hydrodynamiques [43]. Ces simulations conduisent à la valeur $f \cong 2.7$. Les valeurs expérimentales des exposants f et s entretiennent également la confusion ($s \sim 0.8$, $1.4 < s < 1.7$ selon les systèmes physico-chimique [44]. Tout ceci semble suggérer l'existence de deux classes d'universalité mal identifiée jusqu'à présent [43]. Dans le tableau 2.1 sont résumées les valeurs des exposants critiques s et t expérimentales et théoriques :

	théorique	expérimental
viscosité η	$s = 0.75$ ([46]),	$s = 0.7$ ([45]) $1.4 < s < 1.7$ ([44])
module élastique G	$t = f \sim 2$ ([46],[49]-[42]) $f \sim 2.7$ ([43])	$t = f \sim 2$ ([45]- [48]) $f \sim 3$ ([52]-[53])

TAB. 2.1. – Valeurs théoriques et expérimentales des exposants critiques de la viscosité et du module élastique.

2.2. Cas de la gélatine

Les études de rhéologie [45] ont montré que le taux d'hélicité χ , défini comme la fraction en pourcent d'hélices dans les chaînes de gélatine, est le paramètre pour décrire l'avancement de la réaction. L'écart au seuil de gélification pour la gélatine est alors :

$$\epsilon = \frac{|\chi - \chi_c|}{\chi_c} \quad (2.2)$$

Le taux d'hélicité χ en fonction du temps de gélification t pour des solutions de gélatine à différentes concentrations a été mesuré par Djabourov et al. [45]. Ils ont trouvé une relation logarithmique entre χ et t :

$$\chi = a + b \ln(t) \quad (2.3)$$

a et b sont des paramètres qui varient avec la concentration et la température de refroidissement de la solution. Cette relation est montrée dans la figure 2.1.

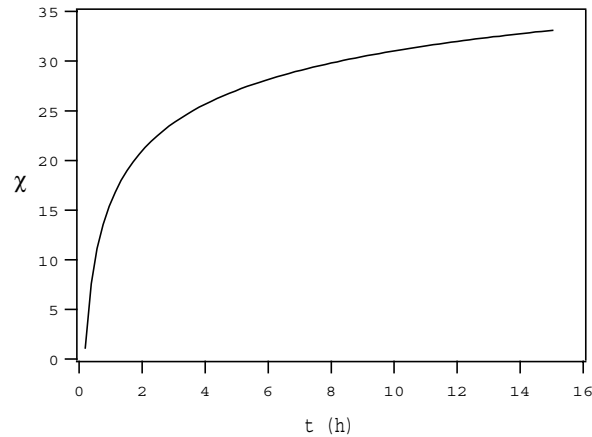


FIG. 2.1. – Variation du taux d'hélicité en fonction du temps de gélification pour une solution de gélatine 1%.

2.3. Préparation de l'échantillon

Dans toutes les expériences nous avons utilisé de la gélatine provenant de la peau de veau fournie par Sigma (G9382). Sa masse moléculaire est $M_w \sim 1 \cdot 10^5$ g/mol. La gélatine se présente comme une poudre jaune. Les solutions de gélatine sont solubilisées dans une solution tampon 50 mM Tris-HCl à pH 7.4 et laissées à la température $\mathcal{T} = 40^\circ\text{C}$ durant 12 heures environ. Pour les solutions de gélatine que l'on étudie sur de longues durées, des faibles quantités de Sodium Azide (à une concentration finale de 2 mM NaN_3) sont rajoutées à la solution

pour empêcher toute contamination bactérienne. La solution est filtrée avec des filtres Millipore d'un diamètre des pores de $0.45\mu\text{m}$, transférée dans les cellules de mesure et ensuite thermalysée dans un bain à la température choisie.

Pour les mesures de diffusion de la lumière de gel de gélatine en présence de particules de Polystyrene Latex, les solutions de billes de latex dans l'eau déionisée et de gélatine dans la solution tampon (préalablement filtrée avec des filtres millipore $0.22\mu\text{m}$) sont préparées séparément et ensuite mélangées pour obtenir une solution finale 1% de gélatine et fraction volumique du latex $\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$.

Le latex a été préparé et nous a été fourni amicalement par Loïc Auvray.

2.4. Viscosité intrinsèque et concentration de recouvrement de la gélatine étudiée

Nous avons mesuré la viscosité de la gélatine η et sa viscosité intrinsèque au Laboratoire SPEC à l'Orme des Merisiers à l'aide d'un rhéomètre à cylindres coaxiaux de type Couette (Reologica StressTech rheometer).

Les mesures de la viscosité ont été effectuées à une série de vitesses de cisaillement décroissantes de 2.06 à 8.53 sec^{-1} et à des valeurs de contraintes de $1.92 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}$ à $8.21 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}$. La température a été maintenue constante, pendant la mesure à 40°C .

La variation de la viscosité de la gélatine en fonction de la concentration mesurée par rhéologie est présentée dans la figure 2.2. Nous avons déterminé la viscosité intrinsèque, $[\eta]$ à partir de la relation :

$$\eta = \eta_0 \cdot (1 + [\eta]C)$$

où $\eta_0 = 0.653 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ est la viscosité de l'eau à 40° . Cette viscosité intrinsèque est égale à $[\eta] = 61.00 \pm 0.04 \text{ cm}^3/\text{g}$. La concentration de recouvrement de notre gélatine peut être calculée donc :

$$C^* = \frac{\eta_0}{[\eta]} = 0.01 \frac{\text{g}}{\text{m}^3} = 1\% (w/w) \quad (2.4)$$

2.5. Appareillage

Nous avons effectué nos expériences des diffusion de la lumière avec un laser Krypton avec une longueur d'onde de la radiation incidente $\lambda_0 = 647 \text{ nm}$.

Les expériences de diffusion statique ont été effectuées en utilisant du toluène comme référence. Le rapport de Rayleigh pour le toluène est $8.5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$ [6].

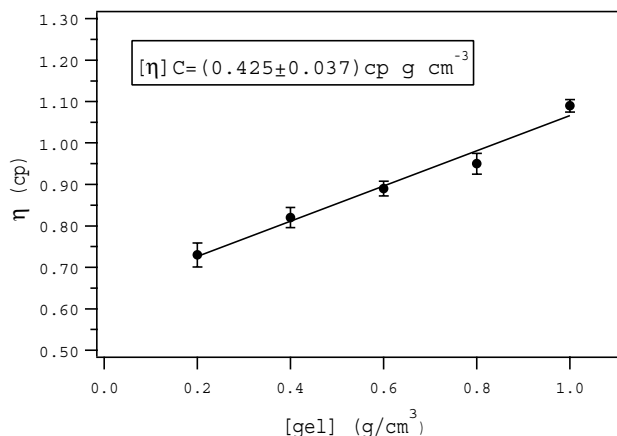


FIG. 2.2. – Variation de la viscosité η d'une solution de gélatine en fonction de la concentration mesurée par rhéologie. La ligne noire correspond au meilleur fit ($\eta = \eta_0 \cdot (1 + [\eta]C)$) et donne une valeur de la viscosité intrinsèque de la gélatine $[\eta] = 61.00 \pm 0.04 \text{ cm}^3/\text{g}$.

2.6. Mesure de diffusion statique de la lumière

Nous avons mesuré le rayon des particules de latex ainsi que leurs polydispersité par diffusion statique de la lumière à des angles de diffusion $10^\circ < \theta < 150^\circ$ qui correspondent aux vecteurs de diffusion suivants :

$$2.2 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^{-1} < \left(q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin(\theta/2) \right) < 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$$

où $n = 1,333$ est l'indice de réfraction de l'eau.

Les mesures ont été effectuées sur une solution de latex polystyrène dans de l'eau déionisée (avec un déionisateur d'eau Alfa-MilliQ). La fraction volumique du latex dans la solution est $\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$ (même concentration utilisée dans les expériences avec la gélatine).

L'intensité diffusée par cette solution en fonction du vecteur de diffusion, q , est présentée sur la figure 2.3.

Pour accéder à la valeur de la masse des particules de latex, nous avons utilisé comme référence le toluène. L'intensité diffusée par le toluène était indépendante de l'angle de diffusion. La variation de l'intensité diffusée avec le vecteur de diffusion q présente un facteur de forme $S(q)$ caractéristique d'une sphère de rayon $R = 225 \pm 2 \text{ nm}$:

$$S(q) = \left[\frac{3 (\sin qR - qR \cos qR)}{(qR)^3} \right]^2$$

Ce comportement est mis en évidence dans la figure 2.4 où sont représentés, en fonction de q , $[I(q) \cdot q^4]$ et le facteur de forme calculé pour une sphère de rayon

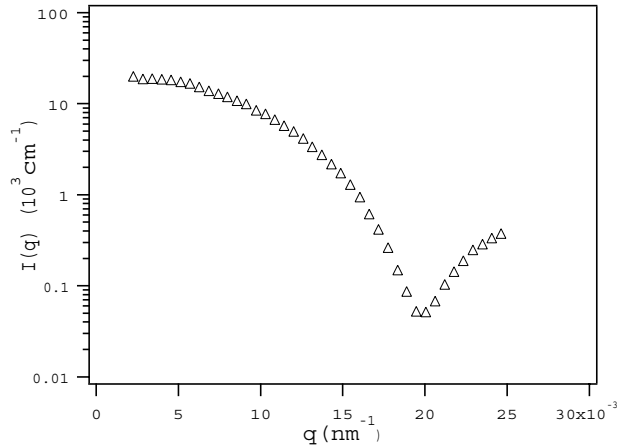


FIG. 2.3. – Intensité diffusée par une solution de particules de latex dans l'eau (fraction volumique du latex $\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$).

$R = 225 \text{ nm}$. Nous pouvons observer que la position du premier minimum de la courbe expérimentale, en correspondance de $q = 0.02 \text{ nm}^{-1}$, est en très bon accord avec la position du premier minimum de la courbe théorique. Ce résultat nous indique que la distribution de taille des particules est très étroite (les particules sont donc très monodisperses).

En connaissant le facteur de forme et la taille des particules, nous pouvons

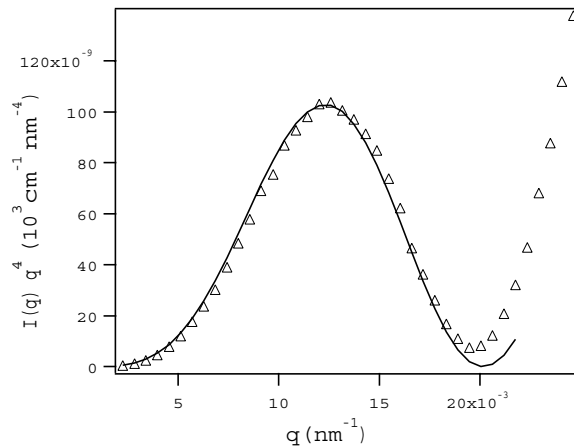


FIG. 2.4. – Représentation en $I(q)q^4$ de l'intensité diffusée par une solution de particules de latex dans l'eau (fraction volumique du latex $\phi = 1.8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$) (triangle); la ligne continue est le facteur de forme d'une sphère de rayon $R = 225 \text{ nm}$.

calculer la limite à $q \rightarrow 0$ de $I(q)$ qui nous permet de calculer la masse des

particules de latex :

$$\lim_{q \rightarrow 0} I(q) = I(0) = (2.65 \pm 0.05) \cdot 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$$

Le facteur de contraste pour la lumière est, dans notre cas, $K_l^2 = 4.56 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ mol g}^{-2}$ (eq.1.12). Pour ce calcul nous avons utilisé la valeur de l'indice de réfraction du polystyrène $n_{\text{ps}} = 1.595$.

La masse des particules de latex mesurée expérimentalement est, donc :

$$M_{\text{latex}} = \frac{I(0)}{\phi \rho K_l^2} = (3.00 \pm 0.06) \cdot 10^{10} \text{ g/mol}$$

où $\rho = 1.05 \text{ g/cm}^3$ est la densité du polystyrène. La valeur de la masse mesurée est en très bon accord avec la valeur attendue :

$$M_{\text{calc}} = \frac{4\pi}{3} N_A \rho R^3 = 3.02 \cdot 10^{10} \text{ g/mol}$$

Pour la concentration utilisée, l'interaction entre les particules est négligeable. Nous avons mesuré par diffusion élastique de la lumière, l'intensité, en fonction du vecteur de diffusion q , d'un gel 1% de gélatine avec les billes de latex (à une fraction volumique $\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$) et du même gel 1% de gélatine sans les billes à $\mathcal{T} = 14^\circ\text{C}$. Sur la figure 2.5 nous pouvons observer que l'intensité diffusée à petits angles par la gélatine seule (carrés) est négligeable par rapport à l'intensité diffusée par les billes de latex (triangles et ronds).

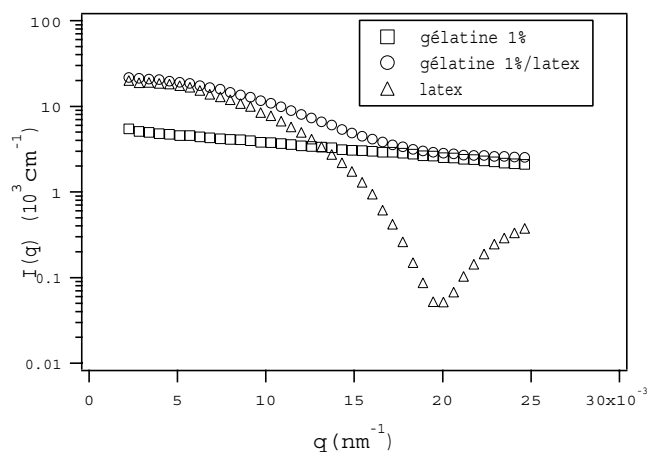


FIG. 2.5. – Intensité diffusée par une solution 1% de gélatine à la température $\mathcal{T} = 14^\circ\text{C}$ (carré), par une solution 1% de gélatine avec les billes de latex (fraction volumique de billes $\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$) à la même température (cercle) et par une solution de billes de latex dans l'eau à la même concentration (triangle).

Les mesures sur le gel de gélatine seule (carrés dans la figure 2.5, nous permettent d'obtenir la longueur de corrélation des fluctuations de concentration ξ_T .

Dans l'approximation d'*Ornstein-Zernike*, le facteur de structure statique est une Lorentzienne ² :

$$S(q) = \frac{1}{1 + (\xi_T q)^2} \quad (2.6)$$

Dans la figure 2.6, le facteur de structure $S(q, \tau)$ du gel 1% de gélatine, est représenté en fonction de q^2 . Ces données ont été analysées avec la fonction 2.6. Cette analyse donne une valeur de $\xi_T = 43 \pm 4$ nm.

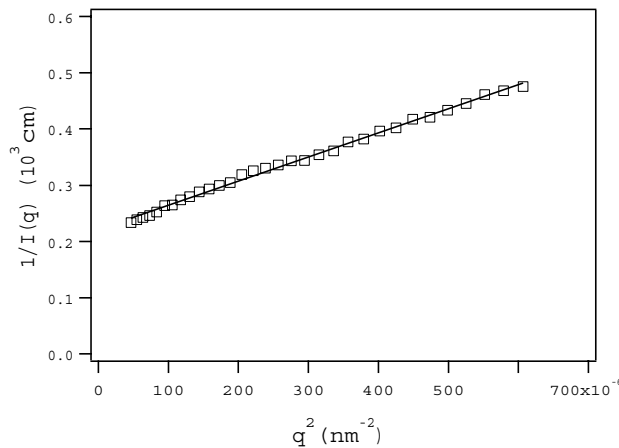


FIG. 2.6. – Inverse de l'intensité diffusée par une solution 1% de gélatine à la température $T = 14^\circ C$ en fonction de q^2 . La ligne représente un fit avec la fonction $S(q) = \frac{1}{1 + (\xi_T q)^2}$.

Il faut observer que la valeur de ξ_T ainsi obtenue est plus grande que la valeur obtenue par diffusion de neutrons à petits angle [55] $\xi_T = 5.5$ nm pour un gel de gélatine à la même concentration. Ceci peut être attribué à la présence d'inhomogénéités dans le gel. La valeur de ξ_T est, dans tous les cas, beaucoup plus petite que la taille des billes de latex $R = 225$ nm. Les inhomogénéités peuvent donc être négligées à l'échelle des particules de latex.

²En supposant qu'à grande distance le décroissance spatiale de la corrélation des fluctuations est rapide, il est possible d'écrire la fonction de distribution de probabilité $G(r)$ (eq.1.31) sous la forme :

$$G(r) \simeq \frac{1}{r} e^{-\frac{r}{\xi_T}} \quad (2.5)$$

Le facteur de structure, qui est définie comme la transformé de Fourier de la $G(r)$ a, dans ce cas, la forme d'une lorentzienne.

2.7. Mesures de diffusion quasi élastique de la lumière

Nous avons étudié par diffusion quasi élastique de la lumière une solution de particules de latex ($\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$) à la température $\mathcal{T} = 20^\circ\text{C}$, pour des angles de diffusion $20^\circ < \theta < 150^\circ$.

Le facteur de structure dynamique mesuré, $S(q, \tau)$, a la forme d'une fonction exponentielle simple $e^{-\tau/\tau_c}$ avec un seul temps caractéristique, τ_c , proportionnel à q^{-2} . Ce comportement est typique d'un système diffusif.

Le résultat est montré dans la figure 2.7 où le logarithme du facteur de structure dynamique, $S(q, \tau)$, des billes de latex dans l'eau est tracé en fonction de $\tau q^2/\eta_0$ (les carrés dans la figure); η_0 est la viscosité de l'eau. Nous avons divisé τq^2 par η_0 pour éliminer les effets dus à la variation de la viscosité de l'eau avec la température.

Les valeurs de la viscosité de l'eau η_0 aux des températures étudiés sont reportées dans le tableau 2.2.

η_0 (cP)	Température ($^\circ\text{C}$)
1.002	20
0.653	40

TAB. 2.2. – Viscosité de l'eau aux deux températures étudiées : 20 et 40 $^\circ\text{C}$.

Ces mesures nous permettent de déterminer le coefficient de diffusion des billes de latex dans l'eau D_0 :

$$D_0 = \frac{1}{\tau_c q^2} = (0.94 \pm 0.05) \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

Cette valeur du coefficient de diffusion correspond à un rayon hydrodynamique (relation de Stokes Einstein, eq.1.34) :

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D_0} = (228 \pm 12) \text{ nm}$$

La valeur du rayon hydrodynamique est en très bon accord avec le rayon de giration mesuré par diffusion statique ($R = 225 \pm 2 \text{ nm}$, figure 2.4).

Nous avons étudié, par diffusion quasi élastique de la lumière aux mêmes angles de diffusion, une solution 1% de gélatine et billes de latex ($\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$) à la température $\mathcal{T} = 40^\circ\text{C}$. Le facteur de structure dynamique a une forme exponentielle, comme dans le cas des billes de latex dans l'eau.

Dans la figure 2.7 nous pouvons observer que les courbes qui représentent le facteur de structure dynamique des billes de latex dans l'eau à $\mathcal{T} = 20^\circ\text{C}$ (carré) et dans la gélatine à $\mathcal{T} = 40^\circ\text{C}$ (ronds) se superposent. Nous pouvons en conclure

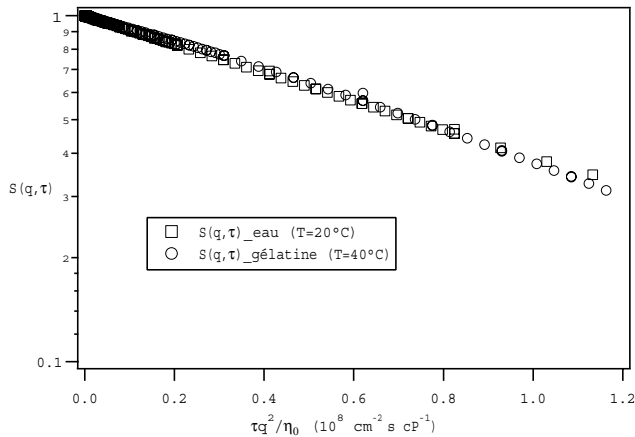


FIG. 2.7. – Intensité diffusée par une solution de particules de latex ($\phi = 1.8$) dans une solution 1% de gélatine à la température $\mathcal{T} = 40^\circ\text{C}$ (ronds), et dans l'eau (carré) à $\mathcal{T} = 20^\circ\text{C}$.

que la dynamique à temps court des particules de latex est dominée par la viscosité du solvant.

En outre ces mesures montrent que il n'y a pas d'absorption de gélatine sur les billes de latex à 40°C , ce qui aurait été révélé par une augmentation du rayon hydrodynamique.

2.8. Traitement des données

Nous avons analysé les fonctions de corrélation de l'intensité diffusée en étudiant séparément la partie à temps court ($\tau < 1$ ms) et la partie à temps long ($\tau > 1$ ms).

À temps court, nous avons analysé les données avec une analyse en développement de cumulants (comme décrit en détail dans l'annexe B.1 et avec un fit exponentielle

$$\left(\frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1 \right)^{1/2} = A_1 e^{-\left(\frac{\tau}{\tau_1}\right)} \quad (2.7)$$

Ces deux méthodes d'analyse donnent des résultats en très bon accord entre eux. La partie à temps longs a été analysée avec une fonction exponentielle étirée :

$$\left(\frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1 \right)^{1/2} = A_2 e^{-\left(\frac{\tau}{\tau_2}\right)^\beta} \quad (2.8)$$

2.9. Gélification : problèmes inhérents à la non ergodicité

En baissant la température en dessous d'une certaine température qui dépend de la concentration en gélatine, on observe une transition de l'état liquide (sol) à l'état solide (gel).

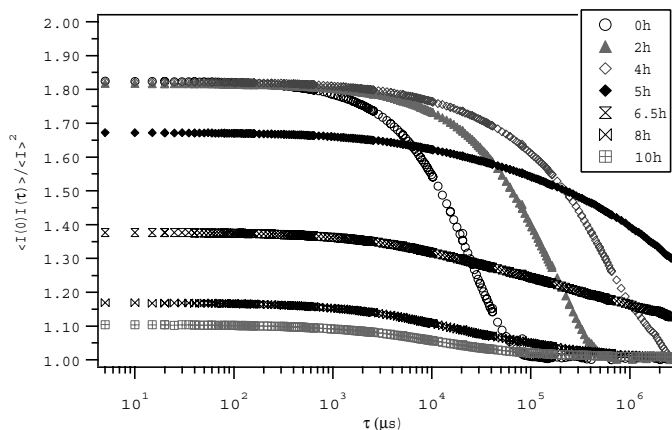


FIG. 2.8. – Variation de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée $g_T^{(2)}(t, \tau)$ pendant la gélification à $\mathcal{T} = 17^\circ\text{C}$ d'une solution 1% de gélatine et billes de latex ($\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$). Chaque spectre correspond à une mesure effectuée sur un endroit de l'échantillon pendant un temps $T = 600$ sec.

En diffusion quasi élastique de la lumière, cette transition est révélée par une brusque diminution de l'amplitude initiale de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée ainsi que par une variation de la dynamique du système. Ce comportement est montré sur la figure 2.8, où la variation de la fonction de corrélation normalisée de l'intensité diffusée $\frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle_T}{\langle I \rangle_T^2}$ est tracée en fonction du temps de corrélation τ pendant la gélification d'une solution 1% de gélatine et billes de latex à $\mathcal{T} = 17^\circ\text{C}$. Chaque spectre a été compté pendant un temps $T = 600$ s à un seul endroit de l'échantillon. Les mesures ont été effectuées à un seul angle de diffusion $\theta = 20^\circ$ ($qR_{\text{latex}} = 1$). La diffusion du gel de gélatine à cet angle de diffusion est négligeable par rapport au latex (figure 2.5).

Comme nous avons vu dans le chapitre précédent, l'origine de cette diminution de l'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée à $\tau \rightarrow 0$ est ambiguë et controversée.

En particulier la faible amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée observée dans la phase gel est interprétée en faisant appel à un hétérodynage partiel de la lumière du fait de l'immobilisation d'une fraction de billes dans les mailles du gel après sa formation, à une perte de l'ergodicité du système découlant du fait que les particules ne peuvent plus effectuer que des petits excursions

autour des positions d'équilibre du fait de la présence du gel alors qu'elles pouvaient explorer toutes les configurations spatiales microscopiques dans la phase sol.

Dans une approche d'autobattement, cette faible amplitude de la fonction de corrélation est liée à l'apparition dans le gel d'un module élastique.

Pour déterminer sans ambiguïté les propriétés d'ensemble de notre système nous avons effectué une moyenne d'ensemble obtenue de la façon suivante : nous avons divisé notre système en 360 sous-volumes v décorrelés, ce qui permet de définir un volume de diffusion V .

Nous avons effectué des mesures de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée $g_T^{(2)}(t, \tau)$ du système au cours de gélification. Chaque mesure sur le sous-volume est effectuée à un angle fixe $\theta = 20^\circ$ pendant un temps $T = 10$ s. Il nous faut 1 h pour effectuer une mesure sur le volume V . On peut considérer que le système n'évolue pas pendant la durée de chaque mesure T , l'échelle de temps caractéristique de la gélification étant de plusieurs heures.

Le temps t correspond aux mesures effectuées sur un même sous-volume avec un intervalle de temps de 1 h. La séquence des mesures effectuées sur chaque sous-volume à un temps t suit, ainsi, la gélification du système.

Pour un temps t fixé nous avons calculé la fonction :

$$g_E^{(2)}(t, \tau) = \frac{\frac{1}{P} \sum_{p=1}^P [g_T^{(2)}(t, \tau)]_p \cdot \langle I_p \rangle_T^2}{\frac{1}{P} \sum_{p=1}^P \langle I_p \rangle_T^2} \quad (2.9)$$

Ce faisant, nous avons effectué une moyenne d'ensemble.

Nous avons répété ces mesures pour quatre différentes températures : $\mathcal{T} = 18, 19, 20$ et 21°C . Le temps de gélification varie légèrement avec la température mais l'évolution du système pendant la gélification montre le même comportement dans ces quatre cas.

À titre illustratif nous montrons les résultats obtenues à $\mathcal{T} = 20^\circ\text{C}$. Dans ce cas nous avons effectué 14 mesures sur le volume V correspondant à une durée totale de 14 heures. Dans la figure 2.9, les fonctions de corrélation de l'intensité diffusée $g_E^{(2)}(t, \tau)$ correspondant aux différents moments de la gélification à 20°C sont présentées en fonction du temps de corrélation τ .

En comparant les figures 2.8 et 2.9, nous pouvons observer que la variation de $g_T^{(2)}(t, \tau)$ et $g_E^{(2)}(t, \tau)$ pendant la gélification est qualitativement la même.

Concentrons nous, pour l'instant, sur le cas de la moyenne sur 360 différents spectres. La diffusion de billes dans les gels est bien décrite par un modèle de diffusion dans une cage [57] ou dans un potentiel harmonique $U(x) = \frac{1}{2}k_{el}x^2$ [76]. Ces deux modèles sont décrits en détail dans l'annexe (A.1.1), mais on peut les résumer de la manière suivante : on appelle $\langle r^2(\tau) \rangle$ le déplacement carré moyen d'une particule de taille R qui diffuse par effet de l'agitation thermique dans une cage de taille $\chi^{1/2}$. Si $R < \chi^{1/2}$, la particule diffuse librement à l'intérieur de la cage et sa dynamique n'est pas modifiée par la présence de la cage

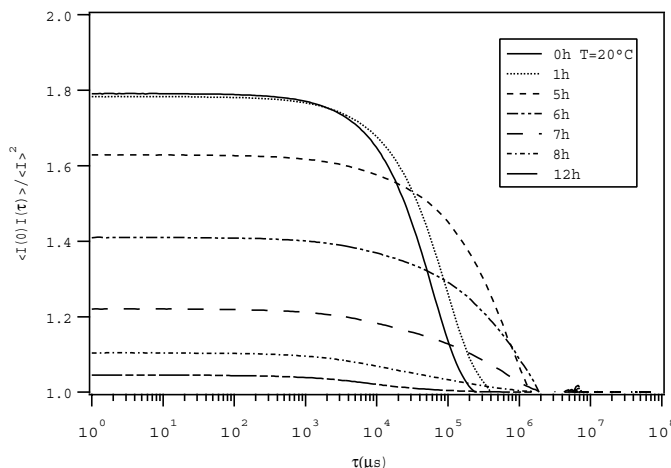


FIG. 2.9. – Variation de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée $g_E^{(2)}(t, \tau)$ pendant la gélification à $T = 20^\circ\text{C}$ d'une solution 1% de gélatine et billes de latex ($\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$). Chaque spectre correspond à la moyenne de 360 spectres mesurés dans 360 positions différentes de l'échantillon.

tant que $\langle r^2(\tau) \rangle < \chi$. La dynamique de la particule ressent la cage lorsque $\langle r^2(\tau) \rangle > \chi$. Le déplacement moyen carré dépend du temps τ et de χ selon une relation de la forme :

$$\langle r^2(\tau) \rangle = \chi \left[1 - e^{-\frac{D\tau}{\chi}} \right] \quad (2.10)$$

où D est le coefficient de diffusion de la particule. En outre on peut écrire :

$$\chi = \frac{k_B T}{GR} \quad (2.11)$$

Le facteur de structure dynamique des particules, dans ce modèle, est :

$$F(\tau) \propto e^{-\langle r^2(\tau) \rangle q^2} \quad (2.12)$$

et donc :

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} F(\tau) \propto e^{-\chi q^2} \quad (2.13)$$

Nous allons analyser le comportement attendu pour la moyenne d'ensemble de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée dans tous les cas possibles : non ergodique (Théorie de Pusey), hétérodyn+auto-battement, auto-battement. Nous avons vu dans le chapitre précédent que la fonction de corrélation de l'intensité diffusée a la même forme dans l'hypothèse de non ergodicité ainsi que dans l'hypothèse d'un hétérodynage partiel de la lumière diffusée. Nous pouvons alors traiter ensemble ces deux cas.

Cas non ergodique et mixte hétérodyne-auto-battement : la moyenne temporelle de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée s'écrit, dans ces deux cas :

$$\langle I(0) I(\tau) \rangle_T = \langle I_F(0) I_F(\tau) \rangle_T + 2I_c \langle E_F(0) E_F^*(\tau) \rangle_T + 2I_c \langle I_F \rangle_T + I_c^2 \quad (2.14)$$

où :

$$\langle I_F(0) I_F(\tau) \rangle_T = \langle I_F \rangle_T^2 + \langle E_F(0) E_F^*(\tau) \rangle_T^2 \quad (2.15)$$

$$\langle E_F(0) E_F^*(\tau) \rangle_T = Nb^2 [F(\tau) - F(\infty)] \quad (2.16)$$

En outre les relations :

$$\langle \langle I_F(0) I_F(\tau) \rangle_T \rangle_E = \langle \langle I_F \rangle_T^2 \rangle_E + (Nb^2)^2 [F(\tau) - F(\infty)]^2 \quad (2.17)$$

$$\langle I \rangle_E = \langle I_c \rangle_E + \langle I_F(\tau) \rangle_E = Nb^2 F(0) \quad (2.18)$$

nous permettent d'écrire la relation suivante :

$$\langle \langle I(0) I(\tau) \rangle_T \rangle_E - \langle I \rangle_E^2 = (Nb^2)^2 [F^2(\tau) - F^2(\infty)] \quad (2.19)$$

Dans le modèle de la diffusion dans une cage, la fonction de corrélation de l'intensité diffusée normalisée devient :

$$g^{(2)}(\tau) - 1 = f^2(\tau) - f^2(\infty) = e^{-2\langle r^2(\tau) \rangle q^2} - e^{-2\chi q^2} \quad (2.20)$$

Un développement limité à $\chi = 0$ de l'équation 2.20 à $\tau = 0$ donne :

$$g^{(2)}(0) - 1 = \sigma_I^2 = 1 - e^{-2\chi q^2} \sim 2\chi q^2 \quad (2.21)$$

et un développement en cumulants donne, au premier ordre :

$$\frac{d}{d\tau} [\ln(g^{(2)}(\tau) - 1)] = \frac{Dq^2}{(1 - e^{-2\chi q^2})} = \frac{D}{2\chi} = D_{App} = \frac{D}{\sigma_I^2} \quad (2.22)$$

et donc :

$$\left(\frac{d}{d\tau} [\ln(g^{(2)}(\tau) - 1)] \right) \cdot (g^{(2)}(0) - 1) = D \quad (2.23)$$

Autrement dit :

$$D_{App} \cdot \sigma_I^2 = D = \text{constante} \quad (2.24)$$

En substituant l'équation (2.11) dans l'expression de D_{App} , nous trouvons :

$$D_{App} = \frac{1}{2} \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R} \cdot \frac{GR}{k_B T} = \frac{1}{2} D_0 \frac{GR}{k_B T} \quad (2.25)$$

$$D_{App} = \frac{1}{2} \frac{G}{6\pi\eta_0} \quad (2.26)$$

On peut encore montrer que la fonction de corrélation de l'intensité diffusée dans ce cas peut être écrite :

$$g^{(2)}(\tau) \simeq \sigma_I^2 e^{-\frac{2D\tau q^2}{\sigma_I^2}} \quad (2.27)$$

Nous avons vu dans le chapitre précédent que dans certains conditions la partie d'autobattement peut être négligée par rapport à la partie hétérodyne. Nous allons traiter ce cas séparément dans la suite.

Hétérodyne : dans le cas où on suppose que la diffusion est purement hétérodyne, la fonction de corrélation de l'intensité diffusée est directement liée au facteur de structure dynamique :

$$\langle\langle I(0) I(\tau) \rangle\rangle_T \rangle_E - \langle I \rangle_E^2 = (Nb^2) [F(\tau) - F(\infty)] \quad (2.28)$$

dans ce cas nous trouvons :

$$g^{(2)}(\tau) - 1 = f(\tau) - f(\infty) = e^{-\langle r^2(\tau) \rangle q^2} - e^{-\chi q^2} \quad (2.29)$$

et :

$$g^{(2)}(0) - 1 = \sigma_I^2 = 1 - e^{\chi q^2} \sim \chi q^2 \quad (2.30)$$

$$\frac{d}{d\tau} [\ln(g^{(2)}(\tau) - 1)] = \frac{Dq^2}{2(1 - e^{-2\chi})} = \frac{D}{2\chi} = D_{\text{App}} = \frac{D}{2\sigma_I^2} \quad (2.31)$$

et donc :

$$\left(\frac{d}{d\tau} [\ln(g^{(2)}(\tau) - 1)] \right) \cdot (g^{(2)}(0) - 1) = \frac{D}{2} \quad (2.32)$$

La relation entre D et σ_I^2 est similaire à celle du cas précédent :

$$D_{\text{App}} \cdot 2\sigma_I^2 = D = \text{constante} \quad (2.33)$$

et :

$$D_{\text{App}} = \frac{1}{2} \frac{G}{6\pi\eta_0 R} \quad (2.34)$$

La fonction de corrélation de l'intensité diffusée dans ce cas peut être écrite :

$$g^{(2)}(\tau) \simeq \sigma_I^2 e^{-\frac{D\tau q^2}{\sigma_I^2}} \quad (2.35)$$

Auto-battement : dans le cas ergodique, la fonction de corrélation de l'intensité diffusée est liée au facteur de structure dynamique par la relation de Siegert :

$$\langle\langle I(0) I(\tau) \rangle\rangle_T \rangle_E - \langle I \rangle_E^2 = (Nb^2)^2 [F(\tau) - F(\infty)]^2 \quad (2.36)$$

la fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée devient :

$$g^{(2)}(\tau) - 1 = (f(\tau) - f(\infty))^2 = \left(e^{-(r^2(\tau))q^2} - e^{-\chi q^2} \right)^2 \quad (2.37)$$

$$g^{(2)}(0) - 1 = \sigma_I^2 = \left(1 - e^{-\chi q^2} \right)^2 \sim \chi^2 q^2 \quad (2.38)$$

Un développement en cumulants au premier ordre donne, dans ce cas :

$$\frac{d}{d\tau} [\ln(g^{(2)}(\tau) - 1)] = \frac{Dq^2}{(1 - e^{-\chi q^2})} = \frac{D}{\chi} = D_{\text{App}} = \frac{D}{\sigma_I} \quad (2.39)$$

avec :

$$D_{\text{App}} = \frac{G}{6\pi\eta_0 R} \quad (2.40)$$

et donc :

$$\left(\frac{d}{d\tau} [\ln(g^{(2)}(\tau) - 1)] \right) \cdot (g^{(2)}(0) - 1)^{1/2} = D \quad (2.41)$$

La relation entre D et σ_I^2 est, dans ce cas, tout à fait différente par rapport aux cas d'avant :

$$D_{\text{App}} \cdot \sigma_I = D = \text{constante} \quad (2.42)$$

Pour conclure, la fonction de corrélation de l'intensité diffusée dans ce cas peut être écrite :

$$g^{(2)}(\tau) \simeq \sigma_I^2 e^{-\frac{2D\tau q^2}{\sigma_I}} \quad (2.43)$$

Afin de déterminer lequel de ces trois cas s'applique à notre système, nous avons extrait le coefficient de diffusion apparent D_{App} et l'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée à $\tau \rightarrow 0$ pour les cinétiques de gélification mesurées avec les deux méthodes : une mesure sur un seul endroit de l'échantillon en cours de gélification ($g_T^{(2)}(\tau, t)$) et la moyenne sur 360 positions différentes ($g_E^{(2)}(\tau, t)$).

