

Thèse de Doctorat

Jean-Marc SCHWARTZ

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Discipline : Sciences agroalimentaires

Spécialité : Physico-chimie des polymères

Unité de recherche : UR 1268 INRA : Biopolymères, Interactions, Assemblages

Rue de la Géraudière, 44300 Nantes

Soutenue le 14 octobre 2015

Criblage d'assemblages à base de protéines végétales et animales : influence des conditions physico-chimiques

JURY

Président :	M. Joël FLEURENCE , Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs :	M. Saïd BOUHALLAB , Directeur de recherche, INRA-Agrocampus Ouest M. Thierry CHARDOT , Directeur de recherche, INRA-AgroParisTech
Examineurs :	M. Romain KAPEL , Maître de conférences, Université de Lorraine M. Rémi SAUREL , Professeur, AgroSup Dijon-Université de Bourgogne
Directeur de Thèse :	M. Marc ANTON , Directeur de recherche, INRA Nantes
Co-encadrants :	Mme Marie-Hélène ROPERS , Chargée de recherche, INRA Nantes M. Alain RIAUBLANC , Chargé de recherche, INRA Nantes

Remerciements

Il y a de nombreux moments possibles pour écrire ses remerciements de thèse mais j'étais déjà tellement en retard que je commence à les écrire juste avant d'envoyer mon manuscrit à la presse. C'est donc en point final et avec émotion que je m'apprête à remercier toutes les personnes ayant contribué de près, de loin, ou pas du tout à mon travail et avec qui j'ai partagé des moments durant ces années de thèse, un longue aventure qui, je l'espère, m'aura apprise de nombreuses choses. Je les remercie pour l'aide, les conseils, le soutien qu'elles m'ont apportés.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et pour leurs questions et conseils pendant et après ce moment, pas toujours facile, qu'est la soutenance. Merci à M. Saïd Bouhallab et M. Thierry Chardot rapporteurs pour le temps qu'ils ont passé à la lecture ce manuscrit. Merci à M. Romain Kapel et M. Rémi Saurel, examinateurs et à M. Joël Fleurence pour avoir présidé ce jury.

Je remercie également M. Jacques Guéguen et M. Marc Anton, directeurs successifs de l'unité Biopolymères Interactions assemblages de m'avoir accueilli au sein de l'INRA. Merci également à M. Jacques Guéguen pour ses conseils scientifiques, ses discussions et son suivi jusqu'à la soutenance et même après.

J'adresse mes remerciements les plus sincères et chaleureux à mes encadrants à qui je n'ai pas toujours rendu la vie facile. A Marc Anton, mon directeur de thèse, merci de m'avoir donné cette opportunité et d'avoir trouvé des moments, malgré un planning très chargé, pour me conseiller et m'encourager tout au long de ma thèse.

Merci à Alain Riaublanc, co-encadrant. Merci pour ton aide précieuse, particulièrement lors des longues fouilles dans nos données de criblage, pour tes réponses quand j'en avais besoin malgré que tu sois sollicité de toutes parts et pour ta gentillesse.

Merci à Marie-Hélène Ropers, co-encadrante. Merci pour tous les efforts que tu as fait pour moi, pour tes conseils, tes discussions. Je n'écrirai pas un pavé entier ici, la thèse m'a suffi,

mais je dirai simplement une chose qui illustre ton importance, ta patience et ton aide : je n'aurais jamais terminé sans toi.

Je tiens également à remercier M. Christian Sanchez et M. Stéphane Pezennec d'avoir accepté d'être membres de mon comité de thèse.

Durant ma thèse, nombreux sont ceux, au laboratoire, qui m'ont aidé dans ce travail ou simplement encouragé. Pour cela, je remercie tout d'abord Véronique Solé pour m'avoir supporté durant une longue période, aidé à me lancer dans la thèse et continué à répondre à mes questions par la suite. D'encadrante, il ne te manquait que le nom. Merci également à Christian Blassel pour son aide dans la purification des protéines.

Un grand merci également à Marie Françoise Devaux de m'avoir replongé dans l'ACP, à Dominique Guibert pour la tension de surface et les petits soucis informatiques du quotidien et à Geneviève Llamas pour nos mesures en DLS et nos essais étranges de potentiel-zeta ainsi que pour toujours t'être beaucoup inquiété pour moi. Merci également à Valérie Beaumal et Elisabeth David-Briand pour vos conseils et réponses rapides, à Cédric Gaillard de m'avoir fait découvrir l'AFM et à Audrey Arnould et Bérénice Houinsou-Houssou pour leur co-expertise sur le foamsan.

Je remercie également toutes les autres personnes de l'équipe ISD que j'ai côtoyées pour les bons moments passés même si je me suis de plus en plus effacé au fil des années. Malgré cela, j'ai continué à recevoir de nombreux encouragements. Merci à Adeline, Anne, Bruno, Camille, Catherine, Claude, Lucie, Michel, Michèle, Patricia, Sébastien, Sylvaine...

Je tiens aussi à remercier mes voisins de bureau. Claire, on aura partagé un bureau, des footings et quelques soirées. Tu m'as donné beaucoup d'excellents conseils que je n'ai pas réussi à bien appliquer mais j'y suis tout de même arrivé aussi. Lorena, merci pour ta bonne humeur constante, ton sourire et pour le maté, une expérience à ne pas rater.

Merci à tous les doctorants, stagiaires que j'ai croisé durant la thèse...

Un grand merci à Claire ! On a passé beaucoup de temps ensemble en dehors du boulot. Il y avait pas mal de séries à suivre il faut dire ! Merci donc pour ton canapé...et désolé pour lui aussi...

Merci également à Aliénor. Certes on ne partage pas du tout les mêmes goûts musicaux mais bon, je ne peux pas t'en vouloir de ne pas avoir 60 ans dans ta tête.

Un grand merci aussi à Audrey. J'ai commencé un an avant toi mais on a fini ensemble, ça m'a beaucoup aidé. Une autre enquête de terminée, n'est-ce pas Wiggins ?

Merci également à Hernan, Tin, Thibaut, William, Gaétan, Stéphanie... la liste est bien longue !

Je remercie aussi tous les volleyeurs et footballeurs du midi. La liste est bien longue. Merci à vous ! Ronan et Yohan, merci d'avoir repris le volley, vous faites bien tourner ça. Mathieu, il te reste peu de temps pour travailler la ponctualité de Glenn et le répondant de Kamal, je compte sur toi.

Merci aussi à tous mes amis, qui m'ont soutenu durant ces années : Arthur, Benjamin et Virginie, Benoit et Pauline, Cédric et Marion, Jérôme et Sarah, Marie, Marion DC., Marion H., Marion P., Nicolas, Paul, Amélie et Romain, ...

Enfin, un immense merci à ma famille et mes proches qui m'ont aidé, peut-être à leur insu, à tenir le coup. Ce travail est l'aboutissement de longues années d'études qu'ils ont rendu possibles. Je remercie donc de tout mon cœur, mes parents, et d'une poignée de main virile, mes frères Pierre et Nicolas. Etudes terminées. Axelle, heureusement que tu étais là ! Merci pour ta patience et ton soutien. Sans toi, mes petites cellules grises n'y seraient jamais arrivées.

Communications scientifiques

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

Publications

Schwartz, J.-M., Solé, V., Guéguen, J., Ropers, M.-H., Riaublanc, A., & Anton, M. (2015). Partial replacement of β -casein by napin, a rapeseed protein, as ingredient for processed foods: Thermoreversible aggregation. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 562–568.

Communications orales

Schwartz, J.-M., Solé, Ropers, M.-H., Riaublanc, A., & Anton, M. (2015). Impact of napin, a 2S protein from rapeseed, in the functional properties of β -casein, Congrès Biopolymers, Nantes (44), Décembre 2013.

Schwartz, J.-M., Solé, Ropers, M.-H., Riaublanc, A., & Anton, M. (2015). Criblage d'assemblages protéiques fonctionnels à partir de protéines d'origine végétale et/ou animale, Journée des Jeunes Chercheurs BIA, Nantes (44), Juin 2014.

Tables des Matières

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. Rôle des protéines dans l'alimentation	4
1.1. Apports en acides aminés	4
1.2. Evolution des apports en protéines dans la consommation mondiale	8
1.3. Les limites de l'augmentation de la production en protéines animales	11
1.4. Vers une substitution des protéines animales par des protéines végétales	13
1.5. Verrous liés à la substitution de protéines animales par les protéines végétales	15
2. Propriétés physico-chimiques des protéines	19
2.1. Protéines végétales	19
2.1.1. Soja	20
2.1.2. Pois	23
2.1.3. Colza	29
2.2. Protéines animales	33
2.2.1. La Caséine β	33
2.2.2. Le Lysozyme	39
2.3. Récapitulatif des principales propriétés physico-chimiques des protéines animales et végétales étudiées	41
3. Assemblages de Protéines	44
3.1. Types de Liaison	45
3.1.1. Liaisons covalentes	45
3.1.2. Liaisons hydrogènes	46
3.1.3. Liaisons hydrophobes	46
3.1.4. Interactions électrostatiques	46
3.2. Modulation des assemblages par les conditions physico-chimiques	47
3.2.1. Importance de la conformation protéique	47
3.2.2. Impact des paramètres physico-chimiques	48
3.2.3. Combinaison des paramètres physico-chimiques et influence sur l'agrégation d'une protéine	50
3.3. Assemblages impliquant deux types de protéines	56
4. Conclusion	69
DEMARCHE DE L'ETUDE	70
MATERIELS ET METHODES	73
1. Matières premières et réactifs	73
1.1. Protéines végétales	73
1.1.1. Napine 2S du colza	73
1.1.2. Viciline, convicine (7S) et légumine (11S) du pois	73

1.1.3.	Conglycinine (7S) et glycinine (11S) du soja	73
1.2.	Protéines animales	74
1.1.1.	Caséine β	74
1.1.2.	Lysozyme	74
1.3.	Eau et tampons	74
2.	Protocole de préparation des mélanges	75
2.1.	Préparation des solutions de protéines	75
2.2.	Mélanges de protéines	75
2.3.	Mise au point du protocole de la station de travail automatisée	76
3.	Méthodes de caractérisation des mélanges	80
3.1.	Electrophorèses SDS-PAGE	80
3.2.	Analyse thermogravimétrique	80
3.3.	Turbidimétrie	81
3.3.1.	Mesures sur plaques	81
3.3.2.	Mesures en cuve	81
3.4.	Taille des particules	82
3.4.1.	Mesures sur plaques	83
3.4.2.	Mesures en cuve	83
3.4.3.	Analyse des données	84
3.5.	Microscopie optique	85
3.6.	Mesure de la tension	85
3.7.	Etude des propriétés moussantes	87
4.	Analyses statistiques	88
4.1.	Modèle linéaire généralisé et analyse de la variance	88
4.2.	Analyse en composantes principales	88
4.2.1.	Principe	88
4.2.2.	Application à l'analyse des données de diffusion dynamique de la lumière	90

RESULTATS ET DISCUSSION 91

1.	Purification et caractérisation des protéines	91
1.1.	Purification	91
1.1.1.	Viciline, convicine (7S) et légumine (11S) du pois	91
1.1.2.	Glycinine (11S) de soja	99
1.2.	Caractérisation	100
1.2.1.	Pureté	100
1.2.2.	Solubilité	109
2.	Criblage des couples protéines végétales/protéines animales en fonction des conditions physico-chimiques	111
2.1.	Turbidité	111
2.1.1.	Interactions des protéines végétales avec le lysozyme	115
2.1.1.1.	Pois	115
2.1.1.2.	Soja	125
2.1.1.3.	Colza	130
2.1.2.	Interactions des protéines végétales avec la caséine β	133
2.1.2.1.	Pois	133
2.1.2.2.	Soja	138
2.1.2.3.	Colza	143
2.2.	Taille des particules	147
2.2.1.	Première méthode de traitement	147
2.2.2.	Seconde méthode de traitement	148
2.2.3.	Troisième méthode de traitement	149

2.2.4.	Quatrième méthode de traitement	153
2.3.	Conclusion	157
3.	Caractérisation des assemblages napine/caséine β	159
3.1.	Stabilité à la température	160
3.2.	Analyse du rôle du calcium dans l'agrégation napine/caséine β	165
3.3.	Coexistence d'interactions hydrophobes et électrostatiques	167
3.3.1.	Formation des agrégats napine/caséine β par interactions électrostatiques	167
3.3.2.	Renforcement de l'agrégation par la température	169
3.4.	Composition des agrégats	170
3.5.	Fonctionnalités aux interfaces et dans les mousses	173
3.5.1.	Tension superficielle	174
3.5.2.	Propriétés moussantes	177
3.6.	Stabilité dans le Temps	179
3.7.	Conclusion	183
	CONCLUSION GENERALE	184
	BIBLIOGRAPHIE	187
	ANNEXES	208

Introduction

Introduction

Nourrir 9 Milliards d'individus à l'horizon 2050 en alliant qualités organoleptique, nutritionnelle et sanitaire, protection de l'environnement, et rentabilité des économies de production et de transformation est un défi que doivent relever les acteurs de l'agriculture du XXIème siècle pour faciliter l'émergence de systèmes alimentaires durables. Les études prospectives (Chaumet et al., 2009) notent en effet la nécessité de ne pas prolonger l'évolution actuelle des productions et utilisations des diverses biomasses agricoles basées uniquement sur la croissance économique.

A l'heure actuelle, la grande majorité des protéines utilisées pour la fabrication de produits alimentaires transformés dans les pays développés est d'origine animale. Ces protéines apportent des qualités organoleptiques et nutritionnelles à des produits formulés tels que les crèmes, sauces, sauces salades, mousses et mayonnaises. Or, compte-tenu du contexte démographique et environnemental évoqué plus haut, et de la nécessité de revoir nos modes de productions, il devient urgent d'utiliser d'autres sources protéiques comme les protéines végétales dont les coûts de production et l'impact environnemental sont plus faibles, la durabilité meilleure et l'apport nutritionnel de bonne qualité.

L'utilisation des protéines végétales comme ingrédients pour l'alimentation humaine reste cependant difficile à cause de plusieurs verrous : sociologiques car liés au statut de la viande dans les habitudes de consommation et à l'acceptabilité gustative des protéines végétales, économiques car liés aux intérêts des secteurs « viande » et « lait », et technologiques car le savoir-faire en matière d'utilisation des protéines végétales est très loin de celui existant pour les protéines animales, et qu'elles présentent certaines limites sur le plan de leur utilisation. En effet les protéines végétales présentent une forte tendance à l'agrégation, ce qui pose des problèmes de mise en œuvre pour des applications en alimentation humaine.

En conséquence, le remplacement total des protéines animales par des protéines végétales n'est pas actuellement envisageable. En revanche, des mélanges de protéines animales et végétales seraient une voie possible pour concevoir des assemblages fonctionnels stables et également pour pallier aux problèmes gustatifs posés par les protéines.

L'incorporation des protéines végétales comme ingrédients couplés aux protéines animales dans l'industrie agroalimentaire nécessite donc une étude plus approfondie des systèmes mixtes protéine végétale/protéine animale afin de maîtriser d'éventuelles interactions entre deux types de protéines, les modalités de ces interactions et leur impact sur les propriétés fonctionnelles.

Cette thèse s'inscrit dans cette problématique avec pour objectif d'étudier les interactions entre des couples de protéines animales et végétales dans différentes conditions physico-chimiques. Nous avons focalisé cette étude sur les protéines de soja, déjà employées pour texturer des produits, les protéines de pois utilisées pour contrôler la teneur en eau des produits alimentaires et la napine, une protéine du colza intéressante pour ses propriétés émulsifiantes (Krause & Schwenke, 2001) et dont l'usage dans l'alimentation humaine en tant qu'ingrédient est autorisé depuis 2013 en Europe (EFSA NDA Panel, 2013). La stratégie choisie consiste en une démarche de physico-chimie intégrative s'appuyant sur des méthodes de criblages moyen-débit des interactions. Il s'agit de caractériser les interactions protéines-protéines par la détermination de leurs structures et des dynamiques d'assemblages. L'approche combinatoire qui est développée permet un large criblage de conditions physico-chimiques et/ou de procédés thermiques. Il constitue une démarche originale pour identifier de nombreux complexes fonctionnels, en rupture avec les schémas classiques d'optimisation.

Les connaissances sur les protéines utilisées lors de ce projet ainsi que sur les assemblages protéiques et les facteurs les influençant sont rassemblées dans la première partie Etude Bibliographique avant que l'approche utilisée ne soit détaillée dans la section Démarche de l'étude. La troisième section Matériels et Méthodes présente les techniques

utilisées lors du projet dont la première étape, qui a consisté en la purification et la caractérisation des protéines de l'étude. Ce travail conséquent de purification et caractérisation des protéines est décrit dans la première partie de la section Résultats et Discussion. Les résultats, obtenus lors du criblage de nos couples protéine végétale/protéine animale en fonction des différents facteurs physico chimiques, sont ensuite présentés dans la seconde partie de la section Résultats et Discussion. Le dernier volet de cette section décrit les interactions d'un couple de protéine animale-protéine végétale sélectionné. Les principales conclusions de ce projet sont finalement présentées dans la Conclusion Générale qui propose également des perspectives à donner à cette étude.

Etude Bibliographique

Etude Bibliographique

1. Rôle des protéines dans l'alimentation

1.1. Apports en acides aminés

Les protéines sont un composant alimentaire très important puisque chez l'humain adulte, environ 2,5 % de la masse protéique est renouvelée chaque jour. Les acides aminés qui composent ces protéines sont au nombre de 20 (tableau 1). Parmi ces 20 acides aminés, tous sont des nutriments essentiels et 9 sont considérés comme indispensables chez l'homme car ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme à une vitesse suffisante pour satisfaire les besoins. Il s'agit de la méthionine, de la lysine, du tryptophane, de la thréonine, de la phénylalanine, de la leucine, de l'isoleucine, de la valine et de l'histidine (Borman & Wood, 1946). D'autres acides aminés peuvent être considérés comme indispensables dans certaines situations où les besoins nets en acides aminés sont augmentés ou lorsque la biosynthèse devient insuffisante. La source d'acides aminés indispensables est donc l'alimentation, sous la forme de protéines.

Nom	Symbole	Nom	Symbole
Glycine	Gly (G)	Cystéine	Cys (C)
Alanine	Ala (A)	Méthionine	Met (M)
Valine	Val (V)	Proline	Pro (P)
Leucine	Leu (L)	Acide glutamique	Glu (E)
Isoleucine	Ile (I)	Glutamine	Gln (Q)
Phénylalanine	Phe (F)	Acide aspartique	Asp (D)
Tyrosine	Tyr (Y)	Asparagine	Asn (N)
Tryptophane	Trp (W)	Lysine	Lys (K)
Sérine	Ser (S)	Arginine	Arg (R)
Thréonine	Thr (T)	Histidine	His (H)

Tableau 1 : Liste des acides aminés et abréviations (FNB/IOM, 2002).

Le besoin nutritionnel en acides aminés est la résultante d'un besoin net, directement lié à la croissance et au statut physiologique, et de la biodisponibilité et de l'efficacité d'utilisation des acides aminés alimentaires (Reeds, 2001). Le besoin en acides aminés dépend donc de l'âge, du sexe et des activités de la personne concernée.

Plusieurs méthodes existent pour déterminer les besoins en acides aminés indispensables. Ces méthodes donnent des résultats plus ou moins homogènes en fonction des acides aminés concernés mais ont tout de même mené à la création de tables des besoins moyens en acides aminés indispensables chez l'adulte (tableau 2). Les différences de valeurs peuvent s'expliquer par des différences méthodologiques et par des prises en compte de nouvelles données selon la date de l'étude.

En mg/g de protéines	FAO/ONU/OMS (FAO/WHO/ONU, 1985) International	ANC 2001 (Martin, 2000) (France)	DRI 2002 (FNB/IOM, 2002) Etats-Unis	FAO/ONU/OMS (FAO/WHO/ONU, 2007) International
His	15	18	17	15
Ile	15	39	23	30
Leu	21	59	52	59
Val	15	32	29	39
Lys	18	45	47	45
Met + Cys	20	23	23	22
Phe + Tyr	21	59	41	38
Thr	11	23	24	23
Trp	5	9	6	6

Tableau 2 : Données officielles de besoins en acides aminés indispensables en France, aux Etats-Unis et au niveau international chez l'adulte en grammes d'acides aminés par gramme de protéine calculés pour un besoin en protéines de 0,66 g/kg/j.

Evidemment la teneur en acides aminés indispensables d'une protéine dépend de la provenance de cette protéine. Le tableau 3 montre les compositions en acides aminés indispensables de nombreux aliments végétaux courants comparés à celles du muscle de bœuf, du lait de vache et de l'œuf de poule. Les protéines d'origine animale sont intéressantes du fait de leur richesse en acides aminés essentiels comme la lysine et le tryptophane. Cette déficience en certains acides aminés peut cependant être compensée en combinant dans un régime alimentaire des protéines végétales de différentes sources (céréales + légumineuses).

Malgré la plus faible teneur des protéines végétales en certains acides aminés indispensables, ces dernières ont une place très importante en Asie et en Afrique où elles représentent respectivement 90% et 80% des protéines totales consommées. En Europe et aux Etats-Unis, le rapport est quasiment inversé puisque les protéines végétales ne représentent qu'environ 30% des apports (Grigg, 1995). Bien qu'il existe des disparités géographiques, les régimes alimentaires de tous les pays ont évolué fortement sur les 50 dernières années.

Acides aminés (mg/g de protéines)	Céréales			Légumineuses			Oléagineuse	Muscle de Bœuf	Lait de Vache	Œuf de poule	Besoins en acides aminés (mg/g de protéines) (FAO/WHO/ONU, 2007)
	Riz	Maïs	Blé	Haricot	Pois	Soja	Colza				
His	21	27	21	26	26	30	25	44	28	23	15
Ile	40	34	34	41	41	51	35	50	64	69	30
Leu	77	127	69	71	70	82	68	82	104	90	59
Lys	34	25	23	63	71	68	65	89	83	72	45
Met + Cys	49	41	36	21	24	33	54	32	36	36	22
Phe + Tyr	94	85	77	69	76	95	76	91	105	104	38
Thr	34	32	28	33	36	41	44	47	51	50	23
Trp	11	6	10	8	9	14	12	14	14	16	6
Val	54	45	38	46	47	52	49	53	68	74	39

Tableau 3 : Composition en acides aminés de quelques graines (Hanczakowska & Świątkiewicz, 2014 ; Nosenko et al., 2014 ; Quillien & Guéguen, 1997) et aliment courants (Meunier & Fouques, 1997) et apports nutritionnels conseillés en acides aminés par gramme de protéines (FAO/WHO/ONU, 2007).

1.2. Evolution des apports en protéines dans la consommation mondiale

Les régimes alimentaires sont fortement liés à la richesse des populations. Par exemple, dans le monde en 1960, la population la plus riche avait un apport calorique plus important en lipides (lipides animaux liés fournis directement par l'aliment (viande, lait) et lipides libres (beurre, huiles végétales, ...) a contrario des lipides végétaux liés (céréales, noix, graines oléagineuses)), sucre et protéines animales tandis que la population la plus pauvre consommait plus de glucides complexes et de protéines végétales (figure 1).

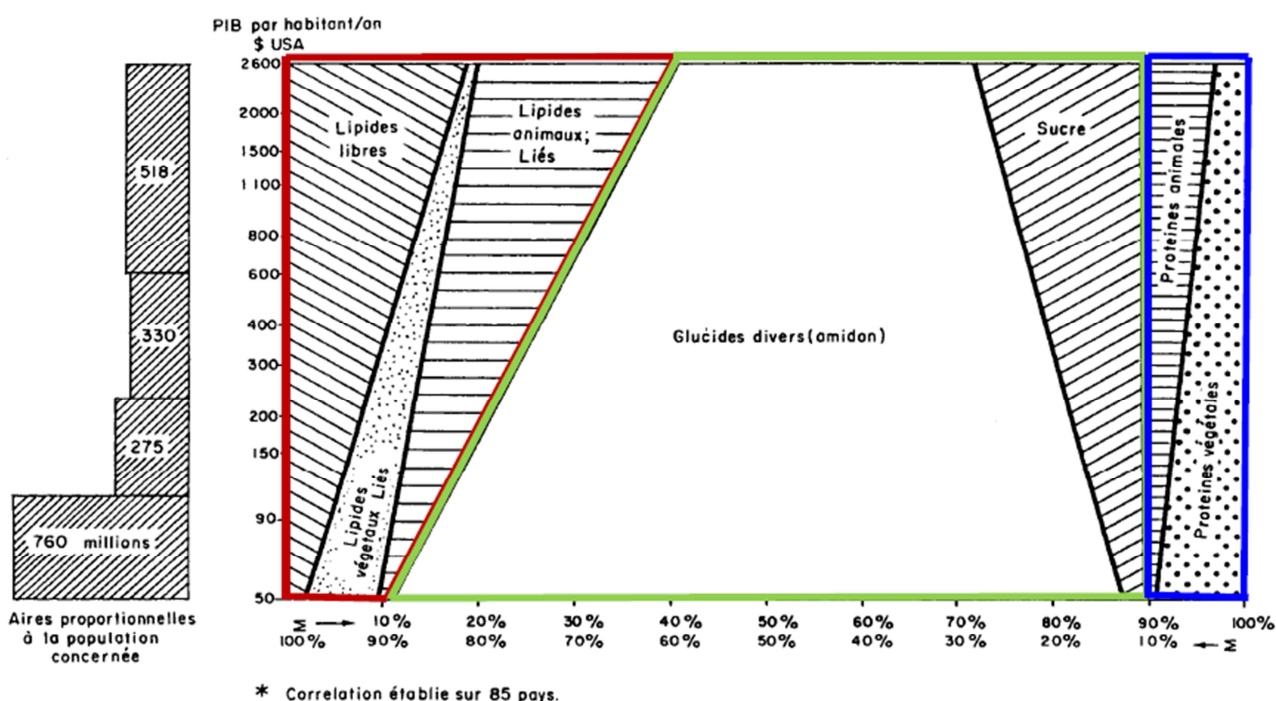


Figure 1: Tendances alimentaires mondiales entre 1960 et 1963 en fonction du PIB/personne/an (Périssé et al., 1969).

Cette tendance s'est confirmée au cours des 10 dernières années (figure 2) où l'augmentation du PIB de nombreux pays en développement s'est accompagnée de la même évolution de leurs régimes alimentaires.

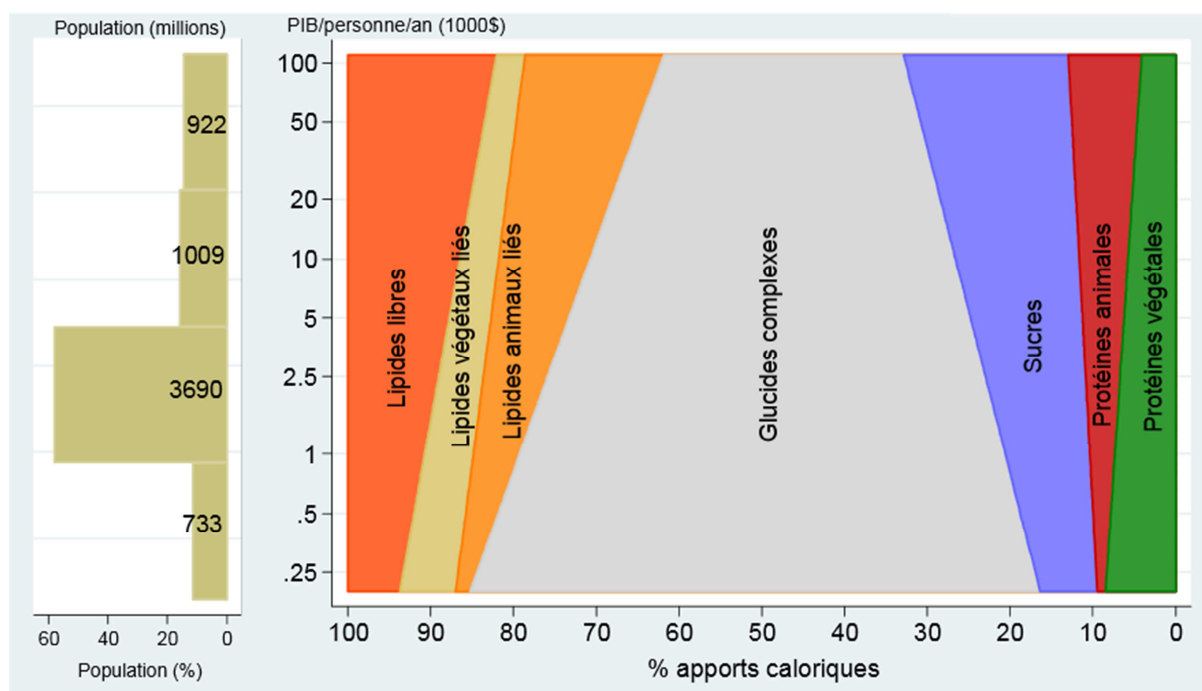


Figure 2 : Tendances alimentaires mondiales entre 2007 et 2009 en fonction du PIB/personne/an (Combris & Martin, 2013).

Ainsi, durant les 40 dernières années, l'enrichissement des populations s'est accompagné de modifications nettes du régime alimentaire mondial :

- Augmentation de la ration calorique totale
- Augmentation de la part des lipides d'origine animale, des sucres et des protéines animales
- Baisse de la part des lipides liés d'origine végétale, des glucides complexes et des protéines végétales.

Sur cette même période, la consommation mondiale de protéines est passée de 61 à 80 g/jour/habitant (FAOSTAT, 2015a), résultant principalement d'une augmentation de la consommation de protéines animales pour les populations à haut revenu (figure 3).

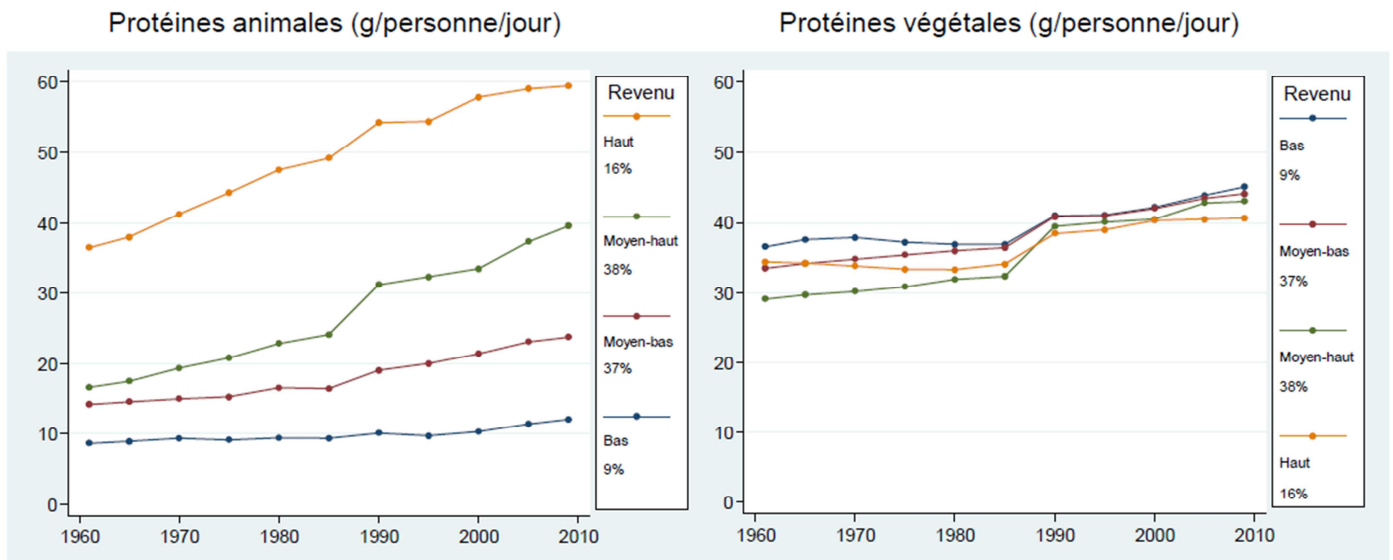


Figure 3 : Evolution entre 1961-1963 et 2007-2009 de la consommation mondiale de protéines par personne et par jour dans le monde selon l'origine des protéines et le revenu des populations (Combris & Martin, 2013).

Les foyers à revenus bas n'ont quant à eux pas augmenté leur ration de protéines animales durant les 50 dernières années. Ces observations confirment que la quantité de protéines animales consommée est fortement corrélée au PNB/habitant malgré quelques exceptions dues à une forte accessibilité à une source particulière de protéines animales comme l'Argentine où 60% des protéines consommées sont d'origine animale (viande bovine) ce qui est bien au-dessus de la moyenne pour l'Amérique du Sud (Grigg, 1995).

Dans le même temps, la consommation de protéines végétales n'a que très peu varié, quel que soit le niveau de revenu des individus, même si les protéines de légumes ont dépassé celles de légumineuses. L'augmentation de la ration en protéines dans l'alimentation mondiale ne repose alors que sur la consommation croissante en protéines animales.

1.3. Les limites de l'augmentation de la production en protéines animales

L'Organisation des Nations Unies (ONU) prévoit, quel que soit le scénario, une augmentation de la population mondiale jusqu'à 9 milliards d'individus en 2050 pour le scénario moyen (figure 4).

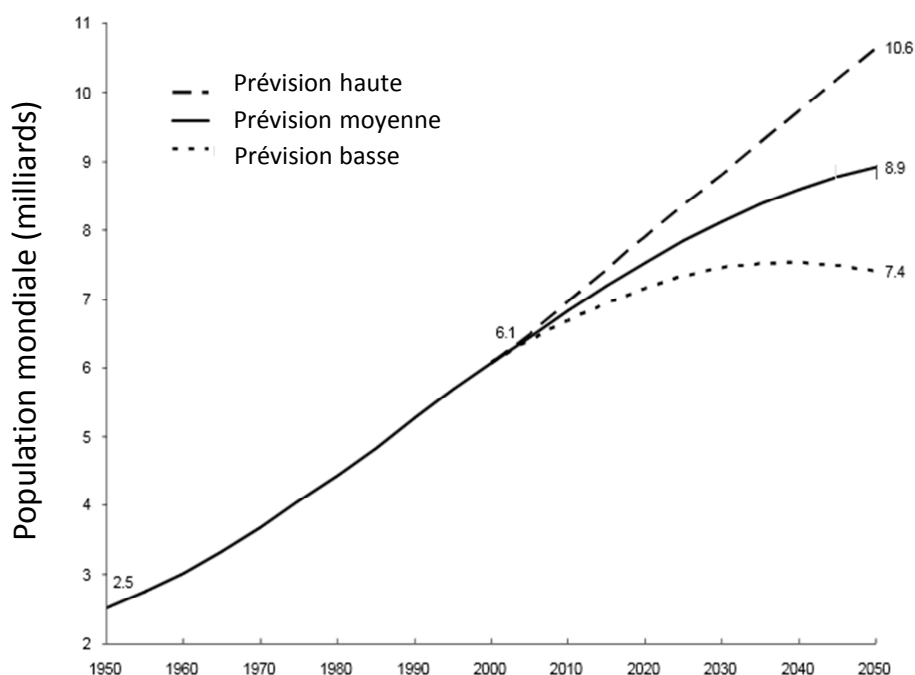


Figure 4 : Population mondiale estimée (1950-2000) et projections de croissance (2000-2050) d'après les Nations Unies (2004).

Cette forte hausse de la population associée à un changement de régime lié à un enrichissement global des populations nécessite l'accroissement des productions agricoles et risque de faire exploser la demande en protéines animales. Or, dans l'étude prospective AGRIMONDE (Chaumet et al., 2009), il a été estimé que l'agriculture ne pourra nourrir 9 milliards d'individus en 2050 qu'en respectant une ration calorique moyenne apparente de l'ordre de 3000 kcal/personne/jour et à condition que la consommation des produits d'origine animale ne dépasse pas les 500 kcal/personne/jour. Or, ce seuil des 500 kcal d'origine animale vient d'être atteint en moyenne dans le monde. Les pays en développement se dirigent déjà vers une consommation de 1000 kcal d'origine animale et de nombreux pays développés ont largement dépassé les 3500 kcal/personne/jour, il devient urgent de trouver des solutions (FAOSTAT, 2015a).

Ces évolutions mondiales accompagnant la croissance économique vont se heurter aux limites des ressources naturelles disponibles et créer un déséquilibre entre quantité produite et quantité disponible. A défaut d'une prise de conscience, la pression va s'accroître sur l'environnement (disponibilités en eau et en terres cultivables, rejets de CO²) et sur le consommateur (augmentation des prix, prévalence de certaines maladies métaboliques).

Pour anticiper cette situation, il convient de modifier dès à présent les pratiques alimentaires en envisageant des scénarii de rupture avec cette tendance à l'explosion de consommation de protéines animales en se dirigeant vers une alimentation plus durable pour les producteurs, le consommateur et l'environnement. L'agence d'évaluation environnementale des Pays-Bas a présenté récemment quelques solutions (tableau 4) (Westhoek et al., 2011). Au niveau de l'alimentation, ils ont proposé de passer à un régime plus sain en accord avec les recommandations de l'organisation mondiale de la santé (Organisation mondiale de la Santé, 2003), c'est-à-dire de manger plus de viande blanche par rapport à la viande rouge et de diminuer la consommation générale de produits d'origine animale. Ces propositions se traduiraient par exemple, en termes de régime alimentaire, par la consommation d'une quantité maximale de 300 g de viande rouge par semaine.

L'effet de ces mesures par rapport à un scénario de référence a également été estimé. Dans ce scénario, l'augmentation de la demande mondiale en produits animaux d'ici 2030 serait de 69%. L'application de ces mesures, rien qu'en Europe, permettrait de réduire cette augmentation mondiale à 57 % pour une réduction de 50% de la consommation de produits animaux et à 60,5 % pour un régime plus sain (Westhoek et al., 2011). Bien que l'Europe ne représente que 6% de la population mondiale en 2030, l'application de ces mesures uniquement à l'Europe représenterait une baisse significative de la demande mondiale en produits d'origine animale, même si, selon ce scénario, l'Europe consommera toujours plus de produits d'origine animale que la moyenne mondiale en 2030. Mais ces changements de régime nécessitent aussi de trouver des substituts.

Scenario	Description
Options at EU level	
Healthier diet	EU diets in 2020 in accordance with health recommendations
Substitution of red meat	Preference shift from red meat to white meat in the EU, with 40% lower red meat consumption in 2020 compared to the <i>Reference Scenario</i>
Reduced consumption of animal products (10%, 20% and 50% less)	Reduction in the consumption of livestock products in the EU, by 10%, 20% and 50%
Animal friendly	All livestock production in the EU according to animal-friendly standards by 2020
Organic	50% of EU livestock production and 20% of EU arable land managed according to organic agriculture standards by 2020
Options at global level	
Low wastage	Reduction in food losses worldwide, from 20% to 5% by 2020 (-15%)
High crop yield increase	Worldwide, yields increase 40% faster than in the <i>Reference Scenario</i> (i.e. a 10% yield increase in the <i>Reference Scenario</i> would become 14%)
Livestock efficiency increase	Worldwide, livestock efficiency 15% higher than in the <i>Reference Scenario</i> by 2020 (i.e. 15% less feed needed per unit of product)

Tableau 4 : Solutions proposées par l'agence d'évaluation environnementale des Pays-Bas pour réduire l'impact de la production et de la consommation de produits animaux sur l'environnement et la santé (Westhoek et al., 2011).

1.4. Vers une substitution des protéines animales par des protéines végétales

Une des solutions envisageables consiste à remplacer les protéines animales par des protéines végétales. La production de protéines végétales présente de nombreux avantages par rapport aux protéines animales. Elles nécessitent moins d'espace pour leur production que la majorité des protéines animales. Pour la même quantité de protéines produite, il y aura une occupation du sol beaucoup moins forte (figure 5) puisque la majorité des protéines végétales produites sont utilisées pour l'alimentation animale et, qu'à l'échelle mondiale, il faut en moyenne 2,2 kg de protéines issues des plantes de grandes cultures pour produire 1 kg de protéines animales (Feillet, 2014). Cet argument est d'autant plus important que la surface de terres arables par personne est en forte diminution avec la croissance démographique.