Pour déterminer le coefficient de diffusion à temps court $D_{\text{App}} = D_s$ et l'amplitude à $\tau \rightarrow 0$, σ_I^2 , nous avons analysé les données en deux manières : avec un développement en cumulants (comme décrit dans l'appendice B) et avec un fit avec une fonction exponentielle dans une fenêtre des temps $\tau < 1$ ms :

$$\left(\frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1 \right)^{1/2} = A_1 e^{-\left(\frac{\tau}{\tau_1}\right)} = \sigma_I e^{-D_s q^2 \tau} \quad (2.44)$$

Dans les figures 2.10 et 2.11, $D_s \sigma_I$ et $D_s \sigma_I^2$ sont tracés en fonction de $\left(\frac{1}{\sigma_I}\right)$ respectivement pour le cas de la moyenne dans différentes positions de l'échantillon et pour le cas de la mesure en un seul point de l'échantillon. Nous pouvons observer que $D_s \sigma_I$ reste constante en fonction de $\left(\frac{1}{\sigma_I}\right)$, comme prévu pour le cas

ergodique (équation 2.42). Le même comportement est observé dans les deux cas. Ce résultat semblerait montrer que, indépendamment de la manière dont nous étudions la gélification de notre système (i.e. soit que l'on fasse une moyenne d'ensemble ou que l'on étudie seulement la moyenne temporelle) la nature non ergodique intrinsèque de ces systèmes soit négligeable.

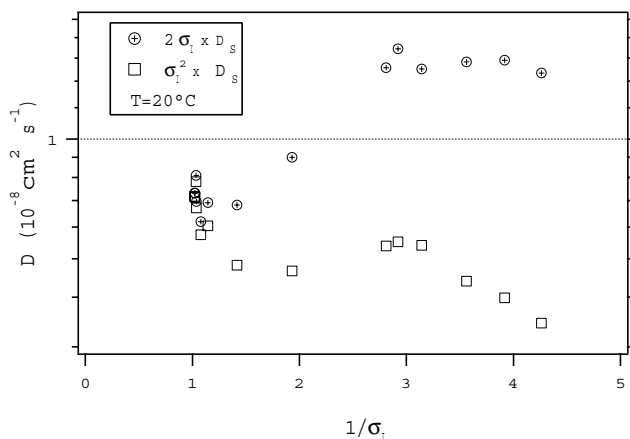


FIG. 2.10. – $D_s \sigma_I^2$ et $D_s \sigma_I$ versus $\frac{1}{\sigma_I}$: D_s est une fonction linéaire de $\frac{1}{\sigma_I}$. Nous pouvons négliger une éventuelle contribution hétérodyne due à l'immobilisation partielle des particules. $\mathcal{T}=20^\circ\text{C}$.

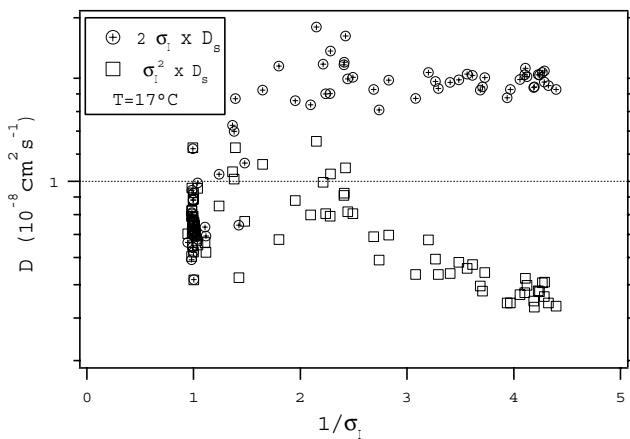


FIG. 2.11. – Même représentation que dans la figure 2.10. Les mesures sont effectuées en un seul point de l'échantillon. $\mathcal{T}=17^\circ\text{C}$.

Nous avons analysé la variation de l'intensité diffusée en fonction de l'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée à $\tau \rightarrow 0$, pour les données moyennées dans l'ensemble et pour la moyenne temporelle à différentes positions

de l'échantillon.

Dans la figure 2.12 nous pouvons observer (tous les symboles sauf les cercles) que la moyenne sur 360 positions de l'intensité diffusée reste constante dans la phase gel. Une moyenne sur 360 sous-volumes donne une bonne estimation des propriétés d'ensemble.

En outre il est attendu, si la théorie de Pusey, i.e. l'hypothèse de non ergodicité, est applicable à notre cas, que la moyenne d'ensemble de l'intensité diffusée à temps long augmente après la gélification.

Dans la figure 2.12, nous avons représenté la moyenne d'ensemble de l'intensité diffusée à $T=18, 19, 20, 21^\circ\text{C}$ et la moyenne temporelle de l'intensité diffusée par le même échantillon à 21°C (cercles) mesurée en différents endroits de l'échantillon, en fonction de $\left(\frac{1}{\sigma_I^2}\right)$.

Nous pouvons remarquer que la moyenne d'ensemble de l'intensité diffusée ne varie pas avec $\left(\frac{1}{\sigma_I^2}\right)$, ce qui n'est pas le cas pour la moyenne temporelle mesurée en différentes sous-régions de l'échantillon. Ce résultat est mis en évidence sur la figure 2.13, où la différence de dépendance entre la moyenne temporelle et la moyenne d'ensemble est mise en évidence à travers la représentation en fonction de (σ_I^{-2}) des produits : $(\langle I \rangle_E \cdot \sigma_I^2)$ et $(\langle I \rangle_T \cdot \sigma_I^2)$.

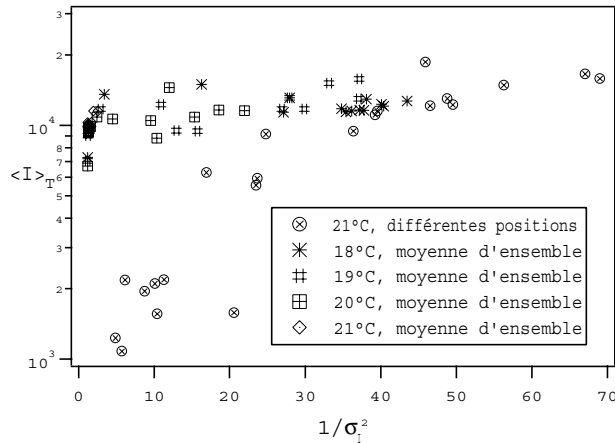


FIG. 2.12. – Variation de la moyenne d'ensemble de l'intensité diffusée par une solution 1% de gélatine et billes de latex à $T=18, 19, 20, 21^\circ\text{C}$ et, (cercles) la moyenne temporelle de l'intensité diffusée par le même échantillon à 21°C mesurée à différents endroits de l'échantillon, en fonction de (σ_I^{-2}) .

Ces deux figures nous montrent, donc, que la moyenne d'ensemble et la moyenne temporelle de l'intensité diffusée varient selon l'endroit illuminé.

La variation de la moyenne temporelle de l'intensité diffusée avec la position d'échantillonnage reflète une inhomogénéité de la distribution des billes dans les différents sous-volumes. Mais la dynamique des billes est indépendante de cette

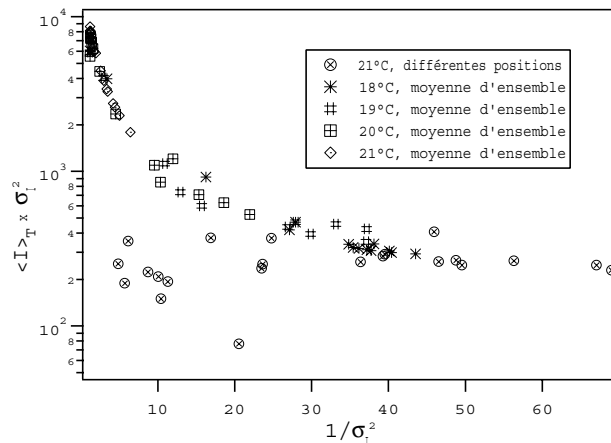


FIG. 2.13. – Variation du produit entre la moyenne d'ensemble de l'intensité diffusée par une solution 1% de gélatine et billes de latex et l'amplitude de la fonction de corrélation à $\tau \rightarrow 0$ aux températures $T=18,19,20,21^\circ\text{C}$, (symboles ronds) du produit entre la moyenne temporelle de l'intensité diffusée par le même échantillon à 21°C et σ_I^{-2} mesurée à différents endroits de l'échantillon en fonction de (σ_I^{-2}).

concentration et donc du sous-volume. Une fois la fonction de corrélation normalisée par l'intensité diffusée, les propriétés dynamiques du système que nous mesurons ne dépendent pas de la méthode de mesure. Nous allons en outre voir plus en détail dans la suite de ce chapitre, que ni le coefficient de diffusion à temps court, ni l'amplitude de la fonction de corrélation ne changent selon que nous les extrayons à partir de la moyenne d'ensemble ou bien de la moyenne temporelle de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée normalisée de notre système en cours de gélification.

2.10. Temps de gélification, t_{gel}

Pour déterminer le temps de gélification t_{gel} nous avons suivi la variation à temps court ($\tau \rightarrow 0$) de l'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée, σ_I^2 . Sur la figure 2.14, σ_I^2 est représentée en fonction du temps de gélification respectivement à $\mathcal{T} = 17$ et 20°C .

Nous pouvons observer dans la figure 2.14 que σ_I^2 reste constante jusqu'à un temps caractéristique qui varie avec la température à laquelle nous étudions la gélification ($t \sim 4.4$ h à 17°C et $t \sim 5.5$ h à 20°C). Pour des temps de gélification t plus grands que ce temps caractéristique l'amplitude de la fonction de corrélation décroît brusquement.

Nous avons appelé temps de gélification, t_{gel} , le temps qui correspond à cette brusque transition.

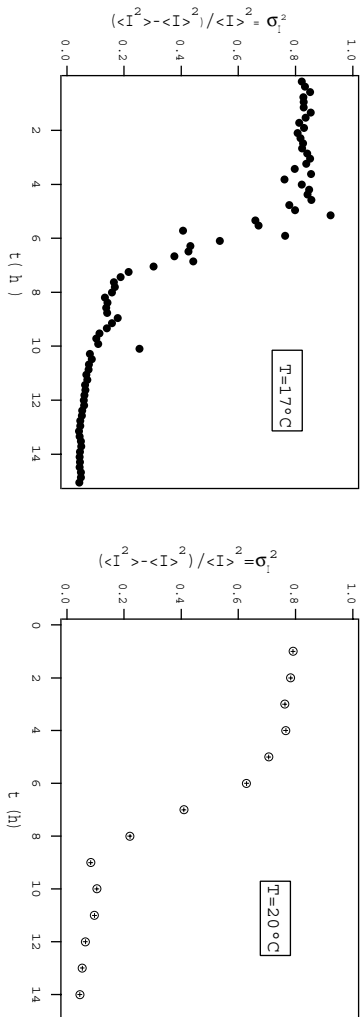


FIG. 2.14. – Variation de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée σ_I^2 pendant la gélification à $T = 17^\circ\text{C}$, $T = 20^\circ\text{C}$ d'une solution 1% de gélatine et billes de latex ($\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$).

2.11. Etat liquide

L'état liquide est caractérisé par la présence de deux temps de relaxation caractéristiques dont le comportement en fonction du temps de gélification, t , est montré sur la figure 2.15 pour deux températures (qui correspondent aussi aux deux méthodes de mesure).

Nous allons analyser séparément le temps court et le temps long.

2.11.1. Comportement à temps court

Nous avons vu dans le paragraphe 2.7 que la dynamique à temps court des billes de latex dans une solution de gélatine à 40°C est dominée par la viscosité du solvant (Figure 2.5).

Un comportement similaire a déjà été observé pour des solutions de gélatine [56]. Ce comportement est similaire à celui prévu par le mécanisme de diffusion dans une cage [57] ou dans un potentiel harmonique $U(x) = \frac{1}{2}k_{el}x^2$ [76], qui est décrit dans le paragraphe 2.9.

Dans notre système composé de la gélatine et des billes de latex, le réseau polymérique joue le rôle de la cage dans laquelle les billes de latex diffusent par effet de l'agitation thermique.

Nous pouvons réécrire $\langle r^2(\tau) \rangle$ (éq. 2.10) de la manière suivante :

$$\langle r^2(\tau) \rangle = \xi_T^2 \left[1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_s}} + \frac{\tau}{\tau_L} \right] \quad (2.45)$$

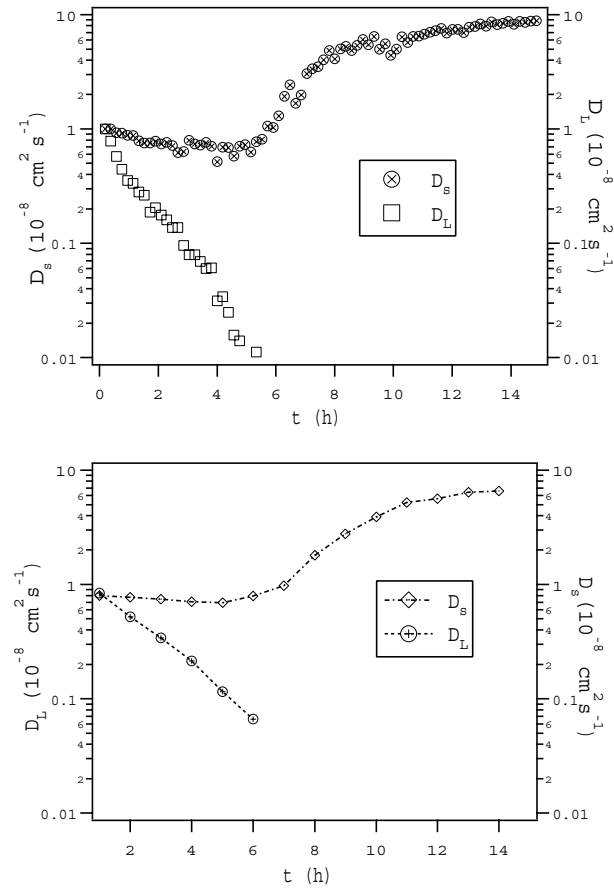


FIG. 2.15. – Variation du coefficient de diffusion à temps court D_s et à temps long D_L en fonction du temps de gélification. En haut : température de gélification $\mathcal{T} = 17^\circ\text{C}$; chaque spectre est mesuré à un seul endroit de l'échantillon pendant 600 s. En bas : température de gélification $\mathcal{T} = 20^\circ\text{C}$; chaque point est le résultat d'une moyenne sur 360 positions de l'échantillon.

où nous avons introduit le terme $\frac{\tau}{\tau_L}$ qui tient compte du fait que la solution polymérique est liquide à temps long.

Pour $\tau < \tau_s$, le terme τ/τ_l est négligeable et un développement limité autour de τ/τ_s montre que les particules diffusent librement ($\langle r(\tau)^2 \rangle \propto \tau$) jusqu'à ce que $\tau < \tau_s$. Pour $\tau_s < \tau < \tau_l$, le terme exponentiel devient négligeable et le déplacement moyen carré atteint une valeur au plateau $\langle r^2 \rangle_{\text{plateau}} = \xi_T^2$. Pour des temps longs (de l'ordre de τ_l), on retrouve un comportement diffusif.

Le temps caractéristique τ_s est lié à la constante élastique de la cage :

$$\tau_s = \frac{f}{k_{\text{el}}} \quad (2.46)$$

où f est la friction rencontrée par les billes et vaut $f = 6\pi\eta_0 R$; η_0 est la viscosité du solvant et $k_{\text{el}} = \frac{k_B T}{\xi_T^2}$ est la constante élastique. En substituant ces expressions dans l'équation 2.46, on obtient

$$\tau_s = \frac{\xi_T^2 6\pi\eta_0 R}{k_B T} \quad (2.47)$$

qui donne une expression pour le coefficient de diffusion à temps court :

$$D_s = \frac{\xi_T^2}{\tau_s} = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R} \quad (2.48)$$

Toutefois dans notre système les billes de latex ont une taille $R > \xi_T$. En partant du modèle de la diffusion dans une cage, nous proposons un modèle modifié et qui s'adapte bien à l'analyse des nos données.

Dans une solution de polymère, le module osmotique de la matrice polymérique, K_{matrice} , est responsable des fluctuations de concentration. Le module osmotique a le même rôle que la constante élastique k_{el} dans le mécanisme de diffusion dans une cage (équation 2.46).

Si nous supposons qu'à temps court les billes de latex et la matrice polymérique se déplacent en phase, la friction exercée sur les billes vient du frottement avec les molécules du solvant. Le coefficient de diffusion est généralement exprimé comme le rapport entre une énergie élastique et une friction. Dans le modèle proposé, le coefficient de diffusion à temps court peut alors s'écrire :

$$D_s = \frac{\xi_T^3 K_{\text{matrice}}}{6\pi\eta_0 R} = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R} \quad (2.49)$$

Le coefficient de diffusion à temps court a la même expression que dans le modèle de diffusion dans une cage (éq. 2.48), mais cependant le temps caractéristique τ_s qui gouverne ce mécanisme est différent. En effet le temps pour lequel ce mécanisme sature est lié au temps de relaxation du module osmotique (eq.2.46) :

$$\tau_s = \frac{\xi_T^3 (6\pi\eta_0 R)}{R k_B T} \quad (2.50)$$

Le déplacement carré moyen atteint alors sa valeur au plateau quand $\langle r^2 \rangle_{\text{plateau}} = D_s \tau_s = \frac{\xi_T^3}{R}$. L'équation 2.10 dévient, alors :

$$\langle r^2(\tau) \rangle = \frac{\xi_T^3}{R} \left[1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_s}} + \frac{\tau}{\tau_l} \right] \quad (2.51)$$

Ce mécanisme est plus rapide que la diffusion dans une cage et est donc le mécanisme dominant à temps court.

2.11.2. Comportement à temps long

Dans la figure 2.15 est montrée le comportement du coefficient de diffusion à temps long D_L , en fonction du temps de gélification. L'origine de ce temps long peut être expliquée de la manière suivante : pour $\tau > \tau_s$ la matrice polymérique a complètement relaxée. Les billes de latex, toutefois, ayant une taille $R > \xi_T$, relaxent avec un temps caractéristique τ_L plus long que celui de la matrice.

Les billes bougent dans une solution de gélatine de viscosité η et leur diffusion est gouvernée par le module osmotique des billes de latex $K_{\text{latex}} = nk_B T$. Leur dynamique ressent donc la viscosité macroscopique de la solution de gélatine et le coefficient de diffusion à temps long D_L est lié à la viscosité :

$$D_L = \frac{K_{\text{latex}}/n}{6\pi\eta R} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (2.52)$$

Dans la figure 2.16, nous avons tracé le coefficient de diffusion à temps long D_L en fonction de l'écart au seuil de la gélification de la gélatine $\epsilon = \frac{|X-X_c|}{X_c}$. Le coefficient de diffusion à temps long suit un comportement en loi de puissance, $D_L \sim \epsilon^s$, sur environ deux décades. La valeur de l'exposant,

$$s = 0.85 \pm 0.10$$

est en très bon accord avec la valeur prévue pour la viscosité par la théorie de la percolation et avec la valeur trouvée par rhéologie sur le même système (tableau 2.1). Nous avons analysé de la même façon le comportement de D_L obtenu

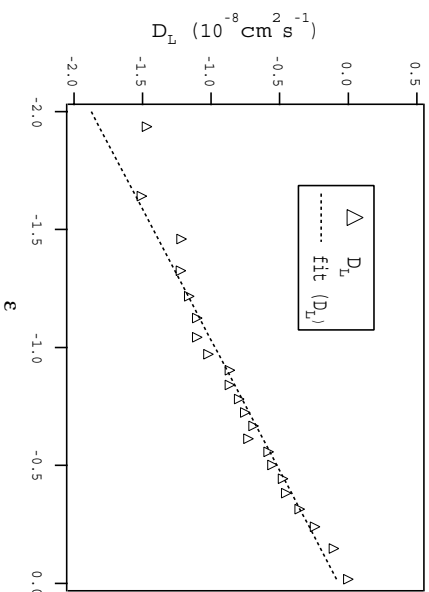


FIG. 2.16. – $\log(D_L)$ versus $\log(\epsilon)$. $D_L \sim \epsilon^s$ pour deux décades. $s = 0.85 \pm 0.10$. Les mesures ont été effectuées sur un seul endroit de l'échantillon.

parmi les mesures effectuées comme moyenne sur différentes positions. La valeur de l'exposant $s = 0.75 \pm 0.05$ est en bon accord avec la valeur trouvée dans le cas de la mesure dans une seule position de l'échantillon. Il faut toutefois souligner

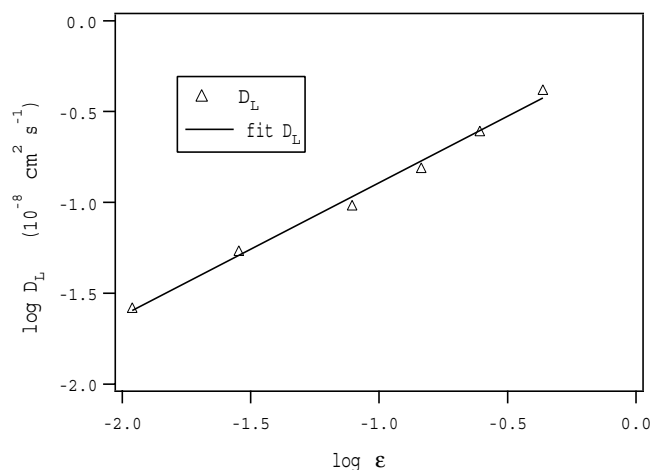


FIG. 2.17. $-\log(D_L)$ versus $\log(\epsilon)$. La pente est $s = 0.75 \pm 0.05$. Les mesures ont été effectuées sur différentes positions de l'échantillon.

qu'un temps d'échantillonnage de $T = 10$ s est trop court pour déterminer la valeur du coefficient de diffusion à temps long avec une bonne statistique. Avant de terminer ce paragraphe, il ne faut pas oublier que nous avons déterminé le coefficient de diffusion à temps long en ajustant la fonction de corrélation pour $\tau > 1$ ms avec une fonction exponentielle étirée (équation 2.8). L'exposant de cette fonction varie avec le temps de gélification comme il est montré sur la figure 2.18. Un comportement similaire a été observé dans d'autres systèmes en cours

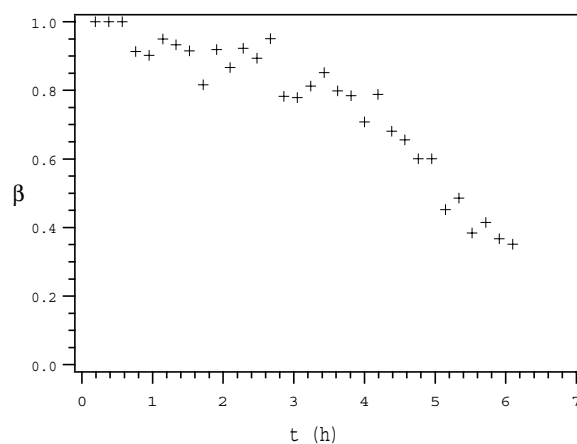


FIG. 2.18. – Variation de β en fonction de l'écart au seuil de gélification ϵ .

de gélification [59],[58].

2.12. Etat solide

La gélification d'une solution de polymère est une transition de l'état fluide à l'état solide, due à la formation d'un réseau tridimensionnel entre les chaînes de polymère. Au fur et à mesure de la progression de la gélification, des agrégats de polymère se forment, jusqu'à former un agrégat de la taille du volume qui contient la solution. La gélification est accompagnée de la formation d'un module élastique de cisaillement G_{matrice} .

Les théories d'échelle prévoient que (paragraphe 2.1.1) :

$$G_{\text{matrice}} \propto \epsilon^t \quad (2.53)$$

L'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée à $\tau = 0$, σ_I , est liée au module longitudinal de la matrice polymérique M_{matrice} qui, dans la phase gel, est assimilable au module de cisaillement G_{matrice} . Nous avons appelé $\mu = \frac{(4/3)G_{\text{matrice}}}{K_{\text{matrice}}}$, où K_{matrice} est le module osmotique de la matrice. L'amplitude de la fonction de corrélation à $\tau \rightarrow 0$ peut être écrite :

$$\left[\frac{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2}{b \langle I \rangle^2} \right]^{1/2} = \frac{1}{1 + \mu} \quad (2.54)$$

Sur la figure 2.19 nous avons tracé μ en fonction de ϵ . Nous trouvons un comportement en loi de puissance avec une valeur de l'exposant critique :

$$\begin{aligned} \mu &\propto \epsilon^t \\ f &= 1.90 \pm 0.10 \end{aligned} \quad (2.55)$$

en très bon accord avec la valeur attendue pour la théorie de la percolation dans l'analogie avec la conductivité et la valeur mesurée par rhéologie sur un gel de gélatine (tableau 2.1). Nous avons montré (paragraphe 2.9 et figure 2.11) que le coefficient de diffusion à temps court est proportionnel à l'amplitude de la fonction de corrélation pour $\tau \rightarrow 0$:

$$D_{\text{App}} \cdot \sigma = D_s \cdot \sigma = \text{constante}$$

Nous pouvons alors écrire la relation suivante :

$$D_s \propto D_0 \cdot (1 + \mu) \quad (2.56)$$

où $D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 R}$ est le coefficient de diffusion des billes de latex dans l'eau. Dans la figure 2.20 la variation de D_s/D_0 est tracée en fonction de μ : nous retrouvons le comportement linéaire prévu par l'équation 2.56 et montré dans la figure 2.11). Une extrapolation à $\mu \rightarrow 0$ donne :

$$D_s = (0.95 \pm 0.10) \cdot D_0$$

Ce résultat est en accord avec notre modèle : à temps court les billes de latex bougent en phase avec la matrice polymérique et elles ressentent de la friction due au frottement avec les molécules du solvant (η_0).

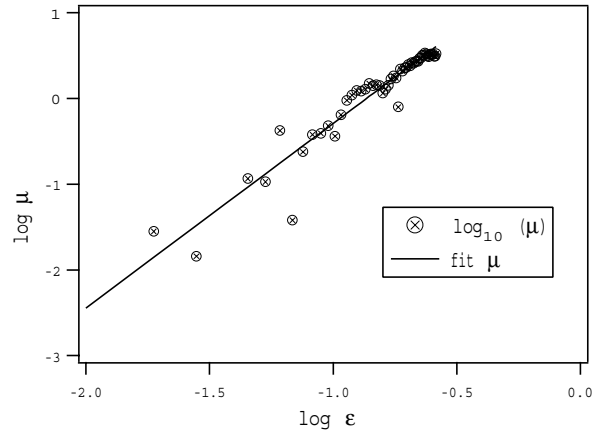


FIG. 2.19. – Variation de $\log(\mu)$ en fonction de $\log(\epsilon)$. On observe un comportement en loi de puissance pour approximativement deux décades. La valeur de l'exposant est $f = 1.90 \pm 0.10$.

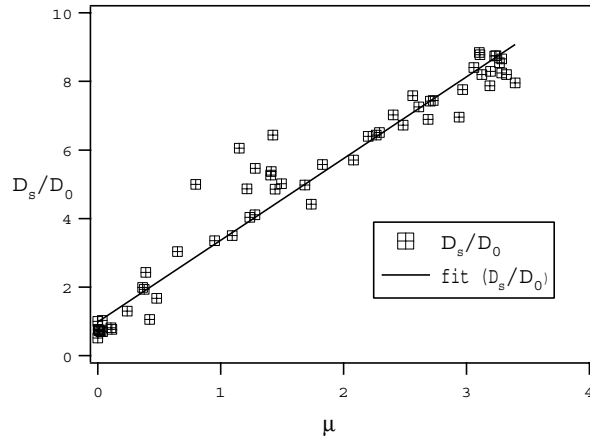


FIG. 2.20. – Variation de D_s/D_0 en fonction de μ . On peut observer une relation linéaire entre D_s et μ , la relation étant $\frac{D_s}{D_0} = 0.95 + 2.34\mu$.

2.13. Conclusion

Dans ce chapitre, j'ai discuté les résultats concernant des mesures de diffusion quasi élastique de la lumière sur une solution de gélatine et billes de latex (qui sont utilisées comme particules sondes) en cours de gélification. Nous avons choisi les conditions expérimentales suivantes :

- 1) $qR \sim 1$
- 2) $R \gg \xi_T$

où q est le vecteur de diffusion, R est la taille des billes de latex et ξ_T est la longueur de corrélation des fluctuations de la gélatine. Les conditions expérimentales

que nous avons choisies sont telles que l'intensité diffusée par la gélatine (dans les deux phases) est négligeable par rapport à l'intensité diffusée par les billes de latex.

Nous avons étudié la gélification de ce système en mesurant à la fois la moyenne temporelle et la moyenne d'ensemble de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée. Une comparaison des résultats obtenus avec ces deux méthodes de mesure ont montré que nous pouvons analyser les spectres obtenus en terme d'autobattement pur. Les inhomogénéités du gel sont négligeables à l'échelle des billes de latex. En outre nous avons montré que bien qu'un gel est un système intrinsèquement non ergodique, la non ergodicité est négligeable à l'échelle spatiale que nous avons exploré.

Nous avons montré que le coefficient de diffusion et l'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée à temps court sont liés entre eux et sont reliés au module de cisaillement du gel G . L'étude de la variation de ce module en fonction de l'écart au seuil de la gélification, ϵ , donne un comportement pour en loi de puissance avec une valeur de l'exposant $f = t = 1.9$, en très bon accord avec la valeur déterminée par des mesures de rhéologie et par certains modèles théoriques.

Nous avons aussi montré que le coefficient de diffusion à temps long D_L dans la phase sol est lié à la viscosité macroscopique de la solution de gélatine η . Le comportement de D_L près du seuil de gélification suit une loi de puissance, avec une valeur de l'exposant $s = 0.85$, cohérente avec la valeur trouvée pour t .

3. Dégradation enzymatique d'un gel de gélatine

Dégradation enzymatique de gels de gélatine

Nous avons utilisé la technique décrite dans le chapitre précédent ainsi que la corrélation de fluorescence, pour l'étude de la dégradation enzymatique de gels de gélatine. Dans cette étude nous partons d'un état solide (un gel de gélatine plus la protéase) et la dégradation du gel se manifeste par l'apparition d'un état liquide (phase sol). La protéase catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques des chaînes de la protéine (p) : quand une fraction suffisante de ces liens (p_c) est hydrolysée, nous observons la transition de la phase gel à la phase sol.

Dans cette partie, sont exposés des résultats concernant la cinétique de cette dégradation enzymatique, en fonction de la concentration en protéase.

Cette étude a été complétée par des mesures de corrélation de fluorescence qui ont permis de mesurer la diffusion de la protéase dans le gel et de mieux comprendre le mécanisme de dégradation.

3.1. La Thermolysine

La protéase que nous avons utilisé est la thermolysine (*Protéase X de Bacillus Rokko* que nous avons achetée chez Sigma).

La thermolysine est une metalloprotéase à zinc. Issue d'une bactérie thermophile, cette enzyme conserve 80% de son activité initiale après une heure de chauffage à $80^\circ C$ en solution aqueuse et est extrêmement stable à $35^\circ C$. Son pH optimal est aux alentours de 8 mais elle reste stable entre pH 6 et 9. Sa masse moléculaire est de 34600 g/mol.

La structure primaire de la thermolysine a été déterminée par séquençage chimique et par diffraction de rayons X. Ces études ont permis de définir en détail la structure de cette protéase ainsi que d'en établir un modèle tridimensionnel. Elle est formée de 316 acides aminés [62]. La thermolysine mesure environ 64 Å de long, 38 Å de large et 37 Å d'épaisseur selon des données cristallographiques. Etant donnée la masse, M , de cette protéine et sachant que le rayon hydrodynamique, R_H , d'une protéine globulaire varie comme $M^{1/3}$, les valeurs connues

3. Dégradation enzymatique d'un gel de gélatine

pour d'autres enzymes (cf. dans le dernier chapitre le travail sur le lysozyme) conduisent à $R_H=27 \text{ \AA}$ pour la thermolysine. La thermolysine est repliée autour d'un cœur hydrophobe avec un atome de zinc en son centre. Le zinc est à la fois essentiel pour l'activité enzymatique et, avec 4 ions calcium, participe à la stabilité de la thermolysine.

Dans le tableau 3.1 sont présentés la composition ainsi que le nombre d'acides aminés à la surface de la thermolysine. On peut remarquer dans ce tableau que

Résidu	Surface	Totale	Résidu	Surface	Totale
Gly	22	36	Ala	6	28
Val	5	22	Leu	2	16
Ile	5	18	Ser	12	26
Thr	16	25	Asp	14	26
Glu	2	7	Asn	16	18
Gln	12	14	Lys	8	11
Arg	7	10	His	1	8
Phe	2	10	Tyr	16	28
Trp	0	3	Pro	4	8
Met	0	2	Cys	0	0

TAB. 3.1. – *Composition totale et à la surface des résidus acides aminés de la thermolysine.*

la thermolysine ne contient pas de cystéine et de ce fait il n'existe aucun pont disulfure dans sa structure. Malgré cette absence, la stabilité de la thermolysine est garantie par de nombreux ponts salins; certains d'entre eux impliquent des résidus très éloignés dans la séquence et favorisent une structure compacte de la molécule. Une combinaison d'interactions hydrophobes, de liaisons hydrogène, d'interactions ioniques et des liaisons métalliques stabilisent cette enzyme. La réaction catalysée par la thermolysine est l'hydrolyse de liaisons peptidiques non terminales dans les protéines. Des études de cinétique enzymatique de la thermolysine commencées dans les années '60 [63], ont montré que la thermolysine hydrolyse de préférence les liaisons peptidiques qui impliquent les groupes amines de résidus hydrophobes volumineux. Des études effectuées sur différents substrats ont montré que des séquences telles que *Ile-Gly*, *Leu-Gly*, *Val-Gly*, *Phe-Gly*, *Met-Gly*, *Gly-Tyr* constituent de bons substrats pour la thermolysine [62].

3.2. Préparation de l'échantillon

En vue de l'étude de leur dégradation, les échantillons sont préparés de la façon suivante : une solution à 1% de gélatine et de particules sondes (billes de latex, $\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$) à la température $\mathcal{T} = 40^\circ\text{C}$ dans une solution tampon 50mM Tris-HCl à $pH = 7.4$, est préparée comme décrit dans le chapitre 2.

Une solution mère de thermolysine dans le même tampon à une concentration de 0.12 mg/ml est préparée et stockée à -20°C .

Les solutions de gélatine et d'enzyme à 40°C , sont mélangées directement dans les cellules de mesure en proportions variables selon la concentration finale désirée (de 0.6 à 4 nM). La solution est agitée vigoureusement (vortex) quelques secondes et ensuite trempée à 4°C pendant 1 heure. Un gel se forme rapidement avant que la dégradation n'ait significativement avancé. L'échantillon est alors transféré dans un bain thermostaté à 14°C pour les mesures de dégradation.

Le protocole de préparation de l'échantillon limite beaucoup la fenêtre de concentration en thermolysine accessible, la concentration maximale pour laquelle nous avons la formation d'un gel étant 4 nM. Au delà de cette concentration, la cinétique de dégradation est trop rapide par rapport à la cinétique initiale de gélification.

3.3. Stabilité de la thermolysine

Aux concentrations les plus faibles en thermolysine, le temps de la dégradation des gels peut être de plusieurs jours.

Nous avons voulu tester et quantifier la diminution de l'activité enzymatique de la protéase due à son action continue pendant ce temps très long. Ce contrôle permet de vérifier aussi si la concentration en protéase active diminue par un effet d'autoprotéolyse.

Les contrôles ont été effectués de la façon suivante : nous avons préparé, pour deux concentrations en thermolysine ($1 \cdot 10^{-7}\text{M}$ et $5 \cdot 10^{-8}\text{M}$), quatre solutions pour chaque concentration en enzyme, dans

- une solution 50 mM Tris-HCl à $pH 7$
- une solution 50 mM Tris-Maléate, 10 mM CaCl_2 à $pH 7$,
- une solution 0.1% de gélatine dans 50 mM Tris-HC à $pH 7.4$
- une solution 0.5% de gélatine dans 50 mM Tris-HCl à $pH 7.4$

Les solutions ont été gardées pendant plusieurs jours à 14°C .

L'activité de la thermolysine a été étudiée par des mesures de densité optique à 345 nm en présence de N-(3-[2 Furyl] acryloyl) - Glycine - Leucine - amide (FA-Gly-Leu-NH₂), un très bon substrat de la thermolysine. Ce substrat est un chromophore absorbant la lumière à 345 nm. Lorsqu'il s'hydrolyse en Furyl acryloyl-Glycine et Leucine-amide ce substrat perd sa propriété d'absorbance.

L'activité enzymatique est alors déductible de la variation de l'absorbance à 345 nm : la disparition du substrat au cours de l'hydrolyse se traduit par une diminution de la densité optique mesurée.

$$\text{Activité (M}^{-1}\text{ min}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta(A_{345})}{[E] \cdot t} \quad (3.1)$$

où $\Delta(A_{345})$ est la densité optique à 345 nm et $[E]$ la concentration en enzyme (exprimée en M) : pour la réalisation de ces expériences, nous avons mélangé, à

des intervalles de 12 heures, dans une cuve de spectrophotométrie, 0.5 ml de la solution de thermolysine et 0.5 ml de la solution du substrat à la concentration 1g/l, les deux solutions préalablement chauffées à 40°C. Nous avons suivi la diminution de l'absorbance à 345 nm en fonction du temps.

Ces mesures ont montré qu'après 41 h l'enzyme dans le tampon Tris-HCl perd toute son activité alors que l'enzyme dans le tampon Tris-Maléate CaCl₂ conserve 20% de son activité initiale et ceci pour les deux concentrations de thermolysine. Par contre, l'activité de l'enzyme est conservée en présence de la gélatine. La gélatine stabilise l'enzyme. Nous avons observé que pour la concentration la plus élevée en gélatine (0.5 %), l'activité de la thermolysine après 118 heures n'est pas changée (dans l'erreur de la mesure). Les résultats à la concentration 10⁻⁷ M sont montrés dans le tableau 3.2.

temps (h)	Activité thermolysine (μMmin^{-1}) ($[\text{E}]=10^{-7}\text{M}$)	
	[Gel]=0.1 %	[Gel]=0.5 %
0	137	64
41	137	66
118	75	67

TAB. 3.2. – *Activité protéolytique de la thermolysine en présence de la gélatine; la concentration en l'enzyme est 10⁻⁷ M.*

Pour résumer, nous pouvons conclure de ces mesures, qu'une "forte" concentration de gélatine stabilise l'enzyme et réduit très fortement la capacité d'autoprotéolyse de la thermolysine.

L'activité protéolytique de la thermolysine reste constante pendant plusieurs jours d'activité continue en présence de la gélatine.