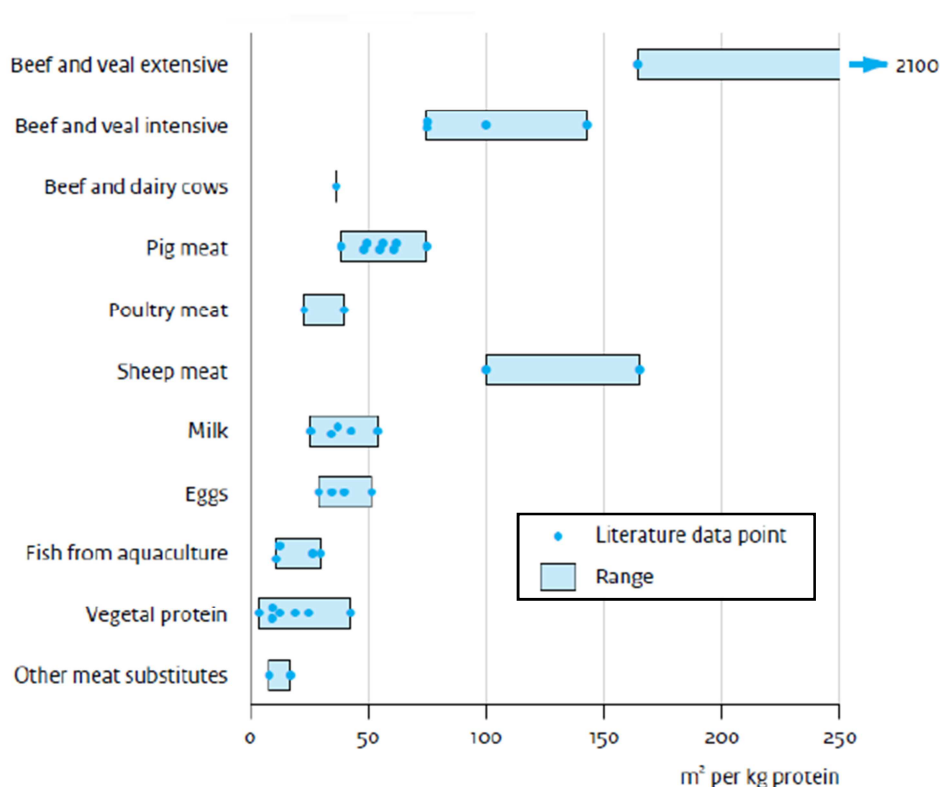


Figure 5 : Représentation graphique de l'occupation des sols en fonction de la quantité de protéines produites selon leur origine (Westhoek et al., 2011).

A cela s'ajoute une pollution moins importante, notamment vis-à-vis de la production de dioxyde de carbone (figure 6), et une consommation d'eau largement inférieure (Hoekstra & Chapagain, 2007). La production de 1 kg de protéines animales peut ainsi nécessiter jusqu'à cent fois plus d'eau que la production d'1 kg de protéines végétales.

Parallèlement aux problèmes environnementaux et d'accessibilité à l'eau, il a été montré que des régimes alimentaires végétariens ou incluant moins de produits animaux que le régime classique nord-américain permettaient de réduire de nombreuses causes de mortalité (maladies cardiovasculaires, maladies rénales...) (Orlich et al., 2013). La surconsommation de produits animaux augmente les risques vis-à-vis de nombreuses maladies métaboliques telles que le diabète, l'hypertension artérielle (HTA) ou encore l'obésité (Campbell & Campbell, 2005). Cependant, l'influence des protéines en elles-mêmes reste controversée.

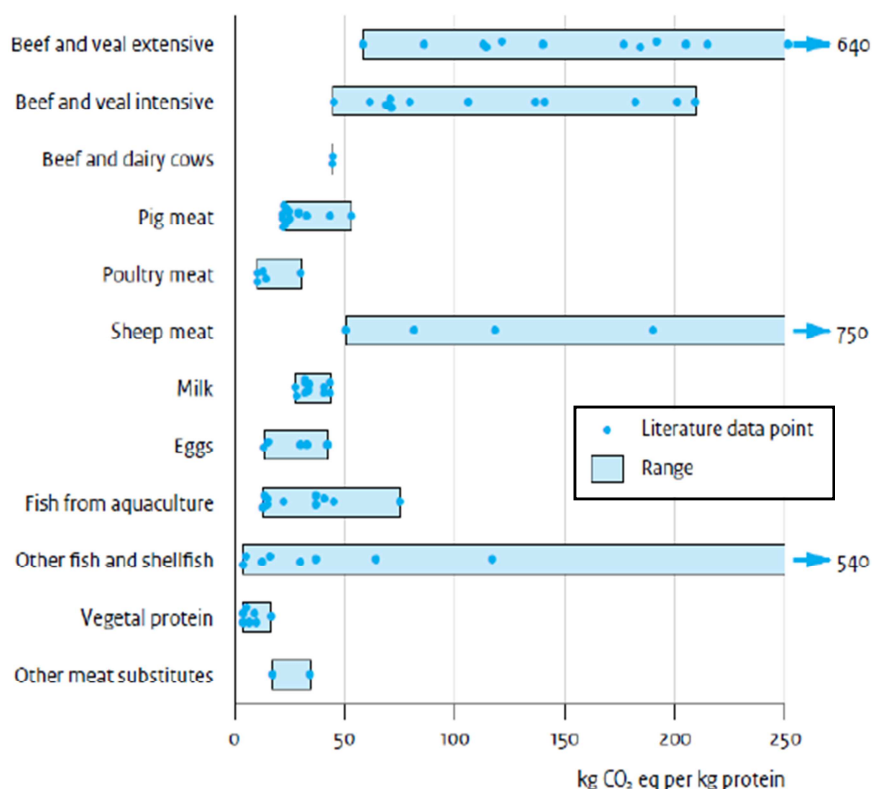


Figure 6 : Représentation graphique de la quantité de CO₂ émise par kg de protéines produite selon leur origine (Westhoek et al., 2011).

1.5. Verrous liés à la substitution de protéines animales par les protéines végétales

Mais malgré tous ces avantages et les recommandations issues de différents organismes, la réintroduction des protéines végétales dans l'alimentation peut rencontrer plusieurs verrous.

Il existe pourtant des sociétés, en plein développement, qui ne fabriquent et ne commercialisent que des produits à base de matières et protéines végétales. C'est le cas de Sojasun qui est entré très tôt sur ce segment et qui propose des desserts, des boissons et des plats préparés à base de soja, encore largement majoritaire comme produit de substitution aux protéines animales. Plus récemment, Beyond Meat, par exemple, a figuré

dans le top des Start-Ups du Time's en proposant des produits à base de soja extrêmement proches de la viande que ce soit au niveau du goût ou de la texture.

Des produits avec des protéines d'autres sources, comme les protéines de pois, commencent également à apparaître sur le marché. D'après une étude de la société MINTEL, le nombre de produits à base de protéines de pois a augmenté de 234% rien qu'entre 2010 et 2013 (Mintel, 2015). Mais ces produits ne concernent qu'une minorité de la population avec des régimes alimentaires particuliers comme les végétariens.

Pour la majorité de la population, il existe encore un blocage sociologique, particulièrement quand il s'agit de remplacer directement la viande par du végétal dans l'assiette. En effet, la consommation de viande est très ancrée dans de nombreux pays et les habitudes alimentaires restent difficiles à changer surtout si elles sont liées à un niveau de vie élevé. De plus, l'acceptabilité des nouvelles sources protéiques est souvent mauvaise. Il faudrait donc lutter contre le symbolisme de la viande tout en améliorant l'image du végétal. Ce blocage sociologique s'accompagne de verrous économiques et structurels puisqu'avec le succès et la croissance des secteurs « viande » et « lait », ces filières s'opposeront forcément, dans leur intérêt économique, à l'augmentation de la part du végétal. De plus, de par sa nouveauté, le secteur des protéines végétales n'est pas encore parfaitement structuré et sa croissance passe par la mobilisation de tous les acteurs concernés, du consommateur au politique en passant par les producteurs et les industriels.

Pour lever ces verrous, il est possible de ne remplacer qu'une partie des protéines animales par des protéines végétales dans les produits formulés. Les protéines végétales ne constituent plus alors la base du produit mais sont utilisées comme ingrédients fonctionnels. En tant qu'ingrédients, les protéines végétales peuvent être utilisées dans le domaine alimentaire (Augustin & Hemar, 2009) mais restent minoritaires. Il existe malgré tout depuis longtemps des produits utilisant de cette manière des protéines d'origine végétale comme ceux présentés dans le chapitre « Applications des Protéines Végétales » (Uzzan & Delfly, 1996) de l'ouvrage *Les Protéines Végétales*, par Godon et al. (2^{ème} édition, 1996) :

- un produit type « crème de Genévrier », avec 7 % de concentré texturé de soja,
- un produit type « crème glacée végétale », avec 3 % de concentré végétal fonctionnel,
- un produit type « fromage à tartiner », avec 10 % d'une préparation à base de protéines végétales et laitières,
- un produit type « bâtonnet de poisson », avec 5 % de concentré texturé de soja et 77 % de filet de morue.

Plus récemment, la société belge Cosucra propose aux industriels un concentré de protéines de pois nommé Pisane avec des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles intéressantes.

Mais ces produits restent peu nombreux par rapport à la taille du secteur de l'agroalimentaire alors que la transition alimentaire va devenir une priorité. Et cela peut s'expliquer par la présence d'un quatrième verrou majeur dû aux différences de propriétés entre protéines animales et protéines végétales et au faible nombre de connaissances existant sur ces dernières. En effet, le savoir-faire quant à l'utilisation de ces protéines pour l'alimentation humaine est très peu développé en comparaison des connaissances sur les protéines animales. Parmi les propriétés qui posent problème : leur solubilité, leur capacité émulsifiante et moussante souvent moins bonnes par rapport aux protéines de lait et d'œuf actuellement utilisées. Il y a également des facteurs de variabilité liés à la génétique ou aux conditions agro-pédologiques ainsi que des phénomènes d'agrégation qui peuvent modifier du tout au tout le comportement de ces protéines en solution en fonction de l'espèce utilisée et des conditions physico-chimiques. Les procédés d'extraction sont également à améliorer afin d'obtenir des protéines végétales d'un niveau de pureté équivalent à celui des protéines animales tout en conservant un intérêt économique.

L'autre problème posé par les protéines végétales est qu'elles sont moins équilibrées en acides aminés que les protéines animales (Quillien & Guéguen, 1997). Il est donc nécessaire de combiner des protéines végétales de plusieurs origines afin d'obtenir un apport correct en acides aminés.

De plus, la digestibilité des protéines d'origine végétale est souvent un peu plus faible comparée aux protéines animales. Etant donné que la France a une consommation en protéines végétales très orientée vers celles du blé, un bon équilibre des apports nutritionnels nécessiterait l'incorporation de légumineuses dans l'alimentation telles que le pois, le soja (Quillien & Guéguen, 1997).

Economiquement, il est plus raisonnable d'encourager la filière pois que soja pour réduire la dépendance de la France vis-à-vis de cette légumineuse. Nous avons donc choisi de nous focaliser sur les protéines de soja en tant que référence, de pois ainsi que sur une protéine de colza dont les extraits sont maintenant autorisés (EFSA NDA Panel, 2013) en tant que nouvel ingrédient alimentaire sous la réglementation (EC) N°258/97. La section ci-dessous présente ainsi les connaissances acquises sur ces protéines tant au niveau structural que fonctionnel.

2. Propriétés physico-chimiques des protéines

2.1. Protéines végétales

Les protéines végétales peuvent provenir de différentes sources comme des :

- Graines de céréales : blé, seigle, orge, avoine, maïs...
- Graines de légumineuses : soja, pois, haricot...
- Graines d'oléo-protéagineux : colza, tournesol...
- Autres sources : feuilles, algues

Elles sont généralement classées en quatre grandes familles selon leur solubilité (Osborne, 1907) : globulines, albumines, gluténines et prolamines (tableau 5).

Protéines	Solubilité	Présence
Albumines	Solubles dans l'eau Coagulées par chauffage	Céréales, oléagineux, protéagineux
Globulines	Solubles dans les solutions salines Insolubles dans l'eau	Céréales, oléagineux, protéagineux
Prolamines	Solubles dans les solutions alcooliques à 60-70% Insolubles dans l'eau et les solutions salines	Céréales
Gluténines	Solubles en solutions alcalines Insolubles dans l'eau, les solutions salines et alcooliques	Blé, riz, maïs

Tableau 5 : Classement des protéines (Osborne, 1907).

Les albumines et les globulines représentent la majeure partie des protéines végétales. Les protéines ont été longtemps caractérisées par leur coefficient de sédimentation (S, défini comme la vitesse de sédimentation par unité d'accélération de la particule dans un milieu) fixé par la masse molaire, la conformation spatiale et le comportement d'une protéine dans le milieu ambiant. On retrouve ainsi des globulines 7S et 11S et des albumines 2S.

Une classification plus récente (tableau 6) existe également, fondée quant à elle sur la fonction des protéines dans la graine (Shewry & Halford 2002) : protéines de réserve, constitutives ou de protection.

Protéines	Fonctions
De réserve	Stockage de l'azote, du soufre et du carbone
Constitutives (métaboliques ou structurelles)	Essentielles pour le développement et la structure de la graine
De protection	Résistance aux agents pathogènes ou insectes

Tableau 6 : Classement des protéines par Shewry & Halford (2002).

2.1.1. Soja

Le soja (*Glycine Max L.*) est une plante très utilisée dans l'alimentation humaine et animale. Depuis les années 1990, la production de soja dans le monde a quasiment triplé, passant d'environ 100 à 300 millions de tonnes par an. Les principaux producteurs, représentant plus des deux tiers de la production, sont les Etats-Unis, le Brésil, l'Argentine et la Chine. En France, la production de soja a très peu évolué en 20 ans, restant légèrement supérieure à 100 000 tonnes par an (FAOSTAT, 2013).

Les graines de soja sont riches en protéines puisque ces dernières représentent environ 40% des composants de la graine (Cheftel et al., 1985). Les protéines de soja peuvent être séparées en deux catégories principales : albumines et globulines qui ont toutes les deux le rôle de protéines de stockage de la graine et qu'on retrouve dans des corps protéiques au sein des cellules des cotylédons. Deux groupes existent également dans les globulines (70% des protéines de la graine) qui diffèrent par leur coefficient de sédimentation, les 7S et les 11S (Wolf, 1970 ; Utsumi et al., 1997). La protéine majeure des 7S de soja est la β -conglycinine tandis que la 11S porte le nom de glycinine. Dans les graines de soja, le rapport entre la 7S et la 11S varie selon la variété entre 0,5 et 3 (Berk, 1993).

Sous la forme d'isolats, les protéines de soja sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire à cause de leurs excellentes propriétés émulsifiantes et gélifiantes proches des protéines de l'œuf (Ratnayake et al., 2012). Les isolats sont par exemple incorporés dans les produits laitiers, les jus de fruits, les barres énergétiques, les soupes et sauces ou les produits céréaliers tels que le pain ou les gâteaux (Soyfoods, 2014). Cependant, ces deux protéines sont très peu utilisées séparément dans l'industrie.

2.1.1.1. β -conglycinine (7S)

Structure et Propriétés physico-chimiques

La β -conglycinine est une glycoprotéine renfermant environ 5% de glucide (Koshiyama & Fukushima, 1976). Sa masse moléculaire varie de 180 à 210 kDa (Maruyama et al., 2002 ; Wolf, 1970) et elle possède une point isoélectrique de 4,9 (Koshiyama, 1968 ; Thanh & Shibasaki, 1978). Cette protéine est constituée par 3 sous-unités majeures (deux acides α et α' et une basique β) et deux sous unités mineures (δ et γ). Ces sous unités s'associent selon plusieurs combinaisons ($\alpha' \beta_2$, $\alpha \beta_2$, $\alpha \alpha' \beta$, $\alpha 2\alpha'$, α_3 et β) pour former différentes isoformes (hétérogénéité de la β -conglycinine) (Maruyama et al., 2002 ; Rickert et al., 2006) avec des structures trimériques (figure 7) stabilisées par des liaisons faibles (absence de ponts disulfures) (Thanh & Shibasaki, 1976).

La température de dénaturation de la protéine se situe, selon les isoformes, entre 65 et 78°C. La globuline 7S de soja est soluble dans les solutions salines mais pas dans l'eau pure. Dans une solution concentrée à 0,08 M de NaCl, la β -conglycinine ne se solubilise pas autour de son pHi (pH = 5) alors qu'à une concentration de 0,5M de NaCl, la protéine est entièrement soluble entre pH 2 et 10 pour une concentration d'environ 1 mg/ml (Kimura et al., 2008). Cette solubilité s'explique par le comportement d'agrégation et de dissociation de la protéine. A pH compris entre 5 et 10 et à faible force ionique ($\mu \leq 0,1$), la β -conglycinine forme un dimère de 6 sous-unités. En milieu plus alcalin ou plus acide, à force ionique plus élevée, les sous-unités de la protéine se dissocient.

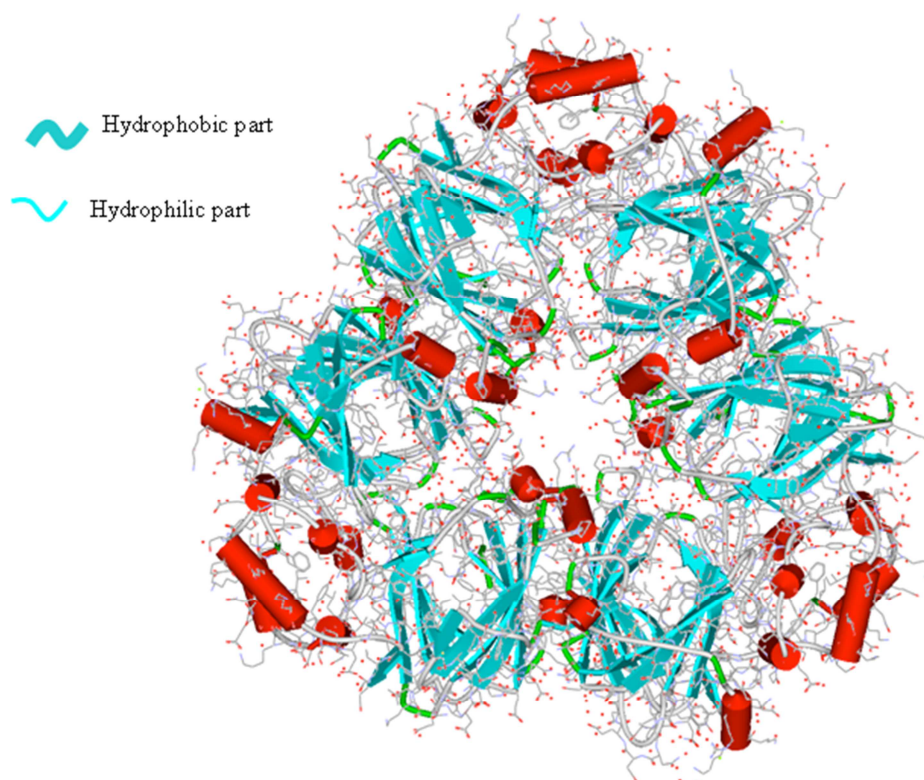


Figure 7 : Représentation schématique 3D de la β -conglycinine de soja native (Barač et al, 2004).

2.1.1.2. Glycinine (11S)

Structure et Propriétés physico-chimiques

La glycinine est une protéine de 320 à 375 kDa (Koshiyama, 1972) ayant un point isoélectrique de 4,9. C'est une protéine hexamérique constituée de 6 sous-unités (figure 8). Chaque sous-unité est elle-même composée par un polypeptide acide A de 37-42 kDa et un polypeptide basique B de 20 kDa liés par un pont disulfure (Nielsen, 1985 ; Petruccelli & Añón, 1996 ; Renkema et al., 2000 ; Utsumi et al., 1987). Les polypeptides A et B s'associent en deux structures hexagonales empilées formant un cylindre par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes et électrostatiques (Badley et al., 1975 ; Peng et al., 1984) et dont les dimensions sont 11x11x7,5 nm (Martin et al., 2002).

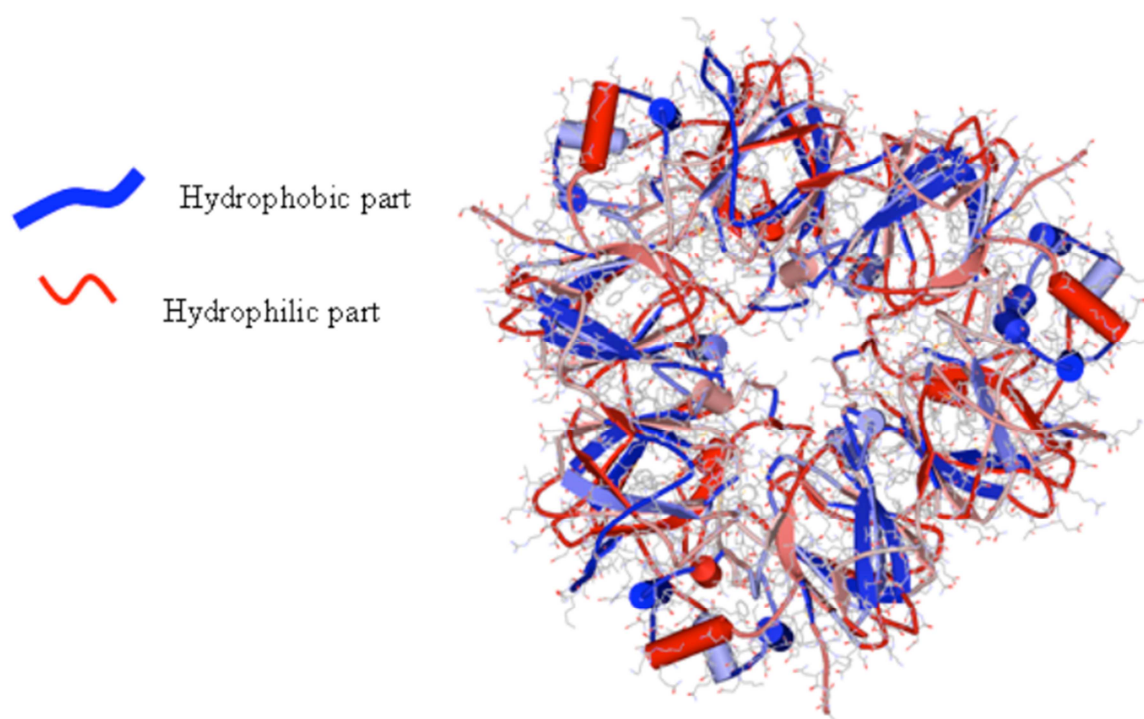


Figure 8 : Représentation schématique 3D de la glycinine (11S) de soja native (Adachi et al., 2003).

La glycinine se dissocie en différentes formes (2S, 3S, 7S) selon les conditions de pH et de forces ioniques (Samoto et al., 2007). Elle présente une solubilité forte en solution saline. Ainsi, dans une solution concentrée en sel (0,5M), la protéine est soluble au-dessus de pH 4. Tandis qu'à faible concentration en sel (0,08M), la solubilité de la glycinine est nulle entre pH 4 et 7 (Kimura et al., 2008).

2.1.2. Pois

Le pois (*Pisum Sativum L.*) est une plante de la famille des légumineuses principalement cultivée pour ses graines, consommées comme légumes ou utilisées dans l'alimentation animale. Sur les 20 dernières années, les principaux pays producteurs de pois sont la Chine, l'Inde et les Etats-Unis. En France, 4^{ème} producteur mondial sur cette même période, la production de pois a varié entre 400 et 600 mille tonnes par an.

Même si le pois est aujourd'hui largement consommé comme légume, les protéines contenues dans ses graines restent toujours très peu exploitées comme ingrédients dans l'industrie agroalimentaire malgré des propriétés fonctionnelles intéressantes (Aluko et al., 2009 ; Barac et al., 2010 ; Maninder et al., 2007).

Les graines de pois contiennent de 20 à 25 % de protéines (Boye et al., 2010 ; Gueguen & Barbot, 1988 ; Schroeder, 1982). Ces protéines se divisent en quatre fractions. Les deux premières, quantitativement prépondérantes, correspondent à deux familles de globulines, protéines de réserve majoritaires (60 à 80 % des protéines totales) ; la troisième fraction regroupe les albumines (10 à 20%) (Gueguen & Barbot, 1988 ; Kimura et al., 2008 ; Tzitzikas et al. , 2006) qui ont un rôle physiologique dans le métabolisme de la cellule (Baniel et al., 1998). D'après Boulter (1977), certaines espèces contiennent également une fraction glutéline.

Les globulines sont constituées principalement de deux familles polymorphes (multigéniques), légumine (11S) et viciline/convicine (7S) (Tzitzikas et al., 2006), caractérisées par leurs différences de solubilité dans différentes conditions de pH et de force ionique (Osborne & Campbell, 1898). Toutes ces protéines de réserve sont localisées dans les corpuscules protéiques de la graine (Müntz, 1989).

Contrairement aux globulines, les albumines regroupent de nombreux types de protéines qui ont, pour la plupart, une activité biologique. Les plus étudiées sont les enzymes (lipoxygénases, amylase ...), les lectines et les inhibiteurs de protéases. Les albumines sont présentes principalement dans le cytosol ou la membrane de la cellule (Derbyshire et al., 1976).

Les rôles physiologiques différents des globulines et des albumines, se traduisent par des compositions en acides aminés très différentes (Gwiazda et al., 1980). Les globulines, source d'azote à la germination, sont des protéines riches en acide aspartique, glutamique et leurs amides ainsi qu'en arginine. De plus, ces protéines présentent des déficiences en certains acides aminés essentiels comme les acides aminés soufrés et le tryptophane.

Enfin, la composition qualitative et quantitative en globulines et albumines d'une part, en légumine et viciline d'autre part est grandement influencée par le génotype et le phénotype de la plante. Plusieurs études expérimentales ont montré que le rapport globulines/albumines peut varier entre 2,4 et 3,9 alors que le rapport légumine/viciline évolue entre 0,2 et 4,2 selon la variété de pois (Casey et al., 1982 ; Gatehouse et al., 1980 ; Schroeder, 1982 ; Tzitzikas et al., 2006).

2.1.2.1. Viciline (7S)

Structure et Propriétés physico-chimiques

La viciline est aussi appelée protéine 7S du pois en raison de son coefficient de sédimentation compris entre 7,1 et 8,1 (Derbyshire et al., 1976). C'est une protéine glycosylée ayant une teneur élevée en acides aspartique et glutamique ainsi qu'en lysine mais totalement dépourvue de cystéine. Cette protéine de masse moléculaire variant entre 150 et 190 kDa (Gatehouse et al., 1982 ; Thomson et al., 1980 ; Tzitzikas et al., 2006), est formée majoritairement de sous-unités de 47 et 50 kDa et d'autres de plus faibles poids moléculaires (33, 19, 16, 13, 12.5 kDa) qui proviennent du clivage *in vivo* des sous-unités majeures (Boulter, 1984 ; O'Kane et al., 2004a ; O'Kane et al., 2004b). La structure oligomérique de la protéine est stabilisée uniquement par des liaisons de faible énergie en raison de l'absence de ponts disulfures car la protéine ne possède pas de cystéine. La présence d'un grand nombre de sous-unités rend la structure de la viciline difficile à définir. La protéine semble organisée en sous-domaines et présenterait une forme pseudo-hexagonale (Gatehouse et al., 1981 ; l'Anson et al., 1988). D'après Lawrence et al. (1994), la viciline aurait la même structure que la phaséoline, protéine 7S de haricot (figure 9).

Plusieurs vicilines ont été identifiées. Cette hétérogénéité, due à l'existence de plusieurs précurseurs, entraîne principalement des changements au niveau de la charge de la protéine (Grant & Lawrence 1964 ; Thomson et al. 1978 ; Gatehouse et al. 1981) même si le point isoélectrique se situe généralement autour de 4,6. De plus, le taux de glycosylation varie également d'une viciline à l'autre (Davey & Dudman, 1979).

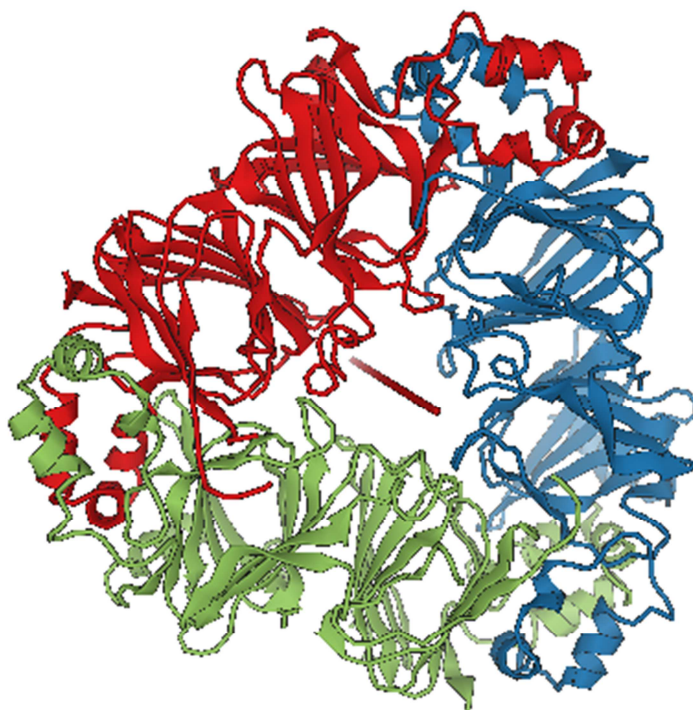


Figure 9 : Représentation schématique 3D de la phaséoline de haricot : structure trimérique organisée selon un axe de symétrie de type trois (Lawrence et al., 1994).

2.1.2.2. Conviciline (7S)

Structure et Propriétés physico-chimiques

La conviciline appartient également à la famille des protéines 7S. Contrairement à la viciline, cette protéine ne subit pas de clivage post-traductionnelle et n'est pas glycosylée (Croy et al. 1980). D'un poids moléculaire entre 180-210 kDa (Tzitzikas et al., 2006). La conviciline présente une structure trimérique, très proche de celle de la viciline, constituée de polypeptides de 68,2 kDa (Newbiggin et al., 1990).

Les globulines 7S de pois sont très peu solubles dans l'eau. Leur solubilité augmente en solution saline. Dans une solution concentrée à 0,08 M de NaCl, la viciline reste très peu soluble entre pH 5 et pH 8. Quand la concentration en NaCl augmente à 0,5 M, elle devient entièrement soluble au-dessus de pH 3 (Kimura et al., 2008).

2.1.2.3. Légumine (11S)

Structure et Propriétés physico-chimiques

La légumine du pois appartient aux protéines de type 11S. C'est une protéine hexamérique d'une masse moléculaire de 330 à 410 kDa (Gatehouse et al., 1980 ; Marcone et al., 1998b) constituée de 6 sous-unités $\alpha\beta$ maintenues par des liaisons hydrogènes, des interactions de Van de Waals et des ponts disulfures et qui s'organisent en deux trimères (Ducel et al., 2004 ; Gatehouse et al., 1984 ; Johnson & Richards, 1962). Chaque sous-unité est constituée de deux polypeptides α (38-40 kDa) et β (19-22 kDa) liés par un pont disulfure (Casey, 1979 ; O'Kane et al., 2004b ; Tzitzikas et al., 2006). Les polypeptides basiques β sont situés dans le cœur hydrophobe de la protéine tandis que les polypeptides α acides se trouvent en périphérie d'après le modèle de structure trigonale bipyramidale (figure 10) suggéré pour l'ensemble des globulines 11S de dicotylédones par Plietz et al. (1983).

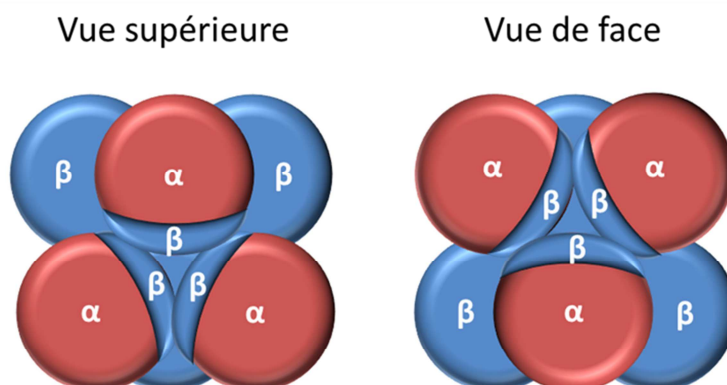


Figure 10 : Modèle de structure quaternaire trigonale bipyramidale envisageable pour les globulines 11S de dicotylédones. Chaque sphère représente un polypeptide acide α ou basique β , constitutifs des sous-unités des légumines (d'après Marcone et al., 1998a).

Les protéines 11S du pois sont cependant très hétérogènes en ce qui concerne leur composition en sous-unités. Cela résulte du fait qu'elles sont codées par des gènes appartenant à des familles multigéniques (Domoney & Casey, 1985). Matta et al. (1981) ont étudié la composition en sous-unités des légumines chez le pois et ont identifié au moins trois classes de légumines se distinguant par trois types de sous-unités $\alpha\beta$: les sous-unités majeures (L4 - 54 kDa), les sous-unités mineures « lourdes » constituées de polypeptides α de haut poids moléculaire (L1 - 58 kDa, L2 - 58 kDa, L3 - 55 kDa) et les sous-unités mineures

« légères » (L5 - 35 kDa). D'autres auteurs ont également mis en évidence l'existence de différentes sous unités (Bacon et al., 1987 ; Lambert et al., 1987).

Les points isoélectriques des polypeptides basiques β varient entre 6,22 et 8,00 tandis que ceux des polypeptides acides α sont compris entre 4,85 et 6,15 (Casey, 1979 ; Matta et al., 1981). Au final, la légumine a un point isoélectrique situé autour de 4,7.

Malgré ces différences importantes de sous-unités, la légumine présente toujours une teneur élevée en arginine, acides glutamique et aspartique et leurs amides (tableau 7).

Acides aminés	Légumine
Glutamine (Gln) et acide glutamique (Glu)	197,4
Thréonine (Thr)	30,8
Sérine (Ser)	57,7
Asparagine (Asn) et acide aspartique (Asp)	130,7
Proline (Pro)	55,0
Glycine (Gly)	68,9
Alanine (Ala)	60,1
Cystéine (Cys)	12,1
Valine (Val)	49,7
Méthionine (Met)	6,6
Isoleucine (Ile)	39,5
Leucine (Leu)	76,0
Tyrosine (Tyr)	36,4
Phénylalanine (Phe)	23,0
Tryptophane (Trp)	n.d
Lysine (Lys)	42,4
Histidine (His)	17,5
Arginine (Arg)	99,9

Tableau 7 : Composition en acides aminés de la légumine de pois (*Pisum sativum* L.) exprimés en résidus pour 1000 et calculés d'après les données de Casey et al. (1981).

Faisant partie de la famille des globulines, la légumine est très peu soluble dans l'eau. Elle devient soluble dans des solutions salines entre 0,5 et 1M. La légumine est également plus soluble à pH 3 qu'à pH 7 (Koyoro & Powers, 1987). Dans une solution à 0,5 M en NaCl, la légumine n'est quasiment pas soluble entre pH 4 et 7. Elle redevient très soluble pour un pH inférieur à 4 ou supérieur à 8 (Kimura et al., 2008). Ces différences de solubilité peuvent

s'expliquer par une forte tendance à l'agrégation ou à la dissociation en fonction des conditions de milieu (Baniel et al., 1998 ; Subirade et al., 1992). La légumine peut se dissocier en trimère puis en monomère aux pH extrêmes et suivant les conditions de force ionique (Chambers et al., 1990 ; Gueguen et al., 1988). Cette dissociation entraîne une exposition des zones hydrophobes internes (sous-unités β) et donc également une modification des propriétés fonctionnelles (Gueguen, 1989 ; Subirade et al., 1992).

2.1.3. Colza

Le colza (*Brassica Napus L.*) est une plante de la famille des brassicacées. Sa culture est en augmentation depuis de nombreuses années. Entre 1993 et 2013, la quantité de colza produit en France a doublé passant de 2 à 4 millions de tonnes (FAOSTAT, 2013). Le colza est principalement cultivé pour son huile (45 à 50%) extraite de ses graines et qui présente un fort intérêt économique puisqu'elle peut être utilisée dans l'alimentation humaine et pour la production de biocarburant. En revanche, les protéines de colza ne sont quasiment pas valorisées dans l'industrie agro-alimentaire en raison de la présence de quantités importantes de substances non protéiques indésirables dans les extraits protéiques et de leur faible qualité dues aux triturations. Le tourteau de colza est aujourd'hui uniquement utilisé en alimentation animale ou dans des domaines non-alimentaires. Pourtant, les protéines de colza possèdent des caractéristiques et compositions en acides aminés intéressantes pour la nutrition humaine (Bos et al., 2007) et les extraits de protéines de colza provenant de variétés contenant de très faibles taux de produits non désirables sont aujourd'hui autorisés dans l'alimentation humaine (EFSA NDA Panel, 2013) en tant que nouvel ingrédient alimentaire sous la réglementation (EC) No 258/97.

Les protéines de colza constituent pour les graines une réserve d'azote, de soufre et de carbone située principalement dans les organes de réserve de la graine, appelées cotylédons. Elles forment la seconde fraction la plus importante des graines de colza après la fraction lipidique : 21 à 24 % dans les graines (Schwenke, 1994). Dans le colza, les protéines de réserve représentent 70% des protéines totales et se répartissent selon deux familles : les albumines (13,4 – 46,1 %) et les globulines (26,5 – 65,3 %) (Raab et al., 1992). La proportion

de ces fractions varie selon la variété de colza. La composition en acides aminés est assez équilibrée mais diffère selon la fraction considérée en raison de leur différence de rôle physiologique. La fraction en globulines a un rôle de réserve en carbone et en azote, mobilisables par la plante lors de la germination et est constituée de protéines de type 7S et 12S. Ces dernières, appelées cruciférines, sont majoritaires dans le colza.

La fraction albumine est en général assez hétérogène car elle rassemble des protéines de réserve et la plupart des protéines ayant un rôle physiologique dans la graine. Les albumines présentent des teneurs plus élevées en acides aminés soufrés et en lysine (Schwenke, 1994) et sont principalement constituées de protéines de type 2S appelées napines qui représentent 15 à 45 % des protéines de la graine selon la variété de colza considérée.

2.1.3.1. La Napine (2S)

Structure et Propriétés physico-chimiques

La napine est une protéine de faible poids moléculaire allant de 12,5 à 14,5 kDa (Gehrig & Biemann, 1996 ; Monsalve & Rodriguez, 1990) avec un point isoélectrique élevé, supérieur à 10 (Monsalve & Rodriguez, 1990). Elle appartient à une famille multigénique codée par 10 à 16 gènes qui sont exprimés pendant le développement de la graine sous forme de précurseurs de 21 kDa (Crouch et al. , 1983 ; Muren et al., 1995) qui donnent naissance, après clivage protéolytique post-traductionnel et maturation, à deux chaînes polypeptidiques de 4,5 et 10 kDa.

Le nombre élevé de gènes de napines ainsi que les différents clivages protéolytiques sont à l'origine de l'existence de plusieurs isoformes de la napine. Neuf isoformes ont été jusqu'à présent clairement identifiées mais de nombreuses autres existent. Les propriétés de ces isoformes peuvent différer, rendant leur séparation difficile (Barciszewski et al., 2000). Malgré le nombre d'isoformes, la composition en acides aminés reste sensiblement la même (tableau 8). Les isoformes ont une longueur de chaîne comprise entre 110 et 128 acides aminés avec de fortes teneurs en histidine, en acides aminés soufrés, en lysine et en

arginine. Huit cystéines se retrouvent chez toutes les isoformes. Leur position est conservée et elles sont impliquées dans la formation de ponts disulfures. Deux ponts lient les deux chaînes entre elles. Deux autres ponts intramoléculaires situés sur la grande chaîne stabilisent également sa structure faisant apparaître les deux chaînes inversées (figure 11). La protéine 2S de colza possède une charge importante qui lui confère une réactivité importante et des sites privilégiés d'interactions électrostatiques.

Isoformes	2SS1	2SS2	2SS3	2SSB	2SSE	2SSI	NAP A	NAP B	NAP C
Longueur séquence (nombre d'acides aminés)	111	120	122	120	127	110	126	126	128
Ala (A)	6	7	7	7	7	6	7	7	7
Arg (R)	4	5	5	4	9	6	5	6	9
Asn (N)	3	2	2	1	2	4	2	2	2
Asp (D)	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Cys (C)	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Gln (Q)	26	25	26	24	27	21	26	27	28
Glu (E)	5	4	4	4	4	6	4	4	4
Gly (G)	6	8	7	7	10	6	8	8	11
His (H)	4	4	4	4	4	2	5	4	4
Ile (I)	3	4	4	4	4	6	4	4	4
Leu (L)	7	8	9	9	6	6	8	9	6
Lys (K)	9	9	9	11	6	5	9	8	6
Met (M)	3	3	2	3	4	1	4	2	4
Phe (F)	2	3	3	3	4	6	3	3	3
Pro (P)	10	12	12	12	14	10	14	15	15
Ser (S)	3	5	6	6	4	4	6	6	4
Thr (T)	4	4	4	4	4	3	4	4	4
Trp (W)	1	1	1	1	1	2	1	1	1
Tyr (Y)	2	2	2	2	2	2	1	1	1
Val (V)	6	6	7	6	7	5	7	7	7
AA basiques (Arg, His, Lys)	17	18	18	19	19	13	14	14	15
AA acides (Asp, Glu)	5	4	4	4	4	7	4	4	4

Tableau 8 : Composition en acides aminés de neuf isoformes connues de la napine.

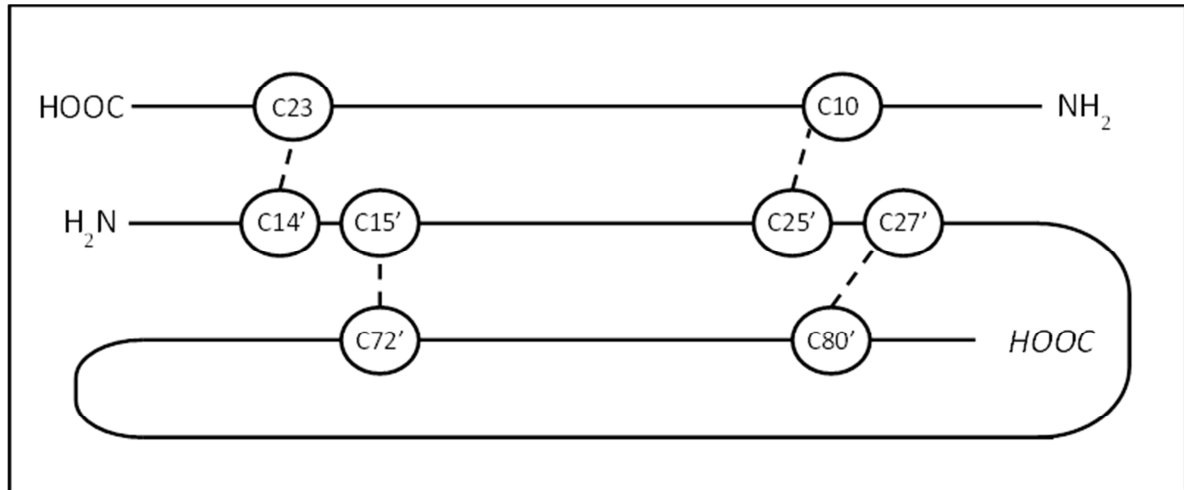


Figure 11 : Représentation schématique de l'isoforme 2SSE de napine de colza montrant les ponts disulfures inter et intramoléculaires d'après Gehrig & Biemann (1996).

La structure secondaire précise de la napine n'a pas été clairement identifiée. Pourtant différentes études ont porté sur le sujet mais ont parfois présenté des résultats différents : 25% d'hélices α et 38% de feuillets β pour Krzyzaniak et al. (1998) ; 40 à 58% d'hélices α et 7 à 20% de feuillets β pour Schwenke et al. (1988) ou Schmidt et al. (2004). Sa structure tridimensionnelle a été élucidée par RMN (Rico et al., 1996) (figure 12). La napine est une protéine très soluble dans l'eau. Entre pH 5 et pH 8, sa solubilité est de 100% jusqu'à des concentrations d'au moins 10 g/L (Stone et al., 2014).

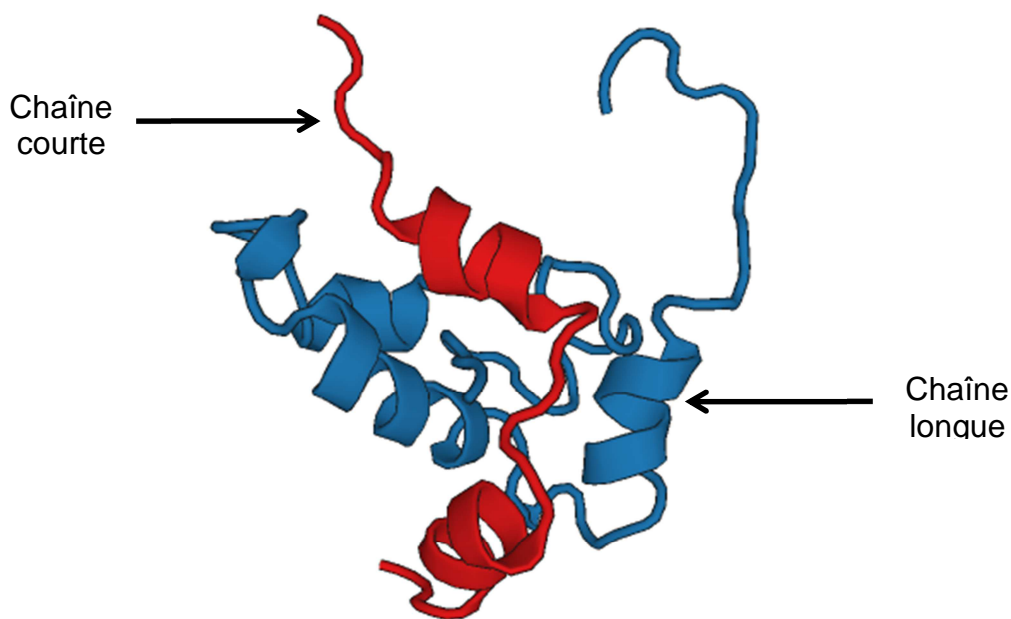


Figure 12 : Représentation schématique 3D de la napine (Bnlb) (Rico et al., 1996).

La présence des ponts disulfures entraîne une grande stabilité de la napine face à la température, à la force ionique et au pH (Krzyzaniak et al., 1998). Seules de très faibles variations de la structure secondaire sont observées après chauffage à 80°C pendant 10 minutes à pH alcalin (Schwenke et al., 1988). L'agrégation de la napine, majoritairement due à des interactions hydrophobes après déploiement de la protéine, s'observe à des températures élevées (90°C) (Krzyzaniak et al., 1998). La napine ne subit aussi que très peu de changements de conformations à pH acide ou basique, en présence de divers électrolytes ainsi que dans des milieux dont la force ionique est inférieure à 0,5M (Krzyzaniak et al., 1998 ; Folawiyo & Apenten, 1997).

2.2. Protéines animales

2.2.1. La Caséine β

Dans le lait, on distingue deux groupes de protéines :

- Les caséines représentant 80 % des protéines totales pour une teneur totale d'environ 26 g/L de lait et sont présentes sous forme d'agrégats colloïdaux. Leur rôle est le transport du phosphate de calcium de la mère à l'enfant grâce à la présence de nombreux résidus phospho-sériques dans leurs structures.
- Les protéines solubles dans le lait (20%) dont les plus présentes sont l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline de poids moléculaires de 14 et 18 KD, ont une très bonne composition en acides aminés et servent souvent de protéines de références en nutrition.

En pratique, les caséines se définissent comme étant la fraction protéique précipitant à pH 4,6 et à 20° (Thompson et al., 1965). Les caséines sont au nombre de quatre : α_1 , α_2 , β et κ de poids moléculaires de 23, 25, 24 et 19 kDa respectivement. Elles diffèrent en fonction du nombre de groupements phosphates et de chaînes glucidiques liés à certains acides aminés.

Les différents types de caséines sont susceptibles de s'associer pour former des micelles, similaires aux micelles de détergent en absence de calcium, et des agrégats (appelés improprement micelles de caséines) grâce à des liaisons hydrophobes et des ponts phospho-calciques dans le lait. La taille de ces agrégats varie entre 30 et 300 nm. La caséine β représente entre 37 et 42 % des caséines du lait soit une concentration d'environ 9 g/L (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989).

Dans l'industrie, les caséines sont utilisées sous quatre formes différentes :

- Les micelles de caséine natives présentes dans le lait.
- Les caséines présures : obtenues après précipitation des micelles après action de la présure, une protéase qui hydrolyse la caséine k responsable de la stabilité colloïdale des micelles.
- les caséines acides : obtenues par précipitation après acidification à leur pHi
- les caséinates : obtenus par neutralisation de caséines précipitées par acidification (calcium, sodium, potassium).

Les propriétés d'association des caséines sous l'action de la présure et de l'acidification sont à la base de l'ensemble des produits laitiers fermentés (fromages, yaourt,..). Elles sont aussi largement utilisées dans de nombreux produits alimentaires comme agents émulsifiants, moussant ou gélifiant. On les retrouve dans les produits laitiers reconstitués, les fromages fondus auxquels elles donnent du filant, les sauces ou les produits de charcuterie.

La France fait partie des principaux producteurs européens. En 2014, 45 500 tonnes de caséines (70%) et caséinates (30%) ont été produits en France dont 18 800 tonnes ont été exportées (FranceAgrimer, 2014).

Structure et Propriétés physico-chimiques

La caséine β est composée de 209 acides aminés (figure 13) et a une masse moléculaire d'environ 24 kDa. Elle comporte cinq résidus de sérines phosphorylés (Bandura et al., 2002). Douze variants génétiques ont été répertoriés (Farrell et al., 2004). Il s'agit de modifications de certains acides aminés, notamment les phosphosérines.

```

10           20           30           40           50           60
MKVLILACLV ALALARELEE LNVPGEIVES LSSSEESITR INKKIEKFQS EEQQQTEDEL

70           80           90           100          110          120
QDKIHFAQT  QSLVYFPFPGP IPNSLPQNIP PLTQTPVVVP PFLQPEVMGV SKVKEAMAPK

130          140          150          160          170          180
HKEMPFKYP  VEPFTESQSL  TLTDVENLHL PLPLLLQSWMH QPHQPLPPTV MFPPQSVLSL

190          200          210          220
SQSKVLPVPQ KAVPYPQRDM PIQAFLLYQE PVLGPVRGPF PIIIV
    
```

Figure 13 : Séquence de la caséine β bovine (Numéro d'accession dans la banque de données UniProt P02666). Les résidus phosphorylés sont indiqués en rouge.

Cependant ces différents variants ont la même structure globale (figure 14) qui laisse apparaître deux régions bien distinctes, donnant à la molécule son caractère amphiphile :

- Région hydrophile : domaine N-terminal (acides aminés 1 à 48) avec une forte électronégativité due aux phosphosérines (-12mV à pH 6,6).
- Région hydrophobe : domaine C-terminal (acides aminés 49 à 209) très peu chargé (Farrell et al., 2004).

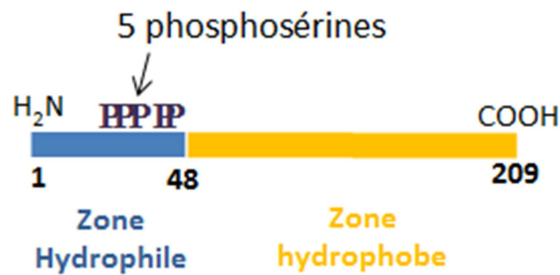


Figure 14 : Schéma simplifié de la structure primaire d'une caséine β .

La caséine β , dont le point isoélectrique est de 5,19 (Cayot & Laurent, 1998), a une structure secondaire très peu organisée comme cela a été montré par diffraction des rayons X (Kajiwara et al., 1988) et par spectroscopie Raman (Byler et al., 1988). Elle peut donc se déplier pour couvrir les interfaces. De même, ne possédant pas de résidu de cystéine, elle ne peut pas stabiliser sa structure et se lier à d'autres protéines via des ponts disulfures. C'est la protéine dont le comportement se rapproche le plus d'un polymère bi-block (Hambardzumyan et al., 2004).

De par sa composition et sa structure, la caséine β est la plus hydrophobe des caséines. Son caractère bi-bloc limite les interactions intra-moléculaires, qui organisent généralement la structure des protéines, au profit d'interactions inter moléculaires qui conduisent les monomères de caséines β à s'associer entre eux pour former des micelles comme les tensioactifs (Leclerc & Calmettes, 1997).

Association en micelles

En solution, les caséines β possèdent la propriété de s'assembler en micelles (Kajiwara et al., 1988) lorsque leur concentration est supérieure à une concentration micellaire critique (CMC). Deux types d'interactions se distinguent alors : caséine-caséine et caséine-solvant. La prédominance d'une ou l'autre des interactions dépend de l'équilibre entre les associations hydrophobes et les interactions électrostatiques et stériques (Leclerc & Calmettes, 1997). Lorsque la concentration en caséine β est faible, l'interaction caséine-solvant est prépondérante. Aucune micelle ne se forme et les caséines β restent en monomères dans le solvant. Cet état des choses est maintenu par des répulsions électrostatiques (protéines de même charge) et stériques.

A contrario, lorsque la CMC est atteinte, l'interaction caséine-caséine devient plus forte que l'interaction caséine-solvant et les caséines β tendent à s'assembler. Ce sont les interactions hydrophobes entre les groupements apolaires de la région C-terminale qui mènent à la formation de micelles permettant de limiter les contacts thermodynamiquement instables entre ces groupements et les molécules d'eau de la solution (Leclerc & Calmettes, 1997a ; Leclerc & Calmettes, 1997b). La transition de micellisation peut être considérée comme une succession d'assemblages de monomères de caséines β entre eux (Mikheeva et al., 2003). Une micelle de caséines β comporterait entre 20 et 50 monomères de caséines β (Evans & Wennerstrom, 1994), ce qui a également été confirmée par O'Connell et al. (2003). Ces micelles résultent d'un équilibre dynamique entre des monomères et des molécules déjà assemblées (O'Connell et al., 2003 ; Rollema, 1992).

Le nombre de micelles en solution dépend de plusieurs facteurs physico-chimiques tels que la température, la concentration en calcium, la concentration en protéines et l'historique de la solution (de Kruif & Grinberg, 2002 ; Leclerc & Calmettes, 1997b ; O'Connell et al., 2003 ; McClements, 1999).

L'implication d'interactions hydrophobes dans ce phénomène conduit à une forte dépendance à la température (Kumosinski et al., 1993 ; Mikheeva et al., 2003). La structure de la caséine β en fonction de la température et de la concentration en calcium a été étudiée par Dauphas et al. (2005). A une concentration en caséine β de 1 mg/ml et à une température inférieure à 15°C, les interactions hydrophobes sont faibles et les caséines β se trouvent sous forme moléculaire. En fonction de l'augmentation de la température et de l'ajout de calcium, d'autres structures ont été observées. Quatre états différents d'agrégation ont été identifiés. Lorsque la température dépasse les 35°C sans calcium, des micelles d'une taille de 20 à 25 nm se forment. En présence de 10 mM de calcium, la caséine β est toujours sous forme agrégée. A basse température, la taille des complexes est de 20 à 25 nm mais augmente jusqu'à plus d'1 μ m lorsque la solution est chauffée à plus de 35°C (figure 15).

Cette taille est cependant aussi grandement influencée par d'autres facteurs physico-chimiques comme le pH et la force ionique, qui modifient la charge nette des molécules et par conséquent modifient la force des répulsions électrostatiques. L'impact du pH et de la température sur l'association en micelles de la β -caséine a aussi été étudié à des concentrations supérieures à 1g/L. Moitzi et al. (2008) ont montré qu'à pH très acide, la température n'influçait pas la taille de la micelle à une concentration de 10 g/L et que la micellisation avait lieu dès 4°C. La taille de la micelle restait proche de 25 nm dans toutes les conditions. Cependant, à pH 6,7, une augmentation de la température entraîne une croissance de la micelle ainsi qu'un changement de forme. Ces changements de forme ont également été observés par Kajiwara et al. (1988). L'absence d'influence de la température à pH très acide indique que, dans ces conditions, les interactions hydrophobes sont négligeables devant les interactions électrostatiques.

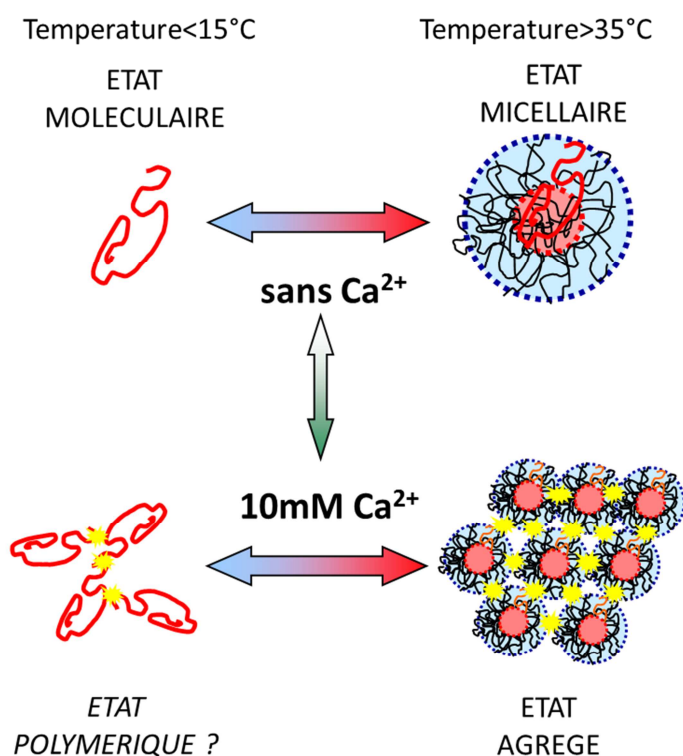


Figure 15 : Représentations hypothétiques de la caséine β en solution à 1 g/L obtenus en variant la température (<math>< 15</math> ou $> 35^{\circ}\text{C}$) et la concentration en calcium (0 ou 10 mM CaCl_2) (Dauphas et al., 2005).

2.2.2. Le Lysozyme

Le lysozyme est une protéine qui se retrouve dans de nombreux liquides physiologiques dont le blanc d'œuf. Les protéines sont le principal constituant du blanc d'œuf après l'eau. Elles représentent la majorité de sa matière sèche avec un rapport « matière azotée/extrait sec » supérieur à 90% (Lechevalier et al., 2007). La composition en protéines du blanc d'œuf est présentée dans le tableau 9.

Protéines	Concentration massique (g/L)
Ovalbumine	57
Ovotransferrine	13
Ovomucoïde	11,5
Lysozyme	3,6
Ovomucine	3,7

Tableau 9 : Principales protéines globulaires constituant le blanc d'œuf de poule d'après Stevens (1991).

Le lysozyme est une enzyme ayant une activité antibactérienne. Il provoque la lyse des bactéries à coloration Gram⁺ par hydrolyse de la liaison $\beta(1\rightarrow4)$ entre l'acide *N*-acétylmuramique et la *N*-acétylglucosamine des polysaccharides de la paroi bactérienne (McKenzie & White, 1991). C'est aussi une protéine riche en acides aminés essentiels tels que la cystéine, la méthionine, le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine ce qui en fait une protéine intéressante pour la nutrition humaine.

En France, l'utilisation du lysozyme dans l'industrie agro-alimentaire se limite pratiquement à la fromagerie afin de lutter contre la prolifération des bactéries butyriques (Awadé et al., 1994). Cette utilisation est autorisée depuis 1989 dans la fabrication de la plupart des fromages (J.O. du 1^{er} octobre 1989). L'utilisation du lysozyme est bien plus répandue au Japon où il peut être utilisée dans la conservation des produits carnés, produits de la mer, des légumes et même du vin et du saké (Proctor & Cunningham, 1988).

Structure et Propriétés physico-chimiques

Le lysozyme est une protéine globulaire basique d'un poids moléculaire de 14,3 kDa et ayant un point isoélectrique de 10,7 (Powrie & Nakai, 1986). Il est constitué de 129 acides aminés dont une grande partie est ionisable (20%) (figure 16).

```
      10          20          30          40          50          60
MRSLLILVLC FLPLAALGKV FGRCELAAAM KRHGLDNYRG YSLGNWVCAA KFESNFNTQA

      70          80          90         100         110         120
TNRNTDGSTD YGILQINSRW WCNDGRTPGS RNLCNIPCSA LLSSDITASV NCAKKIVSDG

     130         140
NGMNAWVAWR NRCKGTDVQA WIRGCRLL
```

Figure 16 : Séquence du lysozyme de blanc d'œuf de poulet (Numéro d'accès dans la banque de données UniProt P00698).

La protéine comprend 9 acides aminés acides et 16 acides aminés basiques. Au niveau de la structure secondaire, le lysozyme est constitué de 39% d'hélices α et de 11% de feuillets β (Diamond, 1974). La structure tridimensionnelle de la protéine est quant à elle organisée en deux domaines : le domaine α majoritairement composé d'hélices α et le domaine β composé d'une hélice 3_{10} et d'un feuillet β antiparallèle constitué de trois brins (McKenzie & White, 1991). De plus, la présence de 8 résidus cystéine conduit à la formation de 4 ponts disulfures qui stabilisent cette structure tertiaire. Trois de ces ponts sont des liaisons intradomaines (Cys₆-Cys₁₂₇, Cys₃₀-Cys₁₁₅ pour le domaine α , Cys₆₄-Cys₈₀ pour le domaine β) alors que le quatrième pont relie les deux domaines entre eux (Cys₇₆-Cys₉₄) (McKenzie & White, 1991).

De par sa structure, le lysozyme de blanc d'œuf est une protéine relativement stable dont la température de dénaturation est de l'ordre de 74°C dans des conditions de pH et de force ionique physiologiques (Shih & Kirsch, 1995 ; Chang & Li, 2002).

C'est également une protéine très soluble à 20°C en présence de faibles concentrations de NaCl (Howard et al., 1988).

Le chauffage à sec à 80°C du lysozyme induit une agrégation immédiate de la protéine lors de la solubilisation aux pH 7 et 9 mais pas à pH 3,6. Cette agrégation, qui augmente avec le temps de chauffage, améliore fortement les propriétés moussantes du lysozyme (Desfougères et al., 2008). De plus, le lysozyme est capable d'interagir à l'interface air-eau avec les autres protéines par des interactions électrostatiques dans un système ternaire ovalbumine-ovotransferrine-lysozyme (Lechevalier et al., 2005).

Le lysozyme est donc similaire à la napine sur plusieurs aspects comme son point isoélectrique et sa masse moléculaire. Il est alors intéressant de comparer les assemblages formés par une de ces protéines à ceux de l'autre.

2.3. Récapitulatif des principales propriétés physico-chimiques des protéines animales et végétales étudiées

Afin d'aider à l'interprétation des résultats, les principales caractéristiques des protéines végétales et animales utilisées durant l'étude sont résumées dans le tableau 10. On peut ainsi voir que les protéines 7S et 11S de soja présentent de fortes similitudes avec les protéines 7S et 11S de pois. Ce sont des protéines d'un gros poids moléculaire, peu solubles à pH 7. Elles sont composées de sous-unités qui s'organisent en trimères pour les protéines 7S et en hexamères (formés par l'empilement de deux trimères) pour les protéines 11S. En fonction du pH, ces sous-unités vont s'associer et se dissocier et jouer sur la solubilité de la protéine. Plus précisément, les protéines 7S possèdent une masse moléculaire de l'ordre de 190kDa, une organisation structurale en trimère et un point isoélectrique proche (de 4.6 à 4.9). Seule la solubilité aux pH étudiés de la protéine 7S de soja est légèrement plus favorable que celle de la protéine 7S du pois. De façon similaire, les protéines 11S du soja et du pois possèdent une masse moléculaire élevée (entre 320 et 400 kDa) et s'organisent sous forme d'hexamères. Leurs solubilités sont identiques.

Par contre, les protéines 7S et 11S de soja et de pois se différencient par leur hydrophobicité et leurs charges de surface (Kimura et al., 2008).

La protéine 2S de colza ne présente aucune homologie avec les protéines 7S et 11S du soja ou du pois. C'est une petite protéine globulaire, de faible poids moléculaire, très stable face au pH et à la température. Elle est également très soluble aux pH étudiés. C'est également une protéine basique (pI = 10) contrairement aux protéines de pois et de soja. La napine présente, en revanche, une certaine homologie avec le lysozyme (Schmidt, 2004). En effet, le lysozyme est, comme la napine, une protéine globulaire très stable, qui possède un point isoélectrique élevé (10,7 et 10-11 pour la napine), une faible masse moléculaire (380 dalton seulement les séparent) et un même pourcentage d'acides aminés hydrophobes (40 et 42%) (Schmidt, 2004).

La caséine β possède une structure très différente. C'est une chaîne qui peut être vue comme un polymère bi-bloc peu organisé mais qui va pouvoir s'associer en micelles en fonction de la concentration totale en protéines, de la température et de la concentration en calcium.

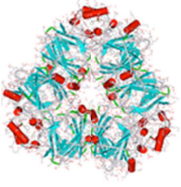
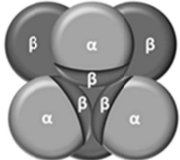
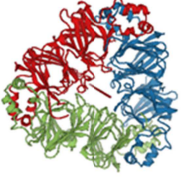
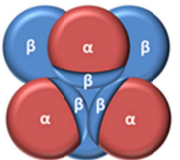
	Protéines végétales				Protéines animales		
	Soja		Pois		Colza	Oeuf	Lait
Nom	β -conglycinine	Glycinine	Viciline Convicine	Légumine	Napine	Lysozyme	Caséine β
Classification	Globuline 7S	Globuline 11S	Globuline 7S	Globuline 11S	Albumine 2S		
Masse moléculaire	180 – 210 kDa	320 – 375 kDa	150 – 190 kDa	330 – 410 kDa	12,5 – 14,5 kDa	14 kDa	24 kDa
Structure	Trimérique 	Hexamérique Vue supérieure 	Trimérique 	Hexamérique Vue supérieure 	Globulaire (très stable)	Globulaire (très stable)	Structure secondaire peu organisée Formation de micelles
Point isoélectrique	4,9	4,9	4,6	4,7	10	10,7	5,2
Solubilité dans l'eau à pH 7	-	--	--	--	+++	+++	+++

Tableau 10 : Récapitulatif des propriétés physico-chimiques des protéines utilisées durant l'étude

3. Assemblages de Protéines

La formation d'assemblages entre protéines de même nature et de natures différentes est un phénomène très répandu prenant place naturellement chez les êtres vivants et permettant le fonctionnement de nombreux mécanismes biologiques (Sidelmann et al., 2000 ; Gell & Jackson, 1999 ; Bowers et al., 2004 ; Milligan, 1996). La formation de tels complexes a donc fait l'objet de nombreuses théories (Kortemme & Baker, 2002 ; Zhang et al., 2005 ; Nocek et al., 1996). La formation d'assemblages dans les organismes vivants peut également être associée à des phénomènes non désirés et à des maladies plus ou moins graves. Ce phénomène est également présent en dehors des organismes vivants et peut mener à la formation de structures très diverses, que ce soit par la taille (de quelques nanomètres à plusieurs micromètres), la forme ou les propriétés fonctionnelles (pouvoirs gélifiant, moussant, émulsifiant, vecteur de molécules...). La drépanocytose, maladie du sang dans laquelle les globules rouges modifient leur forme et provoquent des symptômes comme l'anémie, l'occlusion de vaisseaux sanguins etc, est associée à un changement d'hydrophobicité de l'hémoglobine qui va alors s'associer et précipiter sous la forme d'agrégats fibreux (Harrington et al., 1997). De nombreuses maladies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington sont également liées à des phénomènes d'agrégation de protéines (Ross & Poirier, 2004).

Mais les phénomènes d'association entre protéines dans les systèmes alimentaires diffèrent de ceux observés dans les organismes vivants (Mezzenga et al., 2005 ; Ubbink et al., 2008). Dans les organismes, les conditions de pH, de force ionique et de température sont relativement stables alors que dans les produits alimentaires, toutes ces conditions peuvent énormément varier. De plus, la concentration en protéines tend à être plus haute dans l'alimentaire que dans les organismes vivants (Mezzenga & Fischer, 2013).

Tous ces facteurs intrinsèques ou extrinsèques peuvent influencer la nature des assemblages entre protéines. Connaissant les principales propriétés physico-chimiques des protéines utilisées durant l'étude, il paraît important de rappeler dans un premier temps les différents types d'interactions susceptibles d'exister entre macromolécules ainsi que les

paramètres pouvant influencer ces interactions pour présenter ensuite la formation d'assemblages en fonction de ces facteurs pour une protéine et pour un couple de protéines.

3.1. Types de Liaison

Les interactions entre macromolécules pouvant entraîner la formation de complexes ont été regroupées en trois classes par Tolstoguzov (1997) :

- 1) les interactions entre les molécules chargées,
- 2) les interactions entre les résidus acides ou basiques des chaînes latérales des macromolécules,
- 3) les interactions entre les autres chaînes latérales.

3.1.1. Liaisons covalentes

Les liaisons covalentes sont spécifiques et proviennent du partage d'électrons entre deux atomes d'une même macromolécule ou de deux molécules différentes. Ce type d'interaction a souvent un rôle très important dans la structure et la stabilité des protéines. Il existe deux types de ces liaisons très énergétiques (200 à 800 kJ.mol⁻¹) :

- Liaisons de type peptidique : liaison entre les groupements carboxyliques et les groupements amines des acides aminés. La formation de ces liaisons très énergétiques nécessite fréquemment de fortes températures ou la présence d'agents biologiques ou encore chimiques.
- Ponts disulfures : entre les groupements thiols des résidus cystéine pour former des liaisons intra- et/ou inter-moléculaires (Croguennec et al., 2004). Ces ponts disulfures se retrouvent par exemple sur le lysozyme et stabilisent énormément sa structure (McKenzie & White, 1991 ; Chang & Li, 2002). La formation de ces liaisons est également favorisée par des températures élevées et la présence de catalyseurs, tel le cuivre, qui favorise les réactions d'oxydation (Bouhallab et al., 2004).

3.1.2. Liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogènes ont un caractère électrostatiques et s'établissent entre un atome d'hydrogène (accepteur d'électrons) lié à un atome électronégatif (N, O ou S) et un autre atome électronégatif (O d'un groupe carbonyle par exemple). Ce type de liaison a par exemple été observé lors de l'auto-association de la caséine β en micelles (Faizullin et al., 2013) et lors de la formation de complexes entre la gélatine et la pectine (Braudo & Antonov, 1993). Les macromolécules les plus susceptibles de former ce type de liaison sont celles possédant des fonctions amide, éther ou encore alcool (Azegami et al., 1999).

Les basses températures favorisent ce type de liaison. L'énergie de ces liaisons est dépendante de l'électronégativité des atomes et de leur orientation dans la liaison : l'énergie est la plus élevée lors de l'alignement des deux atomes électronégatifs et de l'atome d'hydrogène impliqués dans la liaison. L'énergie de ces liaisons varie entre 10 et 30 KJ. Mol⁻¹.

3.1.3. Liaisons hydrophobes

Les macromolécules peuvent encore interagir pour former des complexes *via* des associations hydrophobes. Ces associations s'établissent entre des domaines apolaires, souvent lors de modifications conformationnelles de la structure des macromolécules permettant aux zones hydrophobes d'entrer en contact. Les interactions hydrophobes sont de nature endothermique et sont donc favorisées par l'augmentation de la température à l'inverse des liaisons hydrogènes. L'énergie de ces associations hydrophobes est de l'ordre de 2 à 10 kJ.mol⁻¹.

3.1.4. Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques attractives ou répulsives se mettent en place entre des particules de charges électriques opposées ou de même signe. C'est une interaction essentielle dans la formation de complexes macromoléculaires, particulièrement dans l'initiation de phénomènes tels que la coacervation, et de nombreuses théories ont été

développées sur ce type d'interaction (Pogodina & Tsvetkov, 1997; Kong & Muthukumar, 1998 ; Netz & Joanny, 1999).

L'énergie de ces liaisons est de l'ordre de 25 à 50 kJ.mol⁻¹. Elle est très variable et dépend énormément de la valeur de la charge des molécules impliquées, de la répartition de ces charges sur la molécule, de la distance entre les deux molécules et des conditions physico-chimiques du milieu (pH, force ionique, nature des ions et température).

3.2. Modulation des assemblages par les conditions physico-chimiques

La formation d'assemblages entre macromolécules par une ou plusieurs des interactions précitées dépend de leur type et de leur force (Mossa et al., 2004) qui vont être influencés par plusieurs paramètres de nature extrinsèque aux protéines comme les paramètres physico-chimiques du milieu (pH, force ionique, concentration totale, température (van der Linden & Venema, 2007) ou intrinsèques comme la conformation protéique.

Plusieurs auteurs ont montré que la formation d'agrégats protéiques stables peut être réalisée en modulant les interactions répulsives à longue distance et les interactions attractives à courte distance en variant la température et la force ionique dans des solutions de lysozyme (Stradner et al., 2004). La modélisation a également permis de montrer que la structure de ces agrégats peut être modifiée en changeant l'équilibre entre les deux types d'interaction (Mossa et al., 2004).

3.2.1. Importance de la conformation protéique

Le rôle joué par la conformation protéique dans la formation d'assemblages a été mis en évidence sur des protéines globulaires car les assemblages nécessitent souvent une modification de leur structure tridimensionnelle (Chiti & Dobson, 2006). Par exemple, les propriétés d'assemblage des protéines globulaires sont accrues dans les conditions physico-chimiques où ces protéines sont légèrement dépliées, conduisant fréquemment à l'exposition au solvant de régions apolaires initialement cachées au cœur de la structure et

permettant des interactions hydrophobes entre ces protéines. La modification de la conformation des protéines est le plus souvent réalisée en jouant sur la température ou les conditions physico-chimiques du milieu.

L'influence de la conformation protéique a également été montrée sur la forme de l'assemblage. Nigen et al. (2007) ont montré que la structure des assemblages entre le lysozyme et l' α -lactalbumine dépendait de la conformation adoptée par l' α -lactalbumine qui varie selon la température. A 10°C, l' α -lactalbumine adopte une forme dite « native-like » et des agrégats simples sont formés tandis qu'à 45°C, l' α -lactalbumine prend une conformation de type « molten-globule » et son interaction avec le lysozyme mène alors à la formation de microsphères.

3.2.2. Impact des paramètres physico-chimiques

Le pH

Le pH agit sur le degré d'ionisation des groupements portés par les chaînes latérales des protéines. Le pH modifie la charge des protéines ce qui va influencer sur leur solubilité et sur la formation d'assemblages. Dans des systèmes avec un seul type de protéines, une théorie reliant la forme des assemblages protéiques à la densité de charge globale des protéines et à la balance des interactions moléculaires mises en jeu a été proposée par van der Linden & Venema (2007). Dans le cas de protéines complexées avec une charge globale faible, une structure sphérique est attendue pour l'agrégat. A contrario, dans le cas d'une densité de charge importante de l'assemblage, les agrégats ont plutôt une forme linéaire favorisée par les répulsions électrostatiques.

La force ionique

La force ionique va modifier la conformation des assemblages protéiques en écrantant les charges de surface des protéines.

En solution aqueuse, le potentiel électrostatique de surface de protéines régit la distribution des ions à la surface de ces protéines. Pour équilibrer les charges de surfaces, les contre-ions du milieu s'accumulent à l'interface avec la protéine tandis que les co-ions sont repoussés. La distance des différents ions avec la protéine va dépendre de l'intensité du potentiel de surface des protéines.

Lors de la formation d'assemblages protéiques complexes, incluant des protéines de charge globale opposée, *via* des interactions électrostatiques à longue distance, l'augmentation de la force ionique du milieu va aussi masquer les charges de surface des protéines ce qui va réduire les forces électrostatiques à longue distance qui sont attractives dans cette configuration. Par conséquent, l'assemblage protéique entre les protéines de charges opposées est réduit voir même inhibé selon la force ionique de la solution et les forces électrostatiques attractives entre les protéines (Nigen, 2008).

La température

La température peut influencer de deux façons différentes sur la formation d'assemblages :

- En modifiant l'importance des interactions impliquées dans le phénomène d'agrégation. Une hausse de la température va permettre d'augmenter les interactions hydrophobes tandis qu'à faible température, les interactions électrostatiques seront favorisées (Koning & Visser, 1992).
- En provoquant des changements de conformation de la protéine. En augmentant la température et selon leur stabilité thermique, certaines protéines vont subir des modifications de structure entraînant l'exposition de surfaces hydrophobes favorisant l'agrégation (McSwiney et al., 1994 ; Qi et al., 1997; Okamura-Ikeda et al., 2003).

3.2.3. Combinaison des paramètres physico-chimiques et influence sur l'agrégation d'une protéine

Avec tous ces facteurs en jeu, les possibilités d'agrégation sont multiples et il est possible de former des assemblages très différents à partir d'une protéine en jouant sur les conditions physico-chimiques. La température est un moyen simple pour modifier la structure d'un grand nombre de protéines et provoquer la formation d'assemblages protéiques. La dénaturation thermique de nombreuses protéines mène à leur agrégation β -lactoglobuline (de la Fuente et al., 2002), ovalbumine (Weijers et al., 2003), lysozyme (Krebs et al., 2007), lactoferrine (Bengoechea et al., 2011) ... par déploiement de zones hydrophobes ou groupements réactifs qui vont permettre la formation d'agrégats (figure 17) (Schokker et al., 2000).

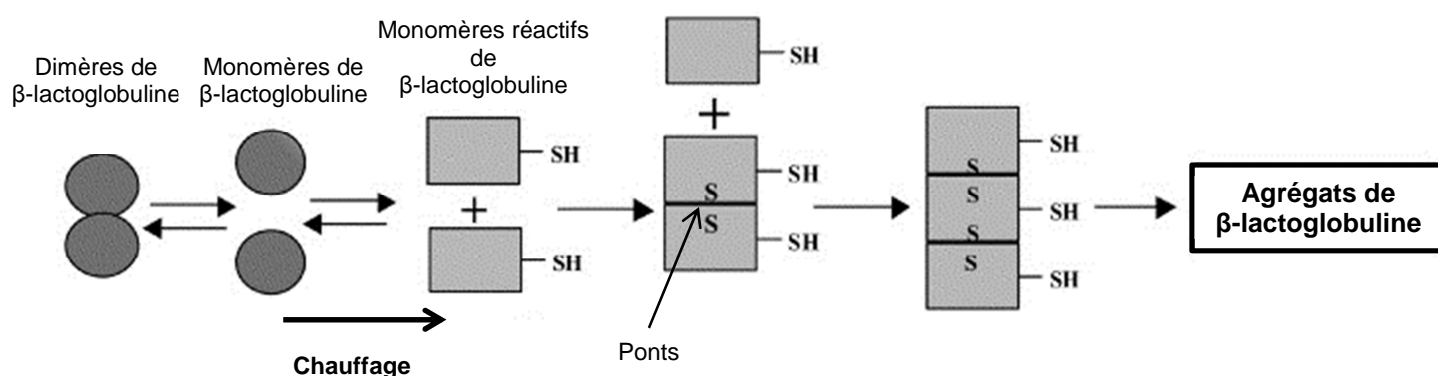


Figure 17 : Mécanisme de formation des agrégats de β -lactoglobuline proposé par Schokker et al. (2000).

Un traitement thermique peut ainsi conduire à la formation de structures sphériques à partir de protéines globulaires. Si on est dans le cas d'une protéine majoritairement hydrophobe comme la tropoélastine, la température permet aussi la complexation. A 35°C, la tropoélastine reste à l'état de monomères. Lorsque la température est supérieure à 35°C, les protéines s'assemblent en particules sphériques de diamètre d'environ 2 à 6 μm par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes (Clarke et al., 2006) (figure 18). De plus, le phénomène est réversible.

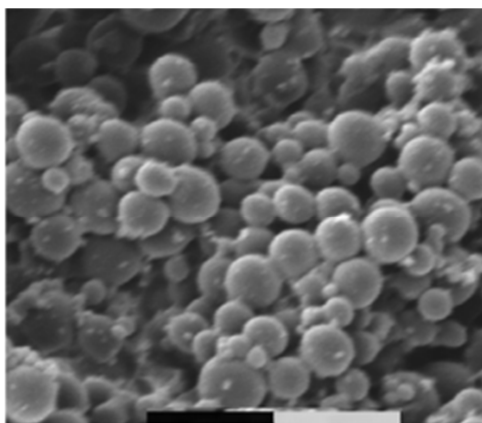


Figure 18 : Observation par microscopie électronique à balayage à haute résolution de microsphères de tropoélastine (Clarke et al., 2006). La barre d'échelle est de 10 μm .

Associé à d'autres paramètres, des modifications du pH permettent également d'obtenir différents types d'assemblages. Pedersen et al. (2006) ont montré que l' α -lactalbumine pouvait s'agréger après une incubation à pH 3 et à 30°C durant plusieurs jours. A ce pH, le Ca^{2+} est déchargée de l' α -lactalbumine dont la structure est modifiée et devient de type « molten globule » (figure 19) avec une exposition plus grande de sa surface hydrophobe. Cette conformation en « molten globule » correspond à un état déplié intermédiaire (dû au relargage du calcium) avec une structure secondaire très proche et une taille légèrement plus grande (10 à 20%) que celle à l'état natif.