3.4. Microrhéologie

3.4.1. Détermination du temps de dégradation

Dans le chapitre précédent nous avons vu qu'il est possible de suivre la transition de gélification en étudiant, par diffusion quasi élastique de la lumière, la dynamique de grosses billes de latex ($R \sim 220$ nm) dans une solution de gélatine en cours de gélification. Nous avons réutilisé cette technique pour l'étude de la dégradation enzymatique de gels de gélatine. Pour cette étude nous avons travaillé à des faibles concentrations en thermolysine : de 0.6 à 4 nM. Les échantillons ont été préparés comme il est décrit dans le paragraphe 3.2.

Nous avons mesuré la variation de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée pendant la dégradation enzymatique, $g_T^{(2)}(q, t, \tau)$, où $T = 1800$ s est la durée de chaque mesure, t est le temps lié à la transition de phase et τ le temps de corrélation.

Toutes les mesures ont été effectuées pour un angle fixe $\theta = 20^\circ$ correspondant à un vecteur de diffusion $q = 4.58 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$, soit $qR = 1$ pour les particules sondes.

Dans la figure 3.1 il est montré un exemple de la variation de $g_T^{(2)}(q, t, \tau)$ pendant la dégradation du gel à la concentration en thermolysine de 1.68 nM.

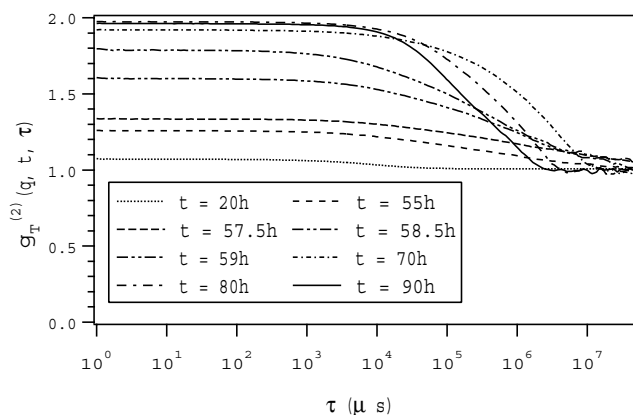


FIG. 3.1. – Variation de $g_T^{(2)}(q, t, \tau)$ pendant la dégradation par la thermolysine d'un gel 1% de gélatine. La concentration en thermolysine est 1.68 nM.

Comme dans le cas de la gélification de la gélatine traité dans le chapitre précédent, nous pouvons observer dans la figure 3.1, qu'il y a une brusque variation de l'amplitude de la fonction de corrélation correspondant à la transition de phase ainsi qu'une variation de la dynamique du système entre la phase sol et la phase gel. Nous voulons déterminer et étudier le temps de dégradation t_{gel} en fonction de la concentration en thermolysine.

Nous avons analysé les temps courts de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée par la méthode de développement en cumulants. La méthode utilisée est présentée en détails dans l'annexe B.

Nous avons déterminé la variation, pendant la dégradation enzymatique, de l'amplitude de $g_T^{(2)}(q, t, \tau)$ et du coefficient de diffusion à temps court D_s . Un exemple est montré sur la figure 3.2.

Nous pouvons observer qu'aussi bien le coefficient de diffusion à temps court, D_s , que l'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée, subissent une brusque variation concomitante. En particulier le coefficient de diffusion à temps court décroît jusqu'à un certain temps au delà duquel il reste constant. L'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée, parallèlement, reste constante pendant les premières heures, puis subit une brusque augmentation et atteint un plateau au delà d'un certain temps.

Comme dans le cas discuté dans le chapitre 2, au delà de ce temps le milieu sondé par les particules est liquide. Ce temps de dégradation est noté t_{gel} .

Dans le chapitre précédent nous avons montré que le coefficient de diffusion à

3. Dégradation enzymatique d'un gel de gélatine

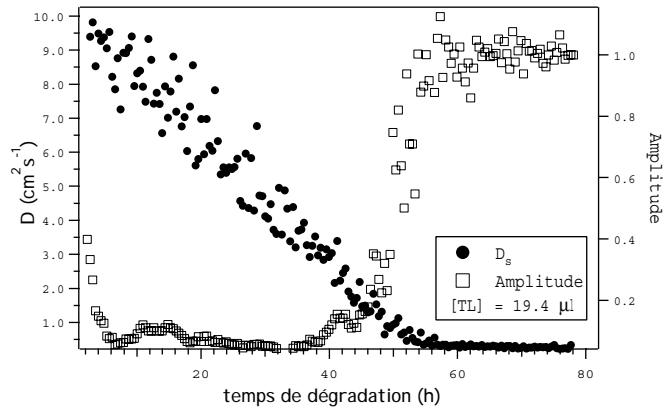


FIG. 3.2. – Variation de l'amplitude de $g_T^{(2)}(q, t, \tau)$ et du coefficient de diffusion à temps court D_s pendant la dégradation enzymatique par la thermolysine d'un gel 1% de gélatine. La concentration de la thermolysine est 1.68 nM.

temps court D_s est directement proportionnel au module élastique de cisaillement du gel G_{matrice} (équation 2.56). Sur la figure 3.3 nous avons tracé le comportement du coefficient de diffusion à temps court, D_s en fonction de l'écart au seuil de la transition ϵ que nous avons déterminée comme décrit dans le chapitre précédent (2.10).

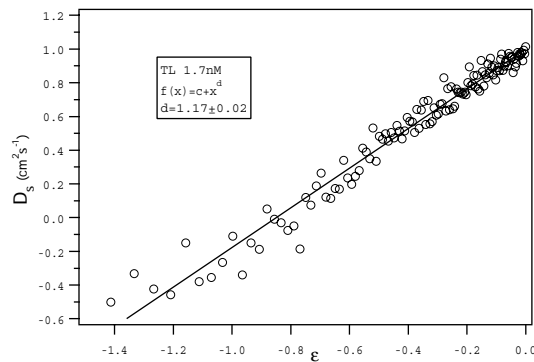


FIG. 3.3. – Variation du coefficient de diffusion à temps court D_s pour un gel 1% de gélatine et billes de latex en fonction de l'écart au seuil de la transition ϵ . La transition de gel à sol est due à l'action protéolytique de la thermolysine ($[E] = 1.68 \text{ nM}$).

Un ajustement des données donne :

$$G \propto \epsilon^{(1.17 \pm 0.02)} \quad (3.2)$$

Ce résultat est surprenant car il n'avait jamais été observé expérimentalement et il n'est pas explicable sur la base des théories existantes (cf. tableau 2.1).

Nous avons de cette façon déterminé t_{gel} pour différentes concentrations en enzyme, comme il est montré dans la figure 3.4.

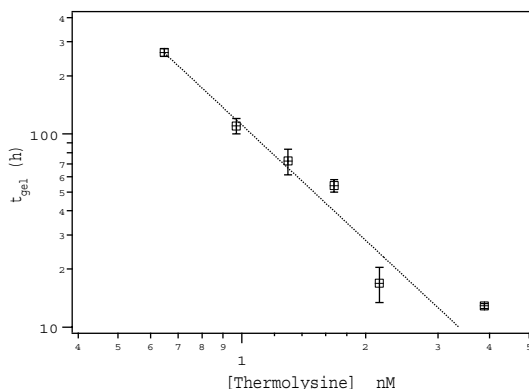


FIG. 3.4. – Variation du temps de protéolyse t_{gel} en fonction de la concentration en enzyme. La ligne est le résultat du fit et donne : $t_{gel} \propto [E]^{-(1.95 \pm 0.15)}$.

Un fit des données de la figure 3.4 avec une fonction de la forme :

$$t_{gel} \propto [E]^{-\frac{1}{\beta}} \quad (3.3)$$

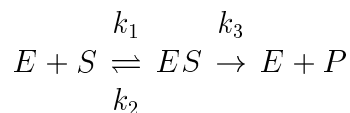
$$\beta^{-1} = 1.95 \pm 0.15 \quad (3.4)$$

donne un résultat qui est inattendu dans le cadre des réactions enzymatiques classiques.

Pour comprendre ce résultat nous avons besoin d'introduire les points principaux de la théorie de la cinétique enzymatique classique, ou de Michaelis-Menten.

3.4.2. Cinétique enzymatique de Michaelis-Menten

Une réaction enzymatique peut être schématisée de la façon suivante [37] : si on appelle E l'enzyme, S le substrat de l'enzyme, ES le complexe enzyme substrat et P le produit de la réaction enzymatique,



k_1 , k_2 et k_3 sont les constantes de vitesse de la réaction.

La réaction est contrôlée par la concentration relative entre l'enzyme et le substrat et par l'affinité de l'enzyme pour le substrat. La vitesse de la formation du produit à partir du complexe ES , V , est donnée par la relation suivante :

$$V = k_3 [ES] \quad (3.5)$$

3. Dégradation enzymatique d'un gel de gélatine

La vitesse de la formation ainsi que la vitesse de la dissociation du complexe ES sont, respectivement :

$$V_{\text{form}} = k_1 [E][S] \quad (3.6)$$

$$V_{\text{diss}} = (k_2 + k_3) [ES] \quad (3.7)$$

A l'équilibre, ces deux vitesses sont égales. En comparant les expressions 3.6 et 3.7 on trouve :

$$[ES] = \frac{k_1}{(k_2 + k_3)} [E][S] \quad (3.8)$$

Nous pouvons introduire la constante de Michaelis-Menten k_M

$$\frac{(k_2 + k_3)}{k_1} = k_M \quad (3.9)$$

qui met en relation toutes les constantes de dissociation qui sont impliquées dans la réaction de dégradation enzymatique. La constante de Michaelis Menten est une grandeur caractéristique de chaque enzyme qui dépend fortement de son affinité pour le substrat ainsi que des conditions physico-chimiques tels que la température, le pH et la force ionique.

Nous pouvons montrer que, à l'état stationnaire, la vitesse de la réaction enzymatique V (équation 3.5 est :

$$V = \frac{[S]}{k_M + [S]} V_{\text{max}} \quad (3.10)$$

Cette équation est appelé équation de Michaelis Menten. V_{max} est la vitesse maximale de la réaction qui est atteinte quand toutes les enzymes sont saturées avec le substrat :

$$V_{\text{max}} = k_3 [E] \quad (3.11)$$

Nous pouvons observer dans l'équation 3.10 que si la concentration en substrat est très faible, c'est à dire $[S] \ll k_M$, la vitesse de la réaction V est directement proportionnelle à la concentration en substrat. A l'inverse, si la concentration en substrat est saturant, c'est à dire $[S] \gg k_M$, la vitesse de la réaction V est égal à V_{max} et elle est indépendante de la concentration du substrat.

3.4.3. Analyse des résultats

Les mesures de dégradation enzymatique de gels de gélatine présentées dans le paragraphe 3.4.1 ont donné une relation entre le temps de dégradation et la concentration en enzyme : $t_{\text{gel}} \propto [E]^{1.95 \pm 0.15}$, comme il est montré sur la figure 3.4. Ce résultat est surprenant dans le cadre de la cinétique enzymatique classique.

En effet, la gélatine consiste en une répétition de la séquence d'acides aminés Gly-X-Y (paragraphe 2.1) où X et Y indiquent des acides aminés variables. Des 20 acides aminés possibles, seuls les séquences Gly-Ile, Gly-Leu, Gly-Val, Gly-Phe,

Gly-Met, Gly-Tyr sont reconnues par la thermolysine (paragraphe 3.1).

À partir de la composition moyenne en acides aminés de la gélatine [64], nous pouvons estimer à environ 18% le pourcentage de sites de reconnaissance pour la thermolysine pour chaque chaîne de gélatine. Pour une solution 1% de gélatine de masse moléculaire $M_W \sim 10^5$ g/mol, nous pouvons alors estimer que la concentration initiale en substrat pour la thermolysine $[S_0]$ est d'environ 18 μM . En outre la masse moyenne d'un acide aminé étant à environ 100 g/mol, nous pouvons estimer qu'une chaîne de gélatine contient environ 1000 acides aminés, dont 180 constituent un substrat pour l'enzyme.

La gélatine est à la concentration de recouvrement, c'est à dire qu'il y a en moyenne une chaîne de gélatine pour chaque lien entre les chaînes.

Appelons n_c le nombre critique de liens qu'il faut défaire pour que la transition gel-sol se fasse. La valeur exacte de n_c dépend des caractéristiques du système mais des simulations numériques de modèles de percolation [65] ou du champ moyen [66] ont montré que $n_c < 0.5$. Nous avons vu qu'en moyenne chaque chaîne de gélatine contient environ 180 sites de coupure pour la thermolysine. Du point de vue de la transition de phase, il suffit que la thermolysine hydrolyse un seul de ces sites pour que la transition ait lieu. Nous pouvons alors estimer que, au seuil de la transition, la consommation en substrat par la thermolysine est inférieure à $0.5/180 \approx 3 \cdot 10^{-3} [S_0]$.

La consommation en substrat est négligeable à la transition. La quantité de substrat ne variant pas, la vitesse de dégradation V définie dans l'équation 3.10 peut être considérée constante pour des temps $t \leq t_{gel}$. Nous pouvons écrire :

$$t_{gel} \propto \frac{1}{V} \quad (3.12)$$

Dans un processus de cinétique enzymatique classique, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en enzyme (équations 3.10 et 3.11). Le résultat que nous trouvons (figure 3.4) est donc différent des prévisions classiques.

Ce résultat dépend fortement de la très faible concentration en thermolysine : des mesures sur la dégradation d'un gel de fibronectine par la thermolysine à des concentrations en enzyme comprises entre 0.1 et 1 μM donnent, en effet, le résultat prévu par l'équation 3.11 [1]. Le processus de dégradation semble être contrôlé par la diffusion de l'enzyme.

Pour analyser ce résultat, nous pouvons schématiser la diffusion de l'enzyme dans le gel de la manière suivante. Les molécules d'enzyme sont distribuées au hasard dans tout le volume.

Concentrons nous sur une molécule d'enzyme particulière et appelons d la distance moyenne entre deux molécules d'enzyme. Un petit schéma est montré dans la figure 3.5. Nous pouvons subdiviser le gel en sous-régions de volume $v = d^3$, chacune contenant en moyenne une molécule d'enzyme qui diffuse, à l'intérieur de ce sousvolume, avec un coefficient de diffusion D . La concentration en enzyme

3. Dégradation enzymatique d'un gel de gélatine

peut être écrite :

$$[E] = \frac{1}{d^3} \quad (3.13)$$

Une fois que l'enzyme a hydrolysé un lien, la probabilité qu'il hydrolyse une liaison peptidique voisine est très élevée car la concentration en substrat dans le volume d^3 est élevée.

Il existe, donc, une corrélation entre les liens qui disparaissent après un temps $\tau_H = \left(\frac{d^2}{D}\right)$, qui est le temps nécessaire pour que les fluctuations de concentration de l'enzyme relaxent d'une distance d .

Si le temps de dégradation t_{gel} est plus petit que τ_H nous ne pouvons pas négliger cette corrélation.

L'enzyme en hydrolysant à l'intérieur d'un sousvolume v crée une région liquide à l'intérieur du gel. On peut supposer que statistiquement le comportement de chaque molécule d'enzyme soit le même et extrapoler les effets dans un sousvolume v à tout le volume occupé par le gel \mathcal{V} .

Une molécule d'enzyme hydrolyse, en moyenne, n_b liens peptidiques dans un temps t .

Appelons a la distance moyenne entre deux séquences peptidiques qui sont substrat pour l'enzyme. La concentration en substrat peut être écrite, alors :

$$[S] = \frac{1}{a^3} \quad (3.14)$$

et nous pouvons définir la densité de séquences peptidiques substrat pour l'enzyme :

$$\rho = \left(\frac{a}{d}\right)^3 \quad (3.15)$$

Nous pouvons alors calculer le nombre de liens hydrolysés dans un temps t par la thermolysine par densité de liaisons peptidiques, y , en utilisant les équations 3.14 et 3.15 :

$$y = n_b \cdot \left(\frac{a}{d}\right)^3 = \frac{n_b}{[S]d^3} \quad (3.16)$$

Si l'enzyme diffuse dans v par effet de l'agitation thermique avec un coefficient de diffusion D , le nombre des liens hydrolysés à l'instant t est :

$$n_b \propto \frac{D \cdot t}{a^2} \quad (3.17)$$

En substituant les équations 3.17, 3.14 et 3.13 dans l'équation 3.16, nous trouvons :

$$y = [S]^{-1/3} D t [E] \quad (3.18)$$

Si la valeur critique de y à la transition, y_c , est indépendant du volume, on peut écrire :

$$t_{gel} \propto \frac{[S]^{1/3}}{D [E]} \quad (3.19)$$

Pour un système brownien, D est une constante et on trouve :

$$t_{gel} \propto \frac{1}{[E]} \quad (3.20)$$

C'est qui est prévue par un processus de cinétique enzymatique classique de Michaelis Menten.

Supposons, maintenant, une diffusion anormale du type :

$$\langle r^2 \rangle \propto t^\beta \quad (3.21)$$

avec $\beta \leq 1$ ($\beta = 1$ dans le cas de la diffusion brownienne "classique"). Nous définissons, ainsi, un coefficient de diffusion apparent ($D = D(t)$) :

$$D = \frac{d\langle r^2 \rangle}{dt} \propto t^{\beta-1} \quad (3.22)$$

En substituant l'équation 3.22 dans l'équation 3.19, nous trouvons :

$$t_{gel} \propto [E]^{-\frac{1}{\beta}} \quad (3.23)$$

avec $\beta < 1$. Nous pourrions, ainsi, expliquer le résultat de la figure 3.4.

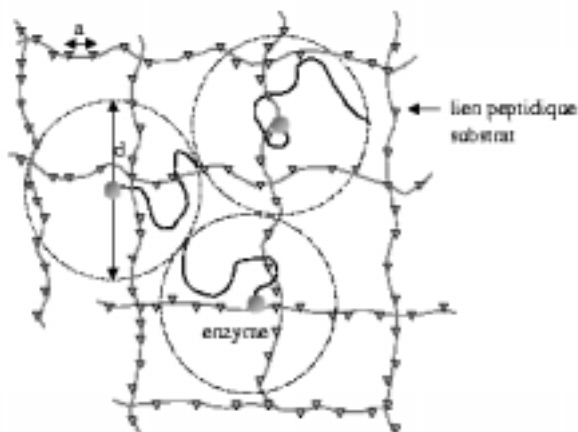


FIG. 3.5. – Schéma de diffusion de l'enzyme dans le gel : l'enzyme diffuse à l'intérieur d'un volume $\propto d^3$, où d est la distance moyenne entre des molécules d'enzyme. Si nous appelons a la distance moyenne entre deux liens peptidiques substrat pour l'enzyme, la concentration en substrat est $[S] \propto a^{-3}$. Dans son processus de diffusion in crée de zones liquides à l'intérieur du gel.

Pour vérifier cette hypothèse, nous devons étudier la diffusion de la thermolysine. Cette dernière étant trop petite pour être étudiée par diffusion de la lumière, nous en avons mesuré la diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence.

3.5. Mesures de Corrélation de Fluorescence

3.5.1. Marquage de la thermolysine

Pour les expériences de corrélation de fluorescence, nous avons marqué la thermolysine avec une molécule fluorescente *Fluorescéine Isothiocyanate* (FITC). Le FITC se complexe avec la protéine à travers des liaisons avec les amines primaires. Le maximum d'émission de fluorescence de la protéine ainsi marquée est à $518nm$. Pour marquer la thermolysine, nous avons procédé comme décrit dans la suite :

- une solution de thermolysine à la concentration de $1g/l$ a été préparée dans une solution tampon 100 mM Carbonate de Sodium à $pH9$;
- le FITC est dissous dans du *Dimethylsulfovide* (DMSO) à la concentration de 10 g/l et est ensuite mélangé avec la solution de thermolysine ($6.74 \cdot 10^{-2}$ ml de la solution de FITC dans 1 ml de la solution de thermolysine) ;
- la solution est passée dans une colonne de chromatographie (Sephadex G-25) qui permet de séparer, par perméation de gel, l'excès de FITC non conjugué avec la protéine : seule la protéine marquée est récupérée.

La concentration finale de la thermolysine est mesurée par des mesures de Densité Optique (DO) selon la formule suivante :

$$\text{concentration protéine}(g/l) = \frac{[A_{280} - (A_{494} \cdot 0.3)] \cdot \text{facteur dilution}}{\epsilon} \quad (3.24)$$

où ϵ est le coefficient d'extinction molaire de la thermolysine à $280nm$:

ϵ_{280} (thermolysine) $= 6.61 \cdot 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [61]. La masse molaire de la thermolysine étant de $M_W = 34600\text{g/mol}$, on peut exprimer ϵ en $\text{g} \cdot (\text{l cm})^{-1}$ ($\epsilon = 1.91\text{ g} \cdot (\text{l cm})^{-1}$). Le facteur 0.3 qui multiplie A_{494} est un facteur de correction qui compense l'absorbance du FITC à 280 nm .

Pour calculer la quantité de protéine marquée avec le FITC, Q , on utilise la formule suivante :

$$Q = \frac{A_{494} \cdot \text{facteur dilution}}{68000 \cdot \text{concentration protéine}(M)}$$

où $68000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ est le coefficient d'extinction molaire à $pH8$ et à 494 nm du FITC.

3.5.2. Préparation de l'échantillon

La préparation du gel de gélatine est la même que pour les mesures de diffusion de la lumière. La concentration de la solution de gélatine est de 1% , la concentration de la solution de thermolysine marquée est de 3 nM .

Les billes de latex fluorescentes ont été achetées chez Molecular Probes. Elles ont une taille $R = 10\text{ nm}$.

3.5.3. La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est une technique qui, à travers l'analyse des fluctuations de fluorescence, permet l'étude de processus dynamiques moléculaires tels que la diffusion ou les fluctuations conformationnelles de molécules. Dans une expérience de corrélation de fluorescence, des particules fluorescentes contenues dans un volume V , sont excitées par un laser. Les particules excitées relaxent et émettent une onde électromagnétique qui est envoyée au corrélateur. Les fluctuations de l'intensité de la fluorescence émise sont analysées à l'aide d'un corrélateur qui calcule la fonction d'autocorrélation de l'intensité de fluorescence $G(t)$.

L'intensité de fluorescence varie en fonction du nombre instantané de particules contenues dans le volume observé, qui varie à cause de la diffusion des particules (les particules entrent et sortent du volume) ou à cause de réactions chimiques. La forme de la fonction de corrélation dépend, entre autre, du système que l'on étudie (si par exemple il est constitué de plusieurs espèces chimiques, ou si parallèlement au processus diffusif le système subit des réactions chimiques, par exemple) et de la forme du volume éclairé.

Dans le cas le plus simple d'un système constitué d'une seule espèce chimique, et si le volume d'excitation est gaussien, la fonction de corrélation de l'intensité de fluorescence s'écrit :

$$G(t) = \langle I(t') I(t' + t) \rangle = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{t}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\omega^2 \tau_D} \right)^{-1/2} \quad (3.25)$$

où $\langle N \rangle$ est le nombre moyen de particules dans le volume V , $\omega = \omega_z / \omega_{xy}$ (ω_z et ω_{xy} sont respectivement la taille du faisceau dans les directions parallèle et perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau), $\tau_D = \frac{\omega_{xy}^2}{4D}$ est le temps caractéristique de diffusion à travers la région illuminée et D est le coefficient de diffusion. Cette expression implique la connaissance de la forme exacte du volume diffusant.

La théorie [67] ainsi que la forme de $G(t)$ (eq. 3.25) montrent que pour obtenir un bon rapport signal/bruit, i.e. pour obtenir une grande amplitude de la fonction de corrélation $G(t)$, il est nécessaire que le nombre de particules dans le volume diffusant soit petit. C'est pour cette raison que le volume éclairé V doit être le plus petit possible, ce qui est possible en utilisant un microscope confocale, ou, encore mieux, un microscope à deux photons.

FCS biphotonique

Au cours de nos expériences de corrélation de fluorescence, nous avons utilisé un microscope confocal biphotonique qui assure une résolution optique très élevée.

Dans un montage expérimental confocal, la lumière d'excitation du laser est en-

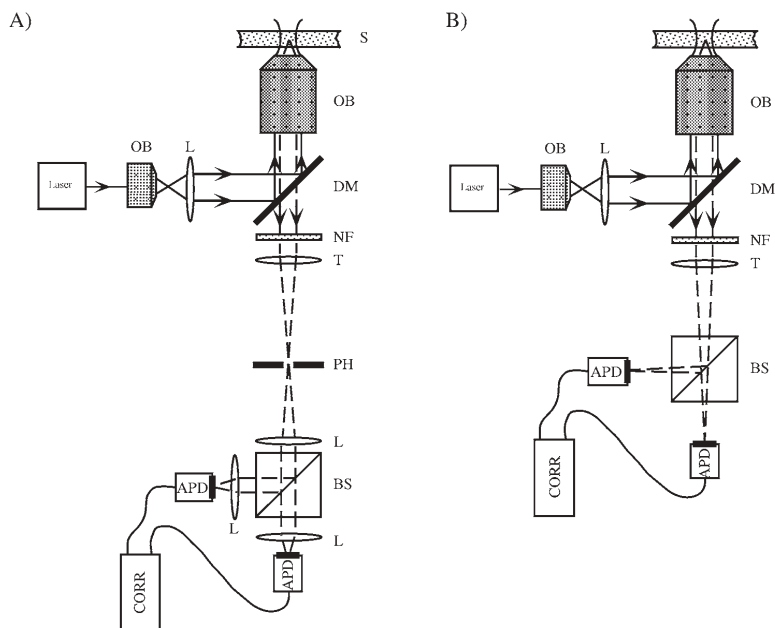


Figure 1. (A) Scheme of a standard confocal experimental setup for FCS. (B) Two-photon modification of the confocal setup. Abbreviations: S: sample; OB: objective; L: lens; DM: dichroic mirror; NF: notch filter; T: tube lens; PH: pinhole; BS: beamsplitter; APD: avalanche photodiode; CORR: correlator.

FIG. 3.6. – Schéma d'un dispositif de spectroscopie de corrélation de fluorescence par microscopie confocale (à gauche) et biphotonique (à droite) [67].

voyé dans l'objectif du microscope qui focalise la lumière à l'intérieur de l'échantillon.

La probabilité d'avoir une excitation à deux photons étant très faible, l'absorption et donc l'émission fluorescente est limitée à une petite région autour du point focal de l'objectif du microscope où la densité de l'énergie est plus élevée.

Dans la figure 3.6 est représenté un petit schéma d'un appareil de spectroscopie de corrélation de fluorescence.

Les expériences de FCS ont été effectuées au Laboratoire de Photophysique Moléculaire de l'Université Paris-XI, en collaboration avec M. B. Arrio.

3.6. Mesures de corrélation de fluorescence

Nous avons mesuré par FCS la diffusion de billes de latex fluorescentes de taille $R = 10$ nm dans un gel 1% de gélatine et dans de l'eau ainsi que la diffusion de la thermolysine marquée avec du FITC à une concentration de $3\mu\text{M}$ dans l'eau, dans une solution 50% eau/glycérol et dans un gel 1% de gélatine.

3.6.1. Mesures de diffusion des billes de latex

Sur la figure 3.7 sont montrés les résultats concernant les mesures effectuées sur les billes de latex dans l'eau et dans un gel 1%.

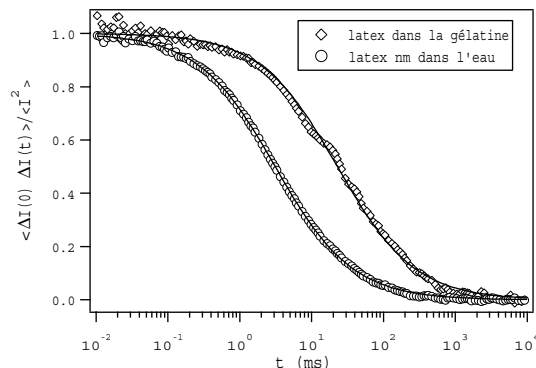


FIG. 3.7. – Fonction de corrélation de l'intensité de fluorescence normalisée $g(t)$ en fonction du temps de corrélation t pour : des billes de latex dans l'eau (cercles) et des billes de latex dans un gel 1% de gélatine (diamants).

Dans le cas dans l'eau la fonction de corrélation de l'intensité de fluorescence normalisée $g(t)$ est celle attendue pour une simple diffusion. Ne connaissant pas la forme exacte du volume diffusant, nous avons ajusté les données avec une fonction phénoménologique de la forme :

$$g(t) = \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{\tau}\right)^\alpha} \quad (3.26)$$

où τ est le temps de relaxation et α est un paramètre qui dépend de la forme du volume illuminé par le laser. Le fit a donné une valeur de $\tau = 3.10 \pm 0.05$ ms et de $\alpha = 0.81 \pm 0.02$.

En ce qui concerne les mesures de diffusion de billes de latex dans la gélatine, les données sont bien fittées par la fonction 3.26 avec la même valeur de α . Nous trouvons une valeur de $\tau = 23.0 \pm 0.5$ ms plus grand que celui de la diffusion dans l'eau, comme attendu. La taille des pores du gel étant de $\xi_T = 43 \pm 4$ nm (chapitre 2) et les billes de latex ayant un diamètre de 20 nm et n'interagissant pas avec la gélatine, elles peuvent diffuser librement dans le gel.

La présence du gel modifie la viscosité du milieu et le coefficient de diffusion des billes dans le gel est plus petit que celui dans l'eau.

3.6.2. Mesures de diffusion de la thermolysine

Nous avons mesuré la diffusion de la thermolysine marquée avec le FITC dans de l'eau. Le signal de la thermolysine étant plutôt faible, nous avons vérifié qu'en

3. Dégradation enzymatique d'un gel de gélatine

augmentant la viscosité de la solution, la courbe est translatée vers des temps de corrélation plus grands. Nous avons comparé la diffusion de la thermolysine dans l'eau et dans une solution 50% d'eau/glycérol.

Dans la figure 3.8 sont montrés les résultats concernant la diffusion de la thermolysine dans l'eau (cercles) et dans le mélange d'eau/glycérol (diamants).

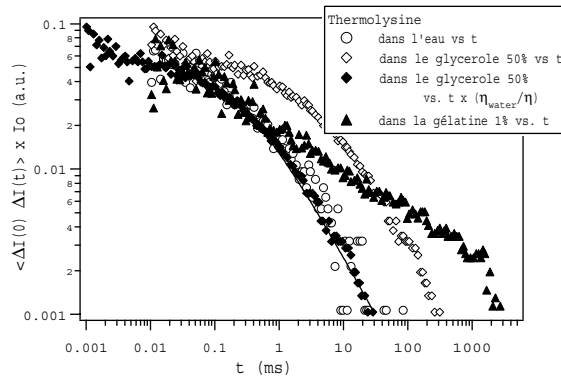


FIG. 3.8. – *Fonction de corrélation de l'intensité de fluorescence normalisée $g(t)$ en fonction du temps de corrélation t pour : de la thermolysine dans l'eau (cercles), de la thermolysine dans une solution 50% d'eau/glycérol (diamants) et dans un gel 1% de gélatine (triangles). Pour tenir compte de l'éventuelle différence de concentration en enzyme entre les différents échantillons, la fonction de corrélation de l'intensité de fluorescence est multipliée par l'intensité de fluorescence moyenne, I_0 .*

La courbe tracée en diamants pleins correspond à la même mesure qu'en diamants ouverts, où nous avons éliminé l'effet de la viscosité en multipliant les données par $\eta_{\text{eau}}/\eta_{\text{gly}}$, où η_{eau} et η_{gly} sont la viscosité de l'eau et du glycérol respectivement. Une comparaison entre cette courbe et la courbe de diffusion de la thermolysine dans l'eau (cercles) montre que, une fois éliminé l'effet de la viscosité, les deux courbes se superposent parfaitement.

Nous avons ajusté ces données avec la fonction 3.26 avec une valeur de α imposée et égal à $\alpha = 0.81$. Le fit a donné une valeur pour τ :

$$\tau = 0.22 \pm 0.01 \text{ ms} \quad (3.27)$$

La ligne continue dans la figure 3.9 correspond au résultat de ce fit.

La dynamique de la thermolysine dans l'eau a un comportement purement diffusif.

Dans la figure 3.8 la courbe en triangles représente la diffusion de la thermolysine dans une solution 1% de gélatine. La forme de cette courbe est tout à fait différente de celle obtenue pour la diffusion de l'enzyme dans l'eau : le mécanisme qui gouverne la diffusion de la thermolysine dans la gélatine est donc différent par rapport à la diffusion brownienne.

Il faut cependant remarquer que la partie initiale de la courbe de diffusion dans le gel se superpose à la courbe de diffusion dans l'eau pour des temps de corrélation $t < 3$ ms, indiquant un comportement diffusif à temps court. Pour des temps de corrélation $t > 3$ ms la dynamique de la thermolysine dans la gélatine est due à des mécanismes différents.

Dans l'hypothèse où la fonction de corrélation de l'intensité de fluorescence est seulement fonction du déplacement moyen carré, nous pouvons introduire la variable de *déplacement carré moyen réduit* $\left\langle \left(\frac{r}{R}\right)^2 \right\rangle$ (où R est une longueur qui dépend des caractéristiques de l'appareillage de mesure), qui nous permet décrire l'équation 3.26 :

$$g(t) = \frac{1}{1 + \left\langle \left(\frac{r}{R}\right)^2 \right\rangle^\alpha} \quad (3.28)$$

Et, en inversant cette expression, nous trouvons :

$$\left\langle \left(\frac{r}{R}\right)^2 \right\rangle = \left(\frac{1}{g(t)} - 1 \right)^{\frac{1}{\alpha}} \quad (3.29)$$

Nous avons calculé le déplacement moyen carré de la thermolysine à partir des données expérimentales de la fonction de corrélation de l'intensité de fluorescence de la thermolysine dans la gélatine. Les résultats sont sur la figure 3.9 où le déplacement moyen carré est tracé en fonction du temps de corrélation t .

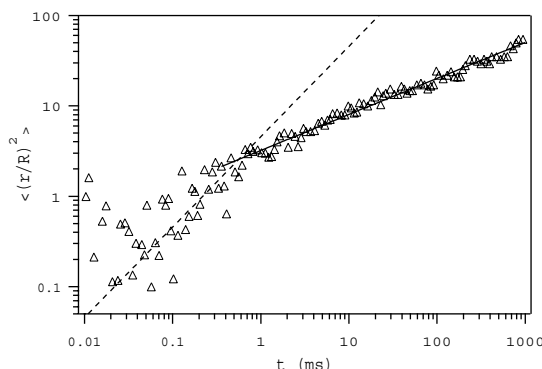


FIG. 3.9. – *Déplacement moyen carré de la thermolysine dans un gel 1% de gélatine. La courbe présente deux parties distinctes : un comportement diffusif pour $t < 3$ ms ($\langle r^2 \rangle \propto t$), et un comportement sousdiffusif pour $t > 3$ ms ($\langle r^2 \rangle \propto t^{0.4}$).*

Deux phases caractérisent la diffusion de la thermolysine dans le gel :

- pour $t < 3$ ms nous observons un comportement diffusif avec :

$$\left\langle \left(\frac{r}{R}\right)^2 \right\rangle = \frac{t}{0.22}$$

- pour $t > 3$ ms un ajustement des données donne :

$$\left\langle \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right\rangle = a \cdot t^{\beta'} \quad (3.30)$$

avec :

$$\begin{aligned} a &= (3.2 \pm 0.1) \\ \beta' &= (0.40 \pm 0.01) \end{aligned} \quad (3.31)$$

Ce résultat est en accord avec le résultat trouvé par diffusion de la lumière (paragraphe 3.4.3). Par diffusion de la lumière nous avons trouvé $\langle r^2 \rangle \propto t^\beta$ avec une valeur de l'exposant $\beta = 0.51 \pm 0.04$ (équation 3.21).

3.6.3. Mécanisme proposé

Pour expliquer le comportement sousdiffusif de la thermolysine dans le gel, qui semble être à l'origine du comportement anormal observé dans l'équation 3.23, nous proposons un mécanisme de "hopping and trapping" [73].

Nous pouvons schématiser l'acte enzymatique de la façon suivante : l'enzyme reste piégée pendant un temps τ correspondant au temps nécessaire pour hydrolyser un lien peptidique.

Une fois la réaction terminée, l'enzyme "saute" sur un site voisin où, à nouveau, elle reste piégée pendant le temps nécessaire pour l'hydrolyse et ainsi de suite.

Nous pouvons représenter ce mécanisme en introduisant une barrière de potentiel d'énergie moyenne E_0 , comme représenté schématiquement dans la figure 3.10.

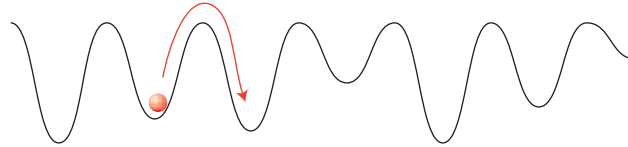


FIG. 3.10. – Représentation schématique de la diffusion de l'enzyme dans une barrière de potentiel d'énergie moyenne E_0 .

Appelons ΔE la hauteur de la barrière ; nous pouvons supposer que les barrières de potentiel ont une distribution exponentielle :

$$P(\Delta E) = \frac{1}{E_0} e^{-\frac{\Delta E}{E_0}}$$

Nous pouvons écrire le temps τ que l'enzyme passe dans un site d'hydrolyse (i.e. dans le minimum du potentiel), comme :

$$\tau = \tau_0 e^{\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (3.32)$$

En connaissant la forme de la fonction de distribution de ΔE , nous pouvons calculer la fonction de distribution de τ . A partir de la relation $P(\tau)d\tau = P(\Delta E)d(\Delta E)$, nous trouvons :

$$P(\tau) = \tau^{-(1+\beta)} \cdot \beta \cdot \tau_0^\beta \quad (3.33)$$

avec $\beta = \frac{k_B T}{E_0}$; cette fonction est définie pour $\tau > \tau_0$.