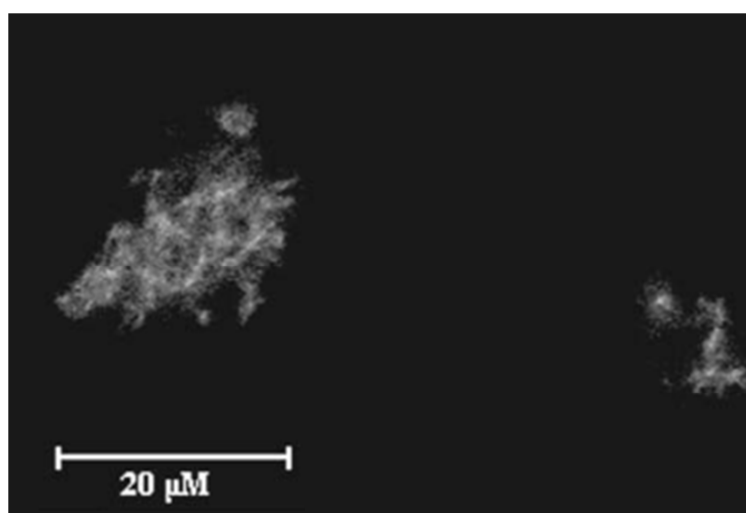


Figure 19 : Observation par microscopie confocale à balayage laser d' α -lactalbumines agrégées à pH 3 (Pedersen et al., 2006).

En modifiant les conditions d'agrégation, l' α -lactalbumine peut aussi s'assembler en fibres de type amyloïde après incubation à 37°C, pH 2 et 100 mM NaCl (Goers et al., 2002) (figure 20). A pH acide et avec une température d'incubation supérieure à 50°C, le lysozyme peut former des fibrilles similaires (Krebs et al., 2000 ; Arnaudov & de Vries, 2005) (figure 20).

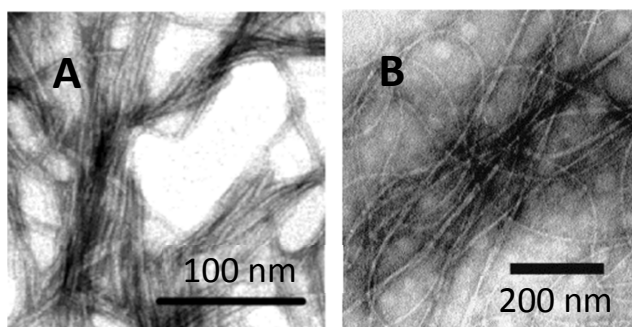


Figure 20 : Observation de fibres amyloïdes résultant de l'assemblage de l' α -lactalbumine (A) (Goers et al., 2002) et du lysozyme (B) (Krebs et al., 2000) par microscopie électronique.

Le contrôle de la forme de l'assemblage en fibres amyloïdes ou en particules sphériques peut ainsi être réalisé avec de nombreuses protéines globulaires (la β -lactoglobuline bovine, l'albumine de sérum bovin, le lysozyme, l'insuline bovine...) par un traitement thermique à un pH voisin de leur point isoélectrique (Bromley et al., 2005 ; Bromley et al., 2006 ; Krebs et al., 2007) (figure 21). La formation de ces structures est permise par l'absence de répulsions électrostatiques au point isoélectrique des protéines et par la légère dénaturation due au traitement thermique.

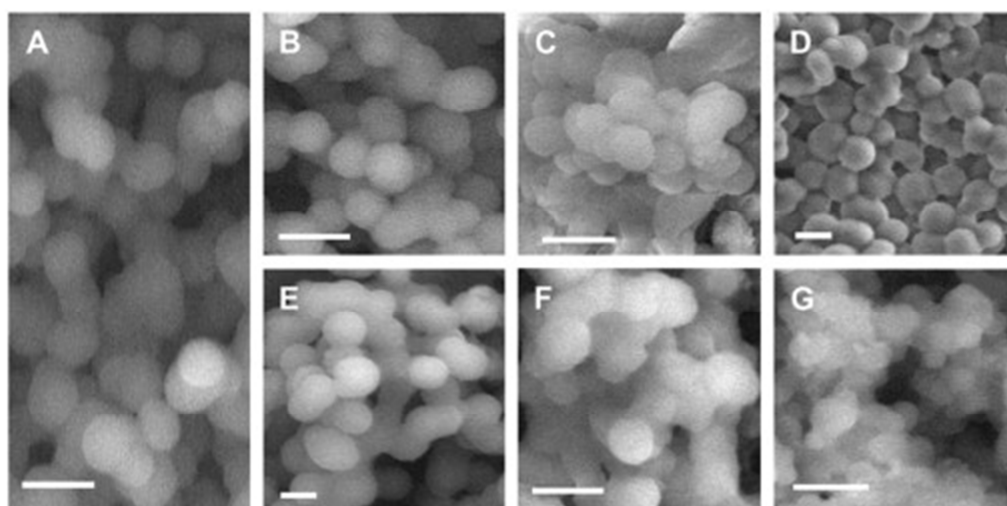


Figure 21 : Observation par microscopie à balayage environnementale de particules sphériques résultant de l'assemblage de différentes protéines à leur point isoélectrique lors de traitement thermique (90°C) en présence de NaCl (0,1M) : (A) β -lactoglobuline ; (B) albumine de sérum bovine ; (C) insuline bovine ; (D) myoglobine de cheval ; (E) Lysozyme ; (F) Transthyrétine humaine ; (G) α -synucléine humaine (Krebs et al., 2007).

Pour la β -lactoglobuline, par exemple, il a été montré qu'il était possible de former deux structures supramoléculaires différentes en ne modifiant que le pH. En chauffant la protéine (6,7 nm de diamètre hydrodynamique moyen) à 80°C, Zúñiga et al. (2010) ont observé, par diffusion dynamique de la lumière, la formation de grands agrégats sphériques (96 nm de diamètre hydrodynamique moyen) à pH 6 et de petits agrégats plus aplatis à pH 6,8 (42 nm de diamètre hydrodynamique moyen). A pH 6,4, la solution de β -lactoglobuline est composée d'un mélange des deux formes précédemment citées (49 nm de diamètre hydrodynamique moyen). Ils ont proposé un mécanisme d'agrégation dépendant du pH qui va influencer sur l'importance des interactions impliquées (figure 22) dont les premières étapes correspondent au mécanisme proposé par Schokker et al. (2000) (figure 17). Le chauffage permet de rendre le monomère de β -lactoglobuline réactif par déploiement en exposant des zones hydrophobes et le groupement thiol, normalement situés à l'intérieur de la protéine, ce qui entraîne la formation d'agrégats intermédiaire de faibles poids moléculaires. En fonction du pH, ces agrégats vont s'associer en plus ou moins grosses particules selon que l'importance des liaisons non covalentes soit favorisée à pH 6 ou que la réactivité des groupements thiol soit plus élevée à pH 6,8, favorisant la formation de ponts disulfures.

Avec la même protéine, il est possible de former d'autres suspensions stables d'agrégats bien définis (Schmitt et al., 2009). Pour cela, la protéine est d'abord solubilisée à faible force ionique et à des pH légèrement supérieurs ou inférieurs à son point isoélectrique (pH 4,5 - 4,7 ou pH 5,7 - 5,9) puis chauffée. Dans ces conditions, les particules formées constituent une population monodisperse dont le diamètre moyen est d'environ 200 nm. Les particules formées à pH 4,6 sont un peu plus grandes que celles formées à pH 5,8. Sachant que les charges nettes globales des agrégats sont respectivement de +30 mV et de -40 mV dans ces conditions, il a été supposé que la charge de l'agrégat limite sa croissance et permet la formation d'une population monodisperse (Schmitt et al., 2009).

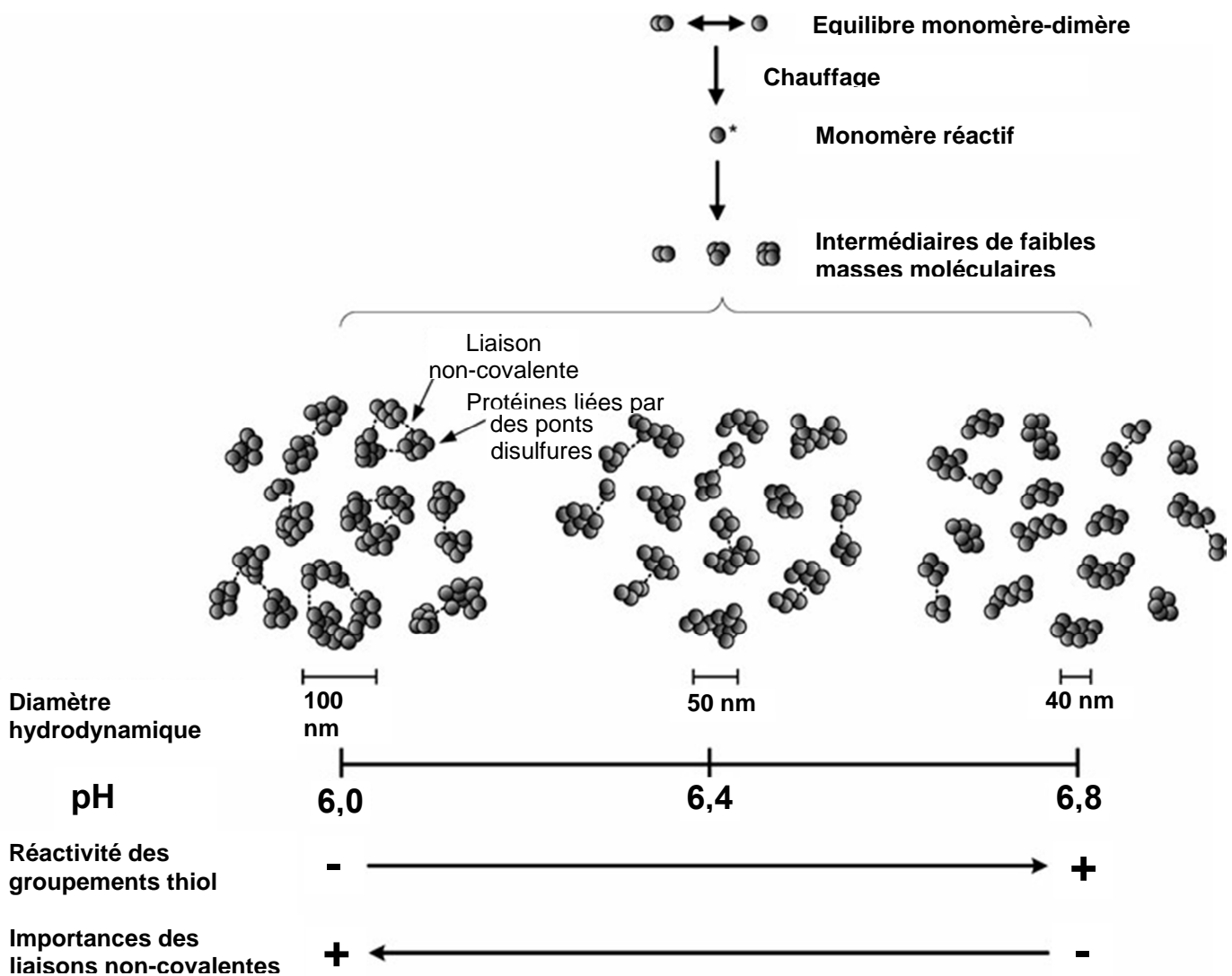


Figure 22 : Proposition de schéma pour la formation d'agrégats de β -lactoglobuline et type de liaison en fonction du pH (Zúñiga et al., 2010).

Pour certaines protéines, une subtile combinaison entre la force ionique et la température permet de former des agrégats sphériques dans des conditions de pH différentes de leur point isoélectrique si la force ionique du milieu est fortement augmentée. Par exemple, l'agrégation de la lactoferrine est fortement dépendante de la concentration en sel. A faible force ionique (pH = 7), les protéines sont principalement sous forme monomériques alors que lorsque, la force ionique augmente, des agrégats se forment (Rabiller-Baudry et al., 2001 ; Mela et al., 2010).

Une faible force ionique peut également favoriser la formation d'agrégats. Ainsi, la β -lactoglobuline forme des agrégats protéiques à des pH proches de son point isoélectrique si la force ionique est peu élevée (4,5 mmol/L NaCl). A contrario, à pH 5, son agrégation diminue fortement lorsque la concentration en NaCl augmente de 4,5 mmol/L à 100 mmol/L. (Majhi et al., 2006). Mais la force ionique ne joue pas seulement sur la formation ou non d'agrégats. Elle peut aussi influencer la forme et la taille des agrégats formés comme pour les fibrilles de β -lactoglobuline formées par chauffage de la protéine à pH 2. Dans ces conditions de formation, la diminution des charges électrostatiques par l'ajout de sels augmente la vitesse d'agrégation et conduit à des fibrilles plus courtes et plus courbées mais ayant la même épaisseur qu'à des forces ioniques inférieures (Arnaudov & de Vries, 2006).

En plus de la force ionique, le type de sels peut également influencer sur les agrégats protéiques. On a déjà vu précédemment l'agrégation de l' α -lactalbumine à pH acide. Ces propriétés d'agrégation sont augmentées par la présence d'ions dans le milieu qui déstabilisent encore plus l' α -lactalbumine. Et cette déstabilisation et donc le potentiel d'agrégation varie en fonction du sel employé. Le pouvoir déstabilisant des anions suit la série d'Hofmeister : $\text{Cl}^- < \text{H}_2\text{PO}_4^- < \text{SO}_4^{2-}$ (Goers et al., 2002).

Dans d'autres situations, il est nécessaire d'apporter des modifications à la protéine pour favoriser l'agrégation. Ainsi, des microfibrilles de caséine κ peuvent être formées après réduction des ponts disulfures à pH neutre (Farrell Jr et al., 2003 ; Thorn et al., 2005 ; Leonil et al., 2008).

3.3. Assemblages impliquant deux types de protéines

Cependant, on est ici dans la situation de systèmes contenant une seule protéine. Or l'ajout d'une autre protéine va influencer l'agrégation. Par exemple, il a été montré que l'ajout de lactoferrine inhibe l'assemblage de l' α -lactalbumine (Takase, 1998). De la même manière, l'auto-association de la caséine κ en fibres amyloïdes peut être stoppée par son interaction avec les caséines β et α (Thorn et al., 2005). Pour les mélanges à deux protéines, la formation d'assemblages et la caractérisation des mécanismes se complexifient donc du fait des propriétés physico-chimiques différentes des deux protéines impliquées dans l'assemblage. Dans ces systèmes binaires, il existe souvent une gamme de pH pour laquelle les deux protéines portent des charges nettes opposées. Dans ces conditions, les interactions électrostatiques entre les deux protéines sont attractives et peuvent entraîner la formation de structures supramoléculaires et l'augmentation de la force ionique va réduire l'agrégation par écrantage des charges des protéines. A contrario, en se fixant dans des conditions de pH où les deux protéines possèdent le même signe de charge globale, l'ajout de sel en solution va généralement favoriser l'agrégation. Le pH et la force ionique ont donc un rôle très important sur l'agrégation de deux protéines (Bouhallab & Croguennec, 2014) (figure 23). Les exemples ci-dessous illustrent l'influence de ces paramètres.

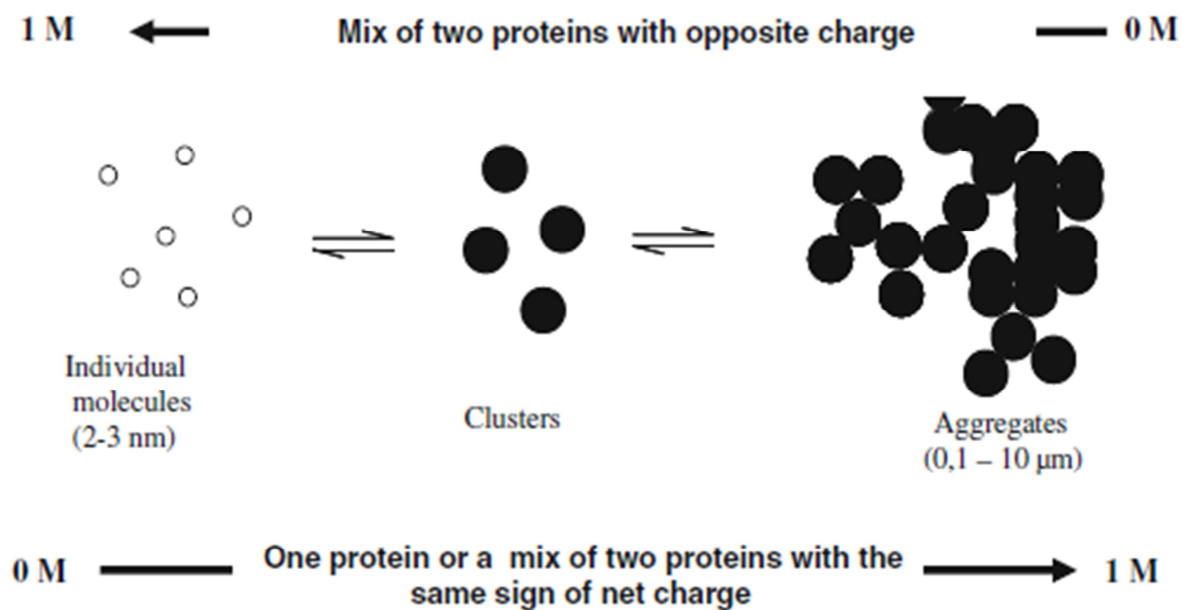


Figure 23 : Influence de la force ionique sur l'agrégation dans des systèmes protéiques à un pH fixé (Bouhallab & Croguennec, 2014).

Le tableau 11 présente des assemblages impliquant deux types de protéines et formés par auto-agrégation ou induites par des conditions particulières.

Comme pour les systèmes mono-protéiques, c'est généralement un ensemble de facteurs qui permet de réaliser et de moduler l'agrégation. L'influence des conditions physico-chimiques sur des systèmes bi-protéiques est décrite dans les paragraphes suivants en s'appuyant sur les exemples présentés dans le Tableau 11. Les effets du ratio, du pH, de la force ionique et de la température sur un ou plusieurs couples protéiques seront expliqués afin de mieux comprendre les conditions de formation des assemblages protéiques.

Protéine 1	Protéine 2	Conditions physico-chimiques d'étude	Forme	Référence
Lysozyme	Lysozyme succinylé	Concentration en protéines = 1 g/L Ratio = 0/1 à 1/0 (v/v) pH = 7,5 Concentration en NaCl = 0 à 40 mM T° = 25 à 50°C	Indéterminée	Biesheuvel et al. (2006)
Lysozyme	β-lactoglobuline	Concentration en protéines = 1 et 10 g/L Ratio = 1/5 à 5/1 (v/v) pH = 3 à 11 Concentration en NaCl = 0 et 0,1 M T° = 20°C	Indéterminée	Howell et al. (1995)
Lysozyme	α-lactalbumine	Concentration en protéines = 1 et 10 g/L Ratio = 1/5 à 5/1 (v/v) pH = 3 à 11 Concentration en NaCl = 0 et 0,1 M T° = 20°C	Indéterminée	Howell et al. (1995)
Ovalbumine	Lysozyme	Concentration en protéines = 60 μM de lysozyme et 170 μM d'ovalbumine pH = 5,8 à 8,6 Concentration en NaCl = 6 à 20 mM T° = température ambiante	Microsphères	Desfougères et al. (2010)
BSA	Lysozyme	Concentration en protéines = 58,5 μM de lysozyme et 12,5 μM de BSA pH = 7,5 à 10,5 Concentration en NaCl = 8,5 à 25 mM T° = température ambiante	Microsphères	Desfougères et al. (2010)
Ovalbumine	Avidine	Concentration en protéines = 3 μM d'avidine et 4,4 μM d'ovalbumine pH = 5,8 à 8,6 Concentration en NaCl = 3 à 25 mM T° = température ambiante	Microsphères	Desfougères et al. (2010)
Ovalbumine dénaturée (72°C/30 min)	Lysozyme	Concentration en protéines = 1 mg/mL Ratio = 3/1 (mol/mol) pH = 7,5 Concentration en NaCl = 0 T° = 25°C	Fibrilles	Sugimoto et al. (2011)

Lysozyme	Apo α -lactalbumine	Concentration en protéines = 0,02 à 2,3 mM Ratio = 0,05 à 2 (mol/mol) pH = 7,5 Concentration en NaCl = 15 mM T° = 5 et 45 °C	Agrégats amorphes et microsphères	Nigen et al., (2007) ; Nigen et al. (2010)
Lysozyme	Apo α -lactalbumine	Concentration en protéines = 0,28 à 2,8 g/L Ratio = 1/1 (mol/mol) pH = 7,5 Concentration en NaCl = 15 à 70 mM T° = 25 et 45 °C	Agrégats amorphes et microsphères	Salvatore et al. (2011)
Lysozyme	Ovalbumine	Concentration en protéine = 0,1 % (m/m) Ratio = 1/10 (m/m) pH = 7,6 Concentration en NaCl = 0 T° = température ambiante	Aucune agrégation	Matsudomi et al. (1987)
Lysozyme	Ovalbumine dénaturée	Concentration en protéine = 0,1 % (m/m) Ratio = 0/1 à 1/3 (m/m) pH = 7,6 Concentration en NaCl = 0 T° = température ambiante	Indéterminée	Matsudomi et al. (1987)
β -lactoglobuline	α -lactalbumine	Concentration en protéines = 4 m% Ratio = 0/1 à 1/0 (m/m) pH = 5,7 à 6,2 Concentration en NaCl = 0 T° = 85°C/15 min	Microgels	Schmitt et al. (2011)
Ovalbumine	Ovotransferrine	Concentration en protéines = 0,1 à 5 mg/mL Ratio = 1/1 (m/m) pH = 5 à 8,6 Concentration en NaCl = 0 T° = 80°C/30min puis 4°C	Aucune agrégation et nanoparticules sphériques	Hu et al. (2007)
Caséine β	Lysozyme	Concentration = 1 mg/mL Ratio = 0,2 à 1,2 (mol/mol) pH = 3 à 13 Concentration en NaCl = 0 T° = température ambiante et 80°C	Micelles et nanoparticules sphériques	Pan et al. (2007)
Lysozyme	Ovalbumine	Concentration en protéines = 43 μ M Ratio = 10/1 à 1/1 (mol/mol) pH = 8 à 10,5 Concentration en NaCl = 0 T) = 80°C/90 min	Nanoparticules sphériques	Yu et al. (2006)

Caséines	Lactoferrine	Concentration en protéines = 5 et environ 10 g/L Ratio = 0/1 à 1/0 (mol/mol) pH = non contrôlé Concentration en NaCl = 0 à 0,8 mol/L T° = température ambiante	Coacervats	Anema & de Kruif (2012)
Caséine β	Lysozyme	Concentration en protéines = environ 10 g/L Ratio = 0/1 à 1/1 (m/m) pH = non contrôlé – 7,66 – 9,01 Concentration en NaCl = 0 à 0,5 mol/L	Coacervats	Anema & de Kruif (2013)
Gélatine-A	Gélatine-B	Concentration en protéines = 0,42 % gélatine-A et 0,28 % gélatine B (m/v) pH = 3,5 à 10 Concentration en NaCl = 0 T° = 25 à 55°C	Coacervats	Tiwari et al. (2009)
β -lactoglobuline A et B	α -lactalbumine	Concentration en protéines = 10 g/L Ratio = 1/1 (m/m) pH = 7 Concentration en NaCl = 0,05 M T° = 75°C	Indéterminée	Schokker et al. (2000)
β -lactoglobuline A et B	Lactoferrine	Concentration en protéines = 0 à 1 mM Ratio = 0/1 à 1/0 (mol/mol) pH = 5 à 6 Concentration en NaCl = 0 T° = température ambiante	Agrégats amorphes et coacervats	Tavares et al. (2015)
β -lactoglobuline	Lactoferrine	Concentration en protéines = 1 à 100 g/L Ratio = 1/0,25 à 1/10 (m/m) pH = 3 à 12 Concentration en NaCl = 0 à 100 mM T° = 25°C	Coacervats	Yan et al. (2013)
β -lactoglobuline	Lactotransferrine	Concentration en protéines = 5 mg/mL Ratio = 1/0 à 0,4/06 (mol/mol) pH = 5,3 à 7,4 Concentration en NaCl = 0 à 1 M T° = température ambiante	Coacervats	Anema & de Kruif (2014)

Tableau 11 : Exemples d'assemblages de deux protéines, et conditions physico-chimiques de l'étude et forme des objets.

Nigen et al. (2007, 2010) ont montré l'influence de nombreux facteurs pour des assemblages entre le lysozyme et l'apo α -lactalbumine. Lors de l'agrégation entre les deux protéines, la température va modifier la structure obtenue. Ainsi à pH 7,5, ces deux protéines forment des agrégats aux formes irrégulières à 5°C. Par contre, à 45°C, des particules sphériques régulières sont observées. La transition entre les agrégats polydisperses amorphes et les microsphères se fait entre 25 et 30°C. A 27°C a lieu un changement conformationnel de l' α -lactalbumine qui devient plus flexible. C'est donc la structure de l'apo α -lactalbumine qui va influencer la forme de l'agrégat (figure 24). Des études encore plus récentes (Salvatore et al., 2011) ont montré que c'est seulement la réorganisation structurale finale de la structure moléculaire qui est impactée par la température et donc le changement de conformation de l'apo α -lactalbumine. Peu importe la température lors du mélange des deux protéines, de petits agrégats homogènes se forment rapidement. Ces agrégats grandissent par collision et fusion et s'orientent vers une forme particulière selon la température.

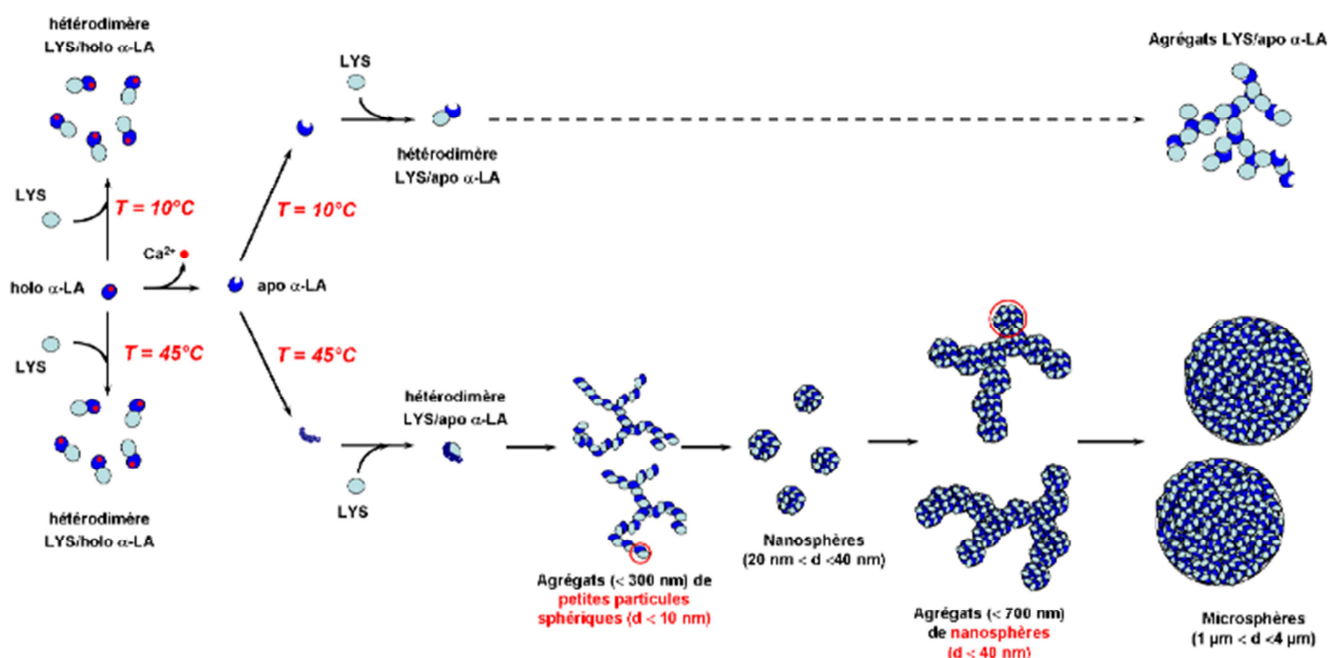


Figure 24 : Schéma du mécanisme d'interaction entre le lysozyme et l'apo α -lactalbumine en fonction de la température (Nigen, 2008).

L'influence du ratio sur la taille des agrégats formés a aussi été mise en évidence. Les agrégats formés pour un ratio molaire lysozyme/apo α -lactalbumine de 0,05 mesuraient de 1 à 2 μm , beaucoup plus petits que ceux formés à un ratio de 1,5 et ayant une taille comprise entre 20 et 50 μm . La taille des microsphères dépendait fortement de la concentration initiale en protéines passant de 100-200 nm pour une concentration en protéines de 0,02 mM à 3-5 μm pour une concentration variant entre 0,2 et 0,5 mM.

Ils ont également prouvé qu'une augmentation de la force ionique diminuait la taille des microsphères obtenues. Pour une force ionique de 4 à 24 mM, des microsphères d'un diamètre de 4 à 6 μm étaient formées alors que pour une force ionique dépassant 44 mM, le diamètre des sphères était toujours inférieur à 1 μm . Cela peut s'expliquer par la chute du pourcentage de protéines impliquées dans les complexes sphériques avec l'augmentation de la force ionique. Pour la force ionique la plus faible (4 mM), 75% des protéines sont agrégées alors qu'avec la force ionique la plus forte (124 mM), il n'y a plus aucun complexe formé et toutes les protéines sont libres en solution. Cependant, même lors de la diminution de la taille des agrégats, la proportion des deux protéines trouvées dans les particules sphériques reste la même quelle que soit la force ionique utilisée. Salvatore et al., (2011) ont confirmé ces résultats. Pour le même couple protéique, la fraction de protéines agrégées diminue fortement passant de 31 à 2 % pour une augmentation de la force ionique de 24 à 39 mM.

Des résultats similaires ont été obtenus pour un autre couple protéique, le lysozyme et l'ovalbumine. Dans ce cas, la dénaturation au préalable de l'ovalbumine est nécessaire à la formation d'agrégats à faible force ionique et à pH 7,6. Une augmentation de la force ionique au-dessus de 50 mM réduit fortement l'agrégation entre les deux protéines à cause de la prédominance des interactions électrostatiques (Matsudomi et al., 1987). La température permet donc de former des assemblages, à partir de protéines qui ne s'auto-associent pas, simplement en modifiant la conformation de ces protéines. De la même manière, on obtient des microsphères en chauffant à 80°C une solution de β -lactoglobuline et d' α -lactalbumine (ratio 80 :20) possédant la même charge à pH 5,7 (Schmitt et al., 2011). Sugimoto et al. (2011) ont également obtenu des agrégats en forme de fibrilles à partir de

solutions d'ovalbumine préchauffée pendant 30 minutes à 72 °C et de lysozyme à pH 7,5 avec un ratio molaire ovalbumine/lysozyme de 3 dans la solution.

D'autres agrégats sphériques sont créés (figure 25) en chauffant des solutions de protéines à des pH où leurs charges sont opposées en suivant un protocole particulier (ovalbumine/ovotransferrine, caséine β /lysozyme, ovalbumine/lysozyme) (Hu et al., 2007 ; Pan et al., 2007 ; Yu et al., 2006).

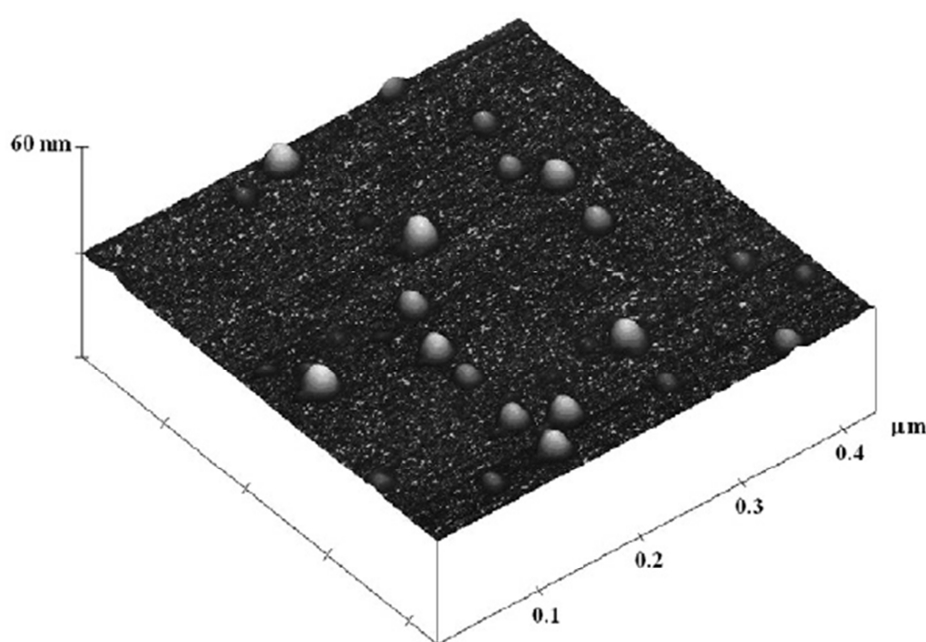


Figure 25 : Images en Microscopie à Force Atomique (AFM) des nanoparticules sphériques de caséine β et de lysozyme (Pan et al., 2007).

Les deux protéines sont mélangées dans des conditions de pH et de force ionique permettant leur auto-association par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques. Puis les solutions sont chauffées à 80°C entraînant une modification conformationnelle des protéines globulaires et engendrant donc la formation de particules sphériques (Hu et al., 2007 ; Pan et al., 2007 ; Yu et al., 2006). En fonction du pH, ces particules sphériques peuvent avoir des tailles et des charges différentes. Pour le couple, lysozyme/ovalbumine, la taille des particules augmente lorsque le pH diminue (figure 26). La solution est la plus homogène lorsque le pH est élevée et la taille des particules petite.

Biesheuvel et al. (2006) ont montré à travers l'expérimentation et la modélisation que pour deux protéines similaires de charges globales opposées, le lysozyme et le lysozyme succinylé, il était possible de moduler leur interaction en faisant varier le pH sans qu'il y ait de modification conformationnelle de la protéine.

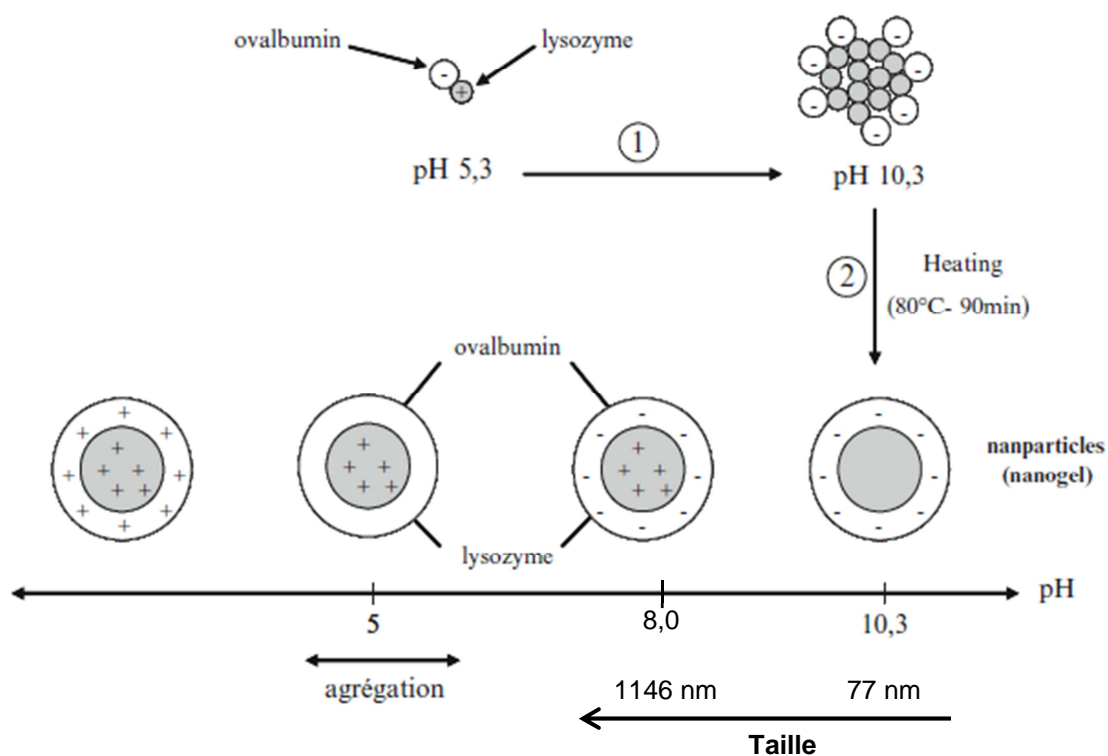


Figure 26 : Schématisation du mécanisme de formation des nanoparticules sphériques de lysozyme et d'ovalbumine selon le pH (construit par Bouhallab & Croguennec (2014) à partir de Yu et al. (2006)).

L'association entre les deux protéines n'est plus possible à des pH où les deux protéines ont la même charge globale. Ils en concluent que l'aggrégation entre les deux protéines est réalisée par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques. De la même manière, Howell et al. (1995) ont montré une influence similaire du pH sur des mélanges entre protéines globulaires de charges globales opposées (lysozyme/ β -lactoglobuline – lysozyme/ α -lactalbumine) où les interactions électrostatiques entraînent l'aggrégation. L'ajustement du pH permet également d'obtenir des structures particulières d'agrégats.

Ainsi, les mélanges ovalbumine/lysozyme, BSA/lysozyme et ovalbumine/avidine mènent à la formation de microsphères dans les gammes de pH respectives 7,4 - 8,6, 6,4 - 8, 7,4 - 9,2 (Desfougères et al., 2010). En dehors de ces pH, il n'y a pas d'agrégation si les protéines portent la même charge ou les agrégats formés sont amorphes.

La température n'influe pas toujours sur l'agrégation. Anema & de Kruif (2012) n'ont pas pu observer d'effet de la température (entre 5 et 40°C) sur des assemblages entre les caséines α et κ et la lactoferrine. La température n'a modifié ni la taille ni le nombre de complexes formés. Mais ils ont montré que la température jouait un rôle dans l'association caséine β /lactoferrine en diminuant la complexation (Anema & De Kruif, 2013). Cette influence a été associée au changement de comportement de la caséine β qui passe d'un état monomérique à un état micellaire entre 5 et 35°C. Ils en ont conclu que la partie hydrophobe de la caséine β contribuait à la complexation à 5°C.

Pour ce mélange protéique, les interactions existant entre les deux protéines entraînent la formation de coacervats. La coacervation correspond à un phénomène de séparation de phase. Lorsque deux macromolécules sont mélangées dans un solvant, la stabilité du système qui en résulte est caractérisée, dans une première approche globale, par un état d'équilibre entre une et deux phases. La formation d'une ou deux phases dépend principalement des interactions entre les deux macromolécules elles-mêmes d'une part et entre ces macromolécules et le solvant d'autre part ainsi que de la taille et de la forme de ces macromolécules. Si les deux biopolymères ont une forte attractivité l'un envers l'autre, comme c'est le cas lorsqu'on mélange deux protéines aux charges globales opposées, deux phases sont généralement obtenues à l'équilibre. Alors que la phase diluée contient de grandes quantités de solvants et (très) peu de macromolécules, le coacervat est lui principalement composé de complexes formés à partir des deux macromolécules par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques et qui se réarrangent spontanément en coacervats liquides contenant de petites quantités de solvant (Bungenberg de Jong, 1949). Pour les couples protéiques précédemment cités, les coacervats les plus gros sont formés lorsque le pH permet l'équilibre des charges nettes globales entre les deux protéines. Lorsque le pH s'éloigne de cette valeur d'équilibre, la taille des coacervats diminue. Thapon

& Brule (1986) ont également montré que l'affinité du lysozyme pour la caséine β diminuait fortement lorsque le pH passait sous 6. En coacervation, le pH peut aussi être utilisé pour moduler la fonctionnalité de coacervats bi-protéiques. Tiwari et al. (2009) ont ainsi utilisé deux protéines non structurées, la gélatine-A et la gélatine-B, pour étudier l'encapsulation et le relargage d'un médicament in-vitro en fonction du pH.

Anema & de Kruif (2012, 2014) ont aussi montré un effet de la concentration en NaCl sur des coacervats de caséine β /lactoferrine et de β -lactoglobuline/lactotransferrine. En augmentant la concentration molaire en sel, ils ont observé une diminution puis une disparition totale de la coacervation. Malgré cela, ils ont également observé en diffusion dynamique de la lumière que dans quelques conditions physico-chimiques particulières (pH et ratio molaire entre les deux protéines), l'ajout d'une petite quantité de sel (inférieure à 0,1 mol/L) entraînait l'intensification du signal et correspondait à une augmentation de la coacervation. Ce phénomène de coacervation complexe favorisée à de faibles forces ioniques a aussi été observé pour certains mélanges protéines-polysaccharide. L'ajout de quelques ions dans le milieu va permettre une modification de la conformation de la molécule et l'exposition de nouveaux groupements réactifs qui vont favoriser l'interaction. Anema & de Kruif (2013) ont également étudié l'influence de la concentration en sel sur des complexes caséine β /lysozyme (figure 27). Une concentration en sel supérieure à 0,5 mol/L empêche toute interaction entre les deux protéines. En dessous de cette valeur, l'état du système peut varier en fonction du ratio entre les deux protéines.

La coacervation dépend également du ratio. Pour le couple caséine β /lactoferrine, la coacervation est la plus forte pour un ratio où la neutralisation des charges portées par les deux protéines est obtenue (Anema & de Kruif, 2012). Ce phénomène n'est cependant pas retrouvé pour un mélange de caséine β et de lysozyme (Anema & De Kruif, 2013).

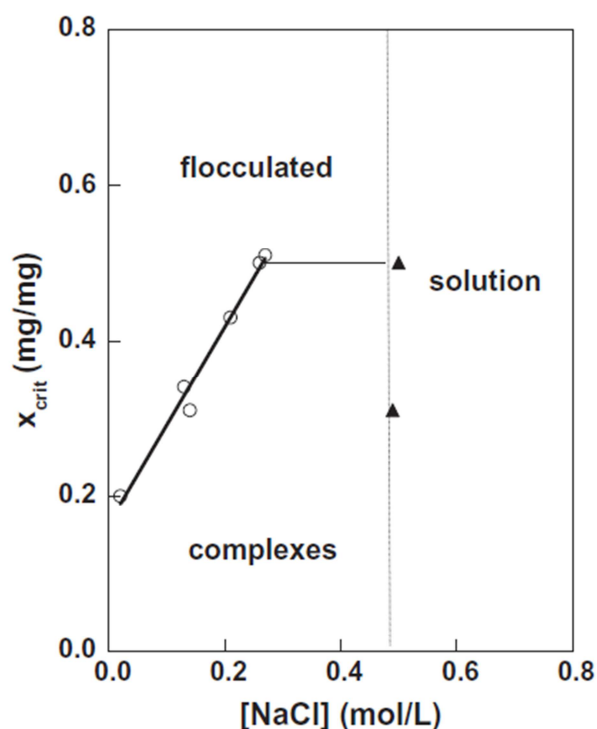


Figure 27 : Concentration critique de flocculation en fonction de la concentration en sel pour un mélange caséine β /lysozyme ($x_{crit} = [\text{lysozyme}]/([\text{lysozyme}]+[\text{caséine } \beta])$) (Anema & de Kruif, 2013).

Toutes ces données montrent que la coacervation est un phénomène très dépendant des conditions physico-chimiques et que de faibles changements de pH, de ratio ou de force ionique suffisent pour former des agrégats au lieu de coacervats ou pour que les deux protéines n'interagissent plus. Tavares et al. (2015) ont construit des diagrammes de phase pour des couples β -lactoglobuline A et/ou B – lactoferrine en fonction de la concentration de chaque protéine à deux pH différents (figure 28). En montant le pH de 0,25 unité, le domaine de coacervation du couple β -lactoglobuline B/lactoferrine augmente fortement. De plus, ces diagrammes montrent que pour une concentration fixée d'une protéine, en modifiant simplement la concentration de l'autre, il est possible de former des coacervats ou des agrégats ou de ne rien former.

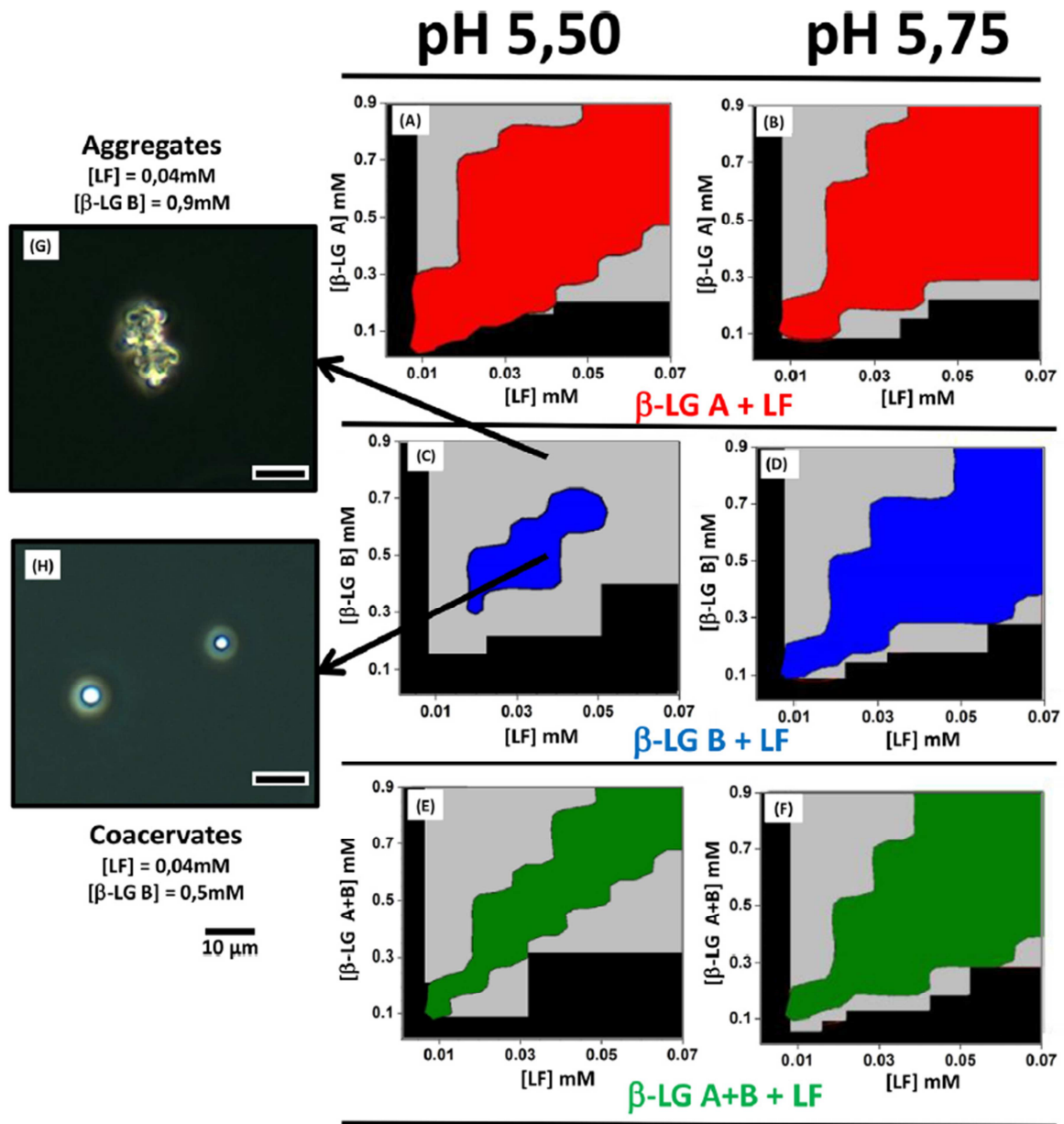


Figure 28 : Diagramme de phases d'un mélange de lactoferrine avec des isoformes de β -lactoglobuline à pH 5,50 et 5,75 (A, B) : lactoferrine/ β -lactoglobuline A ; (C, D) : lactoferrine/ β -lactoglobuline B ; (E, F) : lactoferrine/ β -lactoglobuline A+B. Surfaces en noir : domaines sans structures supramoléculaires détectées ; Surfaces en gris : domaines d'agrégation ; Surface en rouge, bleu et vert : domaines de coacervation. Observations microscopiques d'agrégats (G) formés en mélangeant par exemple 40 μM de lactoferrine et 900 μM de β -lactoglobuline B à pH 5,50 et de coacervats formés en mélangeant par exemple 40 μM de lactoferrine et 500 μM de β -lactoglobuline B à pH 5,50 (Tavares et al., 2015).

4. Conclusion

Les estimations de croissance démographique et d'évolution des régimes alimentaires à l'échelle mondiale montrent que la consommation de produits d'origine animale va fortement augmenter dans les prochaines années faisant encore monter la pression sur les ressources disponibles, la production de produits animaux étant généralement la plus demandeuse d'espace et la plus polluante.

Une des solutions envisageable serait de limiter l'utilisation en tant qu'ingrédient de ces produits d'origine animale dans les produits formulés en remplaçant par exemple les protéines animales par des protéines végétales, plus intéressantes pour l'avenir, ce qui permettrait d'augmenter la durabilité des productions.

Cependant, la littérature montre clairement que les protéines végétales ont des propriétés très différentes de celles des protéines animales, que ce soit leurs tailles, leurs charges, leurs propriétés technologiques. Il est donc difficile pour les industriels, avec en plus des verrous sociologiques et économiques, de substituer technologiquement les protéines végétales aux protéines animales sans étude en amont.

De plus, dans le cas d'une substitution partielle, il y a des risques que des assemblages se forment entre les protéines végétales et les protéines animales sans que l'on sache si ces assemblages pourraient être fonctionnels ou au contraire présenter un problème de mise en œuvre.

Il convenait donc dans cette étude de caractériser l'influence des conditions physico-chimiques sur les interactions protéines-protéines à partir d'un jeu de mélanges modèles d'une protéine végétale et d'une protéine animale. C'est ce qui est proposé dans ce travail de thèse avec le développement d'une approche combinatoire permettant un large criblage de conditions physico-chimiques.

Démarche de l'étude

Démarche de l'étude

Dans un contexte où les industriels de l'agro-alimentaire sont poussés, par des contraintes environnementales et socio-économiques, à incorporer de plus en plus de protéines végétales dans les produits formulés, il est important d'anticiper les potentialités d'introduction de protéines végétales dans un système alimentaire comprenant des protéines animales. L'étude bibliographique a montré que la combinaison de protéines végétales et animales n'est pas facile à mettre en œuvre en raison de leurs propriétés physico-chimiques différentes et que de tels mélanges entre protéines peuvent entraîner certains problèmes tels que l'agrégation ou la précipitation.

Avant de pouvoir mélanger des protéines animales et végétales dans les matrices alimentaires, il était donc nécessaire, en amont, d'explorer les conditions d'interactions entre ces protéines de sources différentes dans des systèmes simples et contrôlés. L'objectif du projet de thèse était donc d'étudier des mélanges de protéines animales et végétales, d'identifier des conditions dans lesquelles des assemblages entre ces protéines peuvent se former et de les caractériser.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons sélectionné les 5 protéines végétales et 2 protéines animales décrites dans la partie bibliographique: la napine (2S) du colza, la conglycinine (7S) et la glycinine (7S) du soja, la viciline (7S) et la légumine (11S) du pois, la caséine β et le lysozyme de l'œuf. Les protéines végétales ont été sélectionnées suivant plusieurs critères : importance en agro-alimentaire, indépendance économique et nouveaux sourcings. Ainsi, le soja a été retenu car il fournit les protéines végétales les plus utilisées en tant qu'ingrédients dans l'industrie agroalimentaire, à un niveau similaire à celui des protéines laitières (Frost & Sullivan, 2014)). Comme le soja est majoritairement produit hors de l'Europe, nous avons également sélectionné deux protéines de pois comme équivalent européen aux protéines de soja (tableau 10) et ceci dans une optique d'indépendance économique. Enfin, nous avons également travaillé avec la napine de colza car le colza est déjà très produit en Europe pour son huile tandis que les protéines ne sont pas valorisées en alimentation humaine et servent seulement sous forme de tourteaux en alimentation

animale. Comme les isolats de protéines de colza sont autorisés comme ingrédients en alimentation humaine depuis 2013 (EFSA NDA Panel, 2013) et possèdent des propriétés fonctionnelles intéressantes (Schwenke, 1994), nous avons saisi cette opportunité pour tenter de mettre en valeur cette protéine dans l'alimentation humaine. De plus, cette protéine possède des propriétés physico-chimiques (masse moléculaire, point isoélectrique, solubilité) très différentes des quatre autres protéines végétales étudiées. Sa similitude avec le lysozyme de l'œuf nous a conduit à retenir cette protéine animale. Comme deuxième protéine animale, nous avons retenu la caséine β qui est très utilisée dans l'industrie agroalimentaire. Les deux protéines animales caséine β et lysozyme possèdent des points isoélectriques très différents, ce qui nous a permis de travailler avec deux protéines animales dont les charges nettes étaient de signes opposés aux pH utilisés dans l'étude (Tableau 10). En outre, la caséine β possède la particularité de s'auto-associer en micelles, suivant la concentration, la température et la concentration en calcium (Dauphas et al., 2005). Ces phénomènes étaient susceptibles de modifier son association avec d'autres protéines. Outre ces critères économiques et scientifiques, le laboratoire possédait un savoir-faire de longue date dans la purification et la caractérisation des protéines végétales qui nous permettaient de travailler sur des fractions de haute pureté et avec un niveau élevé de connaissance de leurs comportements en phase aqueuse (Gueguen et al., 1984). Dans la mesure où un précédent projet du laboratoire, en collaboration avec des industriels (Roquette et INGREDIA), avait déjà montré qu'il était possible de moduler la solubilisation des protéines de pois par la formation d'assemblages entre les isolats de protéines de pois et de protéines laitières par les conditions physico-chimiques du milieu (brevet n° WO 2014/044990), nous avons retenu ces mêmes conditions physico-chimiques (température, pH, salinité, composition du mélange) pour étudier les assemblages entre les protéines pures d'origine animale et les protéines pures d'origine végétale.

Parmi les 7 protéines retenues, 3 ont dû être purifiées. La viciline et la légumine ont été obtenues à partir de farine de pois par gel filtration selon des protocoles établis préalablement à l'INRA de Nantes. La glycinine de soja a également été purifiée par gel filtration à partir d'une fraction enrichie. Toutes les protéines ont ensuite été caractérisées au niveau de la pureté de la solubilité.

Pour étudier les interactions entre chaque protéine animale et végétale (10 couples), les niveaux des 4 paramètres physico-chimiques ont été choisis pour leur influence connue sur la solubilité des protéines étudiées et sur les interactions entre protéines: la concentration totale en protéine (1 - 5 mg/mL), le ratio protéine végétale/protéine animale (m/m) (100/0 – 90/10 – 50/50 – 10/90 – 0/100), le pH (6, 7, 8, 9) et la force ionique (0,5 – 0,2 – 0,1 – 0,05 M). L'usage d'un robot et d'analyses en plaques multi-puits a permis d'analyser l'effet des paramètres sans réduire le plan d'expériences. Un protocole de mélange sur microplaques a été mis au point sur le robot (station de travail automatisée Beckman Coulter) et la formation d'assemblages a été détectée par turbidité (spectrophotométrie-UV) et mesure de la taille des particules (diffusion dynamique de la lumière). La turbidité et la taille des particules ont joué le rôle d'indicateurs d'interactions entre les protéines.

A partir de ces indicateurs, un couple protéine animale/protéine végétale a été sélectionné pour lequel des assemblages se formaient et étaient contrôlés par des facteurs physico-chimiques. Ce couple a ensuite été l'objet d'une analyse plus approfondie en introduisant de nouveaux ratios protéine végétale/protéine animale (70/30 – 30/70) et un nouveau pH (4) ainsi qu'en étudiant la cinétique de formation et l'effet de la température pour tenir compte des procédés de traitement thermique des matrices alimentaires.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Matières premières et réactifs

1.1. Protéines végétales

1.1.1. Napine 2S du colza

La napine est issue d'un lot purifié en 2008 à l'INRA de Nantes à partir d'une farine délipidée de colza de variété Express fournie par le Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux et du Chanvre (CETIOM, Bordeaux, France) d'après le protocole développé par Bérot et al. (2005). La napine avait été conservée en chambre froide à +4°C dans un flacon hermétique.

1.1.2. Viciline, convicine (7S) et légumine (11S) du pois

Les deux protéines de pois (viciline, convicine (7S) et légumine (11S)) ont été purifiées à l'INRA pendant la première année de la thèse à partir de farine (non commerciale) de pois jaune de printemps de la variété Caméor. Le pois, produit en 2009, a été fourni par l'UMR LEG (INRA, Dijon) puis broyé et tamisé (particules inférieures à 200 µm) à l'INRA de Nantes en Avril 2011.

1.1.3. Conglycinine (7S) et glycinine (11S) du soja

Les deux protéines 7S et 11S du soja ont la même provenance mais ont été purifiés à des temps différents. A partir d'une farine de soja délipidée (ADM, Winnipeg, Canada), une fraction enrichie en protéines 11S a été obtenue en 2009 à l'INRA de Nantes. La conglycinine (7S) a été purifiée la même année à l'INRA de Nantes à partir de la farine délipidée de soja selon le protocole établi par Prat (2009).

La glycine a, quant à elle, été purifiée pendant la thèse à partir d'une fraction enrichie en 11S (référence de l'échantillon : 11S CB SO 090210.04 : fraction enrichie en 11S obtenue le 10/02/2009) et les étapes sont décrites dans la partie Résultats et Discussion (Purification des protéines).

1.2. Protéines animales

1.1.1. Caséine β

La poudre de caséine β purifiée a été fournie par Lactalis (Lactalis Ingrédients, Bourgarré, France). Le lot de protéines a été conservée en chambre froide à +4°C dans un flacon plastique fermé.

1.1.2. Lysozyme

Le lot de lysozyme utilisé dans l'étude a été fourni par la société OVONOR (Trégueux, France), filiale du groupe EUROVO. Le lysozyme a été stocké à +4°C dans un flacon hermétiquement clos.

1.3. Eau et tampons

Le tampon trishydroxyméthylaminométhane (Tris) et l'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Lyon, France) au plus haut degré de pureté. L'eau millipore a été obtenue à partir d'une station Milli-Q (Millipore SAS, Molsheim, France). L'acide acétique utilisé provenait de Prolabo (VWR DBH Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France). Deux solutions de chlorure de sodium (NaCl) à 64,4 g/L et 321,4 g/l ont été préparées à partir de NaCl fourni par Prolabo (VWR DBH Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France).

2. Protocole de préparation des mélanges

2.1. Préparation des solutions de protéines

Chaque protéine était solubilisée à une concentration de 1, 5 ou 10 mg/mL pendant au moins 4 heures dans un tampon dans des béchers fermés et sous agitation magnétique (400 rpm). Deux tampons différents ont été utilisés selon le pH visé pour la solution. Lorsque le pH était compris entre 6 et 9, les protéines étaient solubilisées dans un tampon Tris 55 mmol/L. Pour le pH 4, les protéines étaient dissoutes dans de l'acide acétique à 1 mol/L préparé à partir d'acide acétique pur à 90%.

2.2. Mélanges de protéines

Les mélanges d'une protéine animale et d'une protéine végétale à différents ratios massiques compris entre 100/0 et 0/100 (100% de la masse de l'échantillon pour une protéine et 0% pour l'autre et vice versa) et à différentes concentrations en NaCl ont été obtenus en mélangeant les solutions de protéines seules, préparées à un pH donné (4, 6, 7, 8, 9). La concentration en sel a été ensuite ajustée grâce à l'une des deux solutions de chlorure de sodium (64,4 g/L et 321,4 g/l) et en ajoutant un volume supplémentaire d'eau ultrapure (Millipore, Molsheim, France) afin d'obtenir le même volume final de solution et donc la même concentration totale en protéines (1 ou 5 g/L). Les mélanges étaient ensuite agités pendant 5 minutes avec un agitateur de plaque (400 rpm).

Pour les expériences faites avec l'EDTA, les mélanges de protéines à 1,1 mg/mL dans un tampon phosphate 50 mmol/L pH6 NaCl 50 mmol/L étaient dilués en série avec une solution d'EDTA (dilution 1/100).

La préparation des mélanges a été réalisée soit de façon manuelle soit en utilisant la station de travail automatisée dont le principe est décrit ci-dessous.

2.3. Mise au point du protocole de la station de travail automatisée

Les 4 paramètres (pH, force ionique, ratio, concentration totale) ont été étudiés pour l'ensemble des 10 couples de protéines (2 protéines animales x 5 protéines végétales). En travaillant sur la station de travail automatisée (Biomek 3000, Beckman-Coulter, Villepinte, France) (figure 29), on a pu réaliser un plan complet, soit 1600 échantillons différents. Ce robot a permis de réaliser les mélanges de manière répétable à partir des solutions de protéines seules. Même si la station de travail automatisée a permis de réaliser un plan d'expériences complet, son utilisation a également limité, de par la taille du plan de travail, le nombre de facteurs physico-chimiques étudiés et les valeurs de ces facteurs.

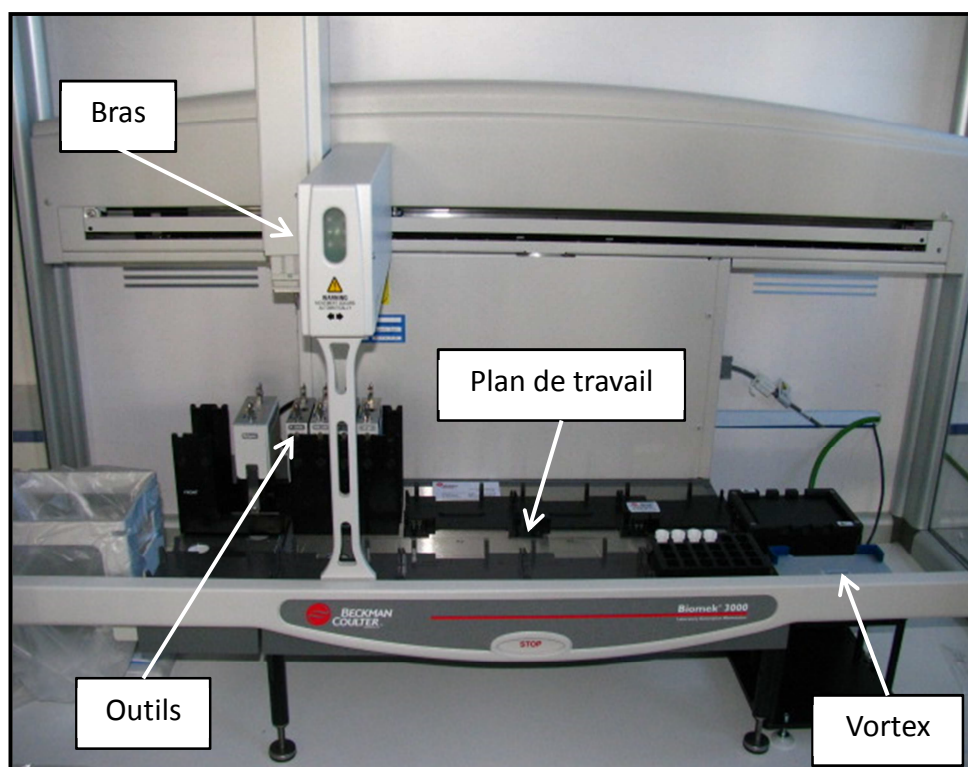


Figure 29 : Photo du robot Biomek 3000.

Le protocole établi s'est déroulé de la manière suivante :

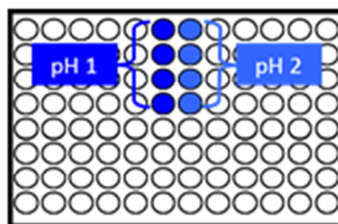
Les solutions protéiques et les solutions salines étaient placées sur le plan de travail du robot (figure 29). Les mélanges étaient faits sur une plaque de 96 puits à fond plat (Greiner Bio-One, Courtaboeuf, France) pour une analyse ultérieure de la turbidité en spectrophotométrie-UV-Vis. Le protocole comprenait la préparation de deux plaques successives afin d'obtenir tous les pH, toutes les forces ioniques et tous les ratios massiques pour un couple de protéines à une concentration totale donnée. Une pause était programmée entre ces deux plaques et permettait de ne placer les solutions nécessaires sur le plan de travail qu'au dernier moment afin d'avoir le même temps de repos pour chaque préparation.

La figure 30 présente les quatre principales étapes constituant le protocole de préparation et la figure 31 compare ces étapes au protocole programmé sur le robot.

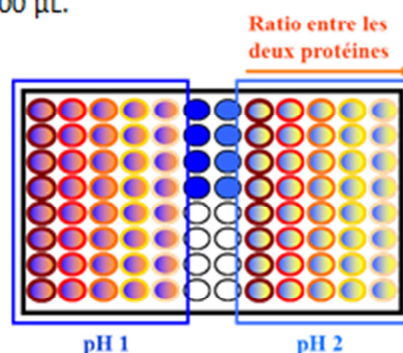
Pour la seconde plaque, le même protocole était répété et produisait une plaque similaire contenant les mélanges protéiques aux deux pH qui n'avaient pas encore été préparés.

Afin d'assurer la répétabilité et la reproductibilité du protocole, des analyses des plaques en turbidimétrie et en diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées. Le processus de pipetage a, par exemple, dû être amélioré pour garantir une répartition homogène des protéines sur la plaque.

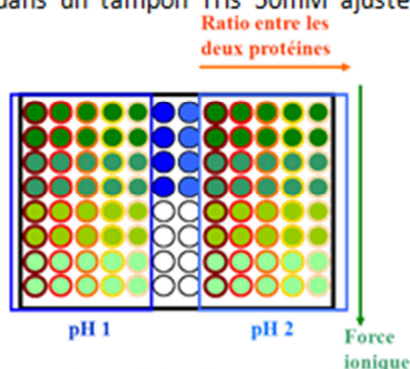
Etape 1 : Les 4 premiers puits des colonnes centrales sont remplis avec 100 μ L de tampon Tris 55 mM à 2 pH différents afin de servir de témoin lors des analyses.



Etape 2 : Les protéines sont réparties sur la plaque de 96 puits. Le pipetage à partir de la solution mère se fait avec une pipette multicanal et une triple aspiration-relargage afin d'avoir la solution la plus homogène possible. Les protéines sont réparties sur une plaque afin de recouvrir les deux mêmes pH utilisés pour les solutions témoins et en suivant le ratio PV/PA : 100/0 – 90/10 – 50/50 – 10/90 – 0/100 de gauche à droite. La quantité de solution mise dans chaque puit est de 100 μ L.



Etape 3 : La force ionique est ensuite ajustée puits par puits à partir des deux solutions de NaCl et d'eau millipore afin d'avoir un volume totale de 110 μ L par puits. Les deux lignes supérieures sont ajustées à une force ionique de 0,5 M puis par force ionique descendante par groupe de deux lignes de puits. Chaque croisement de conditions physico-chimiques est donc présent deux fois sur chaque microplaque. Les mélanges protéiques aux différents ratios sont à la fin du protocole dans un tampon Tris 50mM ajusté à un pH et une force ionique fixés



Etape 4 : Agitation des mélanges sur le module d'agitation (Variomag Teleshake, Thermo Fisher scientific (Langensfeld, Germany) à 300rpm

Figure 30 : Schématisation des quatre principales étapes du protocole utilisé pour la préparation des mélanges avec la station de travail automatisée.

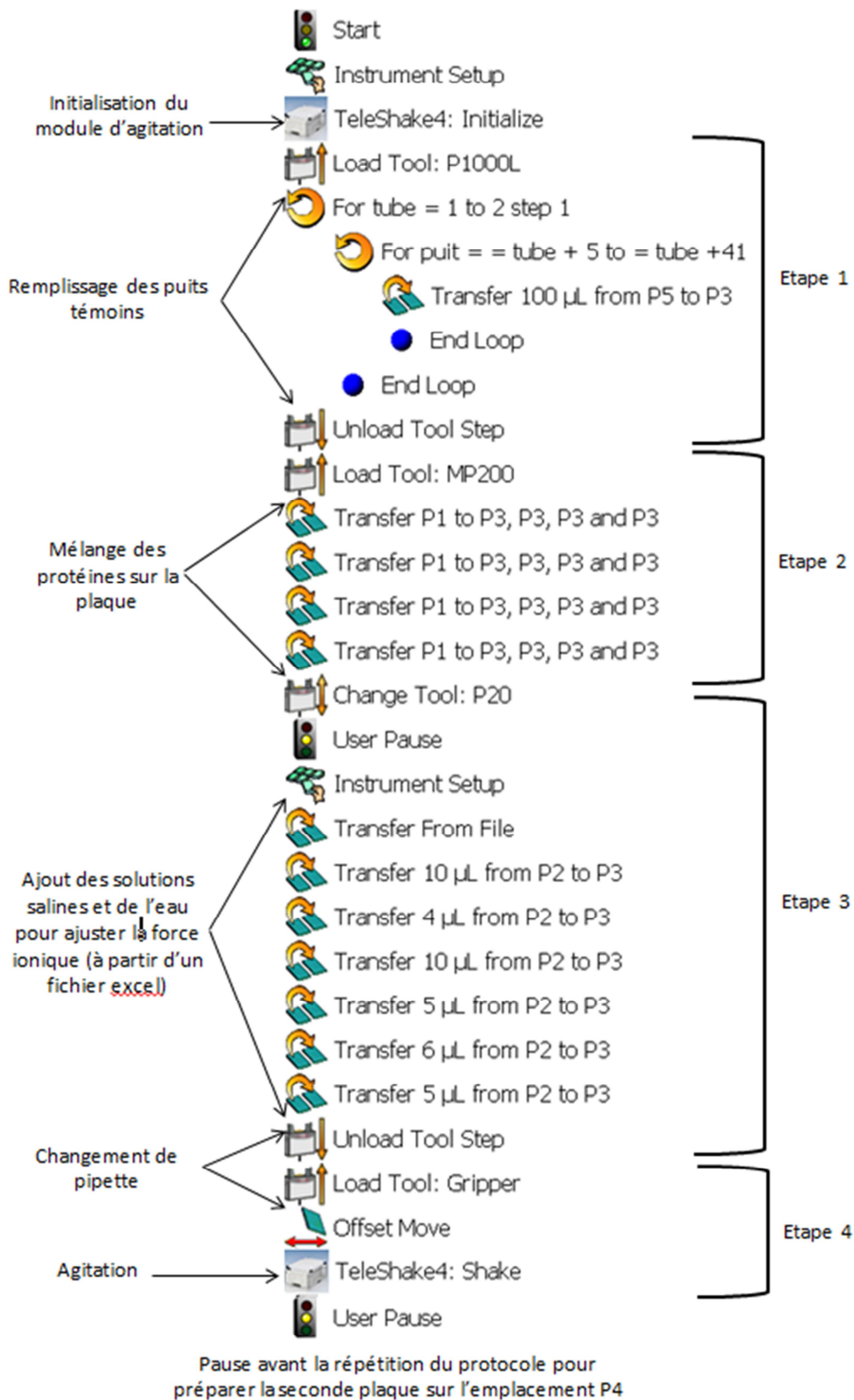


Figure 31 : Programmation de la station de travail automatisée Biomek pour la préparation d'une plaque de mélanges protéiques (P1 : emplacement de plaque avec les solutions de protéines pures _ P2 : emplacement de plaque avec les solutions salines et l'eau _ P3 : emplacement de la plaque à préparer _ P5 : emplacement avec un support à tubes eppendorfs comprenant de l'eau et des solutions salines pour les témoins).

3. Méthodes de caractérisation des mélanges

3.1. Electrophorèses SDS-PAGE

Les électrophorèses sur gel SDS-PAGE 1D ont été réalisées après dilution des échantillons dans un tampon Tris 62 mmol/L pH 6,8, 2% (m/v) SDS, 15% (v/v) glycérol, 0.01% (m/v) bleu de bromophénol à une concentration totale en protéines de 1 mg/mL. Les électrophorèses ont été effectuées à la fois en conditions non réductrices, et réductrices en ajoutant 5% (v/v) de β -mercaptoéthanol. Les protéines ont ensuite été chauffées à 95°C pendant 5 minutes puis 15 μ g d'échantillon ont été déposés dans chaque puits. Les électrophorèses ont été réalisées dans un tampon de migration, Tris 25 mM pH 8,8 contenant 3.5 mM de SDS, à une intensité de 20mA par gel jusqu'à migration complète des protéines. A la fin de la migration, les gels ont été rincés avec de l'eau ultrapure, fixés dans l'acide trichloroacétique (TCA) à 10% (m/m) puis colorés au bleu de Coomassie G-R250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, San Francisco, USA) avant d'être scannés. Le logiciel Multi Gauge (LifeScience, FujiFilm, France) a été utilisé pour réaliser une analyse quantitative de l'intensité des bandes des gels d'électrophorèse.

3.2. Analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique consiste à suivre l'évolution de la masse d'un échantillon en fonction du temps pour une température donnée. Cette technique a été utilisée pour déterminer la quantité de cendres (m/m) présente dans nos échantillons de protéines purifiées grâce au dispositif Q50 TGA (TA Instruments, New Castle, Delaware, Etats-Unis). Une quantité suffisante d'échantillon (≈ 5 mg) était déposée sur la microbalance, placée sous atmosphère inerte puis chauffée à 400°C jusqu'à stabilisation de la masse. La différence entre la masse avant et après chauffage permettait de déterminer le taux de cendres de l'échantillon.

3.3. Turbidimétrie

Les mesures de turbidimétrie ont été utilisées pour identifier les phénomènes d'association ou de solubilisation des protéines animales et végétales mises en solution. Cette méthode nous a permis d'avoir des premières observations directes sur la formation d'assemblages entre les deux protéines mélangées.

3.3.1. Mesures sur plaques

La turbidité des mélanges préparés sur les plaques à fond plat a été mesurée sur un spectrophotomètre UV-Visible lecteur de plaques Elx-808 BioTek (Colmar, France). En raison des filtres disponibles sur l'appareil, l'absorbance a été mesurée à 540 nm au lieu de 600 nm, valeur habituelle recommandée par la littérature. La valeur d'absorbance à 540 nm a été considérée comme suffisante car située dans le domaine du visible, proche de la valeur de 600 nm recommandée et uniquement utilisée comme point de comparaison entre nos échantillons. Chaque plaque a été mesurée deux fois sachant qu'il y avait un duplicat de chaque condition sur chaque plaque.

3.3.2. Mesures en cuve

Les mesures de turbidité en cuve ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-Visible Varian Cary 1 (Melbourne, Australie) dans des cuves d'1 cm de trajet optique. L'absorbance était relevée à 540 nm pour correspondre aux mesures de turbidité réalisées sur plaques multi-puits. Comme pour le lecteur de plaque, on considère la valeur d'absorbance comme une mesure directe de la turbidité puisqu'on ne cherche qu'un point de comparaison entre nos différentes conditions. La température était régulée par un bain thermo-staté intégré à l'appareil afin de réaliser les mesures à différentes températures. Chaque mesure a été répétée 3 fois.

Pour les mesures réalisées en dessous et au-dessus de la température ambiante, la valeur d'absorbance était prise après un temps d'équilibration de 30 minutes et la température réelle était relevée.

Pour les mesures de stabilité dans le temps, une cinétique continue a été réalisée à 20°C avec une mesure toutes les minutes ou toutes les heures pendant 24 heures. Dans un premier cas, l'échantillon n'a pas été agité et dans l'autre cas, l'échantillon a été agité à partir de 14 heures avant chaque mesure de l'absorbance.

3.4. Taille des particules

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une méthode importante pour la caractérisation de la taille de petites particules dans des systèmes simples. La méthode repose sur l'étude du mouvement brownien des particules (mouvement aléatoire dû aux impacts entre particules et molécules du solvant). Le coefficient de diffusion D , d'une particule de rayon r suivant donc un mouvement brownien dans un fluide au repos à une température fixée, peut être donné par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

où k est la constante de Boltzman, T la température absolue et η la viscosité de la phase continue (l'eau dans cette étude).

Dans les conditions citées précédemment, la diffusion dynamique de la lumière permet d'obtenir la valeur de D . En obtenant la valeur de D (coefficient de diffusion) et connaissant la température et la viscosité de la phase continue, on peut calculer le rayon des particules présentes dans la solution. Pour obtenir la valeur du coefficient de diffusion, l'appareil mesure les fluctuations d'intensité de lumière diffusée dues au mouvement brownien des particules. Ces données sont alors traitées par un corrélateur numérique afin d'obtenir la fonction d'autocorrélation des fluctuations d'intensité mesurées en fonction du temps $I(t)$ mesurée de $t=0$ à $t=T$ est définie par :

$$G(\tau) = \frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t + \tau)dt$$

Cette fonction représente la possibilité de retrouver une particule à un instant $t+\tau$ au même endroit où elle se trouvait à l'instant t . Cette probabilité diminue avec la taille de la particule et inversement, plus une particule est grosse, plus elle a de chances d'être retrouvée à la même place. Au final, les calculs réalisés à partir de cette fonction permettent de retrouver le rayon hydrodynamique moyen des particules sans prendre en compte la structure des objets mesurés mais en réalisant une approximation sphérique qui peut être problématique pour des objets très allongés. De même, on obtient ainsi une bonne approximation de la répartition granulométrique de l'échantillon si les populations de particules ne sont pas trop polydisperses. Cependant l'analyse peut être rendue très difficile par la présence simultanée de très grandes particules (plusieurs micromètres) et d'autres très petites (quelques nanomètres). Dans ce cas, les grandes particules, même si elles sont peu concentrées dans le solvant, occulteront complètement les particules plus petites à l'intensité totale diffusée. De même, un trop grand nombre de populations différentes empêchera une analyse correcte.

3.4.1. Mesures sur plaques

La taille des particules pour le criblage a été mesurée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) sur un Nanosizer APS Malvern (Malvern, Royaume-Uni) à un angle de 90° . Les solutions ont été étudiées à des concentrations de 1 et 5 mg/mL sur des microplaques à fond plat préparées à l'aide de la station de travail automatisée. Pour la mesure, l'échantillon est prélevé directement dans le puits à l'aide d'une seringue. Entre chaque échantillon, la seringue est lavée par 100 μ l d'eau millipore puis 100 μ l d'Hellmanex et enfin 400 μ l d'eau millipore. Le protocole de mesure est constitué de 3 runs de 60 secondes à 20°C avec pour paramètres de solvant, une viscosité de 1 mPa.s et un indice de réfraction de 1,33. Pour chaque échantillon, la mesure est réalisée deux fois.

3.4.2. Mesures en cuve

Pour les mesures en cuves, les analyses ont été effectuées grâce à un zetasizer Nano ZS Malvern (Malvern, Royaume-Uni) à un angle de 173° dans des cuves ayant un trajet optique de 1 cm. Le protocole de mesure correspond à 3 runs de 60 secondes avec pour

paramètres de solvant, une viscosité de 1 mPa.s et un indice de réfraction de 1,33. Pour chaque échantillon, 4 mesures ont été réalisées. Dans le cas des mesures de taille de particules au cours du temps, chaque mesure comprenait 12 enregistrements de 30 secondes.

3.4.3. Analyse des données

Dans les deux types de mesures, les données étaient triées avant d'être interprétées. Dans un premier temps, on s'intéressait à l'intercept qui correspond à l'intersection entre la projection du début de la courbe de corrélation et l'axe y du corrélogramme. Cette valeur équivaut à un ratio signal/bruit et permet d'évaluer la qualité de la donnée. L'échelle est faite pour qu'un signal idéal atteigne une valeur de 1. Nous avons donc systématiquement éliminé tous les échantillons pour lesquels l'intercept était inférieur à 0,5 et accepté tous les échantillons pour lesquels l'intercept était au-dessus de 0,7. Entre 0,5 et 0,7, nous avons regardé chaque corrélogramme afin de choisir si l'on conservait ou pas la mesure concernée selon l'allure de la courbe (lisse ou bruitée, avec ou sans épaulement) et la présence de bruit équivalent à de très gros objets sur la ligne de base (figure 32).

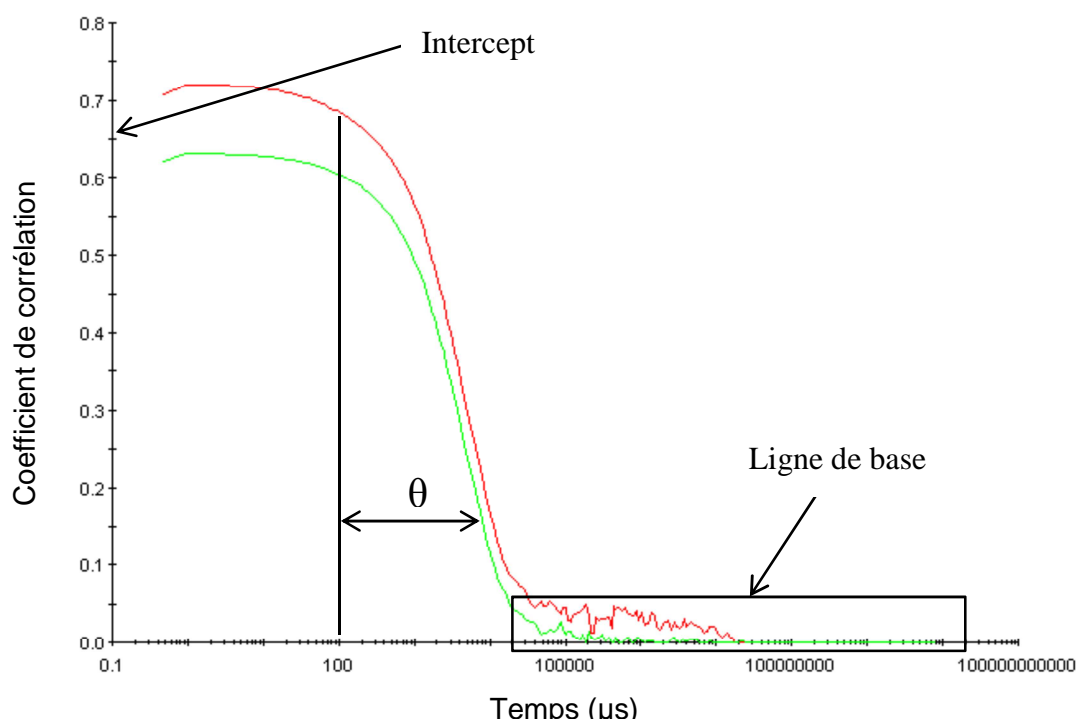


Figure 32 : Exemple de corrélogramme obtenu en diffusion dynamique de la lumière

3.5. Microscopie optique

Les mélanges protéiques ont été observés sur un microscope optique (Nikon Eclipse E400, Nikon France Instruments, Le Pallet, France) couplé à une caméra Hamamatsu 3CCD (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Les échantillons étaient déposés entre lame et lamelle sans spacer et immédiatement observés au grossissement X40 à 10, 20, 30 et 40°C en utilisant une plaque chauffante (Linkam Scientific Instruments Ltd., Tadworth, UK) sur laquelle reposait directement la lame.