Nous pouvons calculer le temps de résidence moyen de l'enzyme dans un minimum de potentiel :

$$\langle \tau \rangle = \int_0^t \tau P(\tau) d\tau = \frac{\beta}{1-\beta} \tau_0^\beta t^{(1-\beta)} \quad (3.34)$$

Si le temps τ_d de diffusion de la thermolysine entre deux réactions enzymatiques est tel que $\tau_d < \langle \tau \rangle$, nous pouvons voir le mécanisme de la dégradation comme une marche aléatoire dont le temps caractéristique de chaque pas est $\langle \tau \rangle$.

Le déplacement moyen carré est, dans ce cas :

$$\langle r^2 \rangle \propto \frac{t}{\langle \tau \rangle} \propto t^\beta \quad (3.35)$$

Ce comportement "anormal" est observable pour des temps de résidence de l'enzyme $t < \tau_m$, où nous avons introduit un "cutoff" τ_m dans la fonction de distribution de τ (eq. 3.33).

Pour des temps $t > \tau_m$, le temps de résidence de la thermolysine dans un site devient négligeable, i.e. la barrière d'énergie potentielle ΔE est négligeable.

Nous retrouvons, dans ce cas, la diffusion classique avec $\langle r^2 \rangle \propto t$.

3.7. Conclusion

Nous avons étudié par diffusion quasi élastique de la lumière, la transition "sol-gel inverse" d'un gel de gélatine ; la transition de phase est induite par une protéase, la thermolysine, qui hydrolyse les liens peptidiques de la gélatine. Quand une fraction suffisante de ces liens est hydrolysée, nous observons la transition de l'état solide à l'état liquide.

L'étude en fonction de la concentration en enzyme a donné une relation entre le temps de dégradation t_{gel} et la concentration en substrat, $t_{gel} \propto [E]^2$, qui n'est pas explicable par un mécanisme de cinétique enzymatique classique. Ce comportement sousdiffusif a été confirmé par des mesures de spectroscopie de corrélation de fluorescence.

Les résultats obtenus suggèrent un mécanisme de cinétique enzymatique limité par la diffusion.

Ce résultat est important si on le replace le cadre de la réorganisation de la matrice extracellulaire qui a lieu, par exemple, lors de la dissémination des métastases :

3. Dégradation enzymatique d'un gel de gélatine

la dissémination tumorale est accompagnée par une surexpression de protéinases qui dégradent l'ECM. Le temps de dégradation enzymatique variant comme $[E]^2$, une petite variation de la concentration en protéinases pourrait avoir un effet important sur la dégradation de l'ECM. Ce fait pourrait impliquer, in vivo, une amplification des effets de la surexpression des protéinases.

D'un point de vue purement physique, nous avons étudié le comportement critique du module élastique du gel de gélatine G (figure 3.4). Nous avons trouvé une valeur de l'exposant critique $t = 1.21 \pm 0.03$ qui n'est pas explicable par aucune des théories existante pour la gélification (cf. tableau 2.1). Ce résultat, pour être expliqué, nécessite, peut être, l'introduction d'une nouvelle classe d'universalité.

4. Les fausses pistes

Introduction

Dans ce chapitre je présente les résultats obtenus pendant la partie initiale de mon travail de thèse. Le but de ma thèse était l'étude de la dégradation enzymatique de gels de protéines de la matrice extracellulaire (ECM). Afin de réaliser les mesures physiques que nous envisagions, il était nécessaire de disposer d'un système physico-chimique suffisamment proche des systèmes biologiques, formant de façon maîtrisée des gels transparents et d'un volume suffisant pour les expériences. Les premiers mois de mon travail de thèse ont consisté à explorer différentes pistes susceptibles de fournir un tel système "modèle". Ces différentes pistes ont conduit à des résultats marginaux par rapport au but qui m'était fixé mais qui méritent néanmoins d'être exposés. Ils le sont ici de façon chronologique.

La matrice extracellulaire est constituée d'un grand nombre de protéines différentes (collagène, laminine, élastine etc...). Parmi ces protéines, la **fibronectine** joue un rôle fonctionnel majeur dans l'adhésion cellulaire. Cette protéine est une molécule de haute masse moléculaire ($5.3 \cdot 10^5$ g/mol) qui est soluble dans le plasma et gélifie dans la matrice extracellulaire. L'étude de la fibronectine présentait un intérêt majeur du point de vue des motivations biologiques de mon travail de thèse et notamment pour son développement futur. Une obtention bien maîtrisée de ces gels nécessite une bonne connaissance de la conformation des macromolécules qui y participent. Aucune donnée cristallographique n'est connue concernant la structure de la fibronectine "entière" et sa conformation en solution était controversée. L'équipe que j'ai intégrée a donc entrepris une étude de la conformation de cette protéine en solution diluée par des mesures de diffusion de la lumière (statique et dynamique) et de diffusion de neutrons aux petits angles. Ma participation à ce travail a consisté en l'étude de la protéine dans son état totalement dépliée. Le résultat principal de cette étude est que la fibronectine "native" se présente sous une forme originale pour une protéine. Sa conformation est celle d'une chaîne idéale (statistique gaussienne) et flexible de 56 globules (appelés modules) de 20 Å de rayon. Ce résultat est publié.

In vitro, il est possible de former des gels de fibronectine de différentes façons.

- En solution suffisamment concentrée (semi-diluée) la fibronectine forme spontanément un gel physique.
- En solution diluée, une réaction avec le glutaraldéhyde conduit à des agrégats

tridimensionnels puis à des gels chimiques.

- Une dénaturation de la protéine peut conduire également à des gels physiques (bien que difficilement réversibles).

Aucune de ces pistes n'a conduit rapidement à un résultat satisfaisant. En solution semi-diluée, les gels nécessitent trop de protéine par rapport aux quantités produites lors de la purification. En solution diluée, les gels formés par réaction avec le glutaraldéhyde à pH=7 et à force ionique physiologique (150 mM NaCl) sont turbides. L'obtention de gels transparents était envisageable en jouant sur le pH et la force ionique. Une étude systématique demandant une grande quantité de protéine et étant donnée la structure globulaire à petite échelle de la fibronectine, nous avons envisagé cette étude systématique sur une petite protéine globulaire, la BSA, de même point isoélectrique que la fibronectine et dont on s'attend à ce que les interactions électrostatiques soient localement similaires. La BSA est une petite protéine ($M = 7.9 \cdot 10^4$ g/mol). Elle est bien connue et commercialisée. Nous avons déterminé des diagrammes de phase en fonction de la concentration en BSA et en glutaraldéhyde à différentes concentrations en sel ajouté. Ces diagrammes de phase sont présentés sur la figure 4.1. Ils présentent des zones de gels turbides et d'autres de gels transparents. Toutefois, cette piste a été abandonnée car la zone du diagramme de phase dans laquelle les gels sont transparents est étroite et à grande concentration en protéine.

La troisième piste étudiée est celle du lysozyme. Cette protéine est sans doute la protéine globulaire la plus utilisée par les physiciens comme modèle pour l'étude de la croissance cristalline. A forte concentration en sel, les interactions électrostatiques sont écrantées à toutes les échelles et les molécules présentent un coefficient d'interaction à deux corps négatif (attractif). Le lysozyme est alors connu pour former des agrégats fractals de dimension de l'ordre de 2 qui sont susceptibles de gélifier pour des concentrations suffisantes. Nous avons entrepris par diffusion de la lumière l'étude de ce mécanisme d'agrégation. Ce travail a permis de mettre en évidence une originalité de ces agrégats qui n'avait pas été soulignée jusqu'à présents. Ces agrégats ont une structure rigide. Cette rigidité comparée à la flexibilité des chaînes de fibronectine nous a paru comme une complexité supplémentaire dans notre recherche de gels de protéines modèles.

4.1. Conformation de la fibronectine en solution diluée : étude par diffusion de lumière et diffusion de neutron aux petits angles

Statistical Conformation of Human Plasma Fibronectin

J. Pelta,[‡] H. Berry,[‡] G. C. Fadda,[§] E. Pauthe,[‡] and D. Lairez^{*,§}*ERRMECE, Université de Cergy-Pontoise, 95302 Cergy-Pontoise Cedex, France, and Laboratoire Léon Brillouin, CEA-CNRS, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France**Received December 3, 1999*

ABSTRACT: Fibronectin is a multifunctional glycoprotein (molecular mass, $M = 530$ kg/mol) of the extra cellular matrix (ECM) having a major role in cell adhesion. In physiological conditions, the conformation of this protein still remains debated and controversial. Here, we present a set of results obtained by scattering experiments. In “native” conditions, the radius of gyration ($R_g = 15.3 \pm 0.3$ nm) was determined by static light scattering as well as small-angle neutron scattering. The hydrodynamic radius ($R_H = 11.5 \pm 0.1$ nm) was deduced from quasi-elastic light scattering measurements. These results imply a low internal concentration ($M/R_{g/H}^3$) compared to that of usual globular proteins. This is also confirmed by the ratio $R_H/R_g = 0.75 \pm 0.02$ consistent with a Gaussian chain, whereas $R_H/R_g = 1.3$ for spherical shaped molecules. However, adding a denaturing agent (urea 8 M) increases R_g by a factor 2. This means that fibronectin “native” chain is not either completely unfolded. The average shape of fibronectin conformation was also probed by small-angle neutron scattering performed for reverse scattering vector q^{-1} smaller than R_g ($0.2 < q^{-1} < 15$ nm). The measured form factor is in complete agreement with the form factor of a random string of 56 beads of 5 nm diameter. It rules out the possibility of unfolded chain as well as globular structures. These results have structural and biological implications as far as ECM organization is concerned.

Fibronectin is a multifunctional glycoprotein expressed by many different cell types (hepatocytes, fibroblasts, macrophages, and leukocytes among others). It is found in plasma and extracellular matrix (ECM).¹ Its main biological functions are based on its affinity for different biological compounds such as cell surface receptors, ECM proteins (collagens, heparin, etc), DNA, gangliosides, and immunoglobulins. In vivo, fibronectin mediates cell adhesion to the ECM, and contributes to phagocytosis regulation, wound healing, cell proliferation, differentiation, and locomotion (1).

Fibronectin is composed of two identical polypeptide subunits covalently linked via two disulfide bonds near their carboxy termini. Each subunit is made of nearly 2500 amino acids (molecular weight about 250 000). It consists of the repetition of 56 modules (1) of three types having a well-defined structure and a high degree of internal homology. Modules of type I, II, and III consist of about 45, 60, and 90 amino acids, respectively. The type I modules make up the NH₂-terminal and COOH-terminal ends of the polypeptide. Two type-II modules interrupt a row of nine type-I modules at the NH₂-terminus. Fifteen type-III modules, make up the middle of the polypeptide (1, 2). Type-I, II, and III modules are also found in many other proteins, type III even being ubiquitous in animal proteins (3). These modules are connected together by short polypeptide segments sensitive to proteinases and are grouped in functional domains that

express specific binding activities (4). The above structure of fibronectin varies somewhat depending on the cellular source of the protein. These variations are mainly due to alternative splicing of the fibronectin mRNA (5).

The three types of modules are globular. Separately, their structure is known as being mainly β -sheet from X-ray and NMR studies on isolated modules (6–8). However, the global conformation of fibronectin cannot be assumed from the folding of the individual isolated modules and, until now, no success in the crystallization of the whole protein has been reported. Thus, to understand the relationship between fibronectin structure and its various adhesive biological functions, a lot of studies have been performed in solution.

On the overall protein, fluorescence studies show the existence of hydrophobic domains (9, 10). Circular dichroism and infrared spectroscopy studies have only detected β -sheet secondary structures (10–12). These results suggest that the modules within the overall protein retain the same structure as isolated.

In the absence of X-ray or NMR experimental data about the whole fibronectin, little is known about its three-dimensional structure. The molecular shape of fibronectin in solution has been extensively investigated by several techniques, but its statistical conformation still remains debated (13).

The early studies of fibronectin conformation are based either (1) on a near macroscopic length scale investigation of hydrodynamic properties (9, 10, 14–16) or static light scattering properties (17) or (2) on a more local length scale investigation using circular dichroism or fluorescence spectroscopy (9, 10, 18).

The main result of these works is that the conformation of fibronectin in physiological conditions would imply both

* To whom correspondence should be addressed: Phone: (33) 1 69 08 72 31. Fax: (33) 1 69 08 82 61. E-mail: lairez@cea.fr.

[‡] Université de Cergy-Pontoise.

[§] Laboratoire Léon Brillouin.

¹ Abbreviations: ECM, extra cellular matrix; NMR, nuclear magnetic resonance; DCl, deuterium chloride; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

large length scale flexibility and local order. The emerging picture is that of a "string of beads". However, such a conformation determination is indirect and has been widely controversial. Thus, several authors have used more appropriate techniques to directly access to this conformation either (1) in the reciprocal space by small-angle X-ray or neutron scattering (19) or (2) in the direct space by microscopy techniques (20–24).

The above results are quite contradictory. Using scattering techniques, a compact and globular conformation is reported in physiological conditions. On the opposite, microscopy studies mainly show a "string of beads"-like conformation but also either a globular or an extended straight strand conformation depending on sample preparation.

In addition to the above suggestions, from fluorescence polarization experiments, another structural model consisting of two independently rotating disk-shaped subunits has even been proposed (25). These contradictory suggestions show the difficulty to validate a model on the basis of a unique technique. Principally, the difficulty follows from the probable complex fibronectin conformation. To summarize, the common opinion for the fibronectin conformation in physiological conditions is in favor of the string of beads model. However, up to now, X-ray and neutron-scattering experiments seem to disagree.

This paper deals with the light-scattering (elastic and quasi-elastic) and small-angle neutron-scattering study of fibronectin conformation in dilute solution. For a better understanding, results obtained in "native" conditions² are compared to those obtained in the presence of denaturing agent (urea 8 M) and to theoretical expectations for globular and ideal polymer coil conformations (Gaussian statistics). In "native" conditions, our data show that fibronectin conformation varies according to the observation length scale: the chain is Gaussian at large scales and globular at smaller ones. This pleads unambiguously in favor of the string of beads model already reported using other techniques. In the presence of denaturing agents, the global conformation turns to an excluded volume chain.

The results allow the discussion of the fibronectin conformation in terms of its structural and biological implications as far as ECM organization is concerned.

MATERIALS AND METHODS

Fibronectin Purification. Fibronectin was purified from human cryoprecipitated plasma according to a new protocol developed in our laboratory that yields high quantity and purity protein (26). This protocol is based on fibronectin affinities for both gelatin and heparin. Briefly, it consists of three liquid chromatography steps: a gelatin affinity, followed by a heparin affinity, and, finally, another gelatin-affinity chromatography. All chromatography gels were purchased from Chisso Corp., Japan. The purity of the preparation was determined by densitometry analysis of silver nitrate-stained SDS–polyacrylamide gel electrophoresis, to (98.6 ± 1.2)% (w/w). Fibronectin solution in 25 mM, pH 7.4, Tris HCl buffer, containing 0.5 mM EDTA, was

concentrated just before use, using Ultrafree-15 centrifugal concentrators from Millipore (100 kg/mol cut off). Fibronectin concentrations were determined by optical absorbance measurements: $A_{280\text{nm}}^{1\%} = 12.8$ (27).

Samples Preparation. Fibronectin solution, 1 cm³, at concentration of the order of 10 mg/cm³, was dialyzed (2 × 24 h, at room temperature) using a micro dialysis cassette (Slide-A-Lyzer, 10 000 MW cut off, Pierce, Rockford, IL) against large volumes (≥ 100 cm³) of solution containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, and 150 mM NaCl.² For experiments on denatured protein, 8 M urea was added to dialysis bath. For neutron-scattering experiments, these dialyses were realized using deuterated compounds (water, Tris, Urea, and DCl, purchased from Eurisotop, Saclay, France).

Scattering Experiments. (1) *Fundamentals of Elastic Light Scattering and Small-Angle Neutron Scattering.* The basic principles (28) of elastic light scattering and small-angle neutron scattering are essentially identical. An incident plane wave of wavelength λ_0 is scattered by the elementary scatterers (monomers of a macromolecule, small solvent molecules, ...). The interference pattern is measured as a function of the scattering vector $q = 4\pi/\lambda \times \sin(\theta/2)$ with θ the scattering angle and λ the actual wavelength in the medium (for light scattering $\lambda = \lambda_0/n$ with n the refractive index of the sample). For macromolecules in solution, after data treatment (29) one accesses to the quantity $\tilde{\Sigma}(q)$, which only reflects the macromolecules contribution to the scattered intensity. For neutronics, $\tilde{\Sigma}(q)$ is the "coherent scattering cross-section per unit volume" usually named "excess Rayleigh ratio" by light-scattering experimentalists. Very generally, one has

$$\tilde{\Sigma}(q) = K^2 CMS(q) \quad (1)$$

where $\tilde{\Sigma}(q)$ is expressed in centimeters⁻¹; C (g/cm³) is the concentration; M (g/mol) the molecular mass of the macromolecules in solution; K^2 (mol cm² g⁻²) is the contrast factor. The scattering function $S(q)$ expresses the interference of waves scattered by monomers belonging to the same macromolecule but also to different macromolecules. The intramolecular term $P(q)$ is the form factor of the macromolecules: $P(q) = (1/N^2) \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^N \langle e^{iq(r_n - r_m)} \rangle$, N being the number of monomers of the macromolecule and r their position vectors. The brackets mean an average over all the possible conformations. For free rotating macromolecules, an average over all orientations leads to

$$P(q) = \frac{1}{N^2} \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^N \left\langle \frac{\sin(qr_{n,m})}{qr_{n,m}} \right\rangle \quad (2)$$

with $r_{n,m} = |\mathbf{r}_n - \mathbf{r}_m|$. At small q ($qr_{n,m} < 1$), one obtains the Guinier formula $P(q) = 1 - q^2 R_g^2/3 + \dots$, where $R_g^2 = (1/2N^2) \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^N \langle r_{n,m}^2 \rangle$ is the averaged square radius of gyration of the macromolecule. In the Guinier q -range ($qR_g < 1$), due to the average over all the orientations, the macromolecules are viewed as spherically symmetrical. In that case, the scattering function $S(q)$ can be factorized into the product of $P(q)$ and of the structure factor $G(q)$. This last factor is directly linked to the osmotic compressibility $kT(C/M)[C(d\pi/dC)]^{-1}$, with π the osmotic pressure of the solution and kT

² In this paper, the term "native condition" is used for conciseness. It means that the protein is prepared in non-denaturing conditions and is in solution at pH 7.4 and [NaCl] 150 mM. These conditions correspond to pH and ionic strength of physiological plasma.

the thermal energy. For macromolecules in weak interaction, a virial expansion of the osmotic pressure can be used: $\pi = \pi_{c \rightarrow 0}(1 + MA_2C + \dots)$, with MA_2 the two bodies interaction term. Finally,

$$\frac{\tilde{\Sigma}(q)_{qR_g < 1, MA_2C < 1}}{C} = K^2 M \left(1 - \frac{q^2 R_g^2}{3} + \dots \right) (1 - 2MA_2C + \dots) \quad (3)$$

At zero q , elastic-scattering experiments are sensitive to the osmotic compressibility of the solution, i.e., a macroscopic property. In this limit, the macromolecules are pointlike. For increasing q , the size of the macromolecules is beginning to emerge, allowing the radius of gyration to be determined. Actually, the scattering vector q acts as the magnifying of a microscope. For even higher q value ($qR_g > 1$ in dilute solution), the intermolecular interference term can be neglected and scattering experiments are only sensitive to the form factor $P(q)$, reflecting the internal conformation of a single macromolecule.

Exact calculation of the form factor can be performed only in a few cases. For instance, a sphere of radius R gives $P(q) = [3 \times (\sin(qR) - qR \cos(qR))/(qR)^3]^2$, with characteristic oscillations at $qR > 1$, which come down to a strong q^{-4} dependence of the scattered intensity using low-resolution spectrometers (as small angle neutron scattering spectrometers). Note that such an oscillation smoothing can also be due to a size distribution of the spheres. Finally, the sphere form factor can be viewed as a reference and generic behavior for dense and compact structures, the q^{-4} behavior being the signature of a sharp interface between the inner and outer parts of the macromolecule. Another borderline case, which is valuable to consider for comparison with experiment, is the ideal polymer chain obeying to Gaussian statistics. Ideal chain corresponds to a random walk of N steps of length b . Its radius of gyration R_g is known as being equal to $Nb^2/6$. For observation length scales q^{-1} large enough compared to b , the form factor of the ideal chain obeys to the Debye function $P(q) = (2/x^2)(e^{-x} - 1 + x)$ with $x = q^2 R_g^2$. At $qR_g > 1$, the Debye function displays a characteristic q^{-2} dependence reflecting the random walk fractal dimension equal to 2. However, in good solvent condition, the polymer is swelled due to excluded volume interactions. In that case, the chain conformation rather corresponds to a self-avoiding random walk leading to a $q^{-1.7}$ dependence of the form factor.

(2) *Quasi-Elastic Light Scattering*. Concentration fluctuations within the scattering volume result in scattered intensity fluctuations. Thus, computing the time-dependent correlation function of the scattered intensity (30) yields the time-dependent structure factor $S(q, t)$. At large length scales q^{-1} , compared to the radius of gyration R_g of macromolecules, only their translational motion contributes to concentration fluctuations. If only one species of macromolecule is in solution, the relaxation function of concentration fluctuations is a single exponential with a characteristic time corresponding to that needed for a macromolecule to cover a q^{-2} area through Brownian motion. $S(q, t)$ can thus be written as $S(q, t) = e^{-Dq^2 t}$, with D the diffusion coefficient of the macromolecules. According to the Stokes–Einstein relation, the

diffusion coefficient is inversely proportional to the hydrodynamic radius R_H , i.e., the radius of the sphere which would encounter the same friction, $R_H = kT/6\pi\eta D$. For spheres, e.g., polymers having a globular and compact structure, R_H is equal to the radius of the sphere $\sqrt{5/3}R_g$. However, for polymer chains in the Zimm limit of hydrodynamic interactions between monomers, R_H is an average value, the calculation (31) of which differing from that of R_g . Actually, $1/R_H = (1/2N^2) \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^N \langle 1/r_{n,m} \rangle$. The different way of averaging for R_g and R_H is the source of different integration constants for both radii leading to a ratio R_H/R_g bearing information on the chain statistical conformation. For instance, $R_H/R_g = 0.80$ for an ideal Gaussian chain and $R_H/R_g = 0.64$ for excluded volume chain (32). However, these values correspond to asymptotical behaviors that are observed for sufficiently long chains, whereas for shorter chains, smaller ratios are found experimentally and explained theoretically (33).

(3) *Experiment Setup and Measurement Conditions*. Light-scattering experiments were performed using vertically polarized Argon gas laser of wavelength $\lambda_0 = 488$ nm. Scattered intensity is measured in the horizontal plane at different scattering angle from 20 to 150°. The total scattered intensity per scattering volume unit of toluene taken as reference is measured to be independent of the scattering angle within 1% error bars. The Rayleigh ratio of toluene is equal to $\mathcal{R}_{\text{toluene}} = 42.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$. The refractive index n_0 of urea solutions was measured using an Abbe refractometer: $n_0 = 1.333 \times (1 + 6.52 \times 10^{-3} [\text{urea}])$, with [urea] in moles per liter. The refractive index increment dn/dC of fibronectin cannot be easily measured in our case because these measurements should be performed in a concentrated regime and thus should require a large amount of protein. From literature, the refractive index increment of proteins in water is $(dn/dC)_{\text{water}} = 0.200 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ at $\lambda_0 = 488$ nm. In the case of proteins in urea solutions, no value of dn/dC is available to our knowledge. Thus, we have calculated the refractive index increment following the equation

$$\left(\frac{dn}{dC} \right)_{8M\text{urea}} = \frac{\rho \left(\frac{dn}{dC} \right)_{\text{water}} - \Delta n_{8M\text{urea}/\text{water}}}{\rho}$$

where $\rho = 1.39 \text{ g/cm}^3$ is the fibronectin density (9) and $\Delta n_{8M\text{urea}/\text{water}} = 0.067$ is the difference between the refractive index of an 8 M urea solution and pure water. Such equation is based on a mixing law argument. It gives $(dn/dC)_{8M\text{urea}} = 0.152 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. The light-scattering contrast factor

$$K^2 = \left(\frac{2\pi n_0}{\lambda_0^2 N_a} \times \frac{dn}{dC} \right)^2$$

where N_a is the Avogadro's number, was thus calculated as equal to $8.22 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ g}^{-2} \text{ mol}$ for protein in water and to $5.23 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ g}^{-2} \text{ mol}$ for protein in 8 M urea solutions. Quasi-elastic light-scattering measurements were performed computing the time-dependent autocorrelation function of the scattered intensity with a Malvern 7032 correlator. The viscosity η of urea solutions was measured at 20 °C using an Ubbelohde capillary viscometer: $\eta(\text{cp}) = 1.0309 \times (1 + 0.0475 [\text{urea}])$.

Small-angle neutron-scattering measurements were performed with the PACE spectrometer at the Laboratoire Léon Brillouin. To cover the widest q -range, three configurations (distance from sample to multidetector/wavelength) were used: 4.7 m/15 Å, 2.3 m/5 Å, and 0.6 m/4 Å. Initial data treatment was carried out following Jacrot (34). For fibronectin in D₂O, $K^2 = 1.10 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ g}^{-2} \text{ mol}$ assuming that 80% of labile hydrogens is actually exchanged (35). For fibronectin in D₂O/8 M urea, $K^2 = 1.22 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ g}^{-2} \text{ mol}$ assuming that all labile hydrogens are exchanged.

RESULTS

Scattered Intensity at $q \rightarrow 0$. Light-scattering experiments were performed on fibronectin solutions in the presence of salt (150 mM NaCl) for protein concentration C between 0.2 and 10 mg/cm³. The q -dependent scattered intensity was analyzed using eq 3. The values of radii of gyration are discussed below. Extrapolation to zero q of the scattering cross-section leads to the apparent molecular mass of the protein in solution: $M_{\text{app}} = \tilde{\Sigma}(q \rightarrow 0, C)/K^2 C = M \times (1 - 2MA_2C)$. Results are plotted in Figure 1, for fibronectin in "native" conditions and in the presence of 8 M urea, respectively. First, note that error bars are much more important for measurements performed in "native" condition than for 8 M urea solutions. In the former case, the very small q dependence (small radius of gyration) of the scattered intensity is responsible for the inaccuracy of the zero q extrapolation. However, the apparent molecular mass M_{app} is found to be concentration independent in "native" conditions, i.e., the second virial is unmeasurable and near zero. In presence of 8 M urea, the apparent molecular mass M_{app} is strongly sensitive to concentration. The second virial coefficient deduced from the slope of M_{app} vs C is equal to

$$MA_{2,8\text{Murea}} = (58 \pm 5) \text{ cm}^3/\text{g}$$

In terms of concentration, $1/MA_2$ is the concentration at which proteins strongly interact and are not any more in a dilute regime. This concentration is equal to $1/MA_2 = 17 \text{ mg/cm}^3$.

Extrapolation to zero concentration of the apparent molecular mass leads to the actual molecular mass of fibronectin deduced from our measurements. One obtains $M = (570 \pm 50) \text{ kg/mol}$ in "native" conditions and $M = (590 \pm 30) \text{ kg/mol}$ in 8 M urea. These measurements are in rather good agreement with the value 530 kg/mol calculated from the fibronectin primary structure. This calculated value is actually increased by the glycosylation that is of the order of 4% of the molecular mass (I). The value measured with urea is slightly higher than the expected molecular mass, but this can be imputed to our calculation of refractive index increment.

Radius of Gyration. In the Guinier range ($qR_g < 1$), the radius of gyration R_g of fibronectin can be determined from the q dependence of the scattered intensity. In the case of "native" fibronectin, R_g is found to have a small value with respect to the light-scattering q -range, leading to a weak q dependence of light-scattered intensity (see eq 3). On the contrary, R_g is found to have a high value with respect to small-angle neutron-scattering q -range, leading to a reduced Guinier range. However, the use of both techniques gives a

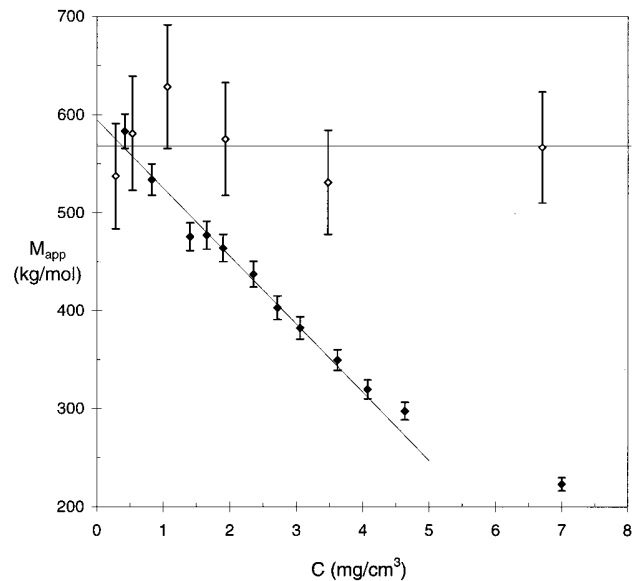


FIGURE 1: Apparent molecular mass $M_{\text{app}} = \tilde{\Sigma}(q \rightarrow 0, C)/K^2 C$, deduced from light scattered intensity measurements, vs concentration, C . In "native" conditions (\diamond), M_{app} is constant within experimental accuracy, i.e., the second virial coefficient (MA_2) is unmeasurable. In 8 M urea solution (\blacklozenge), the second virial coefficient deduced from the slope of the straight line is equal to $MA_{2,8 \text{ M urea}} = (58 \pm 5) \text{ cm}^3/\text{g}$.

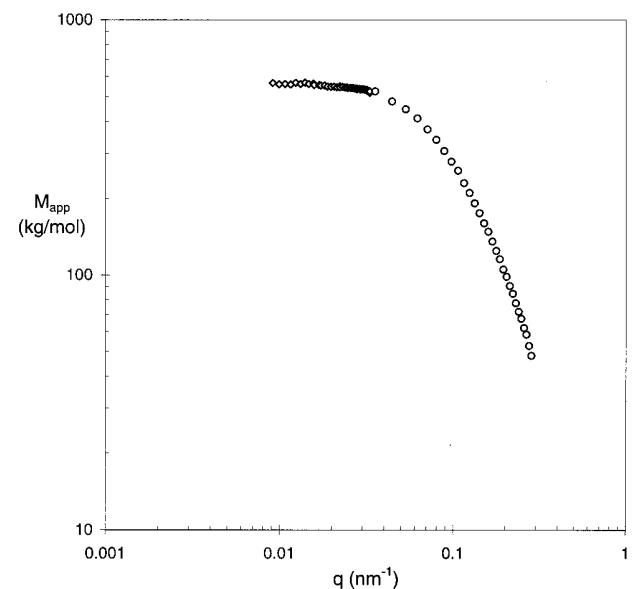


FIGURE 2: Scattering cross section per concentration unit and contrast unit, $M_{\text{app}}(q) = \tilde{\Sigma}(q)/K^2 C$, as a function of scattering vector q , for fibronectin in "native" condition. Diamonds correspond to light scattering measurements and circles to small-angle neutron scattering measurements. At $q \rightarrow 0$, M_{app} is equal to the molecular mass of fibronectin.

good estimate of R_g . In Figure 2, the scattering cross-section per concentration unit, $M_{\text{app}}(q) = \tilde{\Sigma}(q)/K^2 C$, is plotted as a function of the scattering vector q . This figure contains both results obtained by light scattering (at a concentration $C = 6.7 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$) and neutron scattering ($C = 7.1 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$). The data are expressed in units (g/mol) accounting for the different contrast factor of both techniques. In the overlapping q -range of both measurements, one notes a fair superposition of data, making us confident in the measurements performed. Classically, the curvature of the scattering

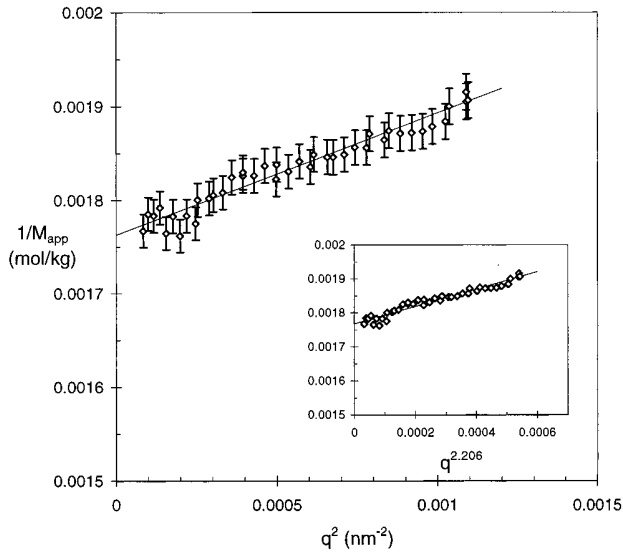


FIGURE 3: Reverse scattering cross-section per concentration unit and contrast unit, $1/M_{app}(q) = K^2C/\tilde{\Sigma}(q)$ vs q^2 (Zimm approximation) and vs $q^{2.206}$ (see inset, Calmettes' approximation). Measurements performed by light scattering for fibronectin in "native" condition at a concentration $C = 6.7$ mg/cm³. Straight lines correspond to linear fits. Both approximations leads to the same radius of gyration $R_g = (15.1 \pm 0.1)$ nm and to the molecular mass $M_{app,q \rightarrow 0} = (570 \pm 10)$ kg/mol.

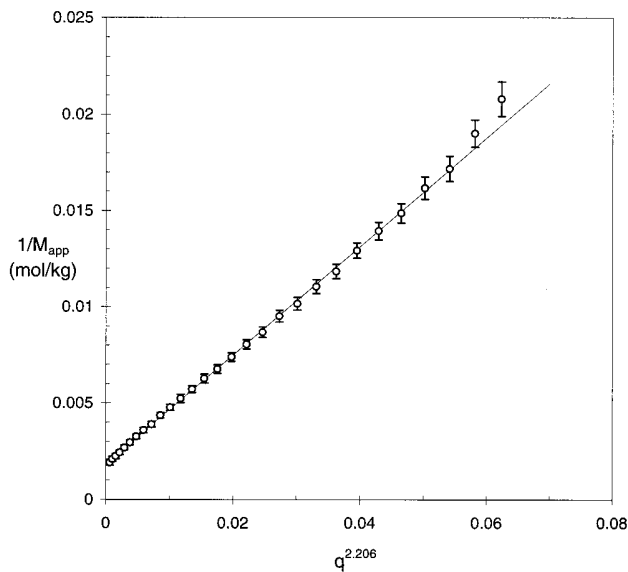


FIGURE 4: Reverse scattering cross-section per concentration unit and contrast unit, $1/M_{app}(q) = K^2C/\tilde{\Sigma}(q)$, measured by small angle neutron scattering for fibronectin in "native" condition at a concentration $C = 14$ mg/cm³, as a function of $q^{2.206}$ (Calmettes' approximation). Straight line corresponds to a linear fit leading to the same radius of gyration $R_g = (15.6 \pm 0.2)$ nm as that measured by light scattering and to the molecular mass $M_{app,q \rightarrow 0} = (545 \pm 10)$ kg/mol.

profile corresponds to scattering vectors of the order of $1/R_g$. To have a more accurate determination of R_g , light-scattering data have been fitted using the Zimm approximation, $\tilde{\Sigma}_{q \rightarrow 0}/\tilde{\Sigma} = [1 + (qR_g)^2/3]$ (Figure 3), and the Calmettes' approximation (36), $\tilde{\Sigma}_{q \rightarrow 0}/\tilde{\Sigma} = [1 + 0.359(qR_g)^{2.206}/3]$ (Figure 3, inset), which is known to linearize the Debye function up to $qR_g \cong 4$. The two approximations lead to the same radius of gyration within error bars: $R_g = (15.1 \pm 0.1)$ nm. The above

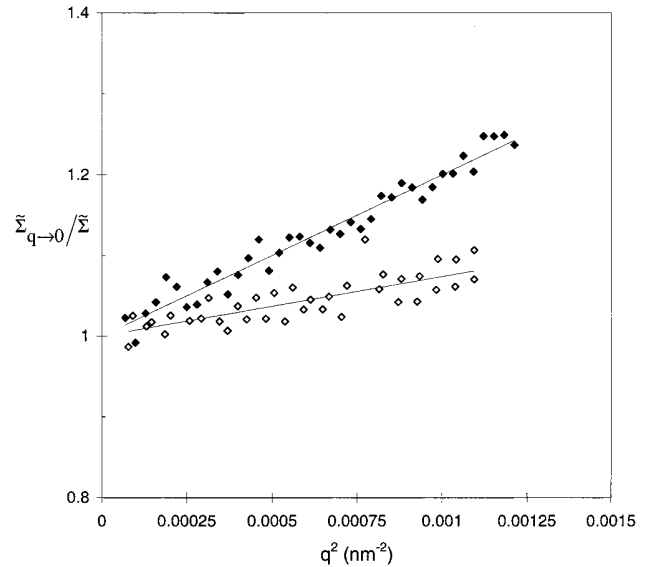


FIGURE 5: Normalized inverse light scattered intensity $\tilde{\Sigma}_{q \rightarrow 0}/\tilde{\Sigma}$ as a function q^2 for "native" fibronectin in "native" conditions (\diamond) and in a presence 8 M urea (\blacklozenge). Measurement performed at concentration $C = 7.1$ mg/cm³ for "native" protein and in a more dilute solution ($C = 1.46$ mg/cm³) for denatured protein because of the higher second virial coefficient. Straight lines correspond to the corresponding Zimm approximation fits: $\tilde{\Sigma}_{q \rightarrow 0}/\tilde{\Sigma} = 1 + q^2 \times R_g^2/3$.

value of R_g reduces so much the Guinier range that it is not possible to fit small-angle neutron-scattering data using the Zimm approximation with the constraint $qR_g < 1$. However, the $1/\tilde{\Sigma}$ vs $q^{2.206}$ representation allows us to fit the data (see Figure 4) yielding $R_g = (15.6 \pm 0.2)$ nm. The values determined using the two scattering techniques are in good agreement. In addition, no systematic dependence of R_g on concentration has been brought out, within error bars in the concentration range here studied ($C < 15$ mg/cm³). Finally, the mean value is

$$R_{g, \text{"native"}} = (15.3 \pm 0.2) \text{ nm}$$

In presence of 8 M urea, an increase of the radius of gyration is observed. In Figure 5, the normalized inverse light-scattered intensity $\tilde{\Sigma}_{q \rightarrow 0}/\tilde{\Sigma}$ as a function of q^2 is plotted and compared to measurements obtained for the "native" protein. The increasing slope in the presence of urea gives evidence for the increase of R_g . In 8 M urea solutions, the radius is too high to be measured with small-angle neutron scattering. The value measured by light scattering is concentration dependent, i.e., sensitive on protein-protein interactions. In Figure 6, the measured values are plotted as a function of protein concentration. The linear behavior allows us to extrapolate the apparent R_g values to zero concentration, leading to the actual size of fibronectin in 8 M urea:

$$R_{g, 8Murea} = (30 \pm 1) \text{ nm}$$

Quasi-Elastic Light Scattering. Quasi-elastic light-scattering measurements were performed in "native" solutions and 8 M urea solution. In both conditions, the dynamical structure factor measured at different scattering angles can be rescaled using iq^2 as variable. Without any data fit, this

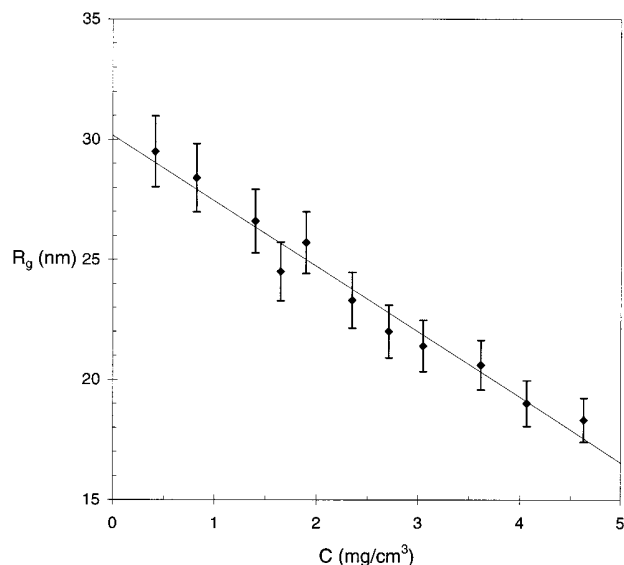


FIGURE 6: Apparent radius of gyration R_g as a function of protein concentration, C , for fibronectin solutions in the presence of 8 M urea (150 mM NaCl). The straight line is a linear fit leading to the extrapolated value $R_{g,8\text{ M urea}} = (30 \pm 1)$ nm at zero concentration.

gives evidence that a diffusion process is probed. In Figure 7, $S(q,t)$ is plotted as a function of tq^2/η . The time axis is divided by the solvent viscosity η in order to get free of trivial effects due to the different viscosities of the two solvents. In log-linear scale, the linear behavior of $S(q,t)$ clearly indicates the simple exponential relaxation ensuring that no aggregation takes place. Thus, in this representation, the slope is equal to $D\eta = kT/6\pi R_H$, with D the diffusion coefficient and R_H the hydrodynamic radius of fibronectin differing in “native” conditions and 8 M urea solution (see inset of Figure 7). The averaged values of the hydrodynamic radius are

$$R_{H,\text{“native”}} = (11.5 \pm 0.1) \text{ nm}$$

$$R_{H,8\text{M-urea}} = (18.3 \pm 0.3) \text{ nm}$$

In both conditions, no significant concentration effect was observed on measurements. This can be explained by a well-known cancellation of hydrodynamic and thermodynamic interactions that operate with opposite signs in the expression of the diffusion coefficient (31).

Small-Angle Neutron Scattering. To probe the internal conformation of fibronectin, the neutron-scattering intensity of fibronectin solutions was collected in a wide q -range corresponding to length scales: $0.2 < q^{-1} \text{ (nm)} < 30$. In this q -range and in dilute solution, the intermolecular contribution to the scattering function can be neglected, and the normalized scattering cross-section $\tilde{\Sigma}(q)/\tilde{\Sigma}_{q \rightarrow 0}$ gives a good approximation of the form factor. In Figure 8, $\tilde{\Sigma}(q)/\tilde{\Sigma}_{q \rightarrow 0}$ is plotted as a function of qR_g for “native” and denatured protein, respectively. At zero q , the two curves tend to one because of normalization. Such normalization is needed for the comparison of the curves. Actually, accounting for the contrast factors (which differ with and without urea) and for the concentration, the two curves should join the value corresponding to the molecular mass of fibronectin, which remains unchanged with urea addition. However, due to the

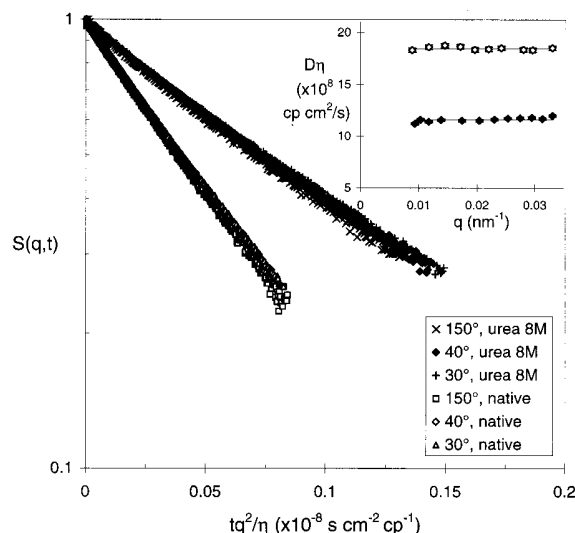


FIGURE 7: Dynamical structure factor $S(q,t)$ as a function of the reduced variable tq^2/η , where t is the time, q the scattering vector, and η the solvent viscosity. Measurements performed in “native” conditions (“native” protein, $C = 7.1$ mg/cm³) and in 8 M urea solution (denatured protein, $C = 3.5$ mg/cm³) at three different scattering angles (see legend). The slope of the curves correspond to $D \times \eta = kT/6\pi R_H$, where D is the diffusion coefficient and R_H the hydrodynamic radius. In the inset the product $D \times \eta$ is plotted as a function of q .

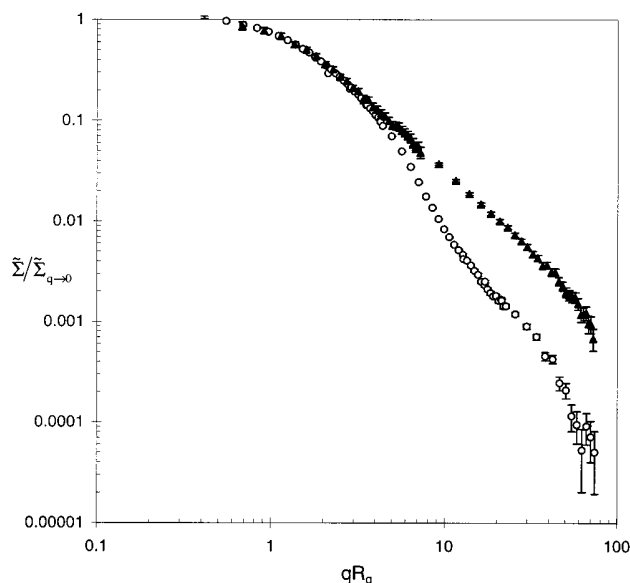


FIGURE 8: Reduced scattering cross-section $\tilde{\Sigma}(q)/\tilde{\Sigma}_{q \rightarrow 0}$ of “native” fibronectin [$C = 14$ mg/cm³ (○)] and urea 8 M denatured fibronectin [$C = 6$ mg/cm³ (▲)] measured by small-angle neutron scattering as a function of qR_g .

second virial coefficient that is nonzero with urea, this is not quite correct, and at zero, $q \tilde{\Sigma}(q)/K^2C$ tends only to an apparent molecular mass. Normalization allows us to get free of such an effect. Nevertheless, the two curves differ strongly in the whole q -range. In 8 M urea solution, the form factor at $qR_g > 1$ displays a power law behavior over more than one decade. The corresponding exponent is equal to 1.7 as expected for a completely unfolded protein. In “native” solution, no power law is observed; the form factor does not show the characteristics of scattering by polymers neither in coil nor in globular conformation. The form factor is much

more complex and will be discussed in details in the next section.

DISCUSSION

To elucidate the “native” fibronectin conformation, comparison with the denatured conformation is useful. Our results give evidence for an increase of both hydrodynamic radius and radius of gyration with 8 M urea addition, i.e., with respect to a completely unfolded conformation. The hydrodynamic radius increases by a factor of 1.6, whereas the radius of gyration increases by a factor of 2. That means the volume occupied by a protein molecule is increased by a factor of 2^3 when unfolded. To compare the different results, let us define the protein concentration inside a protein coil or protein globule as $C^* = M/(^{4/3}\pi R_g^3)$. One obtains $C^* \cong 64 \text{ mg/cm}^3$ for fibronectin in “native” conditions and $C^* \cong 8.4 \text{ mg/cm}^3$ for the unfolded fibronectin. For globular proteins the value $\rho = 1370 \text{ mg/cm}^3$ is usually reported (37) for the density. This value leads to $C^* \cong 2950 \text{ mg/cm}^3$ for a globular protein and using our above definition of C^* (C^* and ρ differ by a factor $\sqrt{5/3}$). Such a direct comparison would indicate that “native” fibronectin adopts neither an unfolded nor a globular conformation.

Examination of the ratio R_H/R_g gives a first indication for the conformation of the protein. The value $R_H/R_g = 0.61 \pm 0.03$ observed for denatured fibronectin is not very far from the value of 0.64 expected for excluded volume chain. As for the value $R_H/R_g = 0.75 \pm 0.02$ observed in “native” conditions, it indicates clearly that “native” fibronectin is certainly not globular ($R_H/R_g = 1.3$ for spheres). Such a ratio is much more compatible with a coil structure allowing a partial solvent-free draining through its volume. The ratio R_H/R_g is just below the asymptotic value expected for ideal infinite polymer chains and significantly higher than the value expected in the case of excluded volume chain. Actually, this result is compatible with the zero second virial coefficient measured in “native” conditions.

The results discussed above would indicate that “native” fibronectin adopts a coil-like conformation but also that it is not completely unfolded. This is quite compatible with the string of beads model already reported in the literature. To check this model, the corresponding form factor has been calculated. The simplest model accounting for this conformation corresponds to an ideal linear chain made of the 56 modules of fibronectin. Assuming a spherical shape for each module, the form factor can be rigorously factorized in two terms: the form factor $P_{RW}(q)$ of a random walk of 56 unit length steps and the form factor of a spherical module of radius $^{1/2}$:

$$P(q) = P_{RW}(q) \times \left[3 \times \frac{\left(\sin\left(\frac{q}{2}\right) - \frac{q}{2} \cos\left(\frac{q}{2}\right) \right)^2}{\left(\frac{q}{2}\right)^3} \right]^2 \quad (4)$$

This is equivalent for a single macromolecule to the factorization of the scattering function in a form factor and a structure factor accounting for the position of the centers of mass. Such a factorization is often used in the case of many particles problem (28) and is applied here in our case: $P_{RW}(q)$ being equivalent to the structure factor of modules. Unfortunately, exact calculation of $P_{RW}(q)$ cannot be achieved,

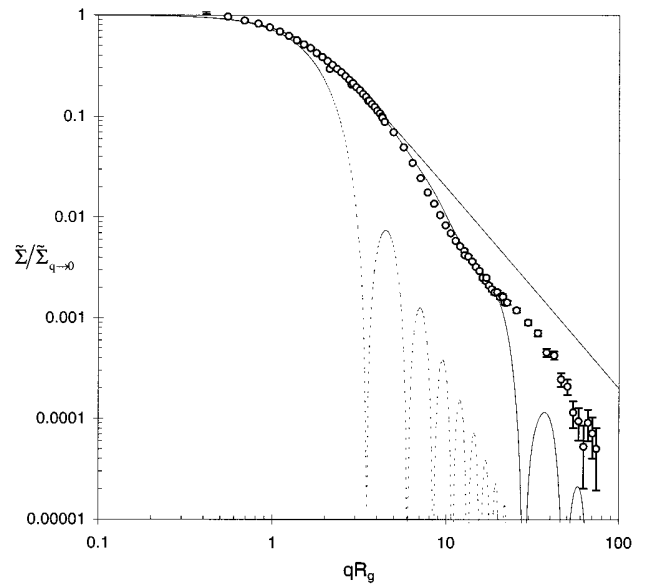


FIGURE 9: Reduced scattering cross-section $\bar{\Sigma}/\bar{\Sigma}_{q \rightarrow 0}$ of “native” fibronectin ($C = 14 \text{ mg/cm}^3$) measured by small-angle neutron scattering as a function of qR_g . Measurement is compared to the form factor of a sphere (lower curve), to the form factor of an ideal chain made of infinitely small monomers [Debye function (upper curve)], and to our calculation of the form factor for a string of 56 beads (intermediate curve).

especially due to the small number of steps leading to a radius of gyration not far from the steps length. Thus, computation of $P_{RW}(q)$ was performed using a Monte Carlo method: (1) a random walk is generated; (2) its form factor is calculated and averaged over all possible orientations following eq 2; and (3) stages 1 and 2 are reiterated in order to average the corresponding form factor.

The result is plotted in Figure 9 and compared to small-angle neutron measurements for “native” fibronectin and theoretical expectations for sphere and Debye’s function of same radius of gyration. One can see that the sphere form factor does not at all fit the data at $qR_g > 1$, whereas the Debye function accounts for the data up to $qR_g = 5$. On the other hand, the string of beads model nicely fits the data up to $qR_g \cong 20$. It is important to note that this latter fit is obtained without any adjustable parameter.

At $qR_g > 20$, measurement is sensitive to the actual shape of the modules: (1) these modules are of three different types and sizes; (2) they are presumably not spherical but rather elliptic; and (3) they are linked together by small spacer peptide chains. All these refinements are not taken into consideration and this is the reason for the discrepancy between measurement and the model at high q . Accounting for point 1 would result in smoothing the oscillations of the model form factor at high q , in better agreement with measurement. Accounting for the elliptic shape of the module would be the most efficient modification of the model. But this is not easy to achieve because factorization of the form factor following eq 4 would not be allowed. Finally, point 3 can be easily achieved in a first approximation taking a smaller average radius of gyration for the modules. In eq 4, this radius is taken to be equal to the half of the step length and this implies modules in contact. Finally, all these refinements would introduce at least three adjustable parameters (size distribution of modules and longitudinal and transverse radii) contrary to our model that has none.

The validity of the string of beads model can be also checked considering the average size of the modules deduced from the model. The classical radius of gyration of a random walk leads in our case to $R_g = b\sqrt{56/6}$, with b the step length. Comparison with the value $R_g = 15.3$ nm measured for the fibronectin yields $b/2 = 2.5$ nm for the average radius of modules ($R_{g\text{ module}} = (b/2)/\sqrt{5/3} = 1.9$ nm). This is in good agreement with the overall length $b = 4$ nm of type III modules deduced from crystallography data (38).

CONCLUSION

Our main result is that fibronectin in "native" conditions has a string of beads conformation, i.e., it is globular at small length scales and obeys to Gaussian statistics at larger ones. This statistical conformation is the starting point to discuss biological implications as far as ECM organization is concerned. The ECM is a gellike network of various proteins, i.e., a network resulting from weak or covalent bonds between the chains, fibronectin being the major functional protein. Its functional properties result from its affinities for a number of biological macromolecules. For instance, in vivo, fibronectin mediates cell adhesion to the ECM and regulates cell proliferation and differentiation (1). Clearly, the fibronectin Gaussian conformation at large length scales makes easier the access of amino acids all along the flexible chain for other ligands. Moreover, the number of possible conformations of a Gaussian chain and their fluctuations are much more important compared to a globular conformation. This leads to a better adaptability for associations. At the same time, fibronectin is stable, with respect to proteinase hydrolysis, because of its globular conformation at small length scales. The ability to fulfill these functions results from its particular statistical conformation: fibronectin is not globular, unlike most intracellular or body fluid proteins. However, besides the helical collagens, many ECM proteins present modular structures composed of repeated globular domains, similar to that of fibronectin (this is the case for vitronectin, laminin, and tenascin). The "string of beads" conformation could thus correspond to a widespread protein conformation in the ECM.

In this paper, the fibronectin conformation was studied in dilute solution at pH and ionic strength corresponding roughly to that of blood plasma. Note that, in the ECM, fibronectin concentration is presumably higher, allowing fibronectin self-association. In addition, fibronectin associates with many other ECM constituents, most of them being less flexible than fibronectin. Finally, in the ECM, the ionic strength is presumably higher than in the plasma because of the high polyelectrolyte concentration. The conformation of fibronectin in the ECM is probably affected by these different physicochemical conditions. Investigations in these conditions would be fruitful for biological understanding of the ECM organization and function.

Finally, note that no crystallization of the whole fibronectin has been reported in the literature. At first sight, this could be due to the high molecular weight of this protein, which increases the difficulty to achieve crystallization, but one has to note that crystallization has been already achieved for much bigger and less-studied proteins than fibronectin [for instance, it is the case of earthworm hemoglobin which has a 4×10^6 g/mol molecular weight (39)]. In our opinion, a

secondary consequence of our result is that the random conformation of fibronectin prevents crystallization.

REFERENCES

1. Ruoslahti, E. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57, 375–413.
2. Potts, J. R., and Campbell, I. D. (1994) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6, 648–655.
3. Tsyguelnaia, I., and Doolittle, R. F. (1998) *J. Mol. Evol.* 46, 612–614.
4. Yamada, K. M. (1989) in *Fibronectin* (Mosher, D. F., Ed.) pp 48–121, Academic Press, Inc., New York.
5. Kornblihtt, A. R., Pesce, C. G., Alonso, C. R., Cramer, P., Srebrow, A., Werbajh, S., and Muro, A. F. (1996) *FASEB J.* 10, 248–257.
6. Dickinson, C. D., Veerapandian, B., Dai, X.-P., Hamlin, R. C., Xuong, N.-H., Ruoslahti, E., and Ely, K. R. (1994) *J. Mol. Biol.* 236, 1079–1092.
7. Williams, M. J., Phan, I., Harvey, T. S., Rostagno, A., Gold, L. I., and Campbell, I. D. (1994) *J. Mol. Biol.* 235, 1302–1311.
8. Sticht, H., Pickford, A. F., Potts, J. R., and Campbell, I. D. (1998) *J. Mol. Biol.* 276, 177–187.
9. Alexander, S. S., Colonna, G., Yamada, K. M., Pastan, I., and Edelhoch, H. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5820–5824.
10. Alexander, S. S., Colonna, G., and Edelhoch, H. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1501–1505.
11. Mosesson, M. W., Chen, A. B., and Huseby, R. M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 386, 509–524.
12. Koteliansky, V. E., Glukhova, M. A., Bejanian, M. V., Smirnov, V. N., Filimonov, V. V., Zalite, O. M., and Venyaminov, S. Y. (1981) *Eur. J. Biochem.* 119, 619–624.
13. Odermatt, E., and Engel, J. (1989) in *Fibronectin* (Mosher, D. F., Ed.) pp 25–45, Academic Press, Inc., San Diego.
14. Edsall, J. T., Gilbert, G. A., and Scheraga, H. A. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 77, 157–161.
15. Williams, E. C., Janney, P. A., Ferry, J. D., and Mosher, D. F. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14973–14978.
16. Rocco, M., Carson, M., Hantgan, R., McDonagh, J., and Heremans, J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 14545–14549.
17. Rocco, M., Infusini, E., Daga, M. G., Gogioso, L., and Cuniberti, C. (1987) *EMBO J.* 6, 2343–2349.
18. Colonna, G., Alexander, S. S., Yamada, K. M., Pastan, I., and Edelhoch, H. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7787–7790.
19. Sjöberg, B., Pap, S., Osterlund, E., Osterlund, K., Vuento, M., and Kjems, J. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 255, 347–355; Sjöberg, B., Eriksson, M., Osterlund, E., Osterlund, K., and Pap, S. (1989) *Eur. Biophys. J.* 17, 5–11.
20. Engel, J., Odermatt, E., and Engel, A. (1981) *J. Mol. Biol.* 150, 97–120.
21. Price, T. M., Rudee, M. L., Pierschbacher, M., and Ruoslahti, E. (1982) *Eur. J. Biochem.* 129, 359–363.
22. Erickson H. P., Carell, N., and McDonagh, J. (1981) *J. Cell. Biol.* 91, 673–678.
23. Tooney, N. M., Mosesson, M. W., Amrani, D. L., Hainfeld, J. F., and Wall, J. S. (1983) *J. Cell. Biol.* 97, 1686–1692.
24. Zenhausern, F., Adrian, M., and Descouts, P. (1993) *J. Electron Microsc.* 42, 378–388.
25. Benecky, M. J., Wine, R. W., Kolvenbach, C. G., and Mosesson, M. W. (1991) *Biochemistry* 30, 4298–4306.
26. Poulouin, L., Gallet, O., Rouahi, M., and Imhoff, J. M. (1999) *Protein Expression Purif.* 17, 146–152.
27. Mosesson, M. W., and Umfleet, R. A. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5728–5736.
28. Higgins, J. S., and Benoît, H. C. (1994) *Polymers and neutron scattering*, Clarendon Press, Oxford.
29. Cotton, J.-P. (1991) in *Neutron, X-ray and light scattering*, (Linder, P., and Zemb, Th., Eds.) pp 3–31, North-Holland Publishing, Amsterdam.
30. Berne, B. J., and Pecora R. (1976) *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology, and physics*, Wiley, New York.
31. Yamakawa, H. (1971) *Modern theory of polymer solutions*,

- Harper & Row Publishers, New York.
32. Oono, Y., and Kohmoto, M. (1983) *J. Chem. Phys.* 78, 520–528.
33. Weill, G., and des Cloizeaux, J. (1979) *J. Phys.* 40, 99–105.
34. Jacrot, B. (1976) *Rep. Prog. Phys.* 39, 911–953.
35. Timmins, P. A., and Zaccai, G. (1988) *Eur. Biophys. J.* 15, 257–268.
36. Calmettes, P., Durand, D., Desmadril, M., Minard, P., Receveur, V., and Smith, J. C. (1994) *Biophys. Chem.* 53, 105–114.
37. Creighton, T. E. (1993) *Proteins*, 2nd ed., W. H. Freeman and Cie New York.
38. Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhill, I., and Erickson, H. P. (1992) *Science* 258, 987–991.
39. Royer, W. E., Jr., and Hendrickson W. A. (1988) *J. Biol. Chem.* 27, 13762–13765.
- BI992770X

4.2. Gels BSA-Glutaraldéhyde : diagramme de phase

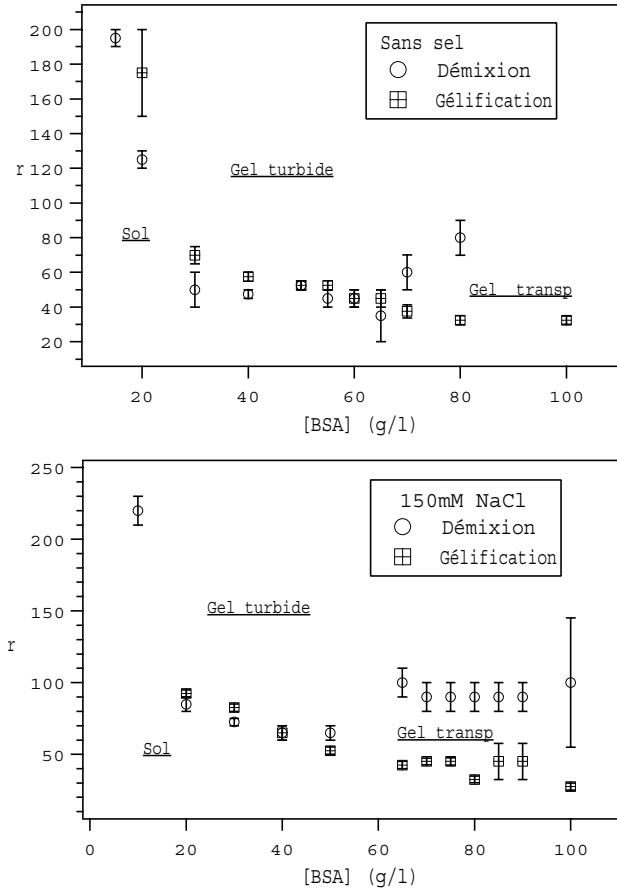


FIG. 4.1. – Diagramme de phase BSA/Glutaraldéhyde. r est le rapport molaire entre le glutaraldéhyde et la BSA. Le tampon est, dans tous les cas, du Tris-HCl, pH7.4.

4.3. Structure rigide des agrégats de lysozyme

Rigid structure of fractal aggregates of lysozyme

G. C. FADDA and D. LAIREZ

*Laboratoire Léon Brillouin, CEA-CNRS CEA/Saclay
91191 Gif-sur-Yvette cedex, France*

(received 5 May 2000; accepted in final form 16 October 2000)

PACS. 87.50.Gi – Ionizing radiations (ultraviolet, X-rays, γ -rays, ions, electrons, positrons, neutrons, and mesons, etc.).

PACS. 61.43.Hv – Fractals; macroscopic aggregates (including diffusion-limited aggregates).

PACS. 81.10.-h – Methods of crystal growth; physics of crystal growth.

Abstract. – The aggregation of hen egg-white lysozyme upon salt addition was studied by quasi-elastic light scattering. Our results agree with the fractal structure of the aggregates already reported in the literature. However, we also demonstrate that these aggregates are rigid, since they do not display any fluctuation of internal concentration. Such a rigid internal structure is a key point to reconcile the fractal structure of the aggregates and their colloid-like ordering. Furthermore, this result has to be considered for understanding crystal nucleation.

Introduction. – The determination of globular proteins structure by neutron or X-ray diffraction is an increasing activity in biophysics [1]. Crystallization of protein is a crucial point for these studies, although crystal growth methods remain greatly empirical up to now. The understanding of protein crystallization is thus of major importance and motivates the study of supersaturated protein solutions. A key point concerns the optimum conditions for nucleation to occur. It has been shown that under physicochemical conditions favorable to attractive interactions between lysozyme molecules and thus to nucleation, fractal aggregates appear in supersaturated solutions [2]. The point is to know whether fractal aggregation is a necessary initial stage for nucleation.

Recently, lysozyme fractal aggregates have been extensively studied [2, 3]. Their structure and growth with time have been analyzed in terms of the diffusion-limited (DLCA) and reaction-limited (RLCA) cluster aggregation models. For instance, lysozyme at a concentration of 3 mM at 20 °C in a pH 4.5 buffer containing 0.5 M NaCl, forms fractal aggregates with a dimension $d_f = 2.08 \pm 0.14$. For increasing concentration, it has been shown [3] the existence of colloid-like ordering of these aggregates, as revealed by a maximum in the light scattering intensity as a function of scattering vector q . Such a result is quite puzzling. First, because the presence of salt prevents possible electrostatic repulsion. Secondly, because usually low-density fractals either interpenetrate or shrink as their concentration increases. Thus no interaction peak should be observed at low scattering vector.

In this paper, we report light scattering measurements on supersaturated lysozyme solutions. Experiments were carried out in physicochemical conditions quite similar to that of Georgalis *et al.* [2] and Umbach *et al.* [3]. We recover their results concerning the fractal structure of the aggregates, but our main observation is concerned with the dynamical structure factor which does not reveal any internal modes for the aggregates. This demonstrates that the aggregates have a rigid internal structure. Such a rigid structure explains their strong interactions.

Materials and methods. – Hen egg-white lysozyme was purchased from Sigma Chemicals. The experiments were conducted in a buffer containing 0.10 M sodium acetate/acetic acid (NaAc) at $pH = 4.5$. Lysozyme at the concentration of 60 mg/ml and NaCl at the concentration of 1.0 M were dissolved separately in the buffer. Equal volumes of the two solutions were rapidly mixed and filtrated twice with Millipore GV 0.22 μm filters. All measurements were carried out at 20 °C.

The experiments were performed with a home-made spectrometer using a vertically polarized argon gas laser with a wavelength $\lambda_0 = 488$ nm. The scattered intensity was measured in the horizontal plane at scattering angles θ from 20° to 150°, corresponding to scattering vectors $q = (4\pi n/\lambda_0) \times \sin(\theta/2)$ between 5×10^{-3} and 3.5×10^{-2} nm⁻¹. The total scattered intensity per volume unit of toluene was taken as reference. The scattering intensity of toluene was found to be independent of the scattering angle within 1%. From the literature, the Rayleigh ratio of toluene is equal to $R_{\text{toluene}} = 42.7 \times 10^{-6}$ cm⁻¹. The absolute value (in cm⁻¹) of the scattering cross-section per volume unit, $\tilde{\Sigma}(q)$, of lysozyme in solution was deduced from the ratio $\tilde{\Sigma}(q) = ((I(q) - I_0)/I_{\text{toluene}}) \times R_{\text{toluene}}$, where $I(q)$, I_0 , I_{toluene} are the scattered intensities of the lysozyme solution, the pure solvent and toluene, respectively. The refractive index increment of lysozyme in water is equal to $dn/dC = 0.230$ cm³g⁻¹ [4], where C (in g/cm³) is the lysozyme concentration. The light scattering contrast factor $K^2 = (2\pi n_0/\lambda_0^2 N_a \times dn/dC)^2$, where N_a is Avogadro's number and $n_0 = 1.3330$ the refractive index of water, was calculated to be 1.09×10^{-6} cm²g⁻²mol. This allows us to calculate the quantity $\tilde{\Sigma}(q)/(K^2 \times C)$ (in g/mole) and to compare it to the molecular weight, $M = 14300$ g/mole, of lysozyme molecules. Quasi-elastic light scattering (QELS) measurements were performed in the self-beating mode. The dynamical structure factor $S(q, t)$ was deduced from the autocorrelation function of the time-dependent scattered intensity $I(t)$ computed by a 256 channels Malvern 7032 multi-correlator.

Quasi-elastic light scattering and internal modes. – The experimental results discussed in the following are concerned with QELS measurements. Let us do a summary of what it is theoretically expected for dilute solutions of large particles in a q -range for which only one characteristic length (the size of the particle) is relevant.

For solutions, $S(q, t)$ represents the relaxation over the length q^{-1} of concentration fluctuations. In dilute solution and at large q^{-1} compared to the characteristic size R_g of the particles ($qR_g < 1$), this relaxation is achieved via the self-diffusion of the particles by translational motion. In the case of monodisperse particles with a diffusion coefficient D , $S(q, t)$ is a simple exponential decay with a characteristic time τ corresponding to the time $1/(Dq^2)$ needed for molecules to cover the q^{-2} area: $S(q, t) = e^{-Dq^2t}$. For dense particles and for fractals made of hydrodynamically interacting units (Zimm model), the particle encounters a friction f proportional to its radius, $f = 6\pi\eta R_H$, where $R_H = \alpha R_g$ is the hydrodynamic radius and η the solvent viscosity. The proportionality factor α depends on particle conformation but it is never far from unity [5].

For increasing scattering vector q ($qR_g > 1$), different cases have to be distinguished. For dense particles such as colloids and spherical micelles, or for particles having a rigid structure, internal density and concentration fluctuations are negligible and $S(q, t)$ is dominated by the translational motion. For fractals having a flexible structure, translational motion of the particle still contributes to $S(q, t)$, but in practice $S(q, t)$ is dominated by concentration fluctuations inside the fractal itself. Let us use a scaling argument stating that in this q range ($qR_g > 1$), $S(q, t)$ is insensitive to the overall size of the fractal. It comes necessarily that the diffusion coefficient corresponds to the motion of fractal segments having a size q^{-1} . In the

case of hydrodynamic interactions between fractal segments (Zimm model) one can write

$$D(qR_g) = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} F(qR_g) \text{ with } \begin{cases} F(qR_g < 1) = 1, \\ F(qR_g > 1) = qR. \end{cases} \quad (1)$$

Actually, for $qR_g > 1$, all the fractal segments having a size smaller than q^{-1} participate to the dynamical structure factor. Due to the distribution in size of these segments, $S(q, t)$ is no longer exponential. As time goes by, the segments shorter than $(t \times kT/\eta)^{1/3}$ have already relaxed, but the slower ones have not. This distribution in relaxation time is responsible for a stretched exponential behavior of $S(q, t)$ [6]:

$$S(qR_g > 1, t) = e^{-(D(q)q^2t)^{2/3}}. \quad (2)$$

These two equations are the signature of internal modes and have been checked by experiments on various objects: binary mixture near the critical point (except for the nonexponential relaxation) [7], linear polymers in good and θ solvent [8–11], branched polymers [12,13], associative polymers aggregates [14], dilute solution of bilayers [15]. This is the general behavior of objects having a flexible structure allowing fluctuations of internal concentration. Note that in the case of no hydrodynamic interactions between fractal segments (Rouse model), an even more drastic effect is expected for internal modes: $D(q) \propto q^2$ and $S(qR_g > 1, t) = e^{-(D(q)q^2t)^{1/2}}$.

Results. – After salt addition, lysozyme aggregates. The aggregation kinetics has been extensively studied [2,3] and is not the purpose of this paper. The aggregation process is very slow in the physicochemical conditions here studied. In fig. 1, the reduced scattering cross-section $\tilde{\Sigma}(q)/(K^2 \times C \times M)$ is plotted as a function of the scattering vector q , for a solution at the initial stage and 4 days later. Initially, the spectrum is completely flat because of the very small radius of gyration of lysozyme compared to the light scattering q range. The mean value is $\langle \tilde{\Sigma}(q)/(K^2 \times C \times M) \rangle = 1.35 \pm 0.05$. To explain this value higher than unity, one needs to take into account attractive lysozyme-lysozyme interactions. In the dilute regime, the osmotic compressibility can be expressed as a virial expansion leading to $\tilde{\Sigma}(0)/(K^2 \times C \times M) = 1 - 2MA_2C + \dots$, where A_2 is the second virial coefficient. Negative values for A_2 have already been observed. With 0.5 M NaCl in water the value $MA_2 = -6.4 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, given in ref. [4,16], leads to the expected value $\tilde{\Sigma}(0)/(K^2 \times C \times M) = 1 - 2MA_2C = 1.38$, in good agreement with our result.

Four days later, the scattering cross-section has increased strongly at low q values (see fig. 1). This reveals association of lysozyme molecules in large aggregates. However, at high q values the scattering spectrum superimposes on the one measured at the beginning. This means that only a very small amount of lysozyme molecules are involved in the aggregates, and the contribution of the free lysozyme molecules to the total scattered intensity cannot be neglected. This is the reason why the scattering function of the aggregates cannot be directly deduced from these measurements.

QELS measurements were performed on lysozyme solutions after aggregation has occurred. In fig. 2, $S(q, t)$ measured at different scattering vectors q is plotted as a function of tq^2 . Such a plot would give a single master curve in the case of a single diffusion process with a diffusion coefficient D : $S(q, t) = e^{-Dtq^2}$. In the present case, relaxation of concentration fluctuations shows two modes with characteristic times differing by two orders of magnitude. The different curves superimpose at short and large tq^2 values. Without further data analysis, this indicates that the two relaxation modes are controlled by diffusion. In order to account more quantitatively for these two modes, $S(q, t)$ is written as the sum of two exponential decays:

$$S(q, t) = Y_1(q)e^{-D_1tq^2} + Y_2(q)e^{-D_2tq^2}, \quad (3)$$

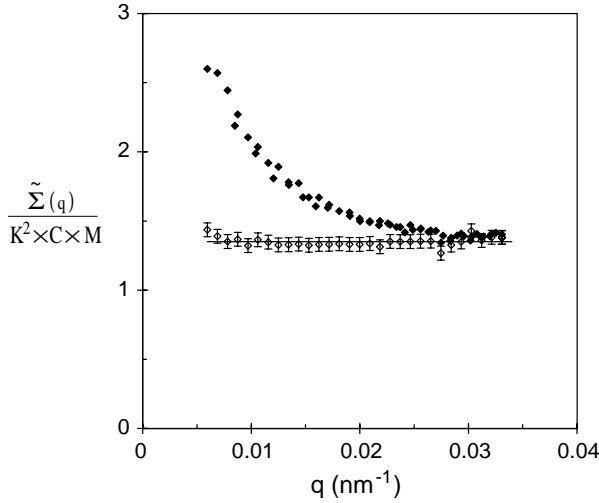


Fig. 1

Fig. 1 – Reduced scattering cross-section per volume unit $\tilde{\Sigma}(q)/(K^2 \times C \times M)$ vs. scattering vector q measured for lysozyme concentration $C = 3 \times 10^{-2} \text{ g/cm}^3$, $[\text{NaCl}] = 0.5 \text{ M}$, $T = 20^\circ \text{ C}$ and $\text{pH} = 4.5$. Hollow symbols: measurement at the initial stage, full symbols: 4 days later. The straight line corresponds to the mean initial value 1.35 ± 0.05 .

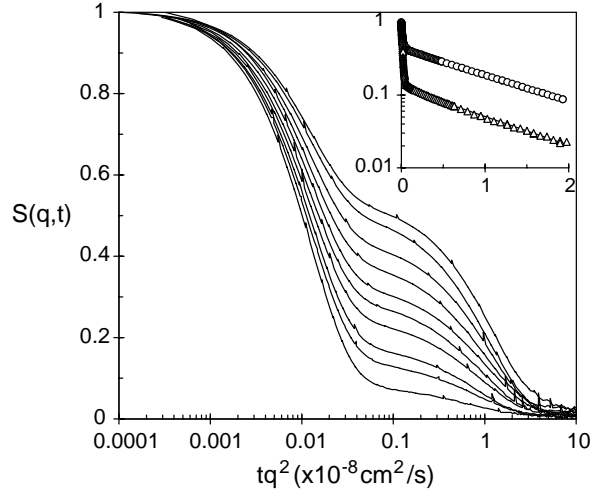


Fig. 2

Fig. 2 – Dynamical structure factor $S(q, t)$ vs. tq^2 in a linear-log scale (inset: log-linear scale) for different scattering vectors q . From upper to lower curve $q = 5.9, 7.4, 8.9, 10, 12, 13, 14, 17, 20$ and $26 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$. In the inset ($q = 8.9, 20 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$ upper and lower curve, respectively) the log-linear scale outlines more particularly the long-time part of the relaxation which decays exponentially.

where the subscripts 1 and 2 refer to short- and long-time relaxation modes, respectively.