3.6. Mesure de la tension

Les mesures de tension de surface ont été réalisées sur un tensiomètre à goutte du modèle Tracker (IT concept, Longessaigne, France). Sur cet appareil, la tension superficielle à l'interface air/liquide est calculée à partir de l'étude du profil du contour d'une bulle présentant une symétrie de révolution en utilisant la loi de Laplace. La forme prise par la goutte dépend de l'équilibre entre la tension interfaciale qui tend à donner une forme sphérique à la goutte et la force de gravité qui tend à allonger la goutte. Appliquée à une interface sphérique, l'équation de Laplace permet de relier la différence de pression ΔP à la tension interfaciale γ et au rayon de courbure R de l'interface.

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R}$$

Dans le cas présent, la bulle étant asymétrique, l'équation de Laplace prend la forme analytique suivante :

$$\frac{1d(x\sin\theta)}{x dx} = \frac{2}{b} - \frac{g \Delta P z}{\gamma}$$

où x et z sont les coordonnées cartésiennes pour tout point du profil de la bulle, l'origine des coordonnées étant considérée à l'apex de la bulle, b est le rayon de courbure à l'apex, θ l'angle de la tangente du profil de goutte par rapport à l'horizontale, g l'accélération de la gravité, $\Delta\rho$ la différence de densité des fluides étudiés et γ la tension de surface.

A partir de l'image de la bulle, la tension de surface est calculée plusieurs fois par seconde en utilisant l'équation ci-dessus. Le tensiomètre est présenté sur la figure 33. A une concentration de 1 g/L, les mesures ont été réalisées en mode goutte pendante. Ce mode consiste à former une goutte du mélange protéique à l'extrémité d'une aiguille droite dans l'air. A une concentration de 0,01 g/L, les mesures ont été faites en mode bulle d'air montante dans la solution de protéines. Dans les deux cas, un moteur permet d'actionner la seringue et de contrôler la formation de la goutte ou la bulle (10 μ L) grâce à une vis micrométrique pilotée par le moteur. Une source lumineuse uniforme éclaire la goutte/bulle dont l'image et donc le profil est projeté sur une caméra reliée à l'ordinateur. L'image est alors numérisée et traitée par un logiciel afin de calculer la tension interfaciale à l'aide de l'équation de Laplace présentée ci-dessus.

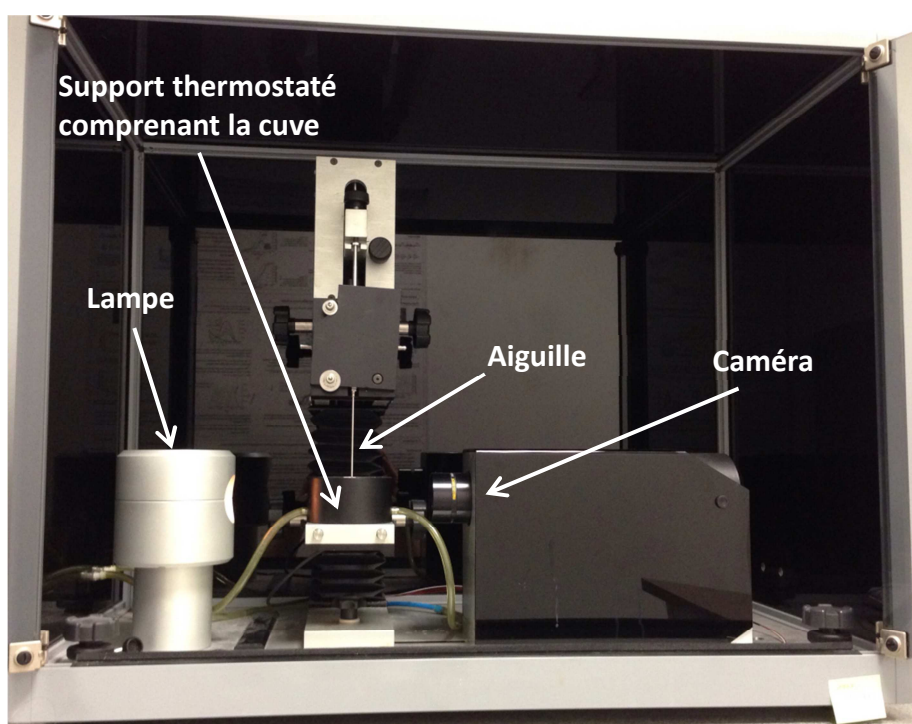


Figure 33 : Photographie du tensiomètre à bulle.

De par cette méthode visuelle, la précision des résultats dépend de plusieurs facteurs à régler avant de commencer la mesure tels que la position de la caméra, la verticalité de la seringue et la résolution de la frontière entre la goutte et son support. De plus, la mesure de la tension est d'autant plus précise que la goutte est grosse.

3.7. Etude des propriétés moussantes

La caractérisation de la capacité moussante des solutions et de leur stabilité a été réalisée sur un FOAMSCAN de la société TECLIS (Lyon, France) qui permet de fabriquer des mousses par bullage et de les caractériser selon plusieurs paramètres (vitesse de formation et stabilité de la mousse, volume de liquide piégé dans la mousse...).

L'appareil est constitué d'une colonne en verre (Cell 20) d'un diamètre intérieur de 21 mm dont la base va, une fois fixée dans l'appareil, reposer sur un fritté (fritté de type J4 : pores allant de 10 à 16 μm). Le fritté est relié à un tube d'injection de gaz alimenté par un générateur d'azote. La colonne est munie de quatre paires d'électrodes réparties sur toute la hauteur qui permettent de mesurer la conductivité en divers points et d'en déduire le volume de liquide contenu à partir d'une calibration préalable. L'appareil comprend également une caméra située dans le même compartiment que la colonne et permettant d'analyser le comportement de la mousse au cours du temps en mesurant l'évolution du volume de mousse (figure 34). Les données sur le volume de liquide contenu et sur le volume de mousse sont transmises et enregistrées sur l'ordinateur relié à l'appareil.

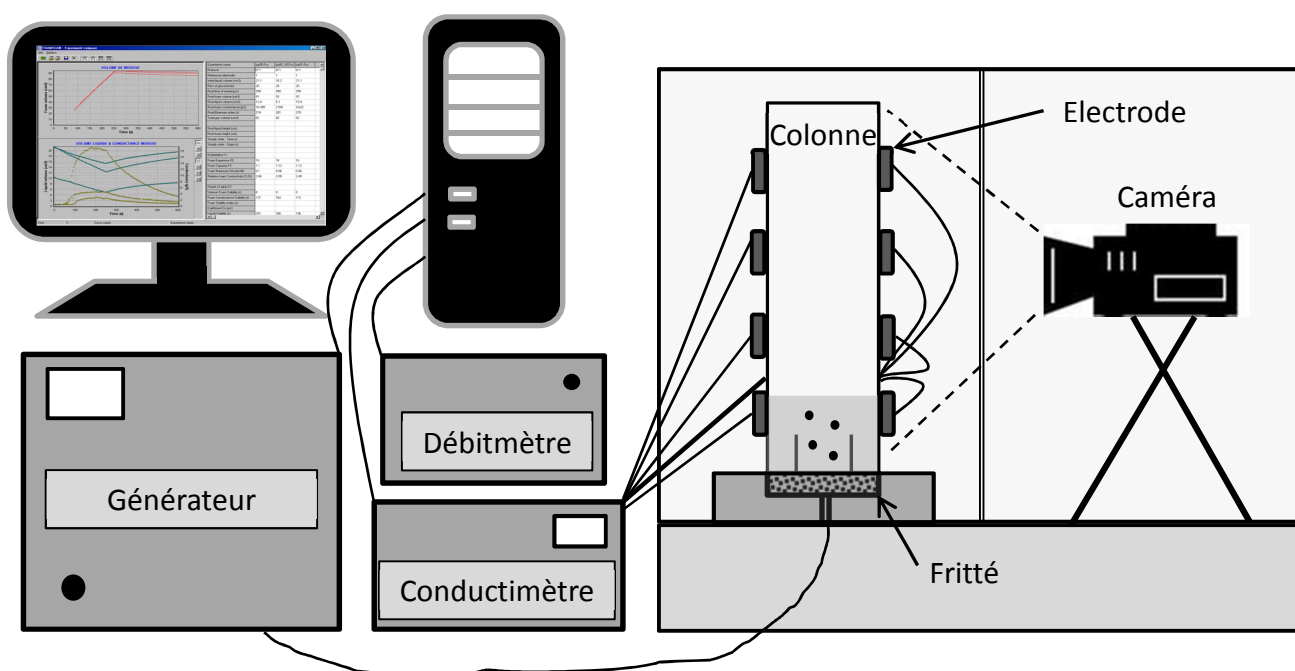


Figure 34 : Schéma de principe du FOAMSCAN.

La calibration du système a été réalisée pour chaque mélange en ajoutant des volumes de solution croissants dans la cuve et en mesurant la conductivité afin d'établir une droite d'étalonnage volume-conductivité. Les mousses ont ensuite été produites à 20°C à partir d'un volume d'échantillon de 10 mL. Le gaz a été introduit à travers le fritté avec un débit de 35 mL/min jusqu'à obtenir un volume de mousse 35 mL. Une fois le volume fixé atteint, l'injection de gaz est stoppée et la stabilité des mousses étudiée sur 80 minutes.

4. Analyses statistiques

4.1. Modèle linéaire généralisé et analyse de la variance

Les résultats du screening ont été analysés grâce à un modèle linéaire généralisé (GLM) comprenant une analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel STATGRAPHICS Plus 5.1 (StatPoint Technologies, Inc, Warrenton, USA). Le modèle linéaire généralisé est utilisé pour fabriquer une fonction reliant une ou plusieurs variables indépendantes à la variable réponse et pour évaluer la validité de cette relation (correspondance entre le modèle et la réalité). La GLM a été utilisée pour déterminer les effets des facteurs (concentration totale en protéines, ratio massique, pH, concentration en NaCl) comme variables indépendantes sur la turbidité des différents mélanges protéiques. Les variables étaient considérées comme qualitatives afin de facilement identifier l'effet de chaque facteur et de chaque interaction sans utiliser de modèle prédéfini.

4.2. Analyse en composantes principales

4.2.1. Principe

L'analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode de statistique descriptive multidimensionnelle qui permet d'analyser simultanément un grand nombre de variables quantitatives. Le principe et l'intérêt majeur de l'ACP est de réduire la dimension des données de départ en remplaçant les variables de départ (v) par des composantes (c) qui sont construites à partir de ces variables initiales ($v > c$).

Les données analysées en ACP peuvent être présentées dans une matrice (tableau 12). Si on considère p variables quantitatives nommées $X^1, \dots, X^j, \dots, X^p$ qui sont observées sur n individus notés $1, \dots, i, \dots, n$, le tableau se présente sous cette forme :

	X^1	...	X^j	...	X^p
1	x_1^1	...	x_1^j	...	x_1^p
.	.		.		.
i	x_i^1	...	x_i^j	...	x_i^p
.	.		.		.
n	x_n^1	...	x_n^j	...	x_n^p

Tableau 12 : Représentation en tableau des données d'une ACP à p variables et n individus.

L'intérêt de l'ACP est d'obtenir une quantité maximale d'informations en réduisant le plus possible la taille de ces informations. Dans ce but, on utilise des composantes qui maximisent la dispersion des observations en comparaison des variables de départ. Cette dispersion se mesure à l'aide de la variance (ou de l'écart -type). Ces nouvelles composantes sont obtenues à partir de combinaisons linéaires des variables initiales. La première composante doit contenir un maximum d'informations, de même pour la deuxième et ainsi de suite tout en conservant des composantes non corrélées afin que toute l'information apportée par chaque nouvelle composante soit « nouvelle » et s'ajoute à celle apportée par les précédentes.

Pour analyser les résultats, on calcule des corrélations variables-composantes qui permettent d'indiquer de quelle manière les variables de départ sont liées à ces nouvelles « variables ». Ensuite, on peut réaliser des graphiques de la répartition des individus sur des axes tracés à partir des nouvelles composantes.

4.2.2. Application à l'analyse des données de diffusion dynamique de la lumière

L'analyse en composantes principales a été utilisée pour étudier les résultats des analyses de taille des particules du screening.

Les données totales triées sur les populations ont donc été rassemblées dans une matrice comprenant y colonnes et x lignes. Chaque colonne correspondait à une classe de taille entre 0 et 10000 nm fournie par le logiciel et chaque ligne correspondait à une mesure. Le nombre de classes de taille conservées dépend du couple analysé. Le croisement d'une ligne et d'une colonne correspondait au pourcentage de population (en intensité ou en volume) dans l'échantillon concerné appartenant à cette classe de taille. Le tableau ainsi obtenu a été utilisé pour réaliser l'analyse en composantes principales (ACP) des données dans l'environnement MATLAB (version 7, The Math Works, Natick, Etats-Unis).

Les nouvelles composantes indépendantes obtenues à partir de combinaisons linéaires des y variables (y classes de taille) et qui permettent de mieux expliquer la variance du système sont classées par ordre d'importance. Ainsi la première composante est celle qui explique le plus de variabilité du système, la seconde composante est la seconde à expliquer le plus de variabilité jusqu'à la énième composante où 100 % de la variabilité du système est expliquée. Ces composantes ont été analysées par rapport aux variables de départ, que sont les classes de tailles afin d'identifier des effets du pH, du ratio massique, de la concentration totale et de la concentration en NaCl sur la taille des particules et de mettre en avant certaines populations particulières.

Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

1. Purification et caractérisation des protéines

1.1. Purification

1.1.1. Viciline, convicine (7S) et légumine (11S) du pois

Les protéines viciline (7S) et la légumine (11S) ont été extraites de la farine de pois jaune de printemps de la variété Caméor selon un protocole établi antérieurement à l'INRA de Nantes (Gueguen et al., 1984).

La figure 35 présente le schéma global de la purification. La farine de pois est d'abord dispersée dans un tampon Tris 50mM pH 8 pendant 4 heures à température ambiante. La dispersion obtenue est centrifugée à 10000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant est récupéré pour être de nouveau centrifugé. Un aliquot des surnageants est prélevé afin d'être analysée par électrophorèse SDS-page (figure 37). Que ce soit avant ou après centrifugation, des bandes correspondantes aux protéines 7S (viciline : 50, 33, 20, 17 kDa, convicine : 71 kDa) et 11S (légumine : 20 et 40 kDa en conditions réductrices et 60 kDa en conditions non réductrices) sont visibles sur le gel.

Une première étape de purification a eu lieu par chromatographie échangeuse d'anion (colonne streamline DEAE 260 mL (GE Healthcare)) afin de séparer les protéines 11S des protéines 7S. L'extrait de farine centrifugé est passé sur la colonne dans un tampon Tris 50 mM à pH 8 avec un débit de 35 mL/min. Afin de pouvoir passer tout le volume d'extrait de farine, 2 chromatographies successives ont été réalisées. En sortie de colonne, la solution éluée est récupérée par fraction de 350 mL. Le chromatogramme est donné en figure 36.

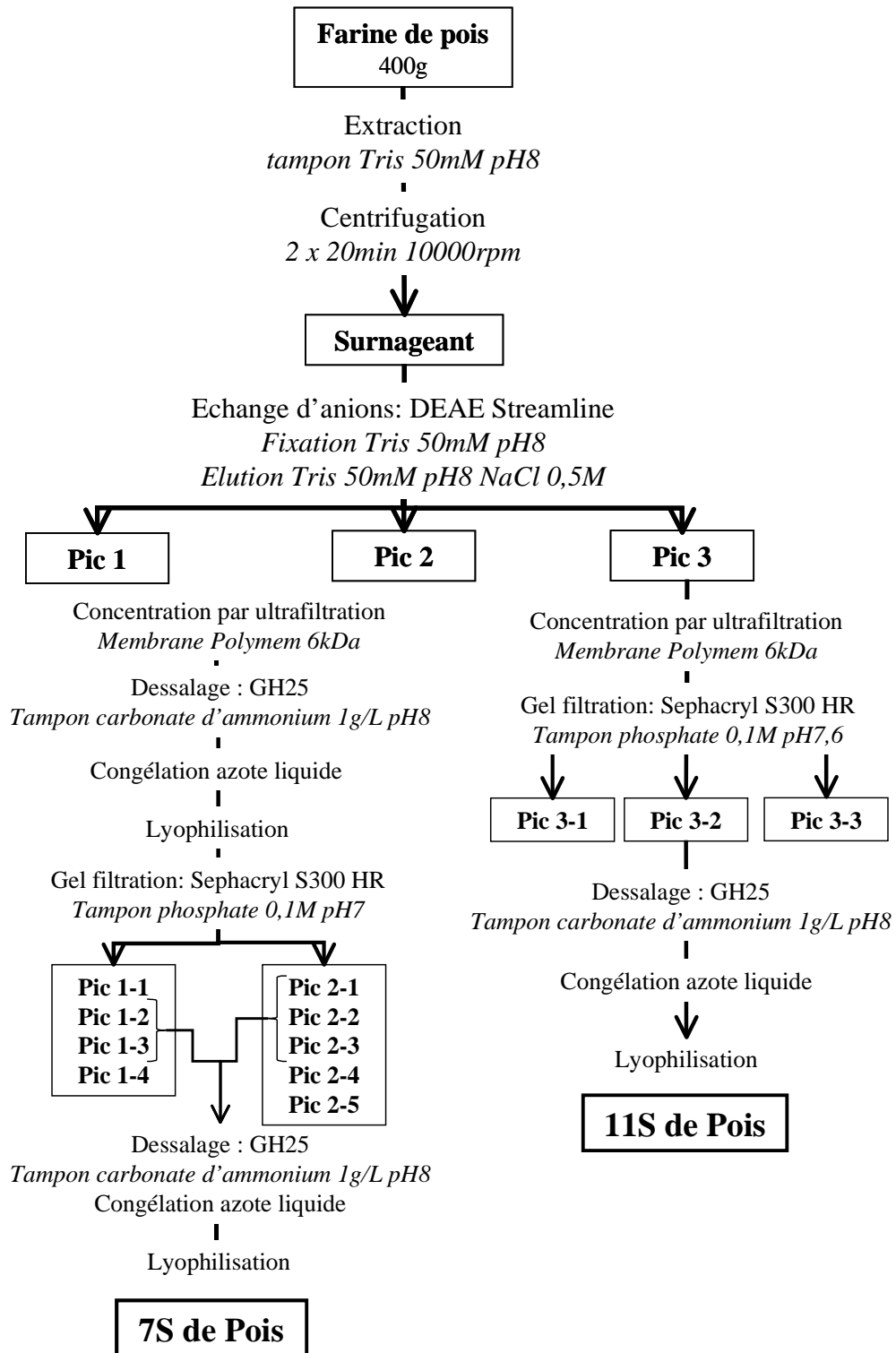


Figure 35 : Schéma global de la purification des protéines 7S et 11S de pois réalisée à l'INRA de Nantes selon le protocole établi par Gueguen et al. (1984).

D'après Gueguen et al. (1984), la partie non retenue avant le pic 1 est principalement constituée d'une partie de la viciline (7S) et des albumines présentes dans la farine. Les 3 pics suivants sont ceux qui contiennent les protéines d'intérêt. En rassemblant les fractions correspondant aux pics sur le chromatogramme, on peut récupérer séparément les différentes protéines.

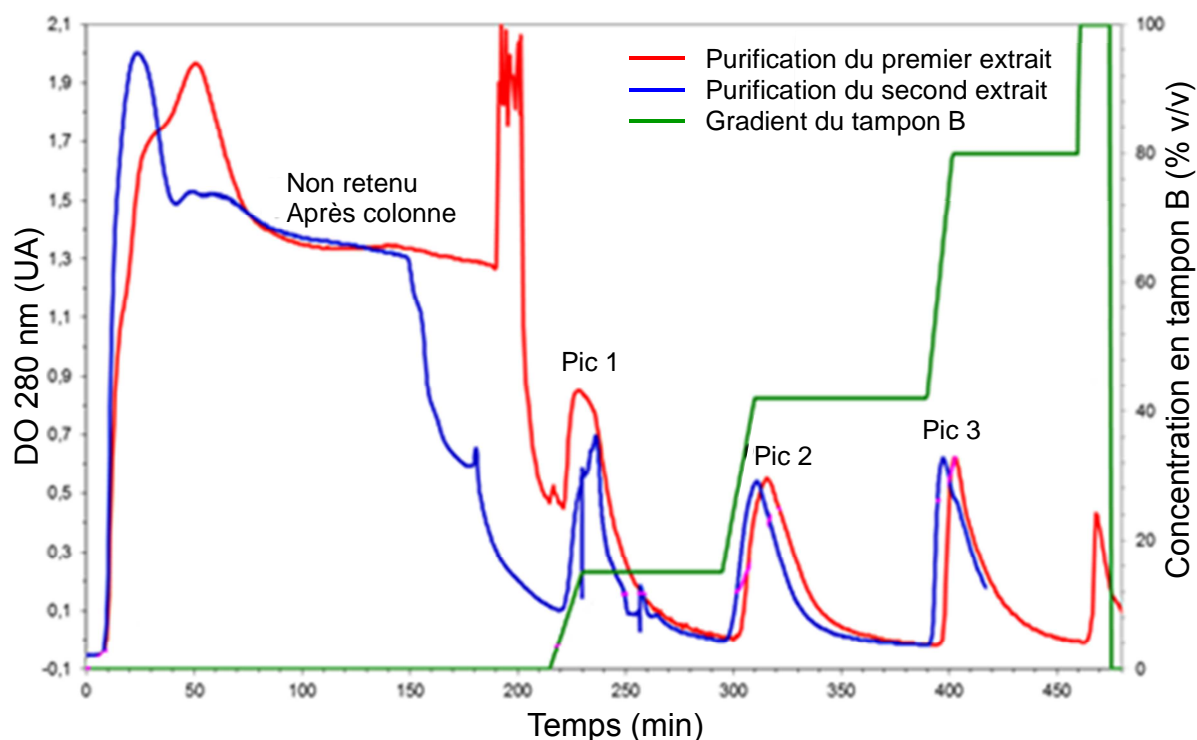


Figure 36 : Chromatogrammes des extraits de farine de pois Caméor sur une colonne DEAE Streamline 260 mL. Injection de 3L d'extrait de farine à un débit de 35 mL/min.

Les fractions des deux chromatographies ont donc été récoltées et mélangées pour correspondre aux 3 pics visibles. Selon Gueguen et al. (1984), on s'attend à retrouver de la 7S de pois dans les pics 1 et 2 (mélanges de viciline et de convicine en différentes proportions) et de la 11S dans le pic 3. Des analyses en SDS PAGE nous ont permis de vérifier la séparation des 7S et 11S de Pois (figure 37).

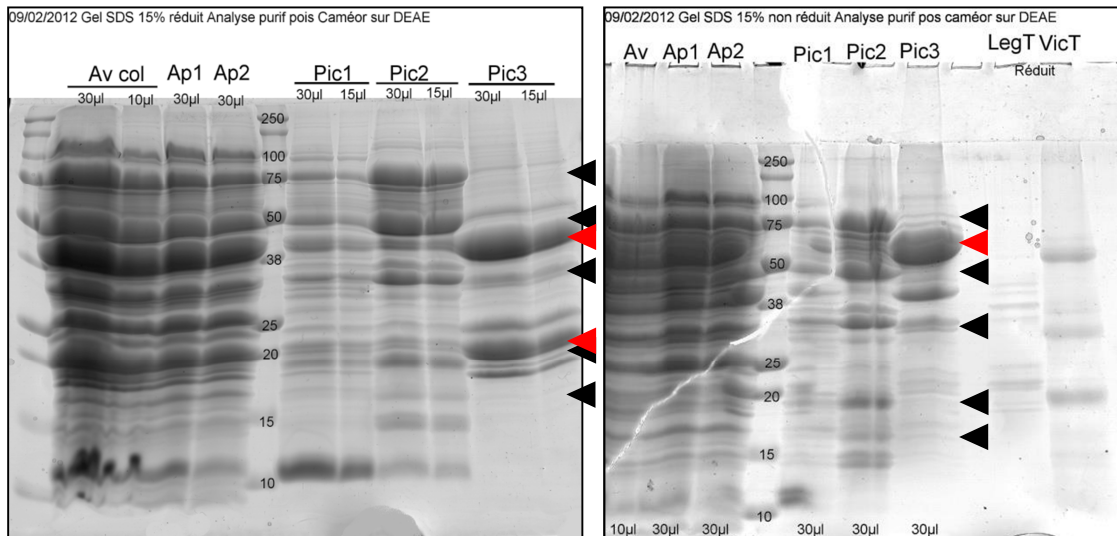


Figure 37 : Gels SDS Page 15% en conditions dénaturantes réductrices (gauche) et non réductrices (droite) de la farine de pois Caméor dispersée dans le tampon (Av col), des extraits de farine après la centrifugation (Ap1 et Ap2) et des fractions correspondant aux pics 1,2 et 3 après chromatographie échangeuse d’anions (Pic1, Pic2 et Pic3). LegT (11S) et VicT (7S) correspondent à des protéines témoins (Dépôts : 15 et 30 µg (1 µg/mL)). Symboles ◄ : sous-unités de la protéine 7S (50, 33, 20, 17 kDa pour la viciline et 71 kDa pour la conviciline en conditions réductrices et non réductrices). Symboles ◄ : sous-unités de la protéine 11S (20 et 40 kDa en conditions réductrices et 60 kDa en conditions non réductrices).

Pour la viciline et la conviciline (7S de pois), on s’attend à trouver des poids moléculaires de 50, 33, 20, 17 kDa correspondant aux sous unités de viciline séparées et 71 kDa pour la sous-unité de conviciline que ce soit en conditions réductrices ou non réductrices. Les bandes apparues sur la figure 37 correspondent bien à ces poids pour les pics 1 et 2. Pour la légumine, des poids moléculaires de 20 et 40 kDa sont attendus en conditions réductrices et 60 kDa en conditions non réductrices. Ces poids correspondent aux bandes obtenues pour le pic 3. On a donc bien séparé la 7S de la 11S de pois même si les électrophorèses montrent tout de même la présence en moindre quantité des deux types de protéines dans chaque fraction sans nous permettre d’en estimer la quantité.

Suite à la séparation de la 7S et de la 11S, les trois fractions (pics 1, 2 et 3) sont concentrées successivement en utilisant un système d’ultrafiltration Polymem (Polymem, Toulouse, France) avec une membrane avec un seuil de coupure à 6 kDa. Le tableau 13 donne les résultats de cette concentration.

Pics	1	2	3
Volume initial (mL)	2980	4550	3350
Volume final (mL)	480	530	500
Facteur de concentration	6.2	8.6	6.7

Tableau 13 : Résultat de la concentration des fractions purifiées de farine de pois Caméor.

La purification des 3 fractions par gel filtration a été réalisée sur une colonne Sephacryl 300 HR avec un système de purification Explorer100. Les deux types de fractions ont été purifiées dans un tampon phosphate 0,1M à pH 7,5 pour la 11S (pic 3) et à pH 7 pour la 7S (pics 1 et 2). La fraction 11S a été purifiée en 7 passages (débit : 5 ml/L, volume d'élution : 1,5 volumes de colonne) et les fractions pic 1 et pic 2 (7S) resolubilisées à 50 mg/mL dans le tampon phosphate ont été purifiées en 5 passages pour le pic 2 et 2 passages pour le pic 1. En sortie de colonne, les fractions récupérées étaient de 75 mL. Les figures ci-dessous présentent les chromatogrammes de purification des 3 fractions.

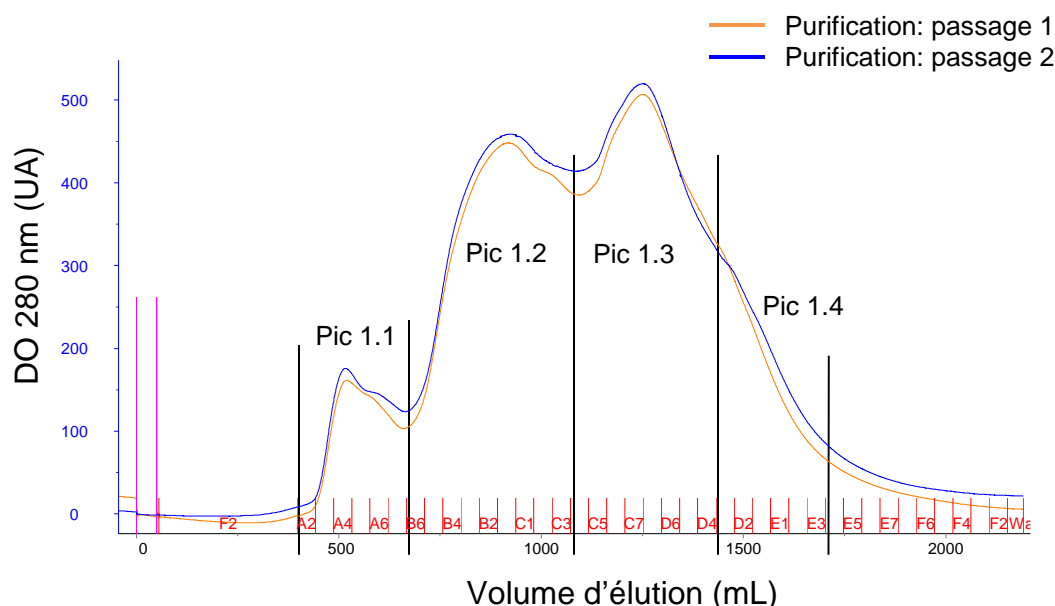


Figure 38 : Chromatogrammes de la fraction pic 1 (7S) de l'extrait de farine purifié par gel filtration sur une colonne Sephacryl 300HR 1800 mL. Injection de 70 mL de la fraction pic 1 à un débit de 5 mL/min.

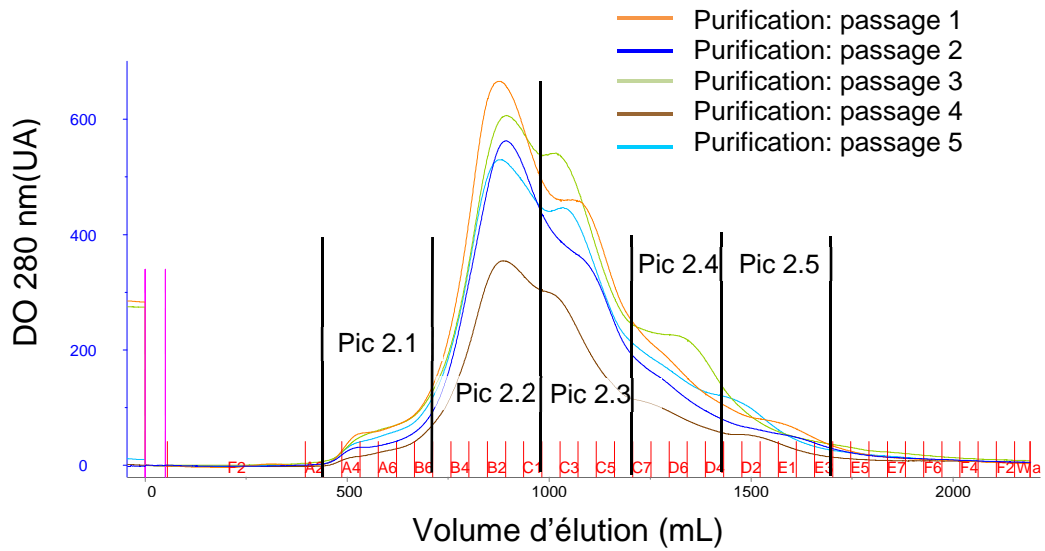


Figure 39 : Chromatogrammes de la fraction pic 2(7S) de l'extrait de farine purifié par gel filtration sur une colonne Sephacryl 300HR 1800 mL. Injection de 70 mL de la fraction pic 2 à un débit de 5 mL/min.

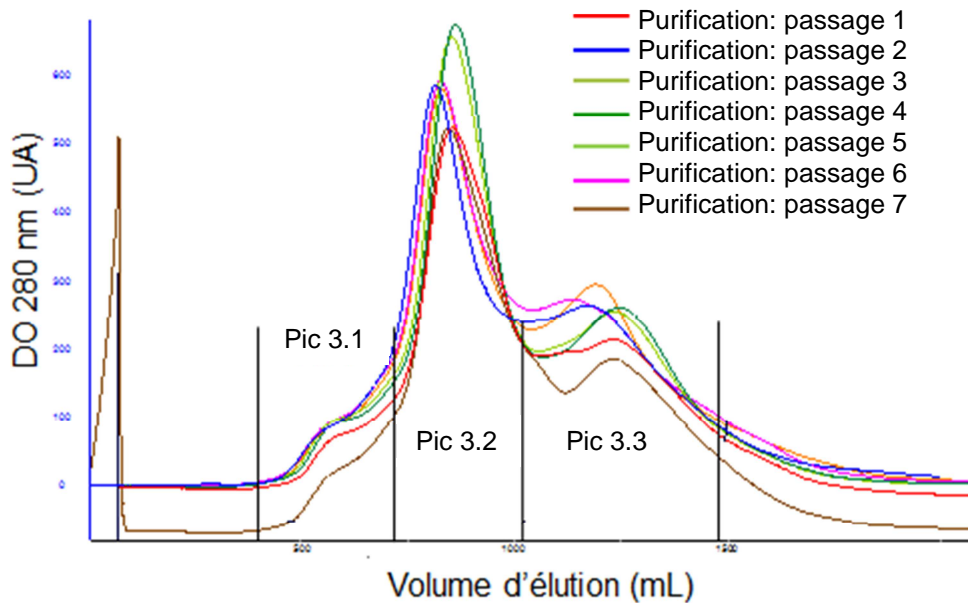


Figure 40 : Chromatogrammes de la fraction pic 3 (11S) de l'extrait de farine purifié par gel filtration sur une colonne Sephacryl 300HR 1800 mL. Injection de 70 mL de la fraction pic 3 à un débit de 5 mL/min.

On a donc obtenu 12 fractions (9 de 7S et 3 de 11S). Les fractions jugées intéressantes en fonction de leur temps d'éluion ont alors été dessalées par l'intermédiaire d'une nouvelle chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Cellufine GH-25 3L (Amicon) dans un tampon carbonate d'ammonium pH 8 1 g/L. Sachant que l'on souhaite étudier l'impact de la force ionique sur les mélanges de protéines, cette étape était très importante car elle permet de retirer la majorité du sel présent dans les échantillons comme le montre la figure 41.

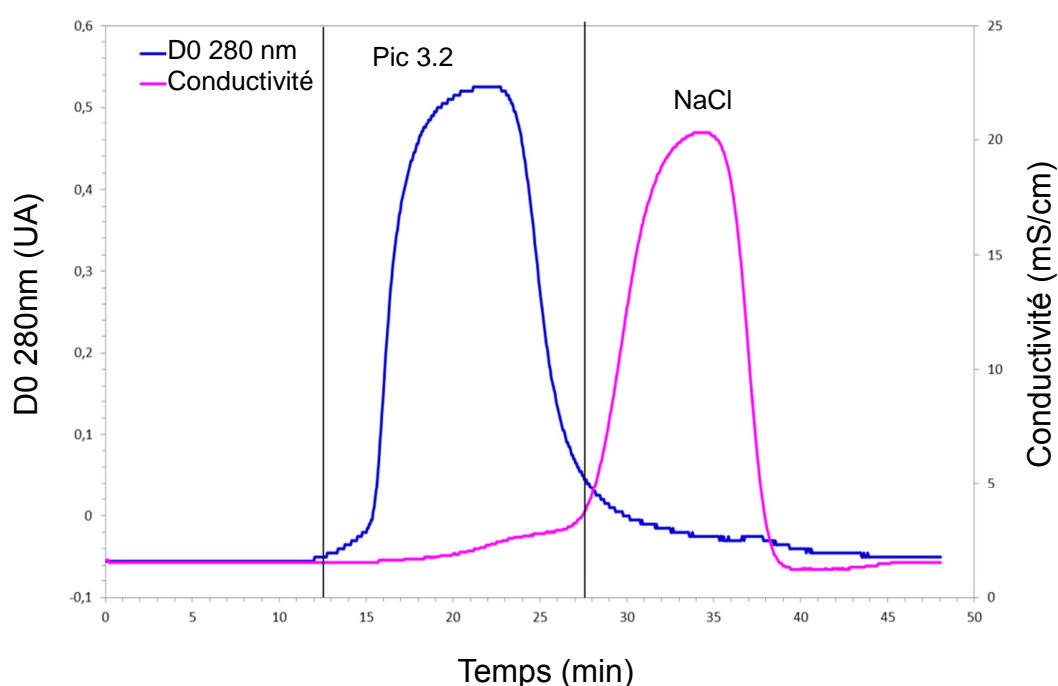


Figure 41 : Exemple de chromatogramme de dessalage en carbonate d'ammonium sur une colonne GH25 3L. Injection de 900 mL de la fraction 3.2 à un débit de 80 mL/min.

Suite à cette étape, toutes les fractions ont été congelées à l'azote liquide ou à -20°C puis lyophilisées. Afin de choisir la fraction utilisée lors de l'étude, des caractérisations ont été réalisées qui sont présentées dans le paragraphe « Caractérisation ». Le bilan massique de cette purification est présenté dans le tableau 14.

Pics DEAE	Pics SephacrylS300	Pool des Runs	Type de congélation	Masse récoltée (g)	Masse totale du pic (g)
1 (7S)	1.1	1+2	Azote		5,11
	1.2	1+2	Azote		1,49
	1.3	1+2	Azote		1,01
	1.4	1+2	-20°C		4,82
2 (7S)	2.1	1+2	-20°C		0,5
		3+4+5	-20°C		
	2.2	1+2	Azote		4,05
		3+4+5	Azote		
	2.3	1+2	Azote		2,36
	3+4+5	Azote			
	2.4	1+2+3+4+5	-20°C		11,08
	2.5	1+2+3+4+5	-20°C		12,74
3 (11S)	3.1	1+2	Azote		0,38
		3+4	-20°C		0,4
		5+6+7	-20°C		0,47
	3.2	1+2	Azote	1,16	
		3+4	Azote	1,24	
		5+6+7	Azote	1,64	
	3.2	1+2	Azote	0,39	
		3+4	-20°C	0,64	
		5+6+7	-20°C	0,74	

Tableau 14 : Bilan massique de la purification des globulines de pois jaune.

Les échantillons lyophilisés de 7S et de 11S de pois ont été conservés en chambre froide (4°C) dans des flacons hermétiques.

1.1.2. Glycine (11S) de soja

La purification de la glycine de soja (11S) s'est faite à partir d'une fraction déjà enrichie en 11S et préparée à l'INRA de Nantes en 2009 par précipitation différentielle au point isoélectrique (11S pH=6,4, 7S pH=4,8) selon la méthode de Marcone et al. (1994). Cette méthode consiste à solubiliser la fraction dans un tampon Tris 20 mM pH 8,6 NaCl 1M pendant une nuit à 4°C (concentration de 50g/L). La solution obtenue est centrifugée à 10000 rpm pendant 20 minutes et le surnageant est récupéré puis purifié par gel filtration sur une colonne Sephacryl 300 HR à un débit de 2,5 mL/min. Trois pics ont ainsi été identifiés sur le chromatogramme (figure 42) et les fractions correspondantes à ces pics en sortie de colonne ont été rassemblées.