The short-time diffusion coefficient D_1 is found to be q -independent and equal to $(76 \pm 1.5) \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. Using the Stokes-Einstein relation $D_1 = kT/(6\pi\eta R_{H1})$, the hydrodynamic radius $R_{H1} = (2.03 \pm 0.05) \text{ nm}$ reported in the literature [17] would lead to $D_1 = 106 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ for free lysozyme molecules. Here again the discrepancy between the measured and the calculated values is explained by lysozyme-lysozyme interactions. For dilute solutions, the diffusion coefficient can be written as $D = D_0(1 + k_D C)$, where k_D is an effective two-body interaction parameter reflecting both thermodynamic and hydrodynamic interactions. Usually in good solvent, k_D is very small because of cancellation of thermodynamic and hydrodynamic interactions, but here the second virial coefficient is negative and thus magnifies the concentration effects. It has been reported [4] that $k_D = -10 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ for lysozyme solutions in conditions identical to those of this study. This value gives $D = 74 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ at $C = 30 \text{ mg/cm}^3$, in good agreement with our D_1 value.

The long-time diffusion coefficient is found to be $D_2 = (0.87 \pm 0.07) \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. It can be ascribed to the presence of lysozyme aggregates. The corresponding hydrodynamic radius is $R_{H2} = (245 \pm 20) \text{ nm}$. Such a high value requires two remarks.

1) As shown in fig. 3, D_2 is q -independent within the experimental accuracy. This means that the translational diffusion motion of aggregates is probed even at length scales smaller than their size. In other words, there are no concentration fluctuations inside the aggregates (no internal modes). In fig. 3, the measurements are compared to the behavior expected for internal modes.

2) At large tq^2 values, $S(q, t)$ is nicely described by a single exponential and not by a stretched exponential as expected in the case of internal modes for flexible structures. This feature is emphasized in the inset of fig. 2, where $S(q, t)$ is plotted as a function of tq^2 in a log-linear scale.

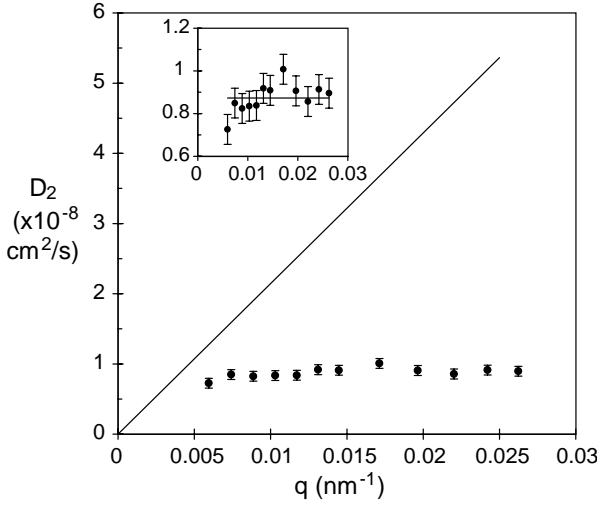


Fig. 3

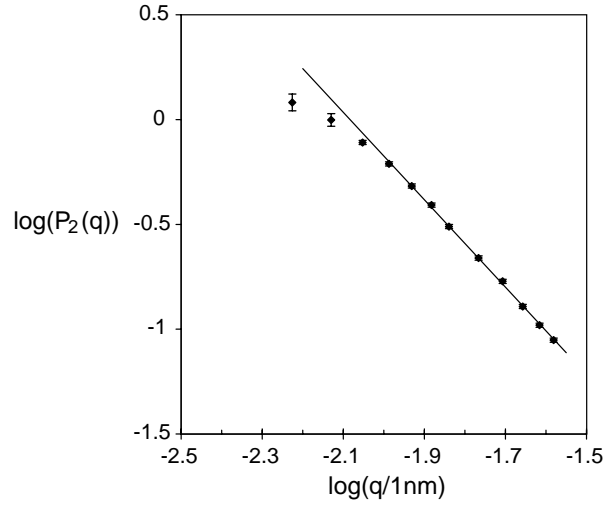


Fig. 4

Fig. 3 – Diffusion coefficient $D_2(q)$ of the aggregates as a function of the scattering vector q . The straight line has a slope equal to $kT/6\pi\eta$, with η the solvent viscosity, and corresponds to what would be expected for relaxation of internal concentration fluctuations.

Fig. 4 – Form factor $P_2(q) \propto Y_2(q)/Y_1(q)$ of lysozyme aggregates deduced from the q -dependent amplitudes of the two relaxation modes observed by QELS. The straight line has a slope equal to -2 .

The two above observations prove that there is no fluctuation of internal concentration inside the aggregates. There are only two possible explanations: 1) the aggregates have a dense structure, *i.e.* they are not fractal; 2) the aggregates are fractal but rigid. Of course, previous experiments reported in the literature plead in favor of this second possibility, but it has to be checked in our case to rule out artifact. This can be achieved by analyzing the amplitudes of the two relaxation modes [14]. In a dilute regime, cross terms can be neglected in the total scattered intensity, $I(q)$, so that

$$I(q) = I_1(q) + I_2(q), \quad (4)$$

where $I_1(q)$ and $I_2(q)$ are the scattering intensities corresponding to free lysozyme and aggregates, respectively. In eq. (3), each mode is weighted by the ratio of the contribution of a given species to the total scattered intensity:

$$Y_1(q) = \frac{I_1(q)}{I(q)}, \quad Y_2(q) = \frac{I_2(q)}{I(q)}. \quad (5)$$

Due to their small size, the contribution I_1 of free lysozymes is q -independent (see fig. 1, hollow symbols). Neglecting interactions between aggregates, the scattering contribution $I_2(q)$ is proportional to their form factor $P_2(q)$ which can thus be deduced from the ratio

$$P_2(q) \propto I_2(q) \propto \frac{Y_2(q)}{Y_1(q)}. \quad (6)$$

The result is plotted in fig. 4 in log-log scales. We found that $P_2(q) \propto q^{-2}$ at q^{-1} smaller than the size of the aggregates. This result is in good agreement with the fractal dimension, d_f , of lysozyme aggregates already reported [2]: $1.97 < d_f < 2.05$ depending on lysozyme concentration with 0.5 M NaCl. Note that in the case of a dense structure, one would expect rather a Porods law ($S_2(q) \propto q^{-4}$) as the signature of a sharp interface between the inside and the outside of the aggregates [18].

Discussion and conclusion. – Our QELS data have been interpreted in terms of large-aggregates self-diffusion rather than of a slow cooperative process. Fractal aggregates being

so large, one may wonder about their possible interactions. Let us show *a posteriori* that our analysis is self-consistent and that these interactions can be neglected. The aggregates are found to have a radius 10^2 times higher than the one of lysozyme. One can estimate the number of lysozyme molecules per aggregate to be $N = (R_{H2}/R_{H1})^{d_f} = 10^4$. Our static and QELS measurements are sensitive to both the aggregates and the free molecules (see fig. 1 and fig. 2), this means that the products of the molecular mass by the mass concentration for the aggregates and for free lysozyme molecules are of the same order. Consequently, the aggregates are 10^4 times heavier than lysozyme molecules, but their concentration is 10^4 times lower: $C(N) = C(1) \times 10^{-4}$. Let us define the overlap concentration C^* of the aggregates as the ratio of their mass to the third power of their radius. C^* scales as $C^*(N) = C^*(1) \times N^{1-3/d_f} = C^*(1) \times N^{-1/2}$, where $C^*(1)$ is the overlap concentration of lysozyme. Finally, the volume fraction occupied by the aggregates is $C(N)/C^*(N) = [C(1)/C^*(1)] \times 10^{-2}$, which means that the aggregates are in a much more dilute regime than free lysozyme molecules. This supports our interpretation neglecting aggregate-aggregate interactions.

The lysozyme aggregates studied here are very large compared to the light scattering q range. Thus, their internal structure and dynamics is probed. Actually, the static structure factor is found to vary as q^{-2} as expected for fractals at $qR_g > 1$. In the same q range, we find that the dynamic structure factor is not governed by internal modes. This observation proves that lysozyme fractal aggregates are rigid. This result explains the colloid-like ordering of these aggregates already reported in the literature [3] and revealed by a scattered intensity peak at low q . Apart from this rigidity, such a peak could be caused by electrostatic interaction (as for polyelectrolytes [19]) or “hard sphere”-like interactions (as for star polymers [20,21] or spherical polymer micelles [22] which both display liquid-like ordering). The former is to be ruled out because of the very high salt concentration but the latter needs special attention. Because of their low-density fractal structure, polymer coils are able to interpenetrate. Thus, polymers in good solvent ($d_f = 1.7$) or in θ solvent ($d_f = 2$) pass from a dilute regime (with a distance d between coils larger than their size R) to a semi-dilute regime (with $d < R$) with an overall scattered intensity profile remaining unchanged but with a decreasing characteristic size ξ ($\xi \propto R$ in the dilute regime, and $\xi \propto d$ in a semi-dilute one). However, the structure of lysozyme aggregates is different from that of a linear chain and rather similar to a branched structure. Such a structure is comparable with monodisperse randomly branched polymers in good solvent which have the same fractal dimension $d_f = 2$ and have been well studied from the point of view of the concentration behavior. Theoretically [23], monodisperse branched polymers do not interpenetrate. The reason is that if they interpenetrate, excluded-volume interaction would be screened and thus the fractal dimension would be that of a Cayley tree [24] ($d_f = 4$) which is not possible in three dimensions. Actually, in the reaction bath, within which they are growing, branched polymers of a given size are swollen by smaller ones, leading to $d_f = 2.5$. Once monodisperse, this possibility is removed and branched polymers do not interpenetrate but rather shrink for increasing concentration. This shrinkage is enabled by the soft and flexible structure of the polymer. Experimentally [25], despite a different mechanism, the concentration behavior of monodisperse branched polymers is similar to that of linear polymers (except for a different concentration dependence of the correlation length). Lysozyme aggregates behave in a completely different manner and present liquid-like interactions. This can be fully explained taking into account their rigidity.

From our quasi-elastic data, we find that the aggregates are monodispersed (as shown by the simple exponential decay of $S(q, t)$ at long time, see fig. 2). On the other hand, previous results have shown that their fractal dimension is 2.08 ± 0.14 [2]. These two results come into conflict with respect to DLCA or RLCA models. The former predicts monodisperse aggregates but with a fractal dimension lower than 2. The latter predicts a fractal dimension in better

agreement with the one of lysozyme aggregates but with a polydispersity which should have an incidence on $S(q, t)$ [26]. In summary, lysozyme aggregates are monodisperse fractals with a dimension of the order of 2 and a rigid structure.

The reason for this rigidity is not understood and should be investigated. In our opinion it is a key point for the understanding of lysozyme crystal nucleation. If fractal aggregation is a necessary initial stage for nucleation, a rearrangement of lysozymes inside the aggregates is required for a nucleus to appear. Clearly, the aggregate rigidity which causes the lack of fluctuations is not favorable to such a rearrangement.

* * *

We warmly thank O. VIDAL for having kindly communicated to us her knowledge about lysozyme and P. CALMETTES for interesting remarks about the paper.

REFERENCES

- [1] See for instance *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins*, edited by A. DUCRUIX and R. GIEGÉ, 2nd edition (Oxford University Press, New York) 1999.
- [2] UMBACH P., GEORGALIS Y. and SAENGER W., *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998) 2382.
- [3] GEORGALIS Y., UMBACH P., SAENGER W., IHMELS B. and SOUMPASIS D. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 1627.
- [4] MUSHOL M. and ROSENBERGER F., *J. Chem. Phys.*, **103** (1995) 10424.
- [5] OONO Y. and KOHMOTO M., *J. Chem. Phys.*, **78** (1983) 520.
- [6] DUBOIS-VIOLETTE E. and DE GENNES P.-G., *Physics*, **3** (1967) 181.
- [7] BERGE P., CALMETTES P., LAJ C. and VOLOCHINE B., *Phys. Rev. Lett.*, **23** (1969) 302.
- [8] ADAM M. and DELSANTI M., *J. Phys. (Paris) Lett.*, **38** (1977) L-271.
- [9] MARTIN J. E., WILCOXON J. P. and ODINEK J., *Macromolecules*, **25** (1992) 4635.
- [10] ADAM M., LAIREZ D., RASPAUD E. and FARAGO B., *Phys. Rev. Lett.*, **77** (1996) 3673.
- [11] ADAM M., FARAGO B., SCHLEGER P., RASPAUD E. and LAIREZ D., *Macromolecules*, **31** (1998) 9213.
- [12] MARTIN J. E. and WILCOXON J. P., *Phys. Rev. Lett.*, **61** (1988) 373.
- [13] ADAM M., LAIREZ D., KARPASAS M. and GOTTLIEB M., *Macromolecules*, **30** (1997) 5920.
- [14] RASPAUD E., LAIREZ D., ADAM M. and CARTON J.-P., *Macromolecules*, **27** (1994) 2956.
- [15] KIMURA Y., OIZUMI J. and HAYAKAWA R., *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci.*, **332** (1999) 3069.
- [16] GRIPON C., LEGRAND L., ROSENMAN I., VIDAL O., ROBERT M. C. and BOUÉ F., *J. Cryst. Growth*, **178** (1997) 575.
- [17] SVERGUN D. I., RICHARD S., KOCH M. H. J., SAYERS Z., KUPRIN S. and ZACCAI G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biophysics*, **95** (1998) 2267 (in this paper the authors report for the radius of gyration $R_g = (1.54 \pm 0.02)$ nm. We deduced R_H from the product $R_H = (5/3)^{1/2} \times R_g$; EBERSTEIN W., GEORGALIS Y. and SAENGER W., *J. Cryst. Growth*, **143** (1994) 71 (in this paper the value $R_H = (2.09 \pm 0.08)$ nm is reported).
- [18] AUVRAY L. and AUROY P., *Neutron, X-ray and Light Scattering*, edited by P. LINDNER and TH. ZEMB (North-Holland) 1991.
- [19] MORFIN I., REED W. F., RINAUDO M. and BORSALI R., *J. Phys. II*, **4** (1994) 1001.
- [20] ADAM M. and LAIREZ D., *Fractals*, **1** (1993) 149.
- [21] WILLNER L., JUCKNISCHEKE O., RICHTER D., FARAGO B., FETTERS L. J. and HUANG J. S., *Europhys. Lett.*, **4** (1992) 297.
- [22] ADAM M., CARTON J.-P., CORONA-VALLET S. and LAIREZ D., *J. Phys. II*, **6** (1996) 1781.
- [23] DAOUD M. and JOANNY J.-F., *J. Phys.*, **42** (1981) 1359.
- [24] FLORY, P. J., in *Principles of Polymer Chemistry* (Cornell University Press, Ithaca) 1953.
- [25] DELSANTI M., MUNCH J.-P., DURAND D., BUSNEL J.-P. and ADAM M., *Europhys. Lett.*, **13** (1990) 697.
- [26] MARTIN J. E., *Phys. Rev. A*, **36** (1987) 3415.

5. Publications

Critical behavior of gelation probed by the dynamics of latex spheres

G. C. Fadda and D. Lairez*

Laboratoire Léon Brillouin, CEA-CNRS, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

J. Pelta

ERRMECE, Université de Cergy-Pontoise, 95302 Cergy-Pontoise cedex, France

(Received 21 November 2000; published 23 May 2001)

We report a quasielastic light scattering study of the dynamics of large latex probe particles ($R = 225$ nm) in gelatin solution undergoing gelation. We show that by focusing on the short-time and long-time behavior of the autocorrelation function, it is possible to simply interpret out data in terms of the divergence of the viscosity and emergence of the shear elastic modulus near the gel point. Our crude analysis allows us to grasp the critical behavior of gelation and to obtain the two critical exponents of the transport properties.

DOI: 10.1103/PhysRevE.63.061405

PACS number(s): 82.70.Gg, 47.50.+d, 83.10.Pp

I. INTRODUCTION

The use of spherical probe particles to study viscoelastic properties of polymer solutions has been suggested for a long time [1,2]. The basic idea is that in a semidilute solution of linear chains, sufficiently small particles freely move in the solution whereas larger particles would be trapped in the polymer transient network. Thus, the dynamics of probe particles is expected to be governed either by the solvent viscosity, or by the macroscopic viscosity, depending on their size R compared to the correlation length ξ_T of concentration fluctuations. A suitable technique to study such dynamics of probe particles is quasielastic light scattering, which has been extensively used on various physicochemical systems. According to the wide literature on this subject it appears that some complications may occur. For instance, a complex signal is sometime observed due to the contribution of the matrix and of the probe particles to the total light scattered intensity [3]. In addition, strong interactions between polymers in solution and particles, are sometimes reported which may cause adsorption of chains on the particles and particles aggregation [4,5]. However, it has been shown that, as soon as these complications are avoided, the basic idea is well founded. In particular for $R/\xi \gg 1$, the long-time dynamics of probe particles is slowed down and governed by the macroscopic viscosity [6–9] rather than the solvent viscosity.

Compared to rheology, the study of thermal fluctuations of concentration of probe particles for the investigation of weak structures is very attractive [10], because it guarantees the structure integrity. In particular, the use of probe particles for the study of gelation looks very tempting and has been already reported. Gelation [11] is a critical phenomenon of connectivity occurring when molecules randomly connect together leading at the gel point to a giant cluster: the gel. The understanding of quasielastic light scattering results obtained on gelling systems is much less clear as those obtained in semidilute solutions. On the one hand, gelation essentially produces a wide polydisperse population of clusters, which is responsible for complex relation processes. Therefore the analysis of the dynamical structure factor of probe particles

in terms of time distribution is not quite obvious. On the other hand, above the gel point, fluctuations tend to be frozen at long-time because the solution becomes solid. This appears through a decrease in amplitude of the scattered intensity fluctuations. The most often used approach to account for this behavior invokes a loss of ergodicity [12–14]. The physical meaning of this approach consists in splitting the probe particles population into two parts: the first being free to diffuse in the medium, the second being trapped in the network and motionless. The scattered intensity has thus two contributions: a time fluctuating or quasielastic part and a constant or elastic part. Quasielastic light scattering technique consists in measuring the autocorrelation function of the scattered intensity. Consequently it also shows the two contributions. The first corresponds to the autocorrelation of the fluctuating part of the scattered intensity and the second to the correlation of this fluctuating part with the elastic scattering that acts as a local oscillator signal. In terms of the light scattering language, this amounts to mix a self-beating and a heterodyne contribution. Such an analysis calls for two remarks. First, the splitting of the probe particles population into two parts seems somewhat arbitrary and unsatisfactory. Second, above the gel point as fluctuations become more and more frozen the increasing heterodyne part leads at short time to a slowed dynamics while quite the opposite is experimentally observed [15].

In this paper, we present an analysis of quasielastic light scattering results from probe particles during gelation of a gelatin solution. We deliberately consider the simplest case, that is: (1) very large spherical and monodisperse latex particles (radius $R = 225$ nm); (2) negligible thermodynamic interactions of probe particles between them or with the matrix; (3) a negligible contribution of the matrix to the scattered intensity; (4) measurements performed at $qR = 1$ with $R/\xi_T \gg 1$. We show that, neglecting the nonergodicity and focusing on the short-time and long-time behaviors of the measured relaxation function, it is possible to simply interpret our data in terms of the divergence of the viscosity and emergence of a shear elastic modulus near the gel point. Our crude analysis allows us to grasp the critical behavior of gelation and to obtain the two critical exponents of the transport properties.

*Author to whom correspondence should be addressed.

II. SAMPLE PREPARATION AND EXPERIMENTAL DEVICE

Gelatin was purchased from Sigma. Solutions of gelatin were prepared in 50 mM Tris-HCl buffer at $pH=7.4$. Solubilization of gelatin was done at 40°C . At this temperature, the intrinsic viscosity of gelatin was measured with a StressTech rheometer from Reologica. It was found to be $[\eta]=61\pm 0.04\text{ cm}^3/\text{g}$. The quasielastic light scattering experiments reported in this paper were performed at a gelatin concentration of 0.01 g/cm^3 .

Polystyrene latex particles were prepared and kindly provided by Loïc Auvray. The latex weight fraction of this initial preparation is $5.6\times 10^{-2}\text{ g/g}$. It was determined by weighing after evaporation of water. This preparation was diluted by a factor of 3.25×10^4 . Assuming a density of $\rho=1.05\text{ g/cm}^3$ for polystyrene this yields a final volume fraction of latex particles of $\phi=1.8\times 10^{-6}$.

Light scattering measurements were performed with a home-made spectrometer using a krypton ion laser of wavelength $\lambda=647\text{ nm}$. Static light scattering measurements were performed for scattering angle θ between 10° and 150° , corresponding to scattering vector, $q=(4\pi n/\lambda)\times\sin(\theta/2)$, where $n=1.333$ is the refractive index of water, in the range $2.2\times 10^{-3}-2.5\times 10^{-2}\text{ nm}^{-1}$. Static measurements were done with toluene as reference (Rayleigh ratio equal to $8.5\times 10^{-6}\text{ cm}^{-1}$). Toluene scattered intensity per unit scattering volume was found to be independent of the scattering angle within 1%. For static light scattering measurements on samples in the gel state, in order to obtain a correctly ensemble averaged intensity whatever the scattering angle, measurements were performed using a special device allowing the sample rotation during measurement. For this purpose, in order to minimize scattering due to optical defects, samples were contained in high optical quality cylindrical quartz cells (Hellma) having a large diameter of 25 mm. Quasielastic measurements were performed by computing the correlation function of the scattered intensity with a Malvern K7032 multitau correlator.

III. STATIC LIGHT SCATTERING MEASUREMENTS

In Fig. 1 the ensemble and time averaged scattered intensity is plotted as a function of the scattering vector q . Measurements were performed on gelatin alone in the gel state, latex alone in solution, and latex plus gelatin solution at the same concentrations.

Let us first discuss the latex alone measurements (Fig. 1, hollow symbols). The q -dependent scattered intensity shows the classical oscillation of the form factor of a sphere: $S(q)=[3\{\sin(qR)-qR\times\cos(qR)\}/(qR)^3]^2$. Especially, the position of the first minimum or the periodicity of the oscillations, allow us to determine the radius of the latex particles as being $R=225\pm 2\text{ nm}$. Note that these latex particles have a very narrow size distribution. This is particularly emphasized in the inset of Fig. 1, where $q^4I(q)$ is plotted as a function of q . In this representation, $q^4I(q)$ is close to zero at the first minimum corresponding to $q\approx 0.02\text{ nm}^{-1}$. This indicates a very good particle monodispersity. Knowing the shape of the

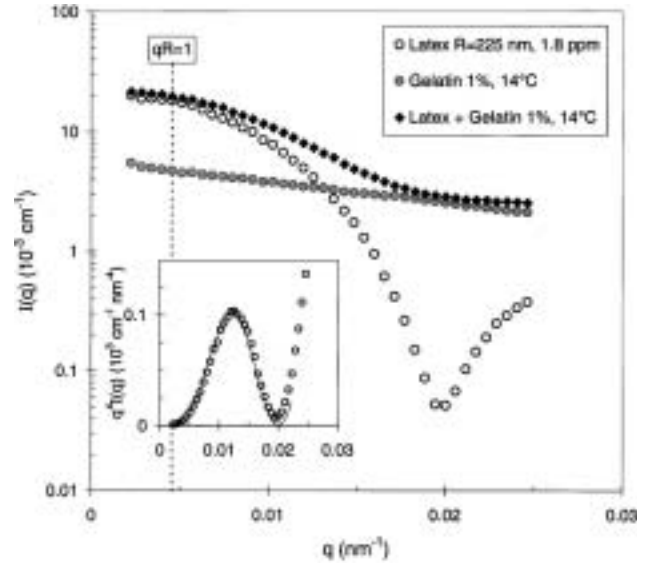


FIG. 1. Ensemble and time-averaged light scattered intensity per volume unit, $I(q)$, vs scattering vector q measured for 1% gelatin alone solution in the gel state, latex alone solution (volume fraction $\phi=1.8\times 10^{-6}$), and latex plus gelatin solution in the gel state at the same concentration. The dotted line corresponds to $qR=1$, with R the radius of latex particles. In the inset, the classical representation $q^4I(q)$ vs q , outlines the very good monodispersity of latex particles (solid line corresponds to sphere form factor with $R=225\text{ nm}$).

form factor and the characteristic size of the particles, it is easy to extrapolate the scattered intensity to $q=0$. One gets $I(0)=(2.65\pm 0.05)\times 10^{-2}\text{ cm}^{-1}$. From the refractive index of polystyrene $n_{\text{PS}}=1.595$, the contrast factor is calculated to be $K^2=[2\pi n(dn/dC)/\lambda^2]^2/N_A=4.56\times 10^{-2}\text{ cm}^2\text{ g}^{-2}\text{ mol}$, where N_A is Avogadro's number and dn/dC the refractive index increment of polystyrene in water assumed to be equal to the difference $n_{\text{PS}}-n$. Thus the forward scattered intensity gives a molar mass of latex particles: $M_{\text{latex}}=I(0)/(\phi\rho K^2)=(3.00\pm 0.06)\times 10^{10}\text{ g/mol}$, which has to be compared to the calculated mass of one particle: $M_{\text{calc}}=N_A\rho R^3 4\pi/3=3.02\times 10^{10}\text{ g/mol}$. The very good agreement between these two values indicates that the latex volume fraction is so small that interactions can be neglected.

Measurements on the sample containing latex and gelatin (Fig. 1, black symbols) and comparison with the value measured for gelatin-alone solution (gray symbols) shows that the gelatin contribution may be neglected at small angles. In this q -range, the shape of the scattered intensity for latex plus gelatin sample is very close to the one obtained for latex alone indicating that no latex particles aggregation occurs.

In Fig. 2, the reciprocal scattered intensity per volume unit, $1/I(q)$, is plotted as a function of q^2 , for the gelatin alone in the gel state. The scattered intensity can be fitted by an Ornstein-Zernike function: $I(q)=1/(1+q^2\xi_T^2)$, and gives the correlation length of concentration fluctuations, $\xi_T=43\pm 4\text{ nm}$. This value is higher than the one already measured by small-angle neutron scattering for gelatin at this concentration [16]. This may be due to small heterogeneities that are commonly observed in gels [17]. However, it is noteworthy

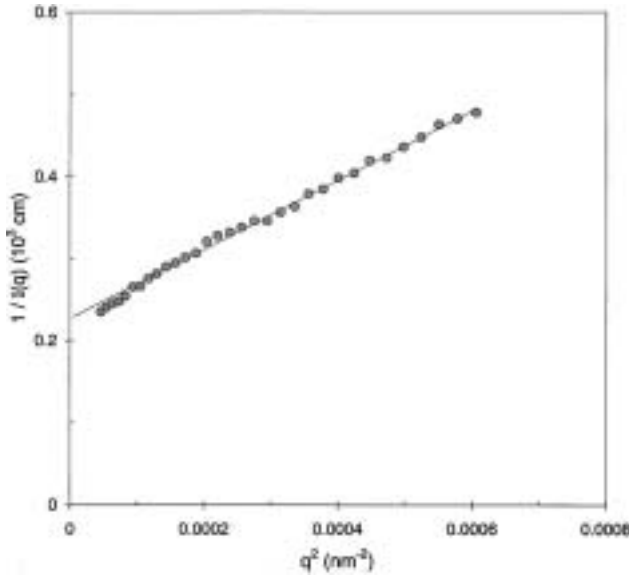


FIG. 2. Reciprocal scattered intensity per volume unit, $1/I(q)$, vs square scattering vector, q^2 , for 1% gelatin alone solution in the gel state. The straight line corresponds to the best fit using an Ornstein-Zernicke function for the scattered intensity: $I(q) = 1/(1 + q^2 \xi_T^2)$, where $\xi_T = 43 \pm 4$ nm is the correlation length of gelatin concentration fluctuations.

thy that despite this higher value of ξ_T , the measured correlation length is much smaller than the latex particle size. Consequently, on the length scale of the latex particles, gelatin concentration is homogeneous.

IV. QUASIELASTIC LIGHT SCATTERING MEASUREMENTS

Quasielastic measurements were done on latex solution in pure water at $T = 20^\circ\text{C}$ for scattering angles θ between 20° and 150° . The dynamical structure factor $S(q, \tau)$ has a simple exponential decay, with a characteristic time τ_c proportional to q^{-2} as expected for diffusive motion. The corresponding diffusion coefficient is found to be $D_0 = 1/(\tau_c q^2) = (0.94 \pm 0.05) \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. From the Stokes-Einstein relation, this value leads to the hydrodynamic radius $R_H = kT/(6\pi\eta_0 D_0) = 228 \pm 12$ nm, where kT is the thermal energy and η_0 the viscosity of water. This value is in very good agreement with the radius measured by static light scattering.

Measurements on latex particles were also performed in 1% gelatin solution at 40°C in the liquid state. In Fig. 3, the dynamical structure factors $S(q, \tau)$, measured in pure water at 20°C and in 1% gelatin solution at 40°C , are plotted as a function $\tau q^2/\eta_0$, in order to account for trivial effect due to the temperature dependence of water viscosity. One can see that the initial decay rate of the structure factor remains unchanged with gelatin. Note that at 40°C the viscosity of water is $\eta_0 = 0.653$ mPa s, whereas the macroscopic viscosity of the solution at the concentration $C = 0.01$ g/cm³, is $\eta = \eta_0(1 + [\eta]C) = 1.07$ mPa s. This proves that at this gelatin concentration and temperature, the solvent viscosity governs

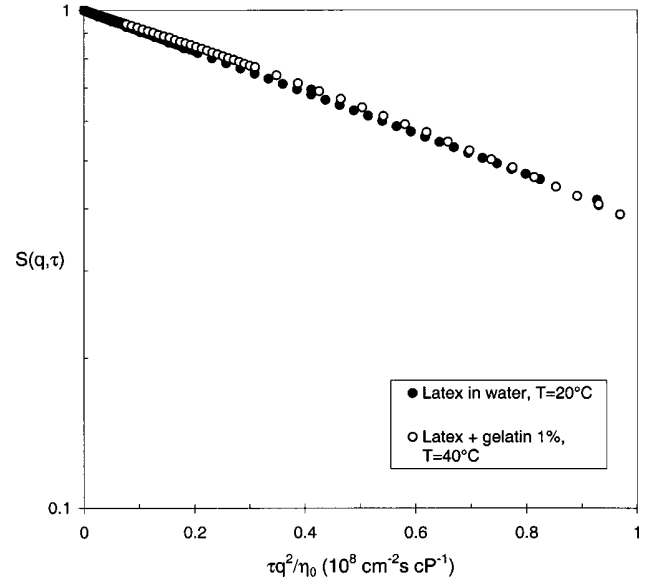


FIG. 3. Dynamical structure factor $S(q, \tau)$ for latex particles in water at 20°C and for latex particles in 1% gelatin solution at 40°C , vs $\tau q^2/\eta_0$, where η_0 is the viscosity of water ($\eta_0 = 1.002$ cP at $T = 20^\circ\text{C}$ and $\eta_0 = 0.653$ cP at $T = 40^\circ\text{C}$).

the short-time dynamics of latex particles. Moreover, this result shows that at 40°C , no significant polymer adsorption occurs on the probe particles because such an adsorption would be revealed by an increase of the hydrodynamic radius of particles. In the following, we will show that the two above remarks are still valid at 17°C , the temperature at which gelation was obtained.

In order to study gelation, the latex plus 1% gelatin solution, initially at $T = 40^\circ\text{C}$, was quenched at 17°C . Such a temperature ensures a gelation process sufficiently slow compared to the duration of one measurement. At $\theta = 20^\circ$, the autocorrelation of the scattered intensity was continuously measured during gelation by step of 10 min. In Fig. 4, the normalized autocorrelation function, $\langle I(0)I(\tau) \rangle / \langle I \rangle^2$, is plotted versus correlation time τ , at different time t during the gelation process (here brackets mean a time averaging). The shape of the autocorrelation function is no more a simple exponential decay. An accurate analysis of this shape is out of the range of this paper. However, in order to quantify the observed behavior, we have focused our analysis on the short-time and long-time behaviors. At short-time ($\tau < 1$ ms), the autocorrelation function is characterized by the initial slope of the relaxation function: $(\langle I(0)I(\tau) \rangle / \langle I \rangle^2 - 1)^{1/2} \propto \exp[-(\tau/\tau_1)]$; whereas the long-time behavior was described by a stretched exponential: $(\langle I(0)I(\tau) \rangle / \langle I \rangle^2 - 1)^{1/2} \propto \exp[-(\tau/\tau_2)^\beta]$. Note that such a stretched exponential behavior for the long-time tail of the correlation function has already been reported and studied in details for gelling systems [18,19]. Although we did not check the short- and long-time dynamics behavior vary properly with q (a multiphotodetector and a multichannel correlator are required for this), we will use the apparent diffusion coefficients, D_S and D_L , defined as $D_S = 1/(\tau_1 q^2)$ and $D_L = 1/(\tau_2 q^2)$.

Without further data analysis, in Fig. 4 one distinguishes

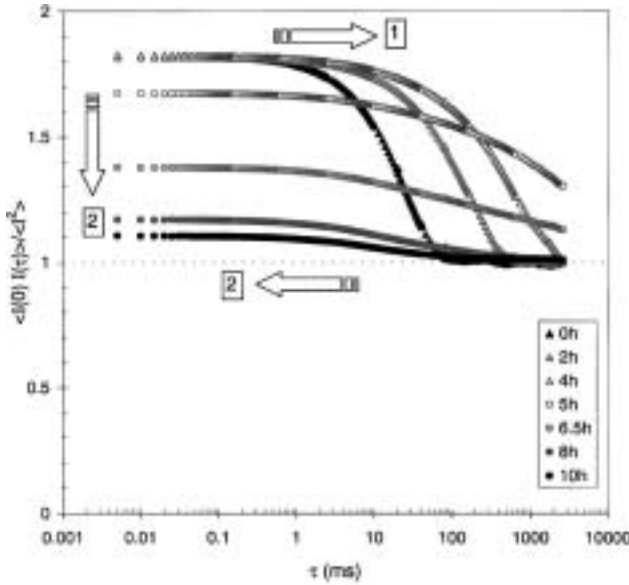


FIG. 4. Normalized autocorrelation function of the intensity scattered by latex probe particles, $\langle I(0)I(\tau) \rangle / \langle I \rangle^2$, vs correlation time τ , for different time t of the gelation process of 1% gelatin solution at $T=17^\circ\text{C}$. Measurements were performed at a scattering angle $\theta=20^\circ$ corresponding to $qR=1$ for latex particles.

two stages during the gelation process:

(1) For gelation times t shorter than 4.4 h the long-time tail of the normalized autocorrelation function shifts to even more long correlation times τ with a constant amplitude (triangles in Fig. 4), whereas the short-time decay rate remains unchanged compared to the one observed in pure water.

(2) For gelation times t higher than 4.4 h the amplitude of the normalized autocorrelation function drastically decreases, and the short-time behavior shifts to shorter correlation times (circles in Fig. 4). This short time behavior is much more emphasized plotting the logarithm of the dynamical structure factor as in Fig. 5. One can see that the initial decay rate increases as gelation goes on.

These two stages also appear clearly in Fig. 6, which shows that: before a gelation time t_c , the short-time dynamics is unaffected whereas the long-time dynamics slows down (D_L tends toward 0 at t_c); beyond t_c , fluctuations decrease in amplitude and the short-time dynamics becomes faster (D_S increases by a factor of 10).

As it will be discussed in the following section, the key point of our paper is that the change of the dynamics of probe particles in these two stages are linked to the critical behavior of gelation, namely, (1) divergence of the macroscopic viscosity below the gel point and (2) emergence of a shear elastic modulus above the gel point.

V. DISCUSSION

A. Short-time behavior in the liquid state

We observed at $T=40^\circ\text{C}$ and in the liquid state at 17°C , that the dynamics of the probe particles is governed at short-

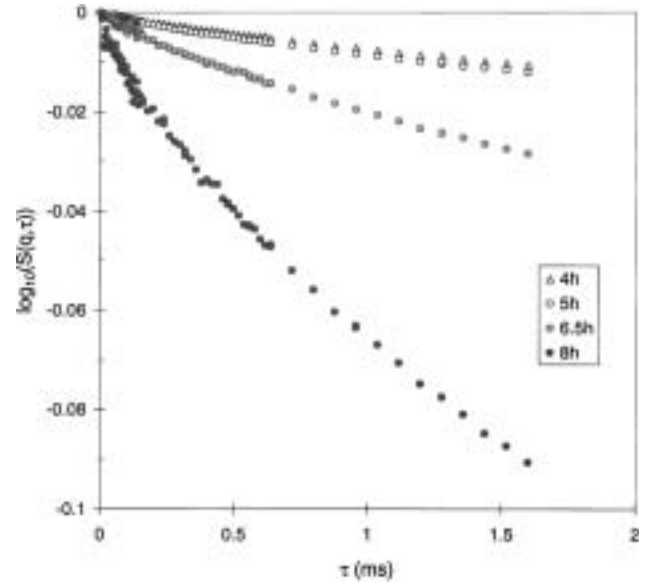


FIG. 5. Logarithm of the short time part of the dynamical structure factor $S(q,\tau)$ vs correlation time τ , for different time t of the gelation process (same experimental conditions as Fig. 4).

time by the solvent viscosity. Our quasielastic measurements were performed at a concentration C corresponding to $[\eta]C=0.6$, i.e., just below the overlap concentration from the point of view of rheological properties. At this concentration, the data already reported in literature [16] as well as

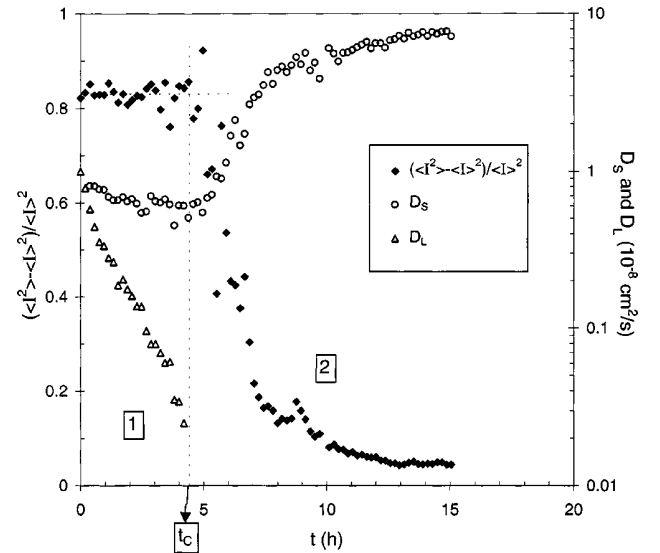


FIG. 6. Dynamics of latex probe particles during gelation of 1% gelatin solution at $T=17^\circ\text{C}$. Full symbols: amplitude of the autocorrelation function of the intensity scattered by latex probe particles, $(\langle I(0)I(\tau) \rangle / \langle I \rangle^2 - 1)_{\tau \rightarrow 0} = (\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2) / \langle I \rangle^2$; Open triangles: long-time apparent diffusion coefficient D_L deduced from a stretched exponential fit of the long-time tail of the correlation function; Open circles: short-time apparent diffusion coefficient D_S deduced from the initial decay rate of the autocorrelation function. At $t_c=4.4\text{h}$, D_L tends to zero, fluctuations become frozen, and the short-time dynamics become faster.

our measurements (see Fig. 2) show that the correlation length of the concentration fluctuations ξ_T is smaller than the size of the latex particles. In this situation, one would expect the matrix be viewed by latex particles as a continuum whose viscosity governs their dynamics. Therefore at first sight, a short-time dynamics governed by the solvent viscosity is puzzling. However, this behavior has been already observed for gelatin solutions [15] and, more generally, for polymer solutions near the overlap concentration [7]. In literature, it is often referred to as a ‘‘positive deviation from Stokes-Einstein behavior.’’

The first idea that would account for such a behavior is a diffusion mechanism within a cage [20] or in a harmonic potential [21]. Let us consider a latex particle in a semidilute solution (matrix) of correlation length ξ_T and note $\langle r^2 \rangle$ the mean-square displacement of the particle. The physical idea is that the polymer transient network does not affect the particle dynamics as long as $\langle r^2 \rangle^{1/2}$ is smaller than ξ_T . Beyond ξ_T , if the particle size is larger than ξ_T , it begins to feel the transient network and to be slowed by the macroscopic viscosity. The dynamical structure factor of the particle can be written as $S(q, \tau) = \exp(-\langle r(\tau)^2 \rangle q^2)$, with

$$\langle r(\tau)^2 \rangle = \xi_T^2 \left[1 - \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_S}\right) + \frac{\tau}{\tau_L} \right]. \quad (1)$$

Equation (1) comes from the expression used in the cage formalism [20,21]: the mean square displacement saturates to a plateau value $\langle r^2 \rangle_{\text{plateau}} = \xi_T^2$ after a time τ_S . Here, we have just added the term τ/τ_L , with τ_L larger than τ_S , in order to account for the liquid state of the semidilute solution at long time. This point will be discussed in the following. Note that due to the nonzero viscosity inside the cage, the short-time dynamics is diffusive [10], $\langle r(\tau)^2 \rangle \propto \tau$, rather than ballistic, $\langle r(\tau)^2 \rangle \propto \tau^2$. A similar expression for $\langle r(\tau)^2 \rangle$ has been used successfully for the description of the dynamics of telechelic triblock copolymers in semidilute solution [22]. In the latter case the transient cross-links of the network are dense copolymer micelles that give the major contribution to the light scattered intensity. Actually, the role of the osmotic modulus for the relaxation of concentration fluctuations can be viewed as being quite similar to the action of a spring constant k_{el} . Then, the characteristic time is $\tau_S = f/k_{\text{el}}$, where $f = 6\pi\eta_0 R$ is the friction experienced by the particle and $k_{\text{el}} = kT/\xi_T^2$. One gets $\tau_S = \xi_T^2(6\pi\eta_0 R)/kT$, which leads to the short-time diffusion coefficient $D_S = \xi_T^2/\tau_S = kT/(6\pi\eta_0 R)$.

However, in our case the particle is larger than the cage and we propose in this paper a somewhat different mechanism. In general, the diffusion coefficient can be written as the ratio of an elastic energy to a friction. But for a given concentration fluctuation, what is the elastic energy and what is the friction? Let us consider the fluctuations of the particles and matrix concentration. At short-time, the driving force for relaxation of fluctuations is the matrix elastic modulus, i.e., in the liquid state the matrix osmotic modulus K_{matrix} . Then, the particles move in phase with the matrix and thus only experience the friction of the solvent. Therefore, we propose to write

$$D_S = \frac{\xi_T^3 K_{\text{matrix}}}{6\pi\eta_0 R} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R}. \quad (2)$$

Compared to the ‘‘cage mechanism,’’ the short-time diffusion coefficient is the same, but the characteristic time at which this mechanism begins to saturate is now shorter and corresponds to the relaxation time of the matrix osmotic modulus: $\tau_S = 6\pi\eta_0 \xi_T^3/kT$. At short time, the mean square displacement saturates at $\langle r^2 \rangle_{\text{plateau}} = D_S \tau_S = \xi_T^3/R$, thus Eq. (1) may be rewritten as

$$\langle r(\tau)^2 \rangle = \frac{\xi_T^3}{R} \left[1 - \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_S}\right) + \frac{\tau}{\tau_L} \right]. \quad (3)$$

The above ‘‘matrix relaxation mechanism’’ is faster than the ‘‘cage mechanism’’ and for this reason dominates the short-time behavior.

Very recently, Zanten and Rufener [9] have reported a study of brownian motion of latex particles in solution of entangled wormlike micelles. Their experimental results for the mean square displacement seems to be in very good agreement with our Eq. (3): short-time and long-time diffusive behaviors separated by a plateau region. This is a very nice textbook case because wormlike micelles are expected to display a pure exponential relaxation function at long-time [23]. The authors interpret their data in terms of diffusion in a Maxwell liquid, i.e., a liquid with a single relaxation time and a single viscosity. At short-time, the viscosity of a Maxwell liquid vanishes and the inertia of the particle cannot be neglected. Consequently, they expect a ballistic short-time behavior. However, the authors have experimentally shown that the short-time dynamics is slower and more compatible with that of a diffusion process. In our opinion, introducing the solvent local viscosity would solve this discrepancy. Except for this point, our approach is very similar to that of Zanten and Rufener. In particular Eq. (3) shows that the mean square displacement saturates at $\langle r^2 \rangle_{\text{plateau}} = \xi_T^3/R = kT/(RK_{\text{matrix}})$, which is identical to the result obtained from the ‘‘Maxwell liquid approach.’’

B. Long-time behavior in the liquid state

At times longer than τ_S the matrix has completely relaxed but not the particles, due to their longer characteristic time proportional to R^3 rather than ξ_T^3 . Now, the remaining relaxation is thus only driven by the osmotic modulus of latex particles: $K_{\text{latex}} = nkT$, where n is the number of particles per unit volume. In this time window, particles do not move in phase with the matrix and thus undergo the macroscopic viscosity η . The long-time diffusion coefficient D_L is

$$D_L = \frac{K_{\text{latex}}/n}{6\pi\eta R} = \frac{kT}{6\pi\eta R}. \quad (4)$$

For polymer chains in solution, gelation occurs when chains are susceptible to link with each other and thus to form polymer clusters. Let us denote the number of links as p and the size of the largest cluster as ξ_C . ξ_C is the correlation length of connectivity, meaning that the probability for

two chains to belong to the same cluster is negligible for distances higher than ξ_C . Gelation is a critical phenomenon of connectivity: at the gelation threshold p_c the correlation length ξ_C tends toward infinity and so does the macroscopic viscosity as well [11]. As one approaches the gelation threshold, it is expected that

$$\eta \propto \varepsilon^{-s}, \quad (5)$$

where $\varepsilon = |p - p_c|/p_c$ is the relative distance to the gelation threshold. Depending on the way hydrodynamic interactions are considered, different values are predicted for the exponent s . In presence of solvent (as opposed to bulk gelation), the most often reported [11] value is $s = 0.9 \pm 0.1$.

Gelatin is denatured collagen, a protein having a triple helix structure. Gelatin aggregation and gelation is due to the formation of helices between different polymer chains. It has been already shown [24] that the relevant quantity that accounts for the degree of connectivity is the helix amount χ , which varies linearly with the logarithm of time whatever the concentration and the temperature. Thus, for the interpretation of our results, the appropriate expression for the relative distance to the threshold is

$$\varepsilon = \frac{|\chi - \chi_c|}{\chi_c} \quad (6)$$

with $\chi = a + b \times \ln(t) + \dots$. For our purpose, which is to examine the gelation critical behavior, the exact expression for the time-dependent helix amount is not needed, but only its shape: $\chi \propto \ln(t)$ leading to $\varepsilon \propto \ln(t/t_c)$. However, in order to obtain quantitatively correct values for ε , the parameter a and b were estimated from Ref. [24]. In Fig. 7 (black symbols), the long-time diffusion coefficient D_L is plotted as a function of the relative distance to the gelation threshold. As expected with respect to Eqs. (4) and (5), a power law behavior is found over more than one decade in ε :

$$D_L \propto \varepsilon^s \quad \text{with} \quad s = 0.85 \pm 0.10. \quad (7)$$

The value of the exponent s is in very good agreement with the most often reported value deduced from rheological measurements.

Note that in order to account for the wide distribution of characteristic times, which is inherent to gelation and to the corresponding wide distribution of cluster sizes, the long-time tail of the correlation function is better described by a stretched exponential decay (see Sec. IV). Therefore Eq. (3) has to be replaced by an expression of the form: $\langle r^2 \rangle = (\xi_T^3/R)[1 - \exp(-\tau/\tau_S) + (\tau/\tau_L)^\beta]$. As the gelation threshold is approached, concomitantly with a decrease of D_L , we have observed a decrease of the exponent β from 1 to 0.3. Such a behavior has already been reported for quasielastic experiments on gelling systems (without probe particles) [18,19].

C. Short-time behavior in the gel state

At the gelation threshold, the appearance of a giant cluster is responsible for the emergence of a shear elastic modulus,

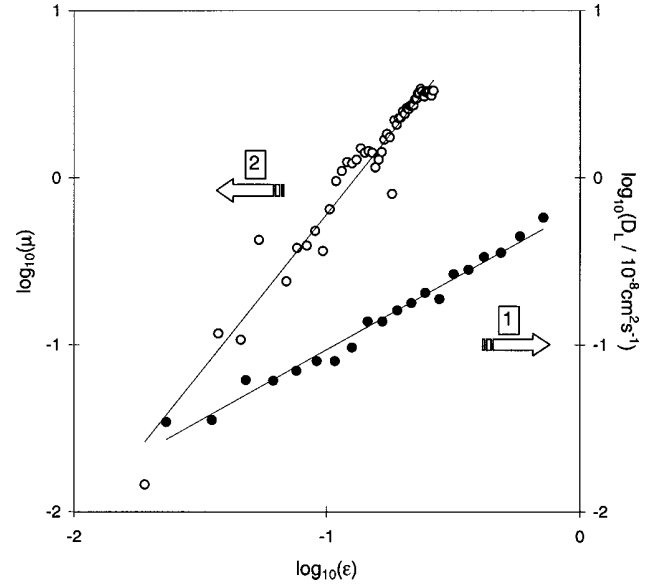


FIG. 7. Black symbols: logarithm of the long-time diffusion coefficient D_L of latex particles before the gel point vs logarithm of the relative distance to the gelation threshold, ε . The straight line is the best linear fit. The corresponding slope is found to be $s = 0.85 \pm 0.1$. Hollow symbols: logarithm of the shear elastic modulus deduced from the amplitude of fluctuations, $\mu = [\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2] / b \langle I \rangle^2 - 1$, measured after the gel point. The straight line is the best linear fit. The corresponding slope is found to be $t = 1.90 \pm 0.10$.

G_{matrix} . Actually, above the threshold this giant cluster is the gel phase that can be viewed as a polymer network of mesh size ξ_C . As for the macroscopic viscosity, gelation theories predict a power law behavior for the shear elastic modulus [11]

$$G_{\text{matrix}} \propto \varepsilon^t. \quad (8)$$

In the case of gelation in a solvent, the most often reported [11] value for the exponent t is $t = 1.9 \pm 0.1$.

Light scattering experiments (as well as other scattering techniques) are sensitive to the longitudinal modulus M of the sample that has a bulk (or compressibility) and a shear contribution. Neglecting density fluctuations and focusing only on concentration fluctuations, one can write [25]: $M = M_{\text{matrix}} = K_{\text{matrix}} + \frac{4}{3} G_{\text{matrix}}$. This longitudinal elastic modulus governs [26] the amplitude of the fluctuations. At $\tau = 0$ and $q = 0$, the dynamical structure factor $S(q, \tau)$ can be written as

$$S(0,0) = \frac{kT/\xi_T^3}{M_{\text{matrix}}}. \quad (9)$$

Since the short-time diffusion coefficient D_S is almost constant before the gelation threshold (see Fig. 6), it appears that the osmotic modulus K_{matrix} also does not significantly change [see Eq. (2)]. Let us assume that this is also the case above the gelation threshold. This is in agreement with the fact that gelation is a transition of connectivity (ξ_C diverges

as p tends toward p_c and not a thermodynamic transition (ξ_T is rather constant). Thus, $K_{\text{matrix}} = kT/\xi_T^3$ and Eq. (9) reduces to

$$S(0,0) = \frac{1}{1+\mu}$$

with $\mu = \frac{\frac{4}{3}G_{\text{matrix}}}{K_{\text{matrix}}} \propto G_{\text{matrix}}$. (10)

Let us neglect the possible problem due to nonergodicity (we will come back to this problem in the following). The autocorrelation of the scattered intensity is

$$\frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} = 1 + b[S(q, \tau)], \quad (11)$$

where b is a constant lying between 0 and 1 and linked to the number of coherence areas viewed by the photodetector (in our experiments $b=0.8$). Assuming that Eq. (10) remains valid up to $qR=1$, one gets at $\tau=0$:

$$\left[\frac{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2}{b\langle I \rangle^2} \right]^{1/2} = \frac{1}{1+\mu}. \quad (12)$$

Equation (12) means that the amplitude of fluctuations is constant in the liquid state ($\mu=0$) and decreases above the gelation threshold with the emergence of the shear elastic modulus. This is in agreement with our results. From the analysis of this decrease one can obtain the critical behavior of the modulus G_{matrix} . The ratio $\mu = G_{\text{matrix}}/K_{\text{matrix}}$ is deduced from Eq. [12] and from data shown in Fig. 6 (full symbols). In Fig. 7 (hollow symbols), μ is plotted as a function of the relative distance to the gelation threshold. As expected from Eq. (8), we observe a power law behavior over more than one decade in ε :

$$\mu \propto \varepsilon^t \quad \text{with } t = 1.90 \pm 0.10. \quad (13)$$

Here again, the value of the exponent t is in very good agreement with the most often reported value deduced from rheological measurements.

According to our interpretation of the short-time behavior before the gelation threshold [see Eq. (2)], we would expect that above the threshold, the elastic modulus involved in the short-time dynamics is $M_{\text{matrix}} = K_{\text{matrix}} + \frac{4}{3}G_{\text{matrix}}$:

$$D_s = \frac{\xi_T^3 \times M_{\text{matrix}}}{6\pi\eta_0 R} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R} \times (1+\mu) = D_0 \times (1+\mu), \quad (14)$$

where $D_0 = kT/(6\pi\eta_0 R)$ is the diffusion coefficient of latex particles in water at the same temperature. Therefore, above the gelation threshold, one expects a linear increase of the short-time diffusion coefficient D_s as μ increases, i.e., as the amplitude of fluctuations decreases. This is actually observed (see Fig. 6). In Fig. 8, the ratio D_s/D_0 is plotted as a function of μ . A linear behavior is found in agreement with Eq. (14). More specifically, extrapolation to $\mu=0$ (liquid state)

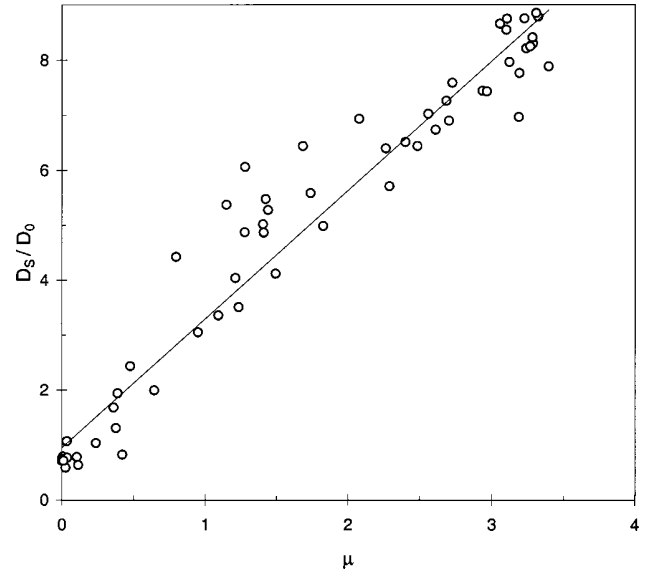


FIG. 8. Ratio of the short-time diffusion coefficient D_s of latex particles measured during gelation to the diffusion coefficient D_0 expected in water at 17 °C vs $\mu = [(\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2)/b\langle I \rangle^2]^{-1/2} - 1$. The straight line is the best linear fit corresponding to $D_s/D_0 = 0.95 + 2.34\mu$.

leads to a diffusion coefficient $D_s = (0.95 \pm 0.10) \times D_0$, in good agreement with our expectation that at short time the friction encountered by the particles is only due to the solvent, in the liquid state as well as in the gel state. The slope in Fig. 8 is higher than the value predicted in Eq. (14). This point is not understood for the moment.

D. Ergodicity or nonergodicity

Our interpretation for quasielastic light scattering on latex particles in gels is on the one hand very classical, because it comes directly from basic considerations on concentration fluctuations and longitudinal compressibility. On the other hand, this approach is different from the one commonly used for this problem. The main feature invoked for the interpretation of the dynamics in gels is the loss of ergodicity. Actually, in a gel, fluctuations are spatially frozen and the autocorrelation of the scattered intensity recorded by usual spectrometer is not an ensemble-averaged quantity. Different techniques are used to account for this problem and to extract the correct structure factor (time- and ensemble-averaged) from measurements [12,27]. As already mentioned, this approach consists in considering the scattered intensity as due to two contributions: a quasielastic part due to thermal fluctuations and an elastic part due to heterogeneities of the gel. Therefore, measurements mixes self-beating and heterodyne contributions [28]:

$$\frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} = 1 + b[y^2 S(q, \tau)^2 + 2y(1-y)S(q, \tau)], \quad (15)$$

where $y = \langle I \rangle_E / \langle I \rangle_T$ is the ratio of the ensemble-averaged to the time-averaged intensity. In the case of probe particles in

a gel contribution of which to the scattered intensity can be neglected, the particle population is split into two parts [13]: a first part corresponds to the fraction y of the total number of particles freely moving in the solution; a second part corresponds to the fraction $(1-y)$ of frozen particles. Let us focus on the short-time behavior predicted by this ‘‘particle population splitting model.’’ Denoting the initial decay rate of $S(q, \tau)$ as Γ , one has at short-time $S(q, \tau) = 1 - \Gamma\tau$ and $S(q, \tau)^2 = 1 - 2\Gamma\tau$. From Eq. (15), one gets

$$\frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle - \langle I \rangle^2}{b\langle I \rangle^2} = y(2-y) - 2y\Gamma\tau. \quad (16)$$

At $\tau=0$, the amplitude of the autocorrelation function decreases with decreasing fraction y of moving particles. This latter expression has to be compared to our approach. Their physical meanings are completely different: Eq. (12) directly links the amplitude of fluctuations to the shear elastic modulus, whereas Eq. (16) involves an increasing fraction of frozen particles as the gel becomes stronger.

Within the ‘‘particle population splitting model’’ the apparent diffusion coefficient is $D_{\text{app}} = \Gamma / [(2-y)q^2]$. This implies that at short time the dynamics is expected to be slowed down as the fluctuations become frozen. In the experiments reported here we have observed quite the opposite situation (see Fig. 6) and this suggests that experiments on gelatin solutions are not hindered by nonergodicity. Actually, this problem of ergodicity has to be considered with respect to the size of the scattering volume V compared to the one of heterogeneities in the sample. Typically, V is higher than $10^6 \mu\text{m}^3$. Such a volume can be considered as ‘‘macroscopic’’ with respect to the size of heterogeneity in gelatin gels. Therefore the distinction between ensemble-averaged and time-averaged scattered intensity is meaningless. Even though it could not be considered as ‘‘macroscopic,’’ problems would start as soon as the q dependence of the autocorrelation function is considered, because the scattering volume depends on the scattering angle.

VI. CONCLUSION

In this paper we have reported a quasielastic light scattering study of the dynamics of latex probe particles in a solution of gelatin undergoing gelation. We have shown that the long-time and short-time behaviors of the dynamical structure factor can be related to the macroscopic viscosity and to the elastic energy of the gelatin matrix, respectively. Before the gel point, the long-time tail of the dynamical structure factor shifts to even more long times as the macroscopic viscosity diverges. This result leads to the exponent for the dependence of the viscosity on the relative distance to the threshold: $s = 0.85 \pm 0.1$. Above the gel point, the amplitude of fluctuations decreases drastically. We interpreted this behavior as being due to the emergence of a shear elastic modulus. Thus, the exponent for the dependence of the shear elastic modulus on the relative distance to the threshold was determined: $t = 1.9 \pm 0.1$. To our knowledge, it is the first time that these two critical exponents for transport properties of gelling systems are obtained via quasielastic light scattering measurements. The values so determined are in very good agreement with those already obtained from rheological measurements on physical gels [11]. Moreover, our results are in good agreement with the earlier theoretical predictions based on the percolation model and on the electrical analogy [11] ($s = 0.75$ and $t = 1.9$). Very recently, more sophisticated theoretical approaches, allowing to study the different components of the stiffness tensor for percolating polymer networks, have been led to an exponent $t = 1.95$, again in very good agreement with our result [29].

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Auvray for providing us with the latex particles used for this work and P. Guenoun for viscosity measurements. We thank P. Calmettes for his attention to our first manuscript. Also, we would like to thank M. Djabourov for drawing our attention to the helix amount as the parameter for connectivity in gelatin solutions.

-
- [1] P.-G. de Gennes, *Scaling Concept in Polymer Physics* (Cornell University Press, Ithaca, NY, 1979).
 - [2] D. Langevin and F. Rondelez, *Polymer* **19**, 875 (1978).
 - [3] See for instance the recent paper of: M. Shibayama, Y. Isaka, and Y. Shiwa, *Macromolecules* **32**, 7086 (1999).
 - [4] W. Brown and R. Rymdén, *Macromolecules* **19**, 2942 (1986); **20**, 2867 (1987).
 - [5] X. Ye, P. Tong, and L. J. Fetters, *Macromolecules* **31**, 5785 (1998).
 - [6] C. N. Onyenemezu, D. Gold, M. Roman, and W. G. Miller, *Macromolecules* **26**, 3833 (1993).
 - [7] J. Won, C. Onyenemezu, W. G. Miller, and T. P. Lodge, *Macromolecules* **27**, 7389 (1994).
 - [8] Z. Bu and P. S. Russo, *Macromolecules* **27**, 1187 (1994).
 - [9] J. H. van Zanten and K. P. Rufener, *Phys. Rev. E* **62**, 5389 (2000).
 - [10] T. G. Mason, H. Gang, D. A. Weitz, *J. Mol. Struct.* **383**, 81 (1996).
 - [11] See for instance a review paper: D. Adam and D. Lairez, in *The Physical Properties of Polymeric Gels*, edited by J.-P. Cohen-Adad (Wiley, New York, 1996), p. 87–142.
 - [12] J. G. H. Joosten, E. T. F. Geladé, and P. N. Pusey, *Phys. Rev. A* **42**, 2161 (1990).
 - [13] B. Carnins and P. S. Russo, *Langmuir* **10**, 4053 (1994).
 - [14] M. Kroon, G. H. Wegdam, and R. Sprik, *Phys. Rev. E* **54**, 6541 (1996).
 - [15] M. Djabourov, Y. Grillon, and J. Leblond, *Polym. Gels Networks* **3**, 407 (1995).
 - [16] I. Pezron, M. Djabourov, and J. Leblond, *Polymer* **32**, 3201 (1991).
 - [17] J. Bastide and S. J. Candau, in *The Physical Properties of Polymeric Gels*, edited by J.-P. Cohen-Adad (Wiley, New York, 1996), p. 143–308.
 - [18] J. E. Martin and J. P. Wilcoxon, *Phys. Rev. Lett.* **61**, 373 (1988).

- [19] M. Adam, M. Delsanti, J.-P. Munch, and D. Durand, *Phys. Rev. Lett.* **61**, 706 (1988).
- [20] F. Sciortino, P. Gallo, P. Tartaglia, and S.-H. Chen, *Phys. Rev. E* **54**, 6331 (1996).
- [21] M. Doi and S. F. Edwards, in *The Theory of Polymer Dynamics* (Clarendon, Oxford, 1986).
- [22] E. Raspaud, D. Lairez, M. Adam, and J.-P. Carton, *Macromolecules* **29**, 1269 (1996).
- [23] M. E. Cates, *J. Phys. (France)* **49**, 1593 (1988).
- [24] M. Djabourov, J. Leblond, and P. Papon, *J. Phys. (France)* **49**, 333 (1988).
- [25] T. Tanaka, L. O. Hocker, and G. B. Benedek, *J. Chem. Phys.* **59**, 5151 (1973).
- [26] Y. Rabin and A. Onuki, *Macromolecules* **27**, 870 (1994).
- [27] J.-Z. Xue, D. J. Pine, S. T. Milner, X.-I. Wu, and P. M. Chaikin, *Phys. Rev. A* **46**, 6550 (1992).
- [28] B. Chu, *Laser Light Scattering*, 2nd ed. (Academic, New York, 1991).
- [29] O. Farago and Y. Kantor, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 2533 (2000); *Europhys. Lett.* **4**, 413 (2000).

Enzyme catalyzed proteolysis of a gel: evidence for an anomalous diffusion controlled mechanism*

G. C. Fadda and D. Lairez

Laboratoire Léon Brillouin, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

B. Arrio

Laboratoire de photophysique moléculaire, UPR 3361 CNRS, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

J.-P. Carton

Laboratoire de Physique de l'état condensé, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

V. Larreta-Garde

ERRMECE, Université de Cergy Pontoise, 2 Av. Adolphe Chauvin, BP 222, 95302 Cergy Pontoise cedex, France

(Dated: June 14, 2002)

Enzyme catalyzed proteolysis of gelatin gels has been studied. The dependence of the gel degradation velocity on enzyme concentration suggests a mechanism controlled by a slow and anomalous diffusion of enzymes in the gel. This point was confirmed by measurement of diffusion motion of enzymes in the gel by 2-photon fluorescence correlation spectroscopy. This result gives new insight on biological processes such as the action of metalloproteinases in the extracellular matrix involved in cellular invasion.

INTRODUCTION

In vivo proteins are often organized in a gel state, i.e. an elastic solid of macromolecules swollen by a large amount of solvent. On one side, protein gelation is involved in many biological processes such as blood coagulation or wound healing [1]. Conversely, the transition from a gel and solid state to a soluble and liquid state, is also of major importance mainly for the extracellular matrix (ECM) behavior. The ECM is a gel of various functional and structural macromolecules (mainly collagen which is a high molecular weight protein) with acute roles in physiology. ECM constitutes a physical barrier isolating organs and is an essential regulator of cell behaviors [2, 3]. In tumor dissemination, invasive cells must disorganize and solubilize the ECM gel [4]. This degradation involves up to 15 different proteolytic enzymes, especially metalloproteinases (MMP) the expression of which has been correlated with tumor invasiveness [5–7]. These proteinases differ by their specificities and reaction mechanisms; moreover, the ECM composition and organization are tissue-dependent. In spite of these peculiarities, in all cases cell invasion implies a similar process that requires the enzyme catalyzed degradation of the ECM gel. Beyond the precise biochemical processes involved at a molecular level, the understanding of the physical mechanisms involved in such degradation is crucial. From this point of view, the use of simplified model systems is an unavoidable stage within the present state of the art.

The extracellular matrix degradation in relation with cell invasion has been widely modeled and considered from a theoretical point of view [8, 9], but only very few studies have been devoted to enzyme kinetics in the corresponding heterogeneous and insoluble media [10, 11]. Experimentally, kinetics of enzyme catalyzed degradation of ECM gels has been reported only recently [12], but the corresponding physical mechanism of degradation remained still puzzling.

In this paper, we report an experimental study which makes a decisive step towards the understanding of this mechanism. Thermolysin catalyzed degradation of gelatin gels has been considered as a model system. Gelatin is denaturated collagen, the main ECM constituent. The gel network crosslinking is due to partial renaturation and triple helix formation [13]. Thermolysin is a Zn-metalloproteinase from *Bacillus thermoproteolyticus* which is an analogue of MMP and displays the same basis mechanism [14, 15], but without the need of other enzymes for activation and with a better stability. Enzyme concentrations in this study are in the range of 1nM, that is the order of magnitude of MMP concentration in ECM during cell invasion [10].

The experimental study here reported consists in two points: 1) enzyme concentration dependence of the gel degradation rate; 2) two-photon fluorescence correlation spectroscopy study of the thermally induced motion of the enzyme in the gel. We will see how these data suggest a degradation mechanism controlled by an anomalous diffusion of the enzyme in the gel.

*Submitted for publication in *Science*

MATERIAL AND METHODS

Sample preparation: Gelatin of type B from bovin skin was purchased from Sigma (G9382). Gelatin solution was prepared in 50 mM Tris-HCl buffer at pH=7.4 at 40°C. The solution was filtered on 0.45 μm Millipore filters. Gel points determinations were performed by quasi-elastic light scattering (Q.E.L.S.) on diluted large latex probe particles (450 nm diameter) [16]. For these experiments, polystyrene latex particles at a final volume fraction $\phi = 1.8 \cdot 10^{-6}$ were added to the gelatin solution at a final concentration of 1% w/w. Thermolysin (Protease X Bacillus Rokko, EC 3.4.24.27) was purchased from Sigma (Lot. 16H0855). Aliquots of 0.12 mg/ml stock solution in pH=7.4, 50 mM Tris-HCl buffer were used for Q.E.L.S. experiments and kept at T=-20°C. Thermolysin solution was added to the gelatin solution at 40°C (gelatin in a liquid state), stirred and cooled at 4°C for 1 hour in order to accelerate the gelation process. The gel was then warmed at 14°C in the experimental device for measurements.

Thermolysin labelling: Fluorescein isothiocyanate (FITC, isomer I) was purchased from Sigma. FITC reacts with primary amines of proteins to form a dye protein conjugate. FITC-thermolysin conjugate was prepared according to Molecular Probes protocol. The excess of FITC was removed from protein solution by gelfiltration on prepacked Sephadex G-25 column from Pharmacia. Final thermolysin concentration was calculated from absorbance measurements at 280 nm (A_{280}) and 494 nm (A_{494}) of the purified conjugate: $[\text{thermolysin}](M) = [A_{280} - (A_{494} \cdot 0.30)]/\epsilon$, where $\epsilon = 6.61 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ is the molar extinction coefficient of thermolysin at 280 nm and 0.30 is a correction factor accounting for the absorption of FITC at 280 nm. The degree of labelling L (number of FITC per protein molecule) was calculated following: $L = A_{494}/(6.8 \cdot 10^4 \cdot [\text{thermolysin}])$, where $6.8 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ is the molar extinction coefficient of FITC at 494 nm and pH=8. In our experiment $L = 2.7$.

Thermolysin stability: 100 nM thermolysin were stored at 10°C in gelatin solutions at 0.5% and 0.1%. Samples of these preparations were tested for proteolytic activity on a peptidic substrate, FA-Gly-Leu, (final concentration 1.6 mM) in a Tris 50 mM Maleate buffer pH=7.0 containing 10 mM CaCl_2 . The reaction was followed spectrophotometrically at 345 nm ($\epsilon_{345} = 660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2-photon fluorescence correlation spectroscopy: Routinely [17], two photon fluorescence excitation mode was performed with a Coherent Titanium:sapphire model 900 Mira laser head, modelocked and tunable from 710 to 920 nm. The Mira laser head was pumped by a 5 W solid state Coherent laser model Verdi providing a single frequency output: 532 nm. The excitation beam replaced the light source of an Axiovert 135 inverted microscope

from Zeiss, equipped with an immersion objective 63x, NA 1.4. A dichroic beam splitter separated the epifluorescent and excitation beams. Fluorescence was detected by an Hamamatsu model R7205-01 photomultiplier operating at 975 V. The fluorescence intensity autocorrelation function was calculated by a digital correlator model Flex2K-12x2 from Correlator.com.

RESULTS AND DISCUSSION

Gel degradation kinetics

Here we report data on the degradation of a protein gel under the action of proteinase. The gel is an aqueous solution of gelatin at a weight fraction of 1% that becomes solid (gel) at low temperature (see Material and Method). Under the action of proteinase some peptide bonds belonging to gelatin chain connecting two crosslinks of the gel network are hydrolyzed and the gel becomes liquid as a given fraction of such bonds are broken. In that sense, the gel undergoes a reverse sol-gel transition [18], however in this paper we are not concerned by the study of the critical behavior of the transition but only on the reverse-gel time.

This time was determined using an experimental method already reported [16]. It consists on Q.E.L.S. measurements on diluted large latex probe particles (450 nm diameter): in the gel state due to the shear elastic modulus, fluctuations of light scattered intensity are frozen and the amplitude of these fluctuations increases as the shear elastic modulus vanishes due to the action of proteinase. At the gel point in the liquid state, t_{gel} , one recovers the amplitude of fluctuation measured in water.

Results so obtained are reported in Fig.1. for different enzyme concentrations between 0.6 nM and 4 nm. The

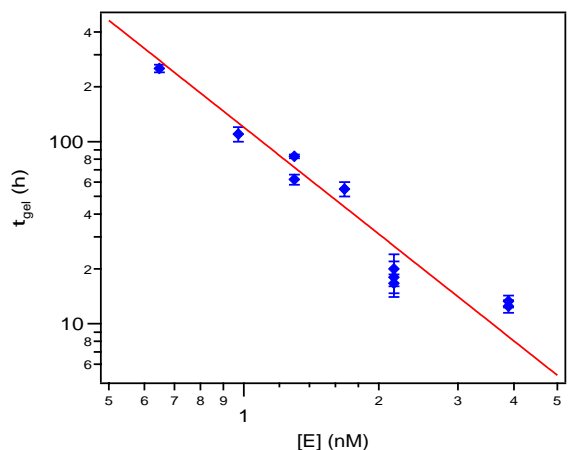


FIG. 1: Variation of the gel proteolysis time, t_{gel} , on enzyme concentration, $[E]$. The straight line has a slope in Log-Log equals to -1.95 ± 0.15 .

gel degradation kinetics is very slow at these proteinase concentrations: the gel time reaches 10 days at the lowest concentration. In view of these long times, the Q.E.L.S. method used for the determination of t_{gel} shows a number of advantages compared to usual rheological measurements: samples are in sealed measurement cells allowing temperature regulation and preventing contamination and solvent evaporation. As measurements are performed for very long time, the stability of the enzyme is questionable. Thermolysin is known to be a particularly stable enzyme [19]. However, in order to check this point specially in presence of gelatin, i.e. a substrate for the enzyme, thermolysin activity was measured at different time on two solutions at different gelatin concentrations. Results are reported in Table 1. It appears that the presence of gelatin reinforces the enzyme stability: at gelatin concentration of 0.5% the enzyme activity is constant within experimental accuracy. In addition, this result shows that at these low enzyme concentrations a decreasing proteinase activity of thermolysin due to autolysis is negligible. As a consequence, results plotted in Fig.1 has to be considered with respect to theoretical expectation for the enzyme catalyzed gel degradation mechanism.

TABLE I: Thermolysin proteolysis activity ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$).

t (h)	0	41	118
Gelatin 0.1%, [E]= 100 nM	10.4	10.4	5.7
Gelatin 0.5%, [E]= 100 nM	4.8	5.0	5.1

The enzyme kinetics of the gel degradation can first be considered in the framework of the classical Michaelis-Menten formalism. The velocity, V , of the enzyme-catalyzed reaction is $V = \frac{[S]}{K_m + [S]} V_{max}$, where $[S]$ is the substrate concentration, K_m the Michaelis constant and V_{max} the maximum velocity for saturated enzymes proportional to the enzyme concentration: $V_{max} \propto [E]$. Gelatin is characterized by the repetition of Gly-X-Y sequences [20] (where X and Y are variable aminoacids). Considering the specificity of thermolysin [21] and the average composition of skin gelatins [22], only 18% of total peptidic bonds can be recognized by the enzyme. For gelatin molecular mass of 10^5 g/mol corresponding to 1000 peptide bonds in average, the number of such recognition sites potentially breakable is thus of the order of 180 per gelatin chain. The gel is a network of crosslinks connected by gelatin chains. It has previously been shown [16] that at the concentration here studied, gelatin chains are at the overlap concentration. This means there is on the average one chain per crosslink for a fully connected gel. Actually, this number is always less than unity and is found to be always less than 0.5

at the gelation threshold, both for percolation simulations [23] and mean-field approach [24]. From the point of view of the reverse sol-gel transition efficiency, the hydrolysis of one peptide bond of this crosslinking chain is enough, however a lot of reaction sites remain on this broken chain as a substrate for the enzyme. Consequently, at the transition threshold between the gel and the liquid state, the substrate consumption never exceeds $0.5/180 \approx 3 \cdot 10^{-3}$ of the initial value $[S]_0$. The substrate consumption is thus negligible up to the gel point. The consequence is that the velocity, V , of the enzyme-catalyzed reaction can be considered as constant up to the time t_{gel} . In other words t_{gel} is proportional to $1/V$. Now the importance of the result reported in Fig.1 clearly appears. An ordinary Michaelis-Menten mechanism for the enzyme reaction would lead to $V \propto [E]$, whereas here $V \propto [E]^2$ is rather observed. Actually, experimental results for enzyme catalyzed gel degradation have already been reported [12]. In a range of enzyme concentration between 0.1 and $1 \mu\text{M}$, i.e. three orders of magnitude higher than the one in Fig.1, the authors report a linear dependence on $[E]$. However the data on Fig.1 clearly suggest a stronger dependence on $[E]$ for $[E] \rightarrow 0$. In order to explain the $[E]^2$ dependence of V here reported and in view of the very low enzyme concentration range of our study, a diffusion limited mechanism has to be considered.