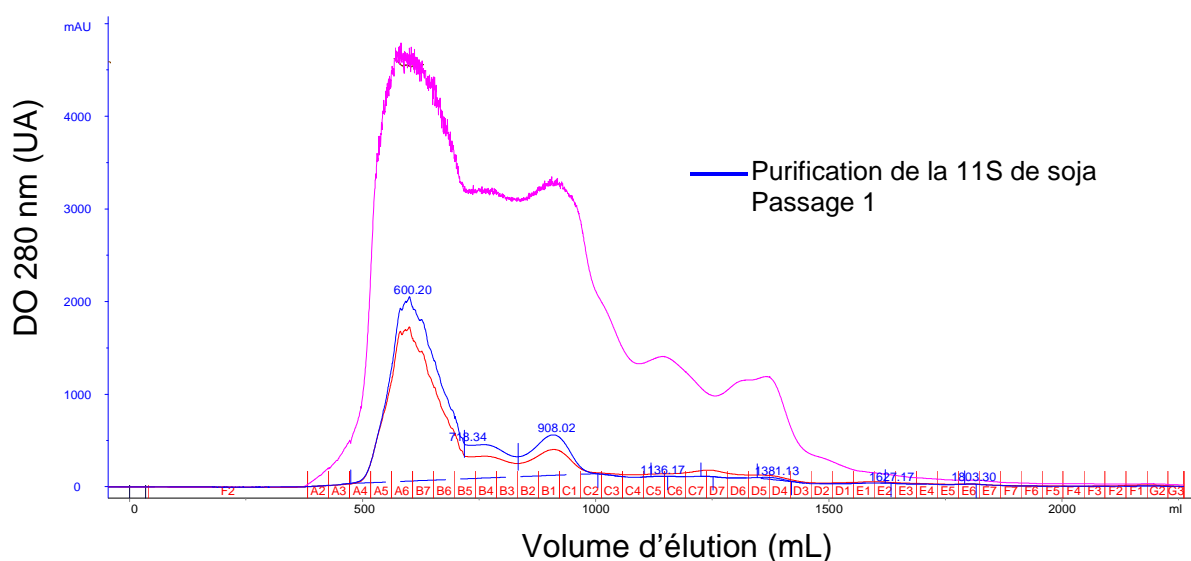


Figure 42 : Chromatogramme de la fraction enrichie en 11S de soja purifiée par gel filtration sur colonne Sephacryl 300HR 1800 mL. Injection de 35 mL de la fraction enrichie en 11S de soja à un débit de 2,5 mL/min.

Ces 3 fractions ont été dialysées pendant 3 jours en carbonate d'ammonium pH 8 (1g/L) avec un seuil de coupure de 10 kDa puis congelés à -20°C et lyophilisés. Le tableau 15 présente le bilan massique de cette purification.

Pic	Masse en g	Rendement purification % 2.5g (masse de fraction enrichie de départ)
1	0.91	36
2	0.28	11
3	0.3	12
		59 %

Tableau 15 : Rendement massique de la purification de 11S de soja à partir de la fraction enrichie préparée à l'INRA en 2009.

Les quantités de protéines purifiées sont intéressantes. Il faut cependant vérifier la pureté de chaque pic en électrophorèse SDS-PAGE afin de choisir la bonne fraction pour l'étude (paragraphe « Caractérisation »). Sachant que la glycinine (11S) n'est pas parfaitement soluble dans ces conditions, le rendement de purification est assez bon avec des pertes correspondant à la solubilisation (perte de solubilité à chaque congélation), à la purification, à la dialyse et à la lyophilisation.

Les protéines de soja ont été conservées en chambre froide (4°C) dans des flacons hermétiquement clos.

1.2. Caractérisation

1.2.1. Pureté

Plusieurs analyses ont été réalisées sur les échantillons à notre disposition afin de déterminer leur degré de pureté et retenir la fraction la plus pure et en quantité suffisante pour le reste de l'étude.

1.2.1.1. Viciline, convicine (7S) et légumine (11S) du pois

Des électrophorèses SDS-Page 15% en conditions dénaturantes réductrices ont été réalisées sur toutes les fractions obtenues à la fin du protocole de purification et sont présentées dans la figure 43. Les échantillons ont été solubilisés à 1mg/mL avec d'être

déposés sur les gels. On s'attend à des poids moléculaires de 20 et 40 kDa pour la légumine (11S), 50, 33, 20, 17 pour la viciline (7S) et 71 kDa pour la conviciline (7S).

On peut voir sur ces électrophorèses qu'il reste des traces de 11S dans les échantillons de 7S et inversement. Cependant cette contamination est inévitable dans le cas de la purification des protéines végétales. La pureté aurait pu être améliorée en ajoutant une étape de purification avec une colonne de concanavoline A qui aurait fixé les protéines glycosylées mais la quantité finale de protéines obtenues n'aurait alors pas été suffisante.

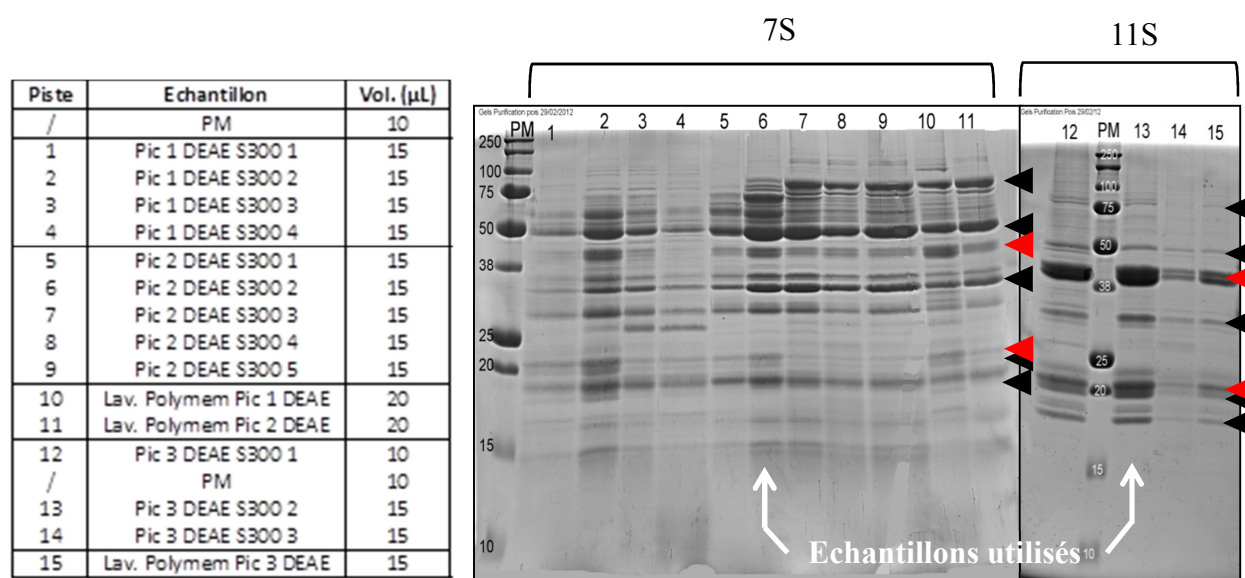


Figure 43 : Electrophorèses SDS-Page des fractions en fin de protocole de purification des globulines de pois Caméor (Pistes 1 à 9 : 7S – Pistes 12, 13 et 14 : 11S) (Dépôts : 15 µg). Symboles ◀ : sous-unités de la protéine 7S (50, 33, 20, 17 kDa pour la viciline et 71 kDa pour la conviciline) ; symboles ◀ : sous-unités de la protéine 11S (20 et 40 kDa).

On a donc choisi de conserver les échantillons qui semblaient les plus concentrés en protéines d'intérêt tout en étant les moins contaminés par d'autres bandes pour les utiliser dans l'étude (7S : Pics 1.2, 1.3 et 2.2, 11S : Pics 3.1 et 3.2). Ces observations ont été confirmées par la réalisation d'analyses Western Blot avec des anticorps anti-11S (2001), anti-7S (2001), anti-PA1a (2002), anti-PA1b (1998) et anti-PA2 (1994) préparés à l'INRA de Nantes et qui ont également montré l'absence d'albumines (2S) dans les échantillons sélectionnés.

Pour compléter les électrophorèses et vérifier le poids moléculaire des protéines présentes dans ces lyophilisats, nous avons également réalisé des analyses en gel filtration sur une colonne Superose 6. La séparation a été réalisée en tampon phosphate salin (PBS) sur deux volumes de colonne (débit = 0,5 mL/min). La calibration de la colonne avec des protéines de poids moléculaires connus a permis de calculer les coefficients de partage (K_{av}) et de déduire le poids moléculaire en fonction du volume de rétention (tableau 16).

Protéine	Ve (ml)	Kav	PM kDa	%
Pic 1.2	13,73	0,417	500	2
	14,75	0,491	253	33
	15,72	0,562	132	39
	17,35	0,680	45	8
	19,09	0,807	14	15
	22,55	1,059	1	4
Pic 1.3	14,92	0,504	226	1
	15,88	0,574	119	10
	18,1	0,735	27	17
	18,98	0,799	15	70
	22,5	1,055	1	2

Protéine	Ve (ml)	Kav	PM kDa	%
Pic 2.2	14,67	0,485	267	21
	15,61	0,554	142	64
	18,99	0,8	15	15
	21,3	0,968	3	0

Protéine	Ve (ml)	Kav	PM kDa	%
Pic 3.1	7,89	-0,008	24671	6
	11,44	0,25	2305	5
	12,48	0,326	1151	17
	14,01	0,437	414	70
	16,05	0,586	106	2
	19,09	0,807	14	1
Pic 3.2	12,93	0,359	852	6
	14,04	0,44	406	94
	17,18	0,668	50	0
	19,99	0,873	8	0
	22,38	1,047	2	0

Tableau 16 : Poids moléculaires calculés des protéines présentes dans les fractions purifiées de protéines de pois et pureté des échantillons (Légumine (11S) => oligomère = 360 kDa, monomères = 40, 20 kDa, Viciline (7S) => oligomère = 150kDa, monomères = 50, 33, 20, 17 kDa, Convicine (7S) => oligomère = 210kDa, monomères = 71 kDa).

Suite à ces analyses, on a choisi d'utiliser la fraction 2.2 pour la 7S qui comprend 85% de 7S sous forme monomérique et la fraction 3.2 pour la 11S qui en contient 94 % sous forme monomérique et qui sont les deux fractions les plus concentrées en protéines d'intérêt.

La concentration en protéines dans les échantillons sélectionnés a été déterminée, respectivement pour les protéines 7S et 11S, à 88 et 92% (dosage par méthode Kjeldahl). Nous avons également réalisé des analyses en thermogravimétrie sur ces échantillons afin de déterminer la quantité de cendres présentes. Les échantillons sont ainsi chauffés à 400°C jusqu'à ce que leur masse se stabilise. On a ainsi trouvé environ 5% de cendres sur les deux échantillons de 7S et de 11S de pois.

1.2.1.2. Conglycinine 7S et glycinine 11S du soja

Les fractions de protéine 11S de soja purifiées durant la thèse ont été analysées électrophorèses SDS-Page (figure 44) :

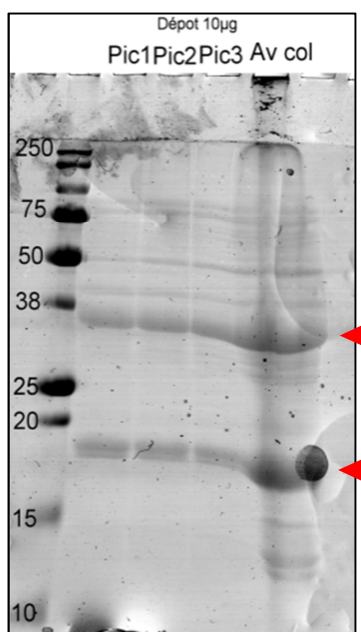


Figure 44 : Electrophorèse SDS-Page comparée de la 11S de soja purifiée (pics 1, 2 et 3) et du lot de fraction enrichie non purifié (Av Col) en conditions réductrices (Dépôts : 15 µg). Symboles ◀ : sous-unités de la protéine 11S (18 et 36 kDa).

Que ce soit avant ou après la purification, on observe bien les deux bandes à 36 et 18 kDa identifiant la protéine 11S. Dans la fraction enrichie non purifiée (Av col), il y avait également de nombreuses bandes associées à de petits poids moléculaires qui ont presque disparu après le passage par la chromatographie d'exclusion stérique.

La quantité de matière minérale présente dans ces échantillons et déterminée par analyse thermogravimétrique s'élève à 5% de cendres (m/m). La fraction correspondant au pic 1 a été utilisée durant l'étude afin d'avoir une quantité suffisante du même échantillon pour réaliser toutes les analyses (0,91 g contre 0,3 g). La part de protéines présentes dans cette fraction a été estimée à 93% (dosage par la méthode Kjeldahl).

Pour la protéine 7S de soja, les différentes fractions collectées ont été analysées par électrophorèse SDS-Page (Figure 45) et par chromatographie en gel filtration.

Puits	Echantillon	Dépôt (µl)
MW1	Marqueur de taille Biorad	10
1	11S CB SO 090210.04	15
2	11S dialyse eau 28/04/2009	15
3	11S dialyse (NH ₄) ₂ CO ₃ 28/04/2009	15
4	7S CB SO 090210.02	15
5	7S 17/04/2009 pic1	15
6	7S 17/04/2009 pic2	15
7	7S 17/04/2009 pic4	15
8	7S 11/05/2009 pic2 GF	15
9	7S 11/05/2009 pic1 GF A	15
10	7S 11/05/2009 pic2 GF B	15
11	7S 11/05/2009 pic4 GF D	15

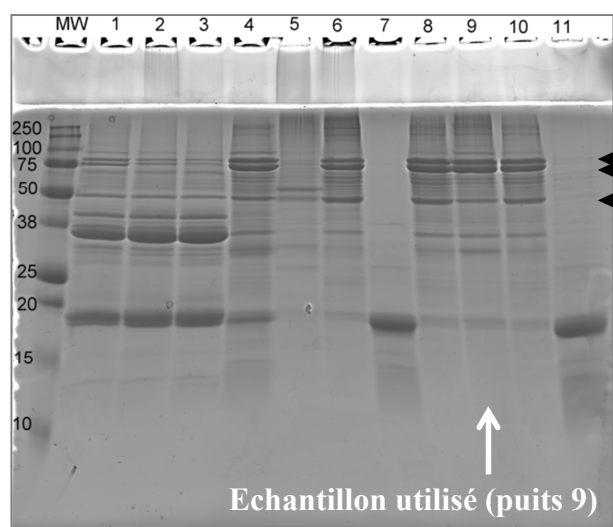


Figure 45 : Electrophorèses SDS-Page des échantillons de 7S de soja (puits 4 à 11) en conditions réductrices (Dépôts : 15 µg). Symboles ◀ : sous-unités de la protéine 7S (50, 74 et 78 kDa).

Cinq échantillons contenaient donc une majorité de protéine 7S de soja (puits 4, 6, 8, 9 et 10) et étaient faiblement contaminés par la présence de 11S. Parmi ces lots, nous avons décidé d'utiliser l'échantillon correspondant au puits 9 suite aux analyses faites en gel filtration (figure 46).

En effet, tous ces échantillons contenaient la 7S principalement sous forme de dimères mais cet échantillon en possédait le plus fort taux (80%) en comparaison d'autres extraits comme celui du pic2 17/4/2009 (figure 47) qui en contient 75%.

Dans l'échantillon sélectionné, le dosage des protéines par la méthode Kjeldahl a montré que cette fraction contenait 81% de protéines et l'analyse du taux de cendres par thermogravimétrie a révélé la présence de 15% de matière minérale.

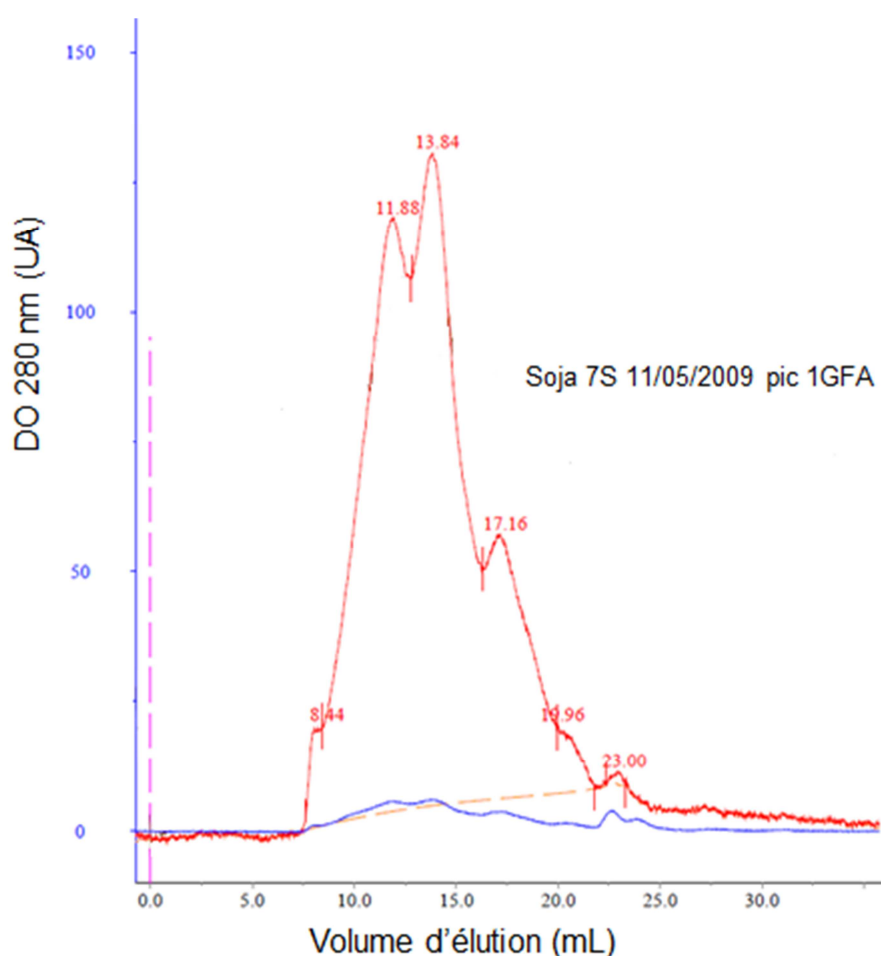


Figure 46 : Chromatogramme analytique de l'échantillon de protéine 7S de soja pic 1GFA (correspondant au puits 9 de l'électrophorèse) sur une colonne superose 6 24 mL. Injection de 100 μ L de 7S de soja à un débit de 0,5 mL/min.

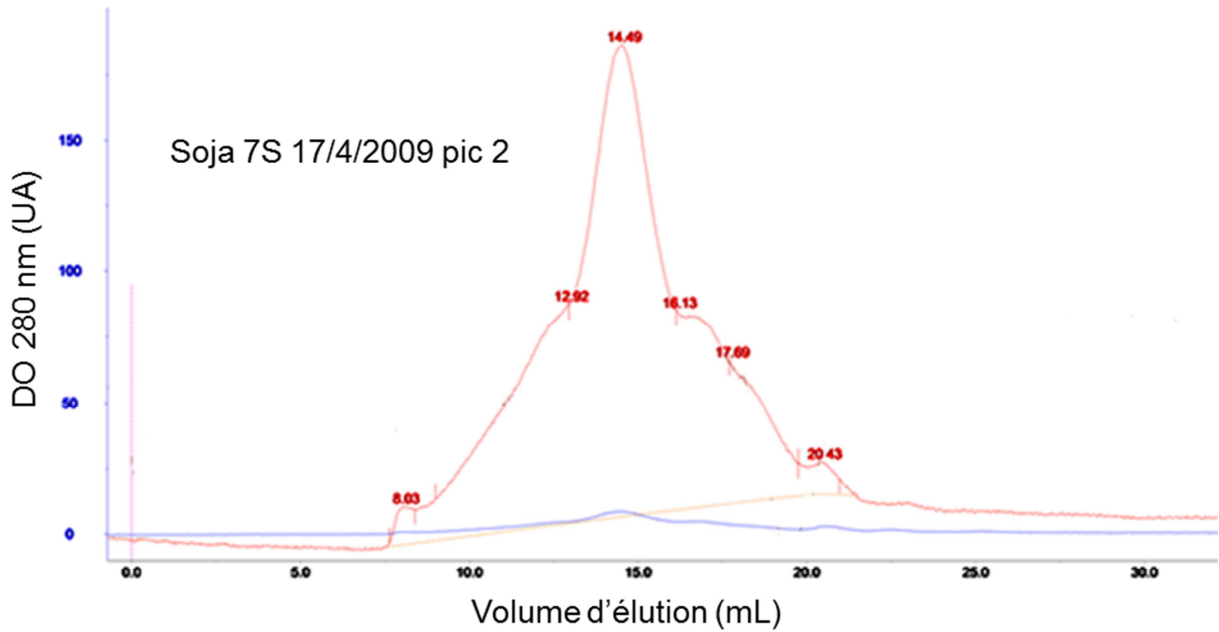


Figure 47 : Chromatogramme analytique de l'échantillon de protéine 7S de soja pic 2 17/4/2009 (correspondant au puits 6 de l'électrophorèse) sur une colonne superose 6 24 mL. Injection de 100 µL de 7S de soja à un débit de 0,5 mL/min.

1.2.1.3. Napine (2S) du colza

Les 4 lots indépendants de 2S de colza ont été analysés par gel filtration (figure 49), électrophorèse SDS-Page (figure 48) et analyse thermogravimétrique.

Puits	Echantillon	Dépôt (µl)
MW	Marqueur de taille Biorad	8
1	Colza 2S 30/6/8	30
2	Colza 2s 16/6/8	30
3	24/6/8 F11-24	30
4	24/6/8 F25-28	30
MW	Marqueur de taille Biorad	8
5	Colza 2S 30/6/8	30
6	Colza 2S 16/6/8	30
7	24/6/8 F11-24	30
8	24/6/8 F25-28	30

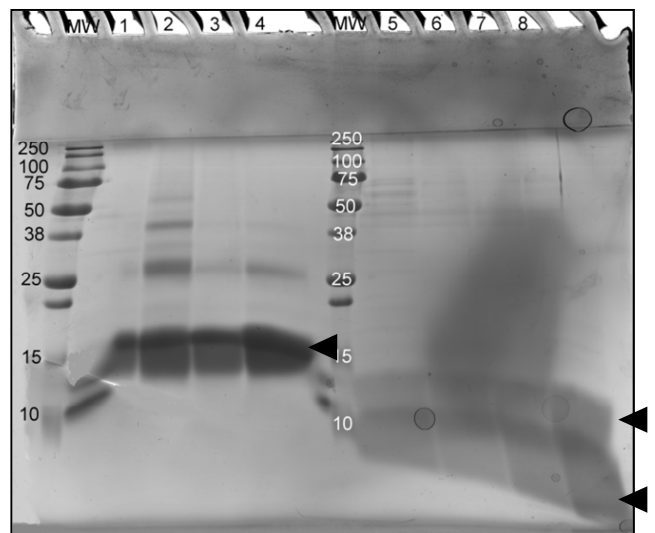


Figure 48 : Electrophorèse SDS-Page comparée des différents lots de 2S de colza en conditions non réductrices (1, 2, 3 et 4) et réductrices (5, 6, 7 et 8) (Dépôts : 15 µg). Symboles ◀ : sous-unités de la protéine 2S (10 et 4,5 kDa) en conditions réductrices et protéine native (14 kDa) en conditions non-réductrices.

Dans les 4 échantillons, on retrouve la présence de bandes correspondant aux poids moléculaires attendus de 14 kDa en conditions non réductrices (puits 1 à 4) et de 10 et 5 kDa en conditions réductrices (puits 5 à 8). L'échantillon 1 a été sélectionné pour l'étude car il n'y a quasiment pas d'autres bandes que celles de la napine et donc une contamination très faible par d'autres protéines. De plus, le taux de cendres de cet échantillon, déterminé par analyse thermogravimétrique était de seulement 8 %, ce qui correspond à la quasi-totalité de la matière non protéique présente car l'échantillon contient 90% de protéines (dosage par méthode Kjeldahl).

La Figure 49 présente le chromatogramme de cet échantillon en chromatographie d'exclusion stérique analytique.

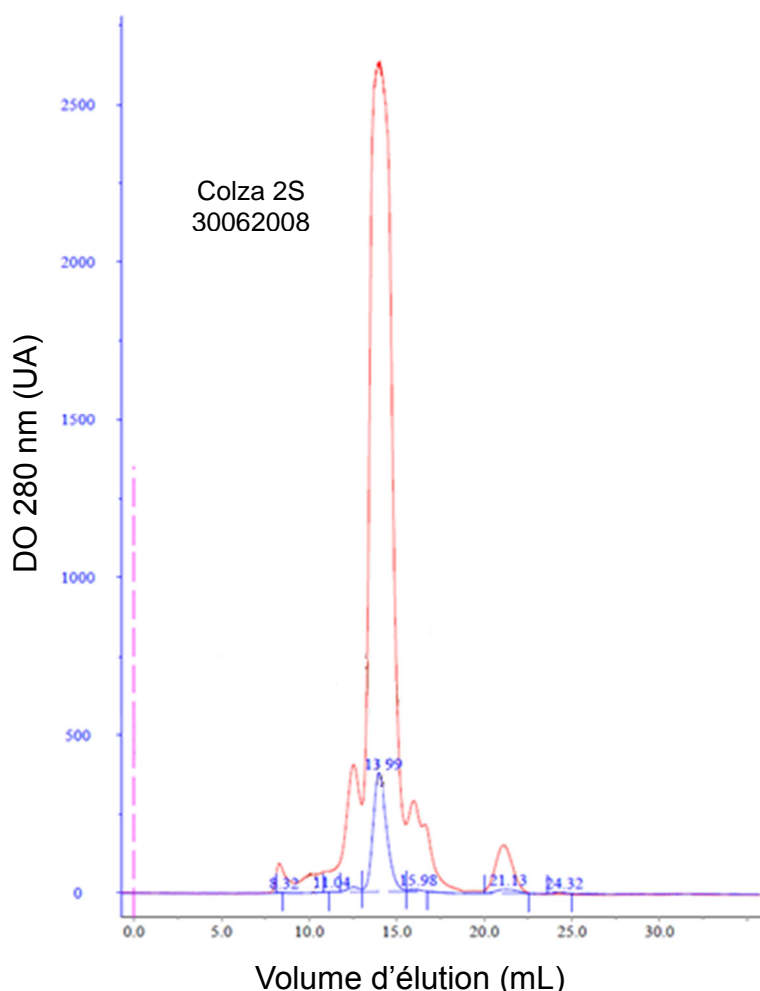


Figure 49 : Chromatogramme analytique de l'échantillon de napine (2S de colza) du lot 30062008 sur une colonne 75 HR 24 mL dans un tampon Tris 50 mM pH 8,5 NaCl 1 M. Injection de 100 μ L de 2S de colza à un débit de 0,5 mL/min.

La calibration de la colonne à l'aide de protéines de référence a permis de relier le volume de sortie à un poids moléculaire. Le pic principal (sorti à 13,99 mL) correspondait donc à un poids moléculaire calculé de 16,4 kDa, très proche des 14 kDa attendus pour la napine et représentait 90% de l'échantillon. Ce lot a donc plus de 90% de napine sous forme monomérique, le reste des protéines de l'échantillon comprenant de la napine agrégée et des traces d'autres protéines de colza.

Une dernière analyse a également été réalisée sur ce lot afin de détecter la présence éventuelle de sucres par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). L'échantillon ne contient aucun sucre à part des traces infimes d'arabinose.

1.2.1.4. Protéines animales : caséine β et lysozyme

Les deux protéines animales utilisées durant l'étude ont toutes les deux été fournies par des industriels et leur pureté a été déterminée en mesurant la teneur en protéines estimée par la méthode Kjeldahl, la nature des protéines identifiée par électrophorèse SDS-Page (Figure 50) et le taux de cendres (analyse thermogravimétrique).

La caséine β contient 90% (m/m) de protéines et son taux de cendres a été déterminé à 10% (m/m) tandis que le lot de lysozyme est constitué à 95% (m/m) de protéines avec un taux de cendres de 5% (m/m). Ce taux de cendres représente la matière minérale présente dans l'échantillon mais qui n'a cependant pas été identifiée. La quantité de calcium a été mesurée pour la caséine β (1,93 mg/g d'échantillon) mais reste infime par rapport au reste de la matière minérale.

Quant aux protéines, on peut voir sur l'électrophorèse que les bandes obtenues correspondent bien aux poids moléculaires attendus pour la caséine (25 kDa) et le lysozyme (14 kDa). Les deux lots sont très propres mises à part les traces d'ovomucoïde (28 kDa) dans l'échantillon de lysozyme et de l'albumine de sérum bovin (60 kDa) dans la caséine β .

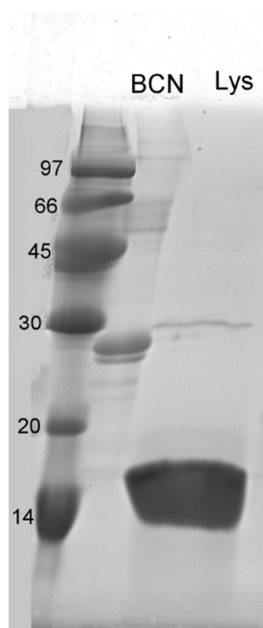


Figure 50 : Electrophorèse SDS-Page des échantillons de caséine β (BCN) et de lysozyme (Lys) (Dépôts : 15 μ g) / Poids Moléculaires attendus caséine β : 25 kDa – lysozyme : 14 kDa.

1.2.2. Solubilité

En plus de ces analyses, nous avons également mesuré la solubilité des protéines sélectionnées dans un tampon Tris 50 mM pH 8 NaCl 1M. Pour cela, nous avons solubilisé chaque échantillon dans le tampon à une concentration de 1 mg/mL pendant 8 heures à température ambiante. La solution était ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 10000 rpm (4000 g). Un dosage des protéines par la méthode BCA était réalisé sur le surnageant et la quantité de protéines mesurée comparée à la quantité théorique présente pour une solubilité de 100% (1 mg/mL). Les résultats obtenus (tableau 17) ont montré que les 3 petites protéines (caséine β , lysozyme et napine) étaient solubles à plus de 90 % dans ces conditions ce qui concorde avec la bibliographie (Mezdour et al., 2008).

Protéine	Pois		Soja		Colza	Caséine β	Lysozyme
	7S	11S	7S	11S	2S		
Solubilité	58%	55 %	73 %	58 %	90 %	96 %	100 %

Tableau 17 : Solubilité des différentes protéines de l'étude dans un tampon Tris 50 mM pH 8 NaCl 1M.

Les protéines 7S et 11S de pois et de soja dont la taille dépasse les 100 kDa sont beaucoup moins solubles dans ces conditions. Ces protéines peuvent avoir une solubilité similaire aux valeurs obtenues à ces pH si la force ionique est très faible (0,08 mol/L) (Kimura et al., 2008). Mais selon la littérature, leur solubilité devrait être de 80 à 100% à une concentration de 0,8 mg/mL dans un tampon avec une force ionique de 0,5 mol/L, proche de nos conditions d'expérimentation. Cette différence peut être due aux congélations incluses dans les méthodes de purification et qui diminuent la solubilité d'une protéine et/ou à l'utilisation d'une protéine de référence animale pour calibrer les dosages avec la méthode BCA.

2. Criblage des couples protéines végétales/protéines animales en fonction des conditions physico-chimiques

Après la purification et la caractérisation des protéines, les lots sélectionnés ont été utilisés pour étudier l'impact des paramètres physico-chimiques (concentration totale, ratio massique, pH, concentration en NaCl) sur des mélanges d'une protéine végétale et d'une protéine animale. La turbidité et la taille des particules des dix solutions différentes ont été mesurées et les résultats analysés en utilisant un modèle linéaire généralisé (GLM) qui permet de tester la significativité des effets de chaque facteur ainsi que de leurs interactions.

2.1. Turbidité

Le modèle linéaire généralisé permet d'associer par une relation linéaire une variable de sortie (variable à expliquer, ici l'absorbance) à une ou plusieurs variables explicatives (par exemple, la concentration, le pH). Pour l'étude des couples protéine végétale/protéine animale et en se limitant aux interactions de premier ordre (entre deux facteurs), on a considéré le modèle linéaire multiple suivant :

$$\begin{aligned} \text{Absorbance} = & \mu + \alpha_1(\text{concentration totale}) + \alpha_2(\text{ratio massique}) + \alpha_3(\text{pH}) + \\ & \alpha_4(\text{concentration en NaCl}) + \alpha_{12}(\text{concentration totale} * \text{ratio massique}) + \\ & \alpha_{13}(\text{concentration totale} * \text{pH}) + \alpha_{14}(\text{concentration totale} * \\ & \text{concentration en NaCl}) + \alpha_{23}(\text{ratio massique} * \text{pH}) + \alpha_{24}(\text{ratio massique} * \\ & \text{concentration en NaCl}) + \alpha_{34}(\text{pH} * \text{concentration en NaCl}) + \varepsilon \end{aligned}$$

avec μ la constante du modèle, α_i les effets de chaque facteur, α_{ij} les effets des interactions de premier ordre entre chaque facteur et ε l'erreur de mesure non expliquée par les effets des facteurs.

Le tableau 18 présente les résultats statistiques obtenus pour un couple protéique (viciline-convicine (7S)/caséine β). Le modèle a été construit à partir de l'équation ci-dessus et en retirant les facteurs non significatifs, c'est-à-dire les facteurs dont la p-value (Tableau 18) est supérieure à 0,05 ce qui signifie qu'on a plus de 5% de chances de se tromper en considérant ce facteur comme significatif. Pour le couple viciline-convicine (7S)/caséine β , les effets non significatifs des interactions et donc éliminés sont : Concentration en NaCl*Concentration totale et Concentration en NaCl* Ratio massique. L'effet de la concentration en NaCl est non significatif (p-value = 0,82) mais a tout de même été conservé dans le modèle car l'interaction entre la concentration en NaCl et le pH est quant à elle significative.

Effets principaux		Interactions	
Facteurs	Significativité (p-value)	Interactions de premier ordre	Significativité (p-value)
Concentration totale	10⁻⁵	Concentration totale*Ratio massique	10⁻⁵
Ratio massique	10⁻⁵	Concentration totale*pH	10⁻⁵
pH	10⁻⁵	Concentration totale*concentration en NaCl	0,85
Concentration en NaCl	0,82	Ratio massique*pH	10⁻⁵
		Ratio massique*concentration en NaCl	0,90
		Concentration en NaCl*pH	10⁻⁵

Tableau 18 : Résultats statistiques obtenus pour le couple viciline-convicine (7S)/caséine β . Les effets sont considérés comme significatifs lorsque la p-value est inférieure à 0,05 (marge d'erreur de 5%) et sont notés en gras. Les effets grisés correspondent aux effets conservés dans le modèle.

Le tableau 19 récapitule l'ensemble des analyses statistiques réalisées sur les mesures de turbidité pour les 10 couples protéine végétale/protéines animale. Les effets de la concentration totale en protéines, du ratio massique en protéines et du pH sont toujours significatifs. Quant à la concentration en NaCl, elle n'a pas d'effet significatif pour les couples viciline-conviciline (7S)/caséine β , glycine (11S)/caséine β et conglycinine (7S)/lysozyme. Cette absence d'effet n'est donc pas liée à une protéine en particulier.

Afin de comprendre l'effet des facteurs physico-chimiques sur l'agrégation des protéines végétales et animales, l'influence précise de chaque facteur sur la turbidité est observée graphiquement. Sur ces graphiques, la turbidité est représentée en fonction de chaque variable explicative par la moyenne de toutes les valeurs de la turbidité pour chaque niveau de la variable explicative. Les barres d'incertitudes portées ne représentent que la variance qui n'est pas expliquée par le modèle. Les effets de chaque facteur significatif, excepté de la concentration totale dont l'effet est identique pour chaque couple, seront présentés couple par couple. La majorité des interactions entre facteurs ont également un effet significatif. Les effets de la concentration totale et des interactions sont identiques et ne seront présentés que pour le couple viciline-conviciline (7S)/lysozyme. Les figures des effets des facteurs principaux non montrées dans cette partie sont présentées en annexes.

Résultats des analyses statistiques du criblage	Couples protéiques		Significativité (p-value)									
			Concentration totale	Ratio massique	pH	Concentration en NaCl	Concentration totale * ratio massique	Concentration totale * pH	Concentration totale * concentration en NaCl	Ratio massique * pH	Ratio massique * concentration en NaCl	pH * concentration en NaCl
Lysozyme	Pois	Viciline (7S)/lysozyme	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	<i>0,15</i>	0,03	<i>0,08</i>	p<0,01	p<0,01	0,01
		Légumine (11S)/lysozyme	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
	Soja	Conglycinine (7S)/lysozyme		p<0,01	p<0,01	<i>0,73</i>				p<0,01	<i>0,85</i>	<i>0,92</i>
		Glycinine (11S)/lysozyme		p<0,01	p<0,01	p<0,01				p<0,01	p<0,01	p<0,01
	Colza	Napine (2S)/lysozyme	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
	Caséine β	Pois	Viciline-conviciline (7S)/caséine β	p<0,01	p<0,01	p<0,01	<i>0,82</i>	p<0,01	p<0,01	<i>0,85</i>	p<0,01	<i>0,90</i>
Légumine (11S)/caséine β			p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
Soja		Conglycinine (7S)/caséine β		p<0,01	p<0,01	p<0,01				p<0,01	p<0,01	p<0,01
		Glycinine (11S)/caséine β		p<0,01	p<0,01	<i>0,65</i>				p<0,01	<i>0,74</i>	<i>0,81</i>
Colza		Napine (2S)/caséine β	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01

Tableau 29 : Récapitulatif de l'analyse statistique des résultats du criblage pour les 10 couples protéine végétales/protéine animale. Un facteur est considéré comme non-significatif lorsque la p-value est supérieure à 0,05 (marge d'erreur de 5%). Les effets significatifs sont en **gras** et les effets non significatifs en *italique*. Les cases grisées correspondent aux effets non étudiés (concentration totale pour les protéines de soja).

2.1.1. Interactions des protéines végétales avec le lysozyme

La première partie des résultats du criblage présente les données obtenues en turbidité pour les mélanges des différentes protéines végétales avec le lysozyme. Les protéines de pois et de soja présentent une charge négative a pH neutre alors que le lysozyme est lui chargé positivement ce qui est favorable à des interactions électrostatiques entre ces protéines.

2.1.1.1. Pois

Les deux protéines de pois sont similaires aux protéines de soja, considérées comme des protéines végétales de référence, mais différent de ces dernières par leurs charges de surface.).

2.1.1.1.1. Viciline-convicine (7S)/lysozyme

Selon les analyses statistiques, quatre facteurs (concentration totale, ratio massique, pH, concentration en NaCl) ont un effet significatif sur la turbidité des mélanges. Les résultats sont présentés pour la concentration totale, le rapport massique, le pH et la concentration en NaCl.

Effet de la concentration totale

L'évolution de la turbidité en fonction de la concentration totale est présentée dans la figure 51. La turbidité moyenne était deux fois plus forte lorsque la concentration en protéines variait de 1 à 5 g/L. L'augmentation de la turbidité avec la concentration montre qu'il y a de grosses particules présentes dans le mélange et que la quantité ou la taille de ces particules augmente avec la concentration. Cet effet est identique quel que soit le mélange et ne sera pas présenté pour les autres couples protéiques.

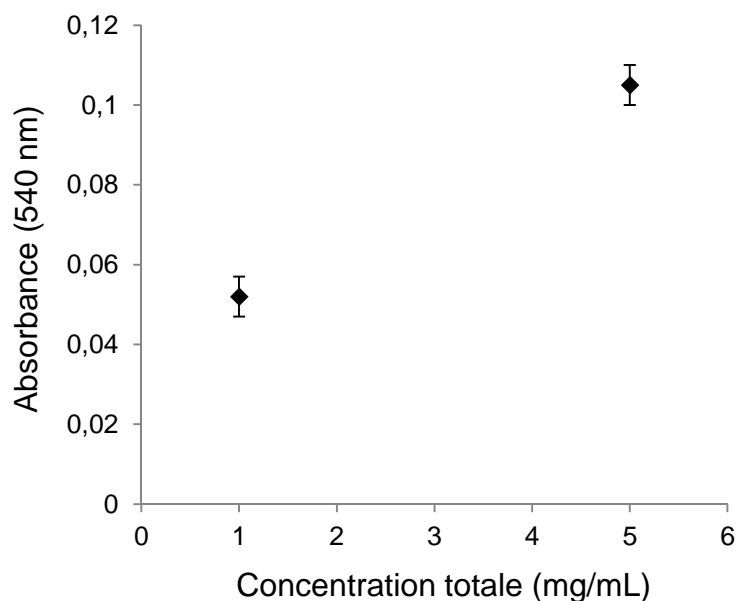


Figure 51 : Effets de la concentration totale en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-conviciline/lysozyme calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour tous les ratios massiques, pH et concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du rapport massique

L'effet du ratio massique sur la turbidité est présenté sur la figure 52. Lorsque la quantité de viciline-conviciline était inférieure ou égale à 10% (m/m) des protéines, la turbidité des solutions était très faible. A contrario, l'absorbance des solutions de viciline-conviciline pures était plus de deux fois supérieure. Une part de la 7S de pois (viciline-conviciline) n'est donc pas solubilisée. Les deux valeurs moyennes de turbidité, non significativement différentes, étaient encore plus fortes à des rapports massiques de 90/10 et 50/50. Cette augmentation de la turbidité peut être due à des interactions électrostatiques entre les deux protéines. Si on considère qu'en absence d'interaction, la turbidité du mélange devrait diminuer en proportion de la fraction de viciline-conviciline, son augmentation ne devrait pas être maximale pour le ratio 50/50.