In standard gelation models [18], crosslinks are expected to occur (or to break in our case of a reverse gelation) randomly with an equal probability anywhere in sample volume. In other words it is assumed that there is no correlation between one crosslink formation (or breaking) and another. For an enzyme catalyzed degradation of a gel, due to enzyme diffusion (with diffusion coefficient D), correlation will disappear after the time, $\tau_H = d^2/D$, needed for an enzyme concentration fluctuation to relax over the mean distance, d , between two enzymes. For reaction characteristic time shorter than τ_H , correlations cannot be ignored: one given enzyme creates a liquid pathway in the gel. In that sense, at low enzyme concentration, the gel degradation mechanism is diffusion rather than reaction limited. Note that this case is different from immobilized enzymes [25] for which the distance enzyme-substrate is responsible for a diffusion limited mechanism and anomalous kinetics.

What do we expect for a diffusion limited degradation of a gel? Above the time τ_H , the gel can be viewed as an homogeneous set of "blobs" of volume d^3 . Inside one of these blobs, everything happens as if one given enzyme reflects at the blob surface. Actually, the self diffusion of one enzyme is not limited to the distance d , but in average as an enzyme goes out a blob, another goes in. Consequently the gel point of the overall volume is statically the same as the one of a blob. Let us denote n_b the number of peptide bonds broken at time t and p the ratio $n_b/([S]d^3)$. For one enzyme randomly walking and

creating a liquid pathway in the blob, $n_b \propto Dt/a^2$, where a is the mean distance between two potentially breakable recognition sites ($[S] = 1/a^3$). Noting that by definition $[E] = 1/d^3$, one gets: $p \propto [S]^{-1/3}Dt[E]$. Assuming that the critical p value is a constant independent of the volume, at the gel point one gets:

$$t_{gel} \propto \frac{[S]^{1/3}}{D \times [E]} \quad (1)$$

For a simple diffusion process due to brownian motion, D being constant, we do not expect an anomalous dependence on enzyme concentration compared to a reaction limited mechanism (Michaelis-Menten). However in our case, the enzymes do not diffuse in a simple liquid but in a complex system which may strongly interact with them. A possible consequence of these interactions should be an anomalous subdiffusion process with a mean square displacement varying with time as $\langle r^2 \rangle \propto t^\beta$, with $\beta \leq 1$ ($\beta = 1$ corresponding to simple diffusion). The term “subdiffusion” refers to a decreasing apparent diffusion coefficient decreasing with time (or length scale) as $D = d\langle r^2 \rangle / dt \propto t^{\beta-1}$. Such behavior is quite usual in soft matter physics and a possible underlying mechanism will be discussed in the following. Using Eq.1 leads to:

$$t_{gel} \propto [E]^{-1/\beta} \quad (2)$$

which accounts for our result (see Fig. 1) for $\beta = 1/2$.

Enzyme diffusion measurements by 2-photon fluorescence correlation spectroscopy

In order to get direct evidence for anomalous diffusion of enzymes in the gel, fluorescence correlation spectroscopy (F.C.S.) measurements were performed. In our knowledge, this is the only technique for such measurements. On one hand enzymes are too small to allow Q.E.L.S. measurements, specially because the gel has a major contribution to the scattered light intensity. Working on labeled enzymes is a major advantage of fluorescence techniques. On the other hand, the technique of fluorescence recovery after photo bleaching (F.R.A.P.) works in a higher concentration range of fluorescent molecules. F.C.S. consists in computing the correlation function of the fluorescence intensity, I , of a small volume observed with a confocal or 2-photon microscope [26]. In the absence of chemical fluctuations, F.C.S. is directly sensitive to concentration fluctuations of fluorescent markers due to their translational motion. In practice, the measured signal is a convolution of correlation function of concentration fluctuations with the illuminated volume profile, leading to complex relaxation function.

In Fig.2, the normalized correlation function of fluorescence intensity is plotted for labeled 20 nm diameter

latex particles in pure water and in the gel here studied. In the case of water, one expects a relaxation curve

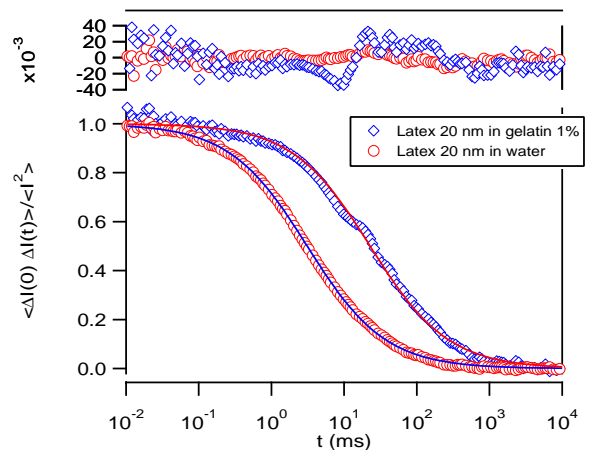


FIG. 2: Normalized fluorescence correlation function vs. time for 20 nm diameter latex beads in water (circles) and gel (diamonds). The lines correspond to best fits using Eq.3 with $\alpha = 0.81 \pm 0.02$ (fit residuals on the top of the graph). For measurement in water $\tau = (3.10 \pm 0.05)$ ms whereas $\tau = (23.0 \pm 0.5)$ ms in gelatin. In both cases, latex particles undergo a simple liquid viscosity and move by a diffusion mechanism.

only due to a simple diffusion process. In the whole time range, the correlation function is nicely fitted using a two parameters phenomenological expression of the form:

$$g(t) = \frac{\langle \Delta I(0) \cdot \Delta I(\tau) \rangle}{\langle I^2 \rangle} = \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{\tau}\right)^\alpha} \quad (3)$$

Note that this equation differs slightly from the exact expression obtained for gaussian profile of the illuminated volume [26] but is easier to handle. As for latex particles in the gel, the same relaxation profile is found but with a longer relaxation time. In particular, the amplitude of fluctuation is of the same order of magnitude in both cases (in Fig.2 the correlation function has been normalized in order to get rid of the dependence on total concentration). This result shows that 20 nm diameter beads are free to move in the gel and only experience a higher viscosity than in water. Actually, for this gel the correlation length of gelatin concentration fluctuations has been measured equal to (43 ± 4) nm [16]. This is the lowest value expected for the mesh size of a fully connected gelatin network at this concentration. As these latex particles are free to move in the gel, in the absence of specific interactions one expects *a fortiori* the same for thermolysin molecules which are ten times smaller.

In Fig.3, F.C.S. measurements are plotted for thermolysin in water, in 50% glycerol solution and in gelatin gel. If one accounts for a viscosity, η , twelve time higher than water, measurements in 50% glycerol superimpose to the those in water. In addition, data can be fit using Eq.3 with an imposed value of $\alpha = 0.81$ (determined

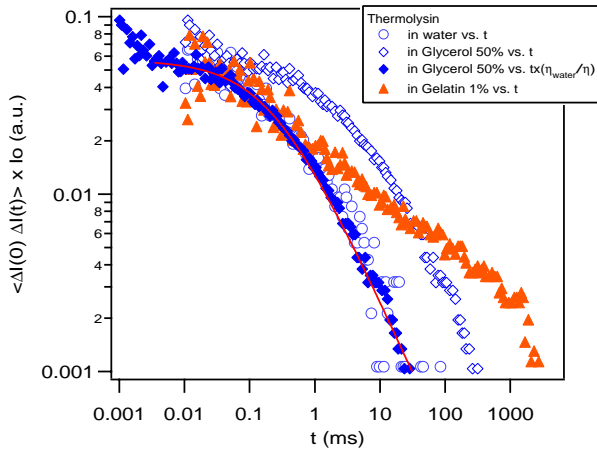


FIG. 3: Fluorescence correlation function for thermolysin in water (circles), in glycerol solution (diamonds) and in gelatin (triangles) at the beginning of the degradation process. Fluorescence correlation function is multiplied by the average fluorescence intensity, I_0 , in order to account for small variations of enzyme concentration. For full diamond symbols, i.e. glycerol solution, the time is multiplied by the ratio of the viscosity of water to the viscosity of the solution, η_{water}/η , in order to account for trivial viscosity effect. The full line corresponds to the best fit of these data using the same curve profile as for latex particles (Fig.2, Eq.3 with $\alpha = 0.81$) with an additional parameter for the amplitude ($a = 0.057 \pm 0.01$, $\tau = 0.22 \pm 0.01$).

on latex particles data because of a better statistics). Measurements in water and glycerol solution are thus consistent with a simple diffusion motion governed by Stokes-Einstein equation: $D = kT/(6\pi\eta R_H)$, where kT the thermal energy and R_H the hydrodynamic radius of enzyme. As opposed to these results, measurements performed in gelatin display a quite different shape for the relaxation function which decreases as a power law over five orders of magnitude in time. Translational motion of enzymes in the gel is clearly slowed down and anomalous compared to the behaviour in water. In order to further advance the data interpretation, let us assume that the correlation function is only a function of the reduced mean square displacement, $\langle (r/R)^2 \rangle$, of enzyme, with R a length characteristic of the apparatus. Eq.3 can be rewritten as $g(t) = \frac{1}{1 + \langle (r/R)^2 \rangle^\alpha}$. Taking advantage of the simple form for $g(t)$, one easily gets:

$$\left\langle \left[\frac{r}{R} \right]^2 \right\rangle = \left(\frac{1}{g(t)} - 1 \right)^{1/\alpha} \quad (4)$$

which leads to the time dependent mean square displacement from measurements. Results are plotted in Fig.4. Compared to the diffusion in water (solid line in Fig.4), in the gel diffusion is slowed down above 3 ms and the mean square displacement shows an anomalous time dependence: over three decades in time one observes

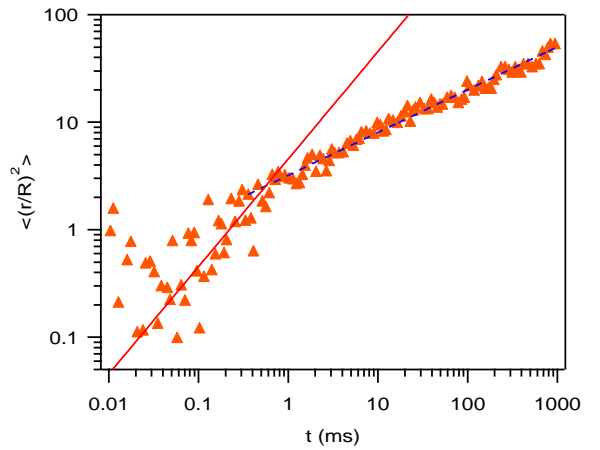


FIG. 4: Reduced mean square displacement of thermolysin in the gel deduced from Eq.4 and data reported in Fig.3. The full line corresponds to the expected simple diffusion in water $\langle (r/R)^2 \rangle = t/0.22$. The dotted line corresponds to the power law $\langle (r/R)^2 \rangle = (3.2 \pm 0.1) \times t^{0.40 \pm 0.01}$.

$\langle (r/R)^2 \rangle = (3.2 \pm 0.1) \times t^{0.40 \pm 0.01}$ (solid line in Fig.4). Apart from the exponent value that slightly differs, this is consistent with the results on gel degradation kinetics and their interpretation. From Eq.2 and paragraph above, one rather expects $\langle r^2 \rangle \propto t^{1/2}$.

What should be the origin of such subdiffusive dynamics of enzymes in the gel? As mentioned above, the mesh size of gelatin network at this concentration is so large compared to the size of enzymes that they are not embedded in the gel network. This is confirmed by measurements on latex particles: despite a larger size they are free to move in the gel. In the absence of adsorption on gelatin, the enzymes are thus expected to freely diffuse in the gel. Now, enzyme stability that is enhanced in presence of gelatin (see Table 1) gives evidence for such adsorption. In our opinion this is probably the main cause of the observed anomalous diffusion. It has been shown [27] that a mechanism of “hopping and trapping” for particles self-diffusion leads to such power law behavior. Let us consider an enzyme adsorbed on a gelatin chain as being in a potential well of depth ΔE . The enzyme residence time can be written as $\tau = \tau_0 e^{\Delta E/kT}$. An exponential distribution of the energy barriers such as $P(\Delta E) = \frac{1}{E_0} e^{-\Delta E/E_0}$, leads to a power distribution of residence times: $P(\tau) \propto \tau^{-(1+\beta)}$, with $\beta = kT/E_0$. The average τ value is time dependent $\langle \tau \rangle = \int_0^t \tau P(\tau) d\tau \propto t^{1-\beta}$. If the diffusion characteristic time of the enzyme between one adsorption site to another is short compared to $\langle \tau \rangle$: $\langle r^2 \rangle \propto t / \langle \tau \rangle \propto t^\beta$. Let us denote τ_m a long time cutoff of the residence time distribution, the above anomalous diffusion disappears at time longer than τ_m and $\langle r^2 \rangle_{t > \tau_m} \propto t$. This point can

explain the discrepancy between the β values deduced from Fig.1 and Fig.4.

CONCLUSION

The kinetics of enzyme catalyzed degradation of gelatin gel suggests both a diffusion limited mechanism (one given enzyme creates a liquid pathway in the gel) and an anomalous subdiffusive motion of the enzymes in the gel. This last point was clearly underscored by 2-photon fluorescence correlation spectroscopy measurements. In view of the small size of enzymes compared to the mesh size of the network this anomalous diffusion is ascribed to adsorption of enzymes on gelatin chains rather than gel structure and heterogeneities as it was already observed by computer simulations [28].

From the theoretical point of view of the critical behavior of the reverse sol-gel transition, our results presumably imply a different universality class from percolation, which usually accounts for most of the gelation processes [18]. Actually, another universality class has been already reported in case of strong correlations in the gel connectivity [29]. Further experiments in this direction are needed to elucidate this point.

Our result makes us wonder whether this anomalous diffusion of the enzyme in the gel depends on the enzymatic activity or not. Further experiments using inactivated enzyme would answer to this question.

The results here reported have to be taken into consideration in the framework of the extracellular matrix remodeling observed in metastasis dissemination. Tumor invasion implies the surexpression of proteinases [5, 7] which degrade the ECM. The unusual anomalous diffusion controlled mechanism of the gel degradation leads to a strong dependence of the apparent proteinase activity on enzyme concentration (the gel degradation velocity varies as $[E]^2$). In other words, a small variation of proteinase concentration has a stronger effect than expected. *In vivo* this would imply an amplification of the effects of proteinase surexpression.

Acknowledgements: We thank C. François for FCS prototype production, all the electronics staff and particularly M. R. Daniel. The authors are also indebted to D. Furio and O. Benoist d'Azy for computer assistance.

- [2] C. B. Basbaum, Z. Werb, *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 731 (1996).
- [3] R. K. Assoian, *J. Cell Biol.* **136**, 1 (1997).
- [4] M. J. Bissell, D. Radisky, *Nature Rev. Cancer* **1**, 46 (2001).
- [5] G. Murphy, J. Gavrilovic, *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 614 (1999).
- [6] Y. A. DeClerck, *Eur. J. Cancer* **36**, 1258 (2000).
- [7] L. J. McCawley, L. M. Matrisian, *Mol. Med. Tod.* **6**, 149 (2000).
- [8] J. C. Dallon, J. A. Sherratt, P. K. Maini, *J. Theor. Biol.* **199**, 449 (1999).
- [9] A. J. Perumpanani, H. M. Byrne, *Eur. J. Cancer* **35**, 1274 (1999).
- [10] H. Berry, V. Larreta-Garde, *Biophys. J.* **77**, 655 (1999).
- [11] V. Larreta-Garde, H. Berry, *J. Theor. Biol.* **251**, 1 (2000).
- [12] H. Berry, J. Pelta, D. Lairez, V. Larreta-Garde, *Biochem. Biophys. Arch.* **1524**, 110 (2000).
- [13] M. Djabourov, *et al.*, *J. Phys. II France* **3**, 611 (1993).
- [14] M. F. Browner, W. W. Smith, A. L. Castelhamo, *Biochemistry* **34**, 6602 (1995).
- [15] F. Grams, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **228**, 830 (1995).
- [16] G. C. Fadda, D. Lairez, J. Pelta, *Phys. Rev. E* **63** (2001).
- [17] E. Guiot, *et al.*, *J. Fluoresc.* **10**, 413 (2000).
- [18] M. Adam, D. Lairez, *Physical properties of polymeric gels: Sol-Gel transition* (John Wiley & Sons, 1996), pp. 87–142.
- [19] T. Imanaka, M. Shibazaki, M. Takagi, *Nature* **324**, 695 (1986).
- [20] T. E. Creighton, *Proteins* (W. H. Freeman and Cie, 1997).
- [21] H. Matsubara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**, 427 (1966).
- [22] J. E. Eastoe, A. A. Leach, *The science and Technogy of Gelatin* (Academic press, 1977).
- [23] J.-P. Clerc, *et al.*, *Annales de physique* (Masson, 1983), vol. 8.
- [24] P. Flory, *Principles of polymer chemistry* (Cornell university press, 1953).
- [25] L. Goldstein, *Kinetic behavior of immobilized enzyme systems* (Academic press, 1976), vol. 44, chap. 29, pp. 397–443.
- [26] O. Krichevsky, G. Bonnet, *Rep. Prog. Phys.* **65**, 251 (2002).
- [27] J.-P. Bouchaud, *J. Phys. I France* **2**, 1705 (1992).
- [28] P. A. Netz, T. Dorfmueller, *J. Chem. Phys.* **103**, 9074 (1995).
- [29] H. J. Herrmann, D. P. Landau, D. Stauffer, *Phys. Rev. Lett.* **49**, 412 (1982).

[1] B. Furie, B. C. Furie, *Cell* **53**, 505 (1988).

6. Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail de thèse nous avons développé un outil expérimental permettant de sonder les propriétés microrhéologiques de gels de polymères. Cet outil permet de caractériser le comportement critique des grandeurs physiques telles que la viscosité et le module élastique près du seuil de gélification. Son principe consiste en l'étude, par diffusion quasi-élastique de la lumière, de la diffusion de grosses particules sondes dans la solution en cours de gélification. Nous avons montré que, lorsque les quatre conditions suivantes sont réunies :

1. $qR \sim 1$, où q est le vecteur de diffusion et R est la taille des billes
2. $R \gg \xi_T$, où ξ_T est la longueur de corrélation des fluctuations du gel
3. l'intensité diffusée par le gel est négligeable par rapport à l'intensité diffusée par les billes de latex
4. le polymère n'est pas absorbé sur les particules sondes

les inhomogénéités dans le gel et son caractère non ergodique peuvent être négligés. Ce point a été discuté en détail dans la partie centrale du chapitre 2.

Nous avons ensuite appliqué cet outil à l'étude de la gélification d'une solution de gélatine en cours de gélification avec, comme particules sondes, des billes de latex de $0.5\mu\text{m}$ de diamètre. Nous avons étudié le comportement critique de la viscosité et du module élastique de ce système, et nous avons trouvé les valeurs suivantes pour les coefficients critiques de la viscosité (s) et du module élastique (f) :

- $s = 0.85 \pm 0.1$
- $f = 1.9 \pm 0.1$

Ces valeurs sont en très bon accord avec les résultats obtenus par rhéologie sur le même système et sont cohérentes entre eux dans le cadre de la théorie des transitions critiques.

Nous avons alors appliqué cette technique à l'étude de la dégradation enzymatique (chapitre 3). Cette étude, réalisée en fonction de la concentration en enzyme, a permis d'obtenir une relation entre le temps de dégradation t_{gel} et la concentration en substrat

- $t_{gel} \propto [E]^2$

qui suggère un mécanisme de cinétique enzymatique limité par la diffusion. Cette relation a été confirmée par des mesures de spectroscopie de corrélation de fluorescence.

Ce résultat est important si il est replacé dans le contexte de la réorganisation de la matrice extracellulaire qui a lieu, par exemple, lors de la dissémination des métastases : la dissémination tumorale étant accompagnée par une surexpression de protéinases, une petite variation de la concentration en protéinase pourrait avoir un effet important sur la dégradation de la matrice extracellulaire.

D'un point de vue purement physique, nous avons trouvé, dans ce système, une valeur pour l'exposant critique du module élastique (figure 3.4) :

$$f = 1.10 \pm 0.03$$

Aucune des théories existante pour la gélification (cf. tableau 2.1) ne peut expliquer ce résultat qui, s'il est confirmé, nécessitera l'introduction d'une nouvelle classe d'universalité.

L'outil expérimental que nous avons développé et validé sur la gélatine peut s'appliquer à d'autres systèmes dans des domaines variés :

1. D'un point de vue biologique il pourrait être appliqué à l'étude de la dégradation enzymatique sur des extraits de la matrice extracellulaire.
2. Le greffage sur les billes de latex des récepteurs des intégrines à la fibronectine permettrait d'appliquer la technique à l'étude de l'adhérence cellulaire.
3. D'un point de vue situé plutôt à l'interface entre biologie et physique il permettrait l'étude de la transition sol-gel de la gélatine due à l'action d'un enzyme.

Enfin, dans le cadre de l'étude des phénomènes critiques, il pourrait être appliqué à des systèmes proches afin d'étudier une éventuelle nouvelle classe de systèmes critiques.

A. Annexe 1

A.1. Diffusion de particules

Considérons un système unidimensionnel constitué de N particules en solution. Si $c(x, t)$ est la concentration de particules présentes en x à l'instant du temps t , le processus de diffusion est décrit phénoménologiquement par la loi de Fick :

$$j(x, t) = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (\text{A.1})$$

où $j(x, t)$ est le flux et D est le coefficient de diffusion des particules. Le flux est dû aux fluctuations de la vitesse des particules, et la vitesse moyenne des particules est nulle. L'équation de continuité pour ce système est :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{\partial j}{\partial x} \quad (\text{A.2})$$

ce qui donne l'équation de diffusion à D constant :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (\text{A.3})$$

Si un potentiel externe $U(x)$ agit sur ce système, la vitesse moyenne des particules n'est plus nulle mais devient :

$$v = -\frac{1}{\zeta} \frac{\partial U}{\partial x}$$

où ζ est la friction subie par les particules ; dans le cas des particules de rayon R dans un solvant de viscosité η_s , $\zeta = 6\pi\eta_s R$. À l'équilibre thermodynamique le flux est nul et la concentration $c(x, t)$ suit une distribution de Boltzmann $c_{eq} \propto e^{-U(x)/k_B T}$. On a la relation suivante :

$$j = 0 = -D \frac{\partial c_{eq}(x)}{\partial x} - \frac{1}{\zeta} c_{eq}(x) \frac{\partial U}{\partial x}$$

qui donne la relation d'Einstein

$$D = \frac{k_B T}{\zeta} \quad (\text{A.4})$$

L'équation d'Einstein est un cas particulier du Théorème de fluctuations et dissipation qui relie les fluctuations thermiques à la réponse du système pour un champ externe appliqué sur le système même. On substituant l'expression trouvée pour D dans l'équation du flux, on obtient l'équation de Smoluchowski :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \frac{1}{\zeta} \left(k_B T \frac{\partial c}{\partial x} + c \frac{\partial U}{\partial x} \right) \quad (\text{A.5})$$

Une description alternative du mouvement Brownien est représenté par l'équation de Langevin :

$$\zeta \frac{dx}{dt} = -\frac{\partial U}{\partial x} + f(t) \quad (\text{A.6})$$

où $f(t)$ est une force aléatoire qui représente la somme des forces dues aux collisions entre les particules du solvant et les particules Browniennes. Ne pouvant pas connaître explicitement la dépendance temporelle de $f(t)$, on considère pour $f(t)$ une variable aléatoire avec une fonction de distribution $\Psi(f(t))$. Dans le cas d'une distribution gaussienne, $f(t)$ a les propriétés suivantes :

$$\begin{aligned} \langle f(t) \rangle &= 0 \\ \langle f(t)f(t') \rangle &= 2\zeta k_B T \delta(t - t') \end{aligned}$$

Dans le cas d'une particule libre en mouvement brownien ($U = 0$), si la particule est à la position x à l'instant de temps $t = 0$, sa position x' au temps t est :

$$x(t) = x' + \frac{1}{\zeta} \int_0^t dt' f(t') \quad (\text{A.7})$$

et donc :

$$\begin{aligned} \langle x(t) \rangle &= x' \\ \langle (x(t) - \langle x(t) \rangle)^2 \rangle &= \frac{2k_B T}{\zeta} t \end{aligned} \quad (\text{A.8})$$

A.1.1. Mouvement brownien dans un potentiel harmonique

Considérons, pour simplifier, le cas d'une particule qui bouge sous l'effet de l'agitation thermique dans un potentiel harmonique unidimensionnel $U = \frac{1}{2}kx^2$. L'équation de Langevin s'écrit :

$$\zeta \frac{dx}{dt} = -kx + f(t) \quad (\text{A.9})$$

et donc :

$$x(t) = \frac{1}{\zeta} \int_{-\infty}^t dt' e^{-\frac{(t-t')}{\tau}} f(t') \quad (\text{A.10})$$

$x(t)$ est une combinaison linéaire de $f(t)$ et donc suit aussi une distribution gaussienne. On trouve, alors :

$$\begin{aligned}\langle x(t) \rangle &= x' e^{-\frac{t}{\tau}} \\ \langle (x(t) - \langle x(t) \rangle)^2 \rangle &= \frac{2k_B T}{k} \left[1 - e^{-\frac{2t}{\tau}} \right]\end{aligned}\tag{A.11}$$

où $\tau = \frac{\zeta}{k}$.

B. Annexe 2 : Méthode d'analyse des données

B.1. Développement en cumulants

Une des méthodes les plus utilisées pour l'analyse des données de diffusion quasi élastique de la lumière, est l'analyse par développement en cumulants. Pour un système dont la fonction de corrélation est composée par plusieurs modes de relaxation Γ_i ou, de façon plus général, lorsque les modes de relaxation suivent une distribution $G(\Gamma)$, dont on ne connaît pas la forme *a priori*, il est en général possible de développer en serie de Taylor :

$$\ln |g^{(1)}(\tau)| = \sum_n K_n \frac{(-\tau)^n}{n!} \quad (\text{B.1})$$

où

$$K_1 = - \left(\frac{\partial \ln |g^{(1)}(\tau)|}{\partial \tau} \right)_{\tau=0} = \langle \Gamma \rangle \quad (\text{B.2})$$

$$K_2 = - \left(\frac{\partial^2 \ln |g^{(1)}(\tau)|}{\partial \tau^2} \right)_{\tau=0} = \langle \Gamma^2 \rangle - \langle \Gamma \rangle^2 \quad (\text{B.3})$$

$$K_3 = - \left(\frac{\partial^3 \ln |g^{(1)}(\tau)|}{\partial \tau^3} \right)_{\tau=0} = \langle \Gamma^3 \rangle - 3\langle \Gamma^2 \rangle \langle \Gamma \rangle + 2\langle \Gamma \rangle^3 \quad (\text{B.4})$$

sont les trois premiers moments de la fonction de distribution. Le développement en cumulants n'est valide que pour τ petit et pour une fonction de distribution $G(\Gamma)$ étroite.

Le premier cumulant donne le temps de relaxation moyen. Pour un système idéal de particules sans interactions, la fonction de corrélation a une forme exponentielle et $\langle \Gamma \rangle = D_s q^2$. Pour un système constitué de particules en interaction, ou pour des particules polydisperses, $\langle \Gamma \rangle = D_{eff} q^2$, où D_{eff} est un coefficient de diffusion effectif qui gouverne la relaxation initiale du facteur de structure.

Les cumulants d'ordre supérieur au premier caractérisent la déviation de la fonction de corrélation par rapport à une fonction exponentielle simple [77]-[78].

Nous avons analysé les données concernant la dégradation de gel de gélatine ainsi

que les cinétiques de gélification à 18, 19, 20, 21°C avec la méthode des cumulants. Cette méthode étant valable seulement pour τ petit, nous avons considéré uniquement la partie initiale de la fonction de corrélation pour l'analyse. Toutefois les résultats dépendaient fortement du nombre des points pris. Nous avons alors procédé de la façon suivante : nous avons effectué une analyse de la partie initiale de la fonction de corrélation $g^{(2)}(\tau)$ avec la méthode des cumulants en variant à chaque fois le nombre de points. Nous avons ainsi déterminé le coefficient de diffusion à temps court D_s , l'amplitude de la fonction de corrélation et le χ^2 correspondant. Nous avons tracé le χ^2 en fonction de nombre de points et nous avons ainsi déterminé lequel des points correspondait au minimum de χ^2 et donc les valeurs de D_s et de l'amplitude de la fonction de corrélation de l'intensité diffusée correspondant au minimum du χ^2 .

Bibliographie

- [1] H. Berry, J. Pelta, D. Lairez, V. Larreta-Garde, *Biochemical and Biophysical Archives* 110 (2000), 1524.
- [2] B.J. Berne and R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*, John Wiley and Sons, New York, 1975.
- [3] J.-P. Hansen et I.R. McDonald, *Theory of Simple Liquids*, Academic Press, 2000.
- [4] C. Kittel and references therein, *Elementary Statistical Physics*, John Wiley and Sons, New York, 1958.
- [5] P.N. Pusey, *Photon Correlation Spectroscopy and Velocimetry*, p. 45, Cummins and Pike Ed., Plenum Press, 1976.
- [6] B. Chu, *Laser Light Scattering*, Academic Press, san Diego, 1991.
- [7] G. Strobl, *The Physics of Polymers : Concepts for Understanding Their Structures and Behavior*, Springer, 1997.
- [8] P.N. Pusey and W. Van Megen, *Phys.A* 157 (1989), 705.
- [9] J.-Z. Xue et al., *Phys.Rev.A* 46 (1992), 6550.
- [10] T. Tanaka et al., *The Journal of Chem.Phys.* 59 (1973), 5151.
- [11] E. Geissler, *Dynamic light scattering*, p.471, Brown W. Ed., Oxford University Press; New York, 1993.
- [12] A.B. Rodd, D.E. Dunstan, D.V. Boger, J. Schmidt, W. Burchard, *Macromolecules* 34 (2001), 3339.
- [13] J.G.H. Joosten, J.L. McCarthy, P.N. Pusey, *Macromolecules* 24 (1991), 6690.
- [14] M. Shibayama, S. Takata, T. Norisuye *Physica A* 249 (1998), 245.
- [15] Y. Suzuki et al., *J.Chem.Phys.* 97 (1992), 3808.
- [16] S. Candau et al., *Advances in Polymer Science*, 44 (1982), 27.
- [17] J.G.H. Joosten, E.T.F. Geladé, P.N. Pusey, *Physical Review A* 42 (1990), 2161.
- [18] I. Nishio, J.C. Reina, R. Bansil, *Physical Review Letters* 59 (1987), 684.
- [19] J.C. Reina, R. Bansil, Č. Koňák, *Polymer* 31 (1989), 103.
- [20] J.C. Reina, R. Bansil, Č. Koňák, *Polymer* 31 (1990), 1038.

- [21] S. Pajevič, R. Bansil, Č. Koňák, *Macromolecules* 26 (1993), 305.
- [22] C.S. Kuo, R. Bansil, Č. Koňák, *Macromolecules* 28 (1995), 768.
- [23] S. Pajevič, R. Bansil, Č. Koňák, *Macromolecules* 28 (1995), 7536.
- [24] T. Norisuye, M. Takeda, M. Shibayama, *Macromolecules* 31 (1998), 5316.
- [25] M. Shibayama, Y. Isaka, Y. Shiwa, *Macromolecules* 32 (1999), 7086.
- [26] B. Camins, P.S. Russo, *Langmuir* 10 (1994), 4053.
- [27] H.B. Bohidar, S. Ghosh, *European Polymer Journal* 36 (2000), 2545.
- [28] G. Nisato, P. Hébraud, J.-P. Munch, S.J. Candau, *Physical Review E* 61 (2000), 2879.
- [29] W. Brown, R. Rymden, *Macromolecules* 19 (1986), 2942.
- [30] Y. Suzuki, I. Nishio, *Physical Review B* 45 (1992), 4614.
- [31] P.A. Hassan, C. Manohar, *Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998), 7120.
- [32] G.D. Phillis, G.S. Ullmann, K. Ullmann, *Journal of Chemical Physics* 82 (1995), 5242.
- [33] T.G. Mason, D.A. Weitz, *Physical Review Letters* 74 (1995), 1250.
- [34] T.G. Mason, H. Gang, D.A. Weitz, *Journal of Molecular Structure* 383 (1996); 81.
- [35] T.G. Mason, K. Ganesan, J.H. Van Zanten, D. Wirtz, S.C. Kuo, *Physical Review Letters* 79 (1997), 3282.
- [36] I. Pezron, Thèse de doctorat, “Caractérisation Structurale des solutions et des gels de Gélatine” (1988).
- [37] L. Stryer, “La Biochimie”, Ed. Flammarion Medecine-Science, Paris (1992).
- [38] P.G. De Gennes, *Journal of Physical Letters* 37 (1976), L-1.
- [39] A. Coniglio, H.E. Stanley, *Physical Review Letters* 52 (1984), 1068.
- [40] J.E. Martin, D. Adolf, J.P. Wilcoxon, *Physical Review A* (1989), 1325.
- [41] M. Daoud, *Macromolecules* 33 (2000), 3019.
- [42] O. Farago, Y. Kantor, *Europhysics Letters* 57 (2002), 458.
- [43] E. Del Gado, L. De Arcangelis, A. Coniglio, *Physical Review E* 65 (2002), 041803.
- [44] M. Adam, D. Lairez, “Physical properties of polymeric gels : sol-Gel transition” (1996), John Wiley and sons, 87.
- [45] M. Djabourov, J. Leblond, P. Papon, *Journal de Physique (France)* 49 (1988), 333.
- [46] P.-G. de Gennes, “Scaling Concepts in Polymer Physics” (1996), Cornell University Press.
- [47] M. Tokita, K. Hikichi, *Physical Review A* 35 (1987), 4329.

- [48] M. Tokita, R. Niki, K. Hikichi, *Journal of Chemical Physics* 83 (1985), 2583.
- [49] M. Plischke, B. Joos, *Physical Review Letters* 80 (1998), 4907.
- [50] M. Plischke, D.C. Vernon, B. Joos, Z. Zhou, *Physical Review E* 60 (1999), 3129.
- [51] O. Farago, Y. Kantor, *Europhysics Letters* 52 (2000), 413.
- [52] J.E. Martin, D. Adolf, J.P. Wilcoxon, *Physical Review Letters* 61 (1988), 2620.
- [53] D. Durand, M. Delsanti, M. Adam, *Europhysics Letters* 3 (1987), 297.
- [54] M. Djabourov, J. Leblond, P. Papon, *Journal de Physique (France)* 49 (1988), 319.
- [55] I. Pezron, M. Djabourov, J. Leblond, *Polymer* 32 (1991), 3201.
- [56] M. Djabourov, Y. Grillon, J. Leblond, *Polymer Gels Networks* 3 (1995), 407.
- [57] F. Sciortino, P. Gallo, P. Tartaglia, S.-H. Chen, *Physical Review E* 54 (1996), 6331.
- [58] J.E. Martin, J.P. Wilcoxon, *Physical Review Letters* 61 (1988), 373.
- [59] M. Adam, M. Delsanti, J.-P. Munch, D. Durand, *Physical Review Letters* 61 (1988), 706.
- [60] D. Stauffer, A. Coniglio, M. Adam, *Advances in Polymer Science* 44 (1982), 103.
- [61] *Handbook of biochemistry and molecular biology : Proteins, Volume III*, G.D. Fasman Editor (1976)
- [62] E. Pauthe, Thèse de doctorat, “Approches cinétiques et moléculaires de la reconnaissance enzyme-substrat : application à l’étude de l’activité protéolytique de la thermolysine” (1998).
- [63] T. E. Creighton, “Proteins : Structures and Molecular Properties”, W. H. Freeman and Company, New York (1993).
- [64] J. Eastoe, A. Leach, “The Science and Technology of Gelatin”, Academic Press.
- [65] J.-P. Clerc et al., *Annales de Physique (Masson)*, 1983, vol.8.
- [66] P. Flory, *Principles of Polymer Chemistry* (1953), Cornell University Press.
- [67] O. Krichevsky, G. Bonnet, “Fluorescence Correlation Spectroscopy : the technique and its application”, *Report on Progress in Physics* 65 (2002), 251.
- [68] A. Ott, J.P. Bouchaud, D. Langevin, W. Urbach, *Physical Review Letters* 65 (1990), 2201.
- [69] H. Pfister, H. Scher, *Advances on Physics* 27 (1978), 747.
- [70] J. Bernasconi, W.R. Schneider, S. Strassler, S. Alexander, *Physical Review Letters* 41 (1979), 185.

- [71] A. Cardoso, P. Tabeling, *Europhysics Letters* 7 (1988), 225.
- [72] Y. Pomeau, A. Pumir, W.R. Young, *Physics of fluids A* 1 (1989), 462.
- [73] J.P. Bouchaud, *Journal de Physique I, France* 65 (1992), 1705.
- [74] M. Riès-Kautt, A. Ducruix, *Journal of Biological Chemistry* 264 (1989), 745.
- [75] M. Muschol, F. Rosenberger, *Journal of Chemical Physics* 103 (1997).
- [76] M. Doi, S.F. Edwards, "The Theory of Polymer Dynamics", Oxford University Press (1986).
- [77] M. Mandel in "Dynamic Light Scattering. The Method and Some Applications" , Wyn Brown Ed., Clarendon Press, Oxford (1993).
- [78] P.N. Pusey and R.J.A. Tough in "Dynamic Light Scattering. Applications of Photon Correlation Spectroscopy", Edited by R. Pecora, Plenum Press, New York (1985).