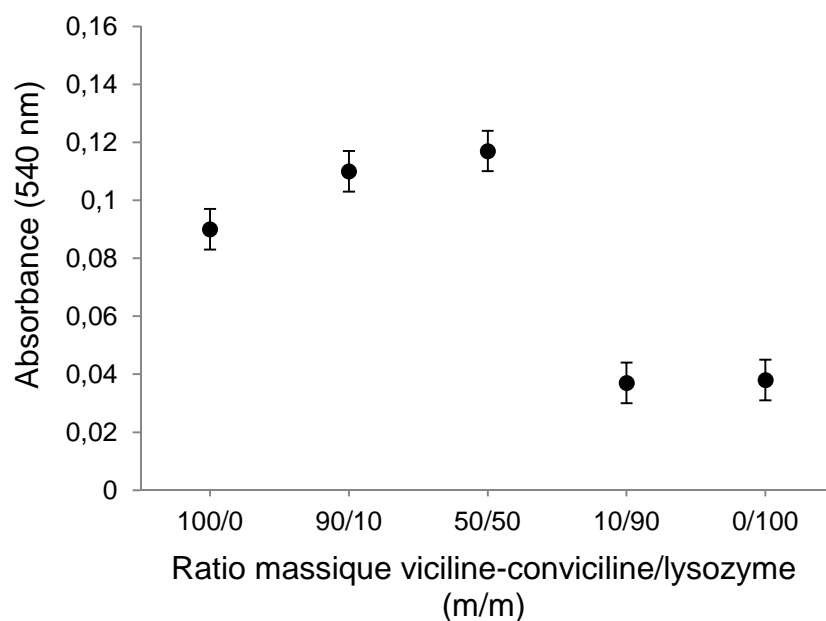


Figure 52 : Effets du ratio massique en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-convicine/lysozyme calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les pH et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du pH

Le pH entraînait une augmentation linéaire de la turbidité entre pH 6 et 8 (figure 53) puis la turbidité baissait lorsque le pH passait de 8 à 9. Comme la solubilité de la 7S de pois augmente (viciline-convicine) augmente toujours dans cette gamme de pH (Kimura et al., 2008), en absence d'interaction avec le lysozyme, nous devrions observer une baisse de la turbidité avec l'augmentation du pH. Cette augmentation de la turbidité moyenne suivie d'une diminution est liée aux interactions électrostatiques entre la 7S de pois (viciline-convicine) et le lysozyme qui semblent maximales à pH 8. Dans cette gamme de pH, la charge de la 7S de pois (viciline-convicine) augmente alors que celle du lysozyme diminue. La formation d'assemblages entre les deux protéines semble nécessiter une charge bien définie pour chaque protéine.

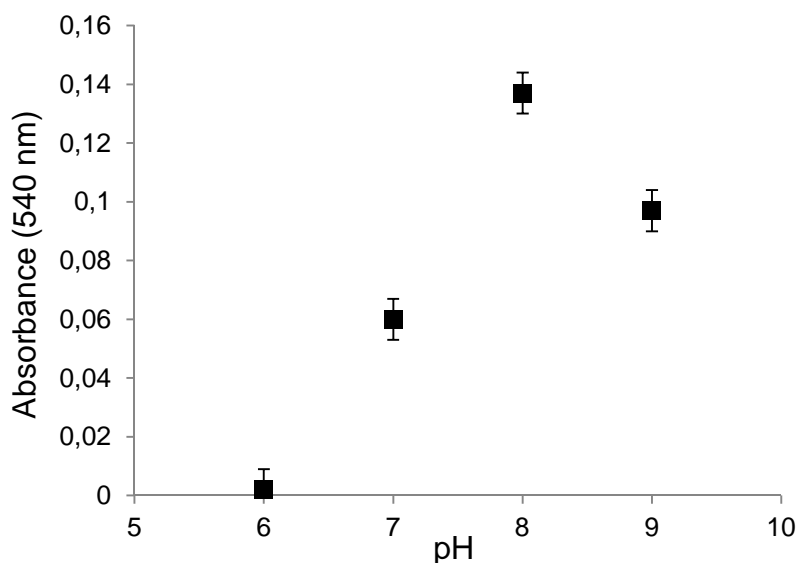


Figure 53 : Effets du pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-convicine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massique et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet de la concentration en NaCl

La valeur moyenne de l'absorbance des solutions de viciline-convicine/lysozyme diminuait lorsque la concentration en NaCl augmentait (figure 54). Cependant, cette baisse était faible et non monotone puisque la turbidité moyenne augmentait entre les concentrations 0,1 et 0,2 mol/L. Ce comportement est probablement lié conjointement à la solubilisation de la 7S de pois (viciline-convicine) agrégée et à l'impact du NaCl sur les interactions entre la 7S de pois (viciline-convicine) et lysozyme, électrostatiques ou d'autre nature.

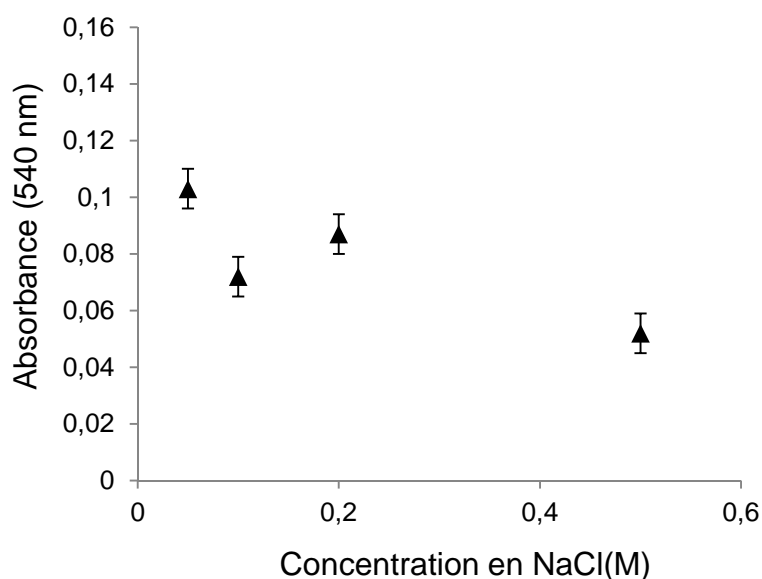


Figure 54 : Effets de la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-convicine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massiques et les pH. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Interactions entre les facteurs

Les interactions entre les facteurs concentration totale*ratio massique, concentration totale*pH, ratio massique*pH et pH* concentration en NaCl sont significatives pour le couple viciline-convicine/lysozyme (tableau 19). Cependant, les interactions avec les facteurs concentration totale et concentration en NaCl ne semblent pas directement liées à l'existence d'interactions entre la protéine végétale et la protéine animale. L'effet de la concentration totale assez similaire quel que soit le pH, faiblement plus accentué aux pH 7 et 8. (figure 55). De même pour l'effet de la concentration en NaCl qui ne modifie que très peu l'effet pH sauf à 0,1 M de NaCl, concentration à laquelle la turbidité est plus faible aux pH 8 et 9 (figure 56). Quant à l'interaction entre la concentration en NaCl et le ratio massique, elle se manifeste principalement à une concentration en sel de 0,2 M et pour des ratios massiques de 50/50 et 90/10 pour lesquels la turbidité semble plus forte par rapport à 0,1 M ce qui pourrait être dû à des interactions autres qu'électrostatiques entre les deux protéines (figure 57).

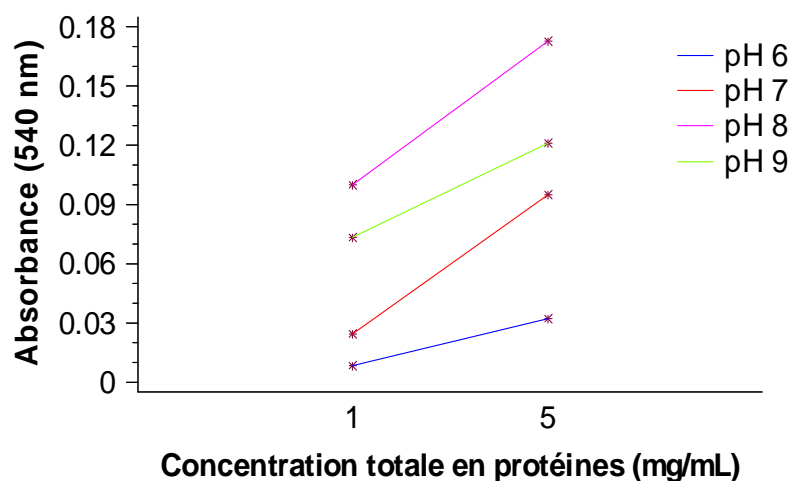


Figure 55 : Effets de l'interaction entre la concentration totale et le pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-convicine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs moyennes de l'absorbance en fonction de la concentration totale en protéines pour chaque valeur de pH.

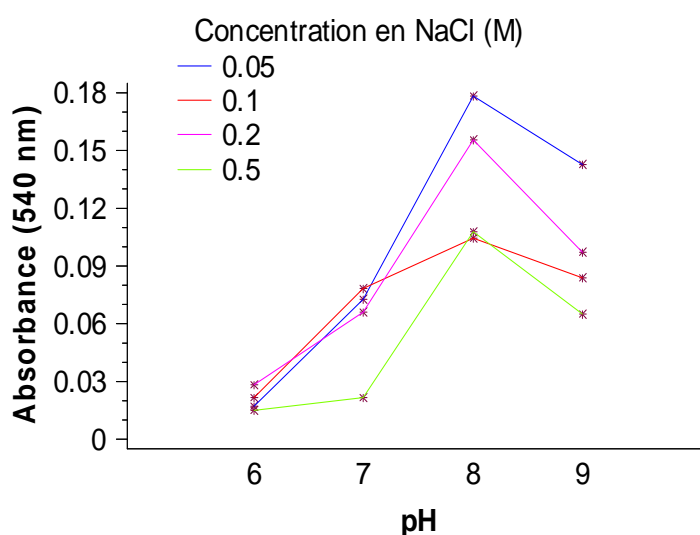


Figure 56 : Effets de l'interaction entre la concentration en NaCl et le pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-convicine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs moyennes de l'absorbance en fonction du pH pour chaque concentration en NaCl

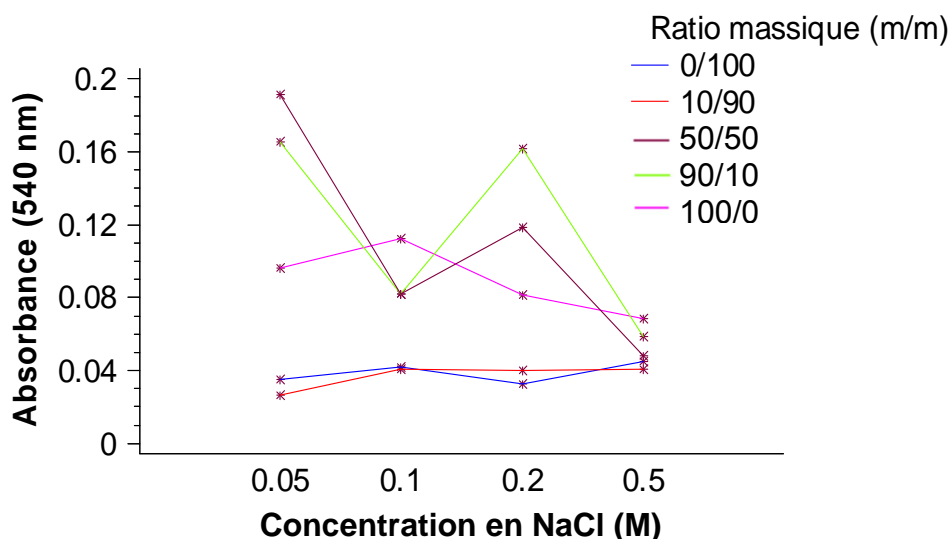


Figure 57 : Effets de l'interaction entre le ratio massique et la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-convicine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs moyennes de l'absorbance en fonction de la concentration en NaCl pour chaque ratio massique massique viciline-convicine/lysozyme.

Mais vu l'effet important du ratio massique et du pH sur la turbidité des solutions, il est plus intéressant d'observer l'effet des interactions entre ces facteurs (figure 58). Hormis à pH 6 pour lequel la valeur moyenne de la turbidité était donc très faible quel que soit le ratio massique, la turbidité était toujours plus forte pour des ratios massiques de 50/50 à 90/10. La turbidité est maximale pour le ratio 50/50 à pH 9, mais à 90/10 pour pH 8. Les évolutions de turbidité peuvent s'expliquer par l'agrégation de la 7S de pois (viciline-convicine) avec le lysozyme par le biais d'interactions électrostatiques. La formation d'assemblages serait facilitée par des charges de surfaces bien définies pour chaque protéine et maximale à pH 8. Mais en s'éloignant de ce pH, pour lequel un ratio massique de 90/10 (proche de 1/1 molaire) semble optimal, d'autres types d'assemblages, basés sur des ratios molaires plus faibles en viciline-convicine, pourraient aussi se former.

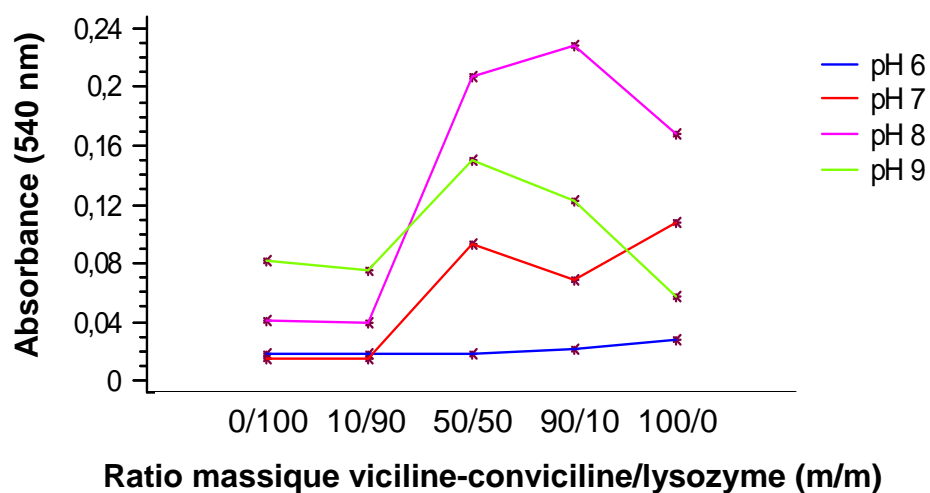


Figure 58 : Effets de l'interaction entre pH et ratio massique sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-convicine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs moyennes de l'absorbance en fonction du ratio massique viciline-convicine/lysozyme pour chaque valeur du pH.

L'évolution de la turbidité en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de mélange pour le couple viciline-convicine/lysozyme montre un maximum pour pH 8 et à des ratios massique compris entre 50/50 et 90/10. Cette augmentation de la turbidité est vraisemblablement due à des interactions électrostatiques entre les protéines de charges opposées mais au vu du faible effet de la concentration en sel, il n'est pas exclu que d'autres types d'interactions interviennent dans la formation des assemblages.

2.1.1.1.2. Légumine (11S)/lysozyme

Selon l'analyse de la variance, quatre facteurs (concentration totale, ratio massique, pH, concentration en NaCl) ont un effet significatif sur la turbidité. La concentration globale, qui entraîne une hausse de la turbidité moyenne, n'influe pas sur l'effet des autres facteurs.

Effet du rapport massique

La figure 59 montre l'effet du ratio massique légumine/lysozyme sur la turbidité du mélange. Plus la concentration en légumine était importante, plus les solutions étaient turbides. La turbidité des solutions est causée par la fraction de légumine non solubilisée lorsque le pH est supérieur à 8 ou la concentration en NaCl peu élevée (Kimura et al., 2008). Il n'y a donc probablement pas d'interaction entre les deux protéines.

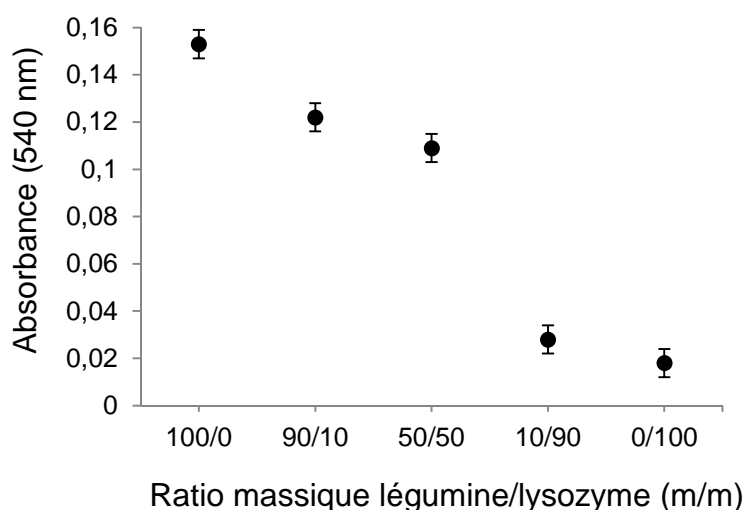


Figure 59 : Effets du ratio massique en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange légumine/lysozyme calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les pH et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du pH

La figure 60 présente l'effet du pH sur la turbidité des solutions. Celle-ci ne variait pas significativement tant que le pH ne dépassait pas une valeur de 8 mais chutait brutalement à pH 9 quand la légumine devenait plus soluble (Kimura et al., 2008).

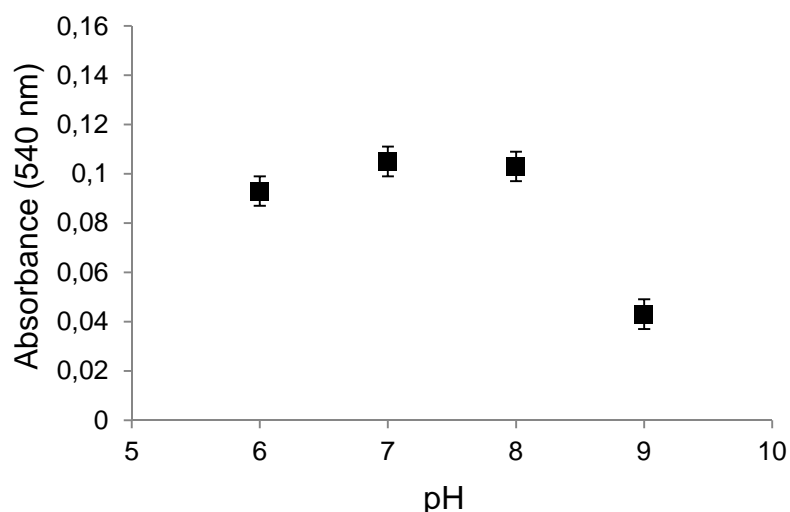


Figure 60 : Effets du pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange légumine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massique et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet de la concentration en NaCl

En dernier lieu, les effets de la concentration en NaCl sur les interactions entre légumine et lysozyme sont montrés dans la figure 61. La valeur moyenne de turbidité a diminué passant de 0,14 à 0,09 lorsque la concentration en NaCl augmentait de 0,05 mol/L à 0,1 mol/L. Après cette forte chute, la turbidité a continué à diminuer significativement mais beaucoup plus faiblement.

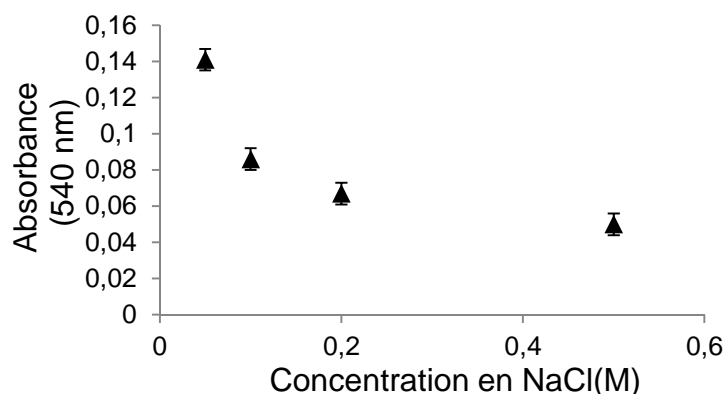


Figure 61 : Effets de la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange légumine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massiques et les pH. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Interactions entre les facteurs

Pour le couple légumine/lysozyme, toutes les interactions entre les facteurs ont un effet significatif (tableau 19) relié aux variations de solubilité de la protéine végétale mais celles-ci ne permettent pas de mettre en évidence d'interactions entre les deux protéines.

L'évolution de la turbidité en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de mélange pour le couple légumine/lysozyme ne peut être reliée qu'à la variation de solubilité de la légumine de sorte qu'aucune interaction entre les deux protéines n'a pu être mise en évidence.

2.1.1.2. Soja

Les protéines de soja sont les protéines végétales de référence et les plus utilisées dans l'industrie agroalimentaire d'où l'importance d'étudier l'impact de leur introduction dans des systèmes contenant des protéines animales.

Les couples incluant les protéines de soja et les protéines animales ont été testés à une seule concentration totale (1 mg/mL) afin de minimiser la consommation de matière première (quantité disponible très limitée).

2.1.1.2.1. Conglycinine (7S)/lysozyme

Dans ce couple, la conglycinine est mélangée à une protéine animale de charge globale opposée. Un effet significatif mais faible de deux facteurs (ratio massique, pH) a été détecté par analyse de la variance dans un modèle linéaire généralisé. Les résultats sont présentés facteur par facteur.

Effet du rapport massique

Comme la conglycinine et le lysozyme présentent une assez bonne solubilité, le rapport massique avait un faible impact sur la turbidité des solutions (figure 62). L'absorbance moyenne augmentait légèrement lorsque la concentration en conglycinine augmentait car il y avait plus de protéine insoluble dans le mélange.

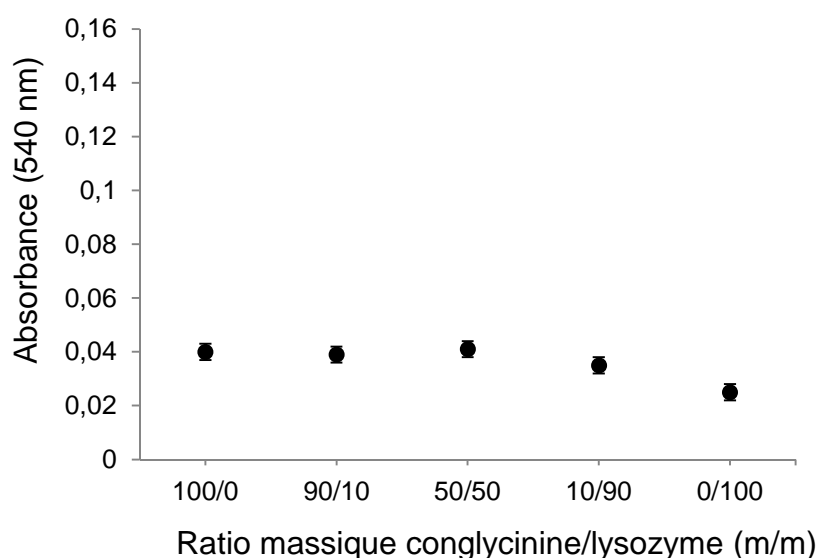


Figure 62 : Effets du ratio massique en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange conglycinine/lysozyme calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour tous les pH et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du pH

La figure 63 montre l'effet du pH sur la valeur moyenne de l'absorbance. La valeur diminuait très légèrement avec l'augmentation du pH, correspondant à une meilleure solubilisation de la conglycinine.

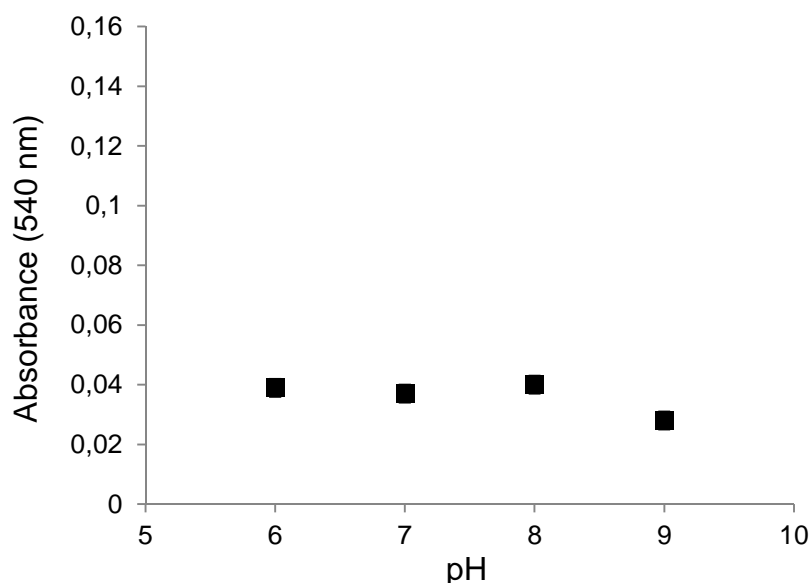


Figure 63 : Effets du pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange conglycinine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle pour tous les ratios massique et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Interactions entre les facteurs

Pour ce couple protéique, seule l'interaction entre les facteurs pH et ratio massique est significative (tableau 19). Son interprétation ne permet cependant pas de mettre en évidence un phénomène d'agrégation.

L'évolution de la turbidité en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de mélange pour le couple conglycinine/lysozyme ne peut être reliée qu'à la variation de solubilité de la conglycinine de sorte qu'aucune interaction entre les deux protéines n'a pu être mise en évidence.

2.1.1.2.2. Glycine (11S)/lysozyme

Les analyses statistiques réalisées sur ce couple ont montré un effet significatif des trois facteurs (ratio massique, pH, concentration en NaCl). Les résultats sont présentés facteur par facteur.

Effet du rapport massique

Les effets du rapport massique sur la turbidité sont présentés sur la Figure 64. La turbidité augmentait avec la concentration en glycinine. Les valeurs d'absorbance étaient plus élevées pour un ratio massique en protéine végétale supérieur à 50% à cause de la fraction non soluble de glycinine (Kimura et al., 2008).

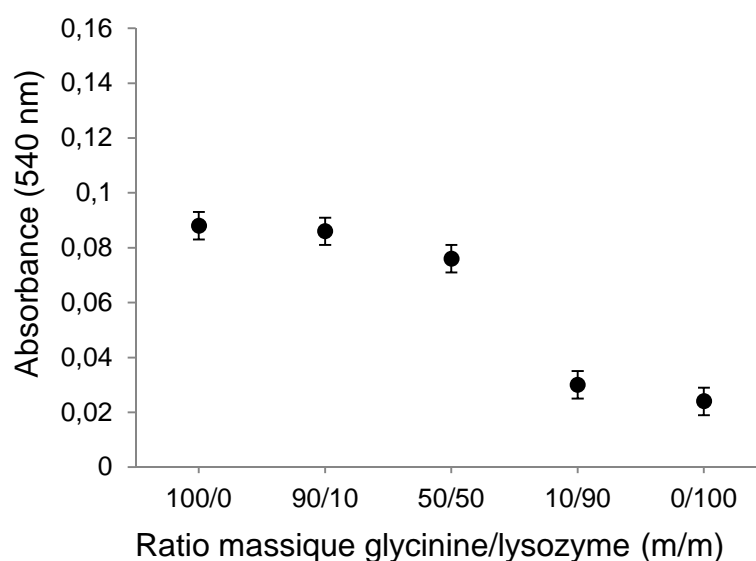


Figure 64 : Effets du ratio massique en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange glycinine/lysozyme calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour tous les pH et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du pH

La figure 65 montre l'effet du pH. La turbidité baissait linéairement avec l'augmentation du pH et donc avec l'augmentation la solubilité de la glycinine (Kimura et al., 2008).

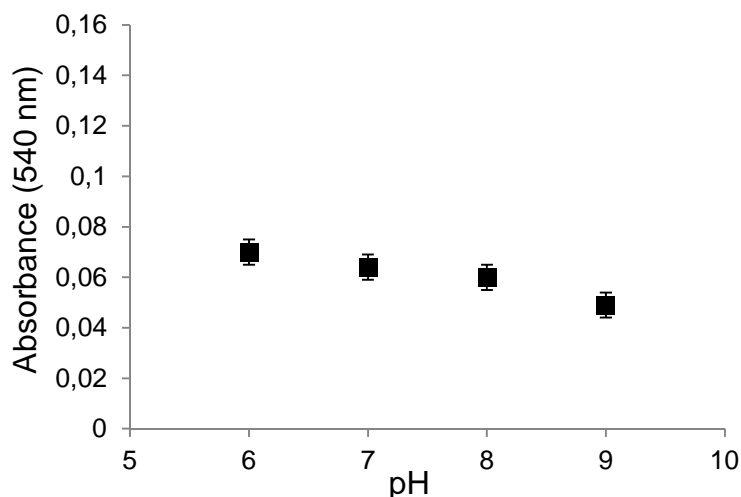


Figure 65 : Effets du pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange glycine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle pour tous les ratios massique et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet de la concentration en NaCl

L'ajout de NaCl dans la solution entraînait une diminution significative de la turbidité (figure 66). Entre des concentrations en NaCl de 0,05 mol/L et de 0,5 mol/L, la turbidité avait pratiquement été divisée par deux.

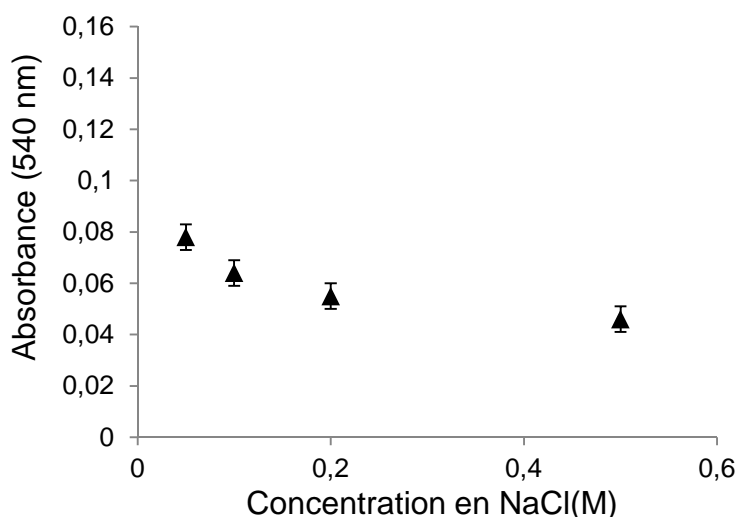


Figure 66 : Effets de la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange glycine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle pour tous les ratios massiques et les pH. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Interactions entre les facteurs

Toutes les interactions entre les trois facteurs ont un effet significatif (tableau 19), relié aux variations de solubilité de la protéine végétale, et ne permettent pas de démontrer l'existence d'interactions entre la glycine et le lysozyme.

L'évolution de la turbidité en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de mélange pour le couple glycine/lysozyme ne peut être reliée qu'à la variation de solubilité de la glycine. Par conséquent, aucune interaction entre les deux protéines n'a été mise en évidence.

2.1.1.3. Colza

2.1.1.3.1. Napine (2S) de colza/lysozyme

Le couple napine/lysozyme diffère des couples protéine de légumineuse/protéine animale par le fait qu'il implique deux protéines globulaires de petites tailles qui ont des charges globales de même signe. Les analyses statistiques sur la turbidité ont montré que la concentration totale, le ratio massique, le pH et la concentration en NaCl avaient un effet significatif. Les résultats sont donc présentés facteur par facteur sans la concentration totale. Cette dernière n'entraîne qu'une hausse de la valeur moyenne de la turbidité.

Effet du rapport massique

La figure 67 présente l'effet du rapport massique sur la turbidité. Toutes les solutions de napine et de lysozyme étaient transparentes à l'œil nu dans toutes les conditions possibles de concentration totale en protéines, de pH et de concentration en NaCl. Cependant, les valeurs d'absorbance mesurées augmentaient significativement et linéairement avec la concentration en lysozyme atteignant la valeur maximale pour une solution pure de lysozyme. Ces différences de turbidité peuvent donc s'expliquer par la concentration en lysozyme. Aucune interaction entre les protéines ne peut être observée.

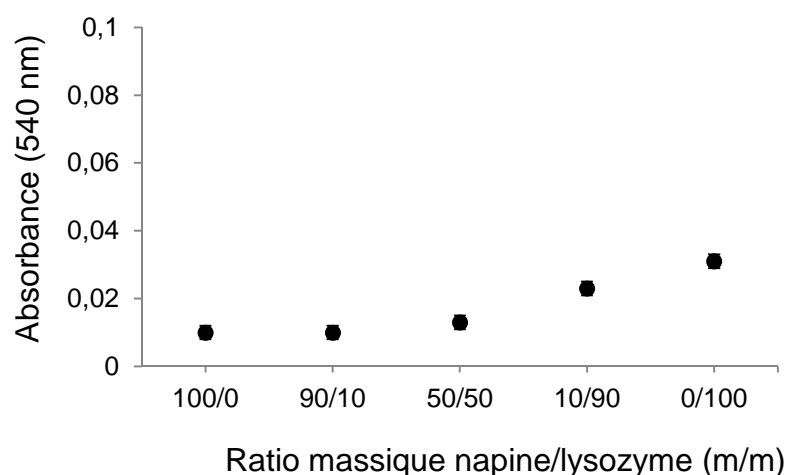


Figure 67 : Effets du ratio massique en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange napine/lysozyme calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les pH et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du pH

La valeur moyenne de la turbidité augmentait progressivement à partir de pH 8 (figure 68). Cependant, même si ces augmentations sont significatives, les valeurs d'absorbance mesurées restent très faibles et le trouble des solutions n'est pas visible à l'œil nu. Sachant qu'en augmentant le pH, on s'approche du point isoélectrique du lysozyme et de la napine, l'augmentation de turbidité peut être due à un début de précipitation de chacune des protéines

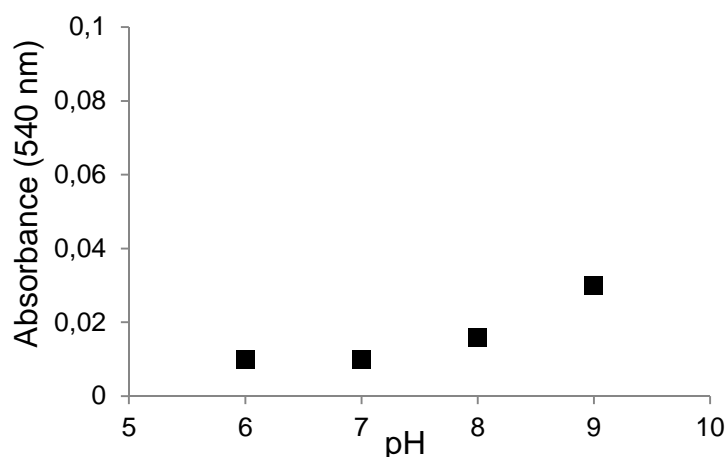


Figure 68 : Effets du pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange napine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massique et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet de la concentration en NaCl

Finalement, la concentration en NaCl, même si elle avait un effet significatif, n'avait que très peu d'impact sur la de la turbidité, les valeurs d'absorbance variant entre 0,011 et 0,022 (figure 69).

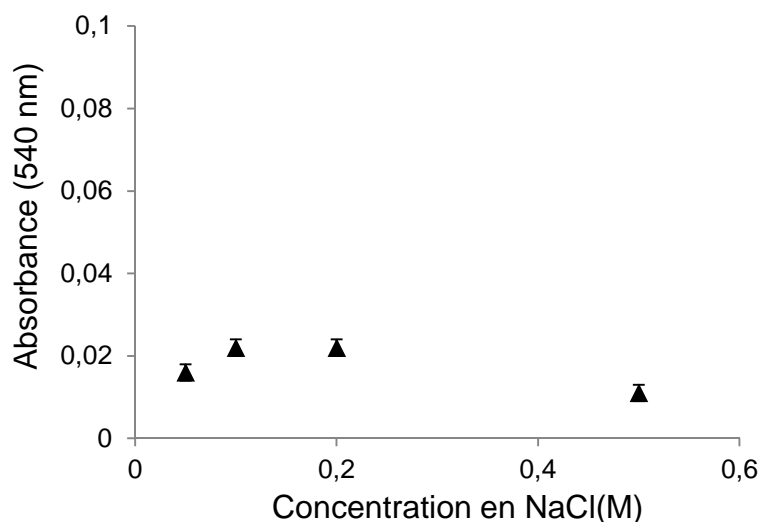


Figure 69 : Effets de la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange napine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massiques et les pH. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Interactions entre les facteurs

Les interactions entre facteurs ont toutes un effet significatif (tableau 19) mais très faible, relié à la solubilité et aux concentrations des deux protéines, et ne permettent pas de mettre en évidence d'interactions entre les protéines de ce couple.

L'évolution de la turbidité en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de mélange pour le couple napine/lysozyme est très faible et ne peut être reliée qu'à la variation de solubilité des protéines individuelles. Aucune interaction entre les deux protéines n'a donc pu être mise en évidence.

La seconde partie des résultats du criblage présente les données obtenues en turbidité pour les mélanges de protéines végétales avec la caséine β . Aux pH de travail, les protéines de pois et de soja présentent une charge globale de même signe que la caséine β alors que la napine de colza présentera une charge globale de signe opposé ce qui est favorable à des interactions électrostatiques entre cette protéine et la caséine β .

2.1.2. Interactions des protéines végétales avec la caséine β

2.1.2.1. Pois

2.1.2.1.1. Viciline-convicine (7S)/caséine β

Le mélange entre les protéines 7S de pois et la caséine β permet d'étudier une interaction entre la caséine β et une protéine deux fois plus petite que la 11S de pois (150 KDa) mais qui possède une charge globale de même signe aux valeurs de pH de l'étude. Les analyses statistiques ont montré que trois facteurs (concentration totale, ratio massique, pH) avaient un effet significatif. Les résultats sont présentés pour le rapport massique, le pH et la concentration en NaCl sachant que la concentration totale n'entraîne qu'une hausse de la turbidité moyenne des solutions.

Effet du rapport massique

La figure 70 montre l'effet du ratio massique sur la turbidité des mélanges viciline-convicine/caséine β . Dans ces solutions, la turbidité était très faible lorsqu'il y avait 10% (m/m) ou moins de viciline-convicine et très haute à 90% (m/m) ou plus. A un ratio massique de 50/50, la turbidité moyenne avait une valeur médiane. Ces résultats sont similaires à ceux observés pour le couple légumine/caséine β . Aucune agrégation n'est observée et la turbidité est seulement causée par la protéine végétale non solubilisée.

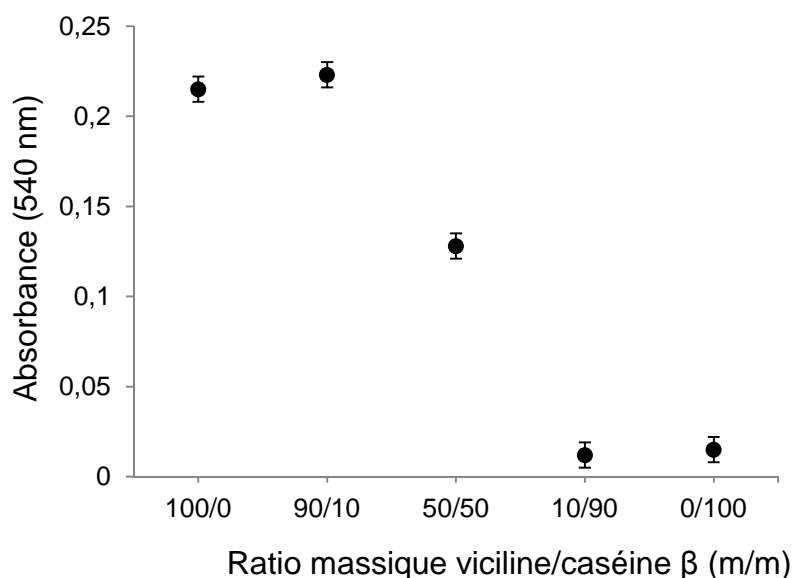


Figure 70 : Effets du ratio massique en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-convicine/caséine β calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les pH et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du pH

La turbidité est aussi influencée par le pH (figure 71). Entre pH 6 et 7, aucune différence significative entre les valeurs moyennes de l'absorbance n'était observée. Mais lorsque la valeur du pH montait à 8 puis à 9, la turbidité chutait fortement suivant la solubilisation de la 7S de pois (viciline-convicine) (Kimura et al., 2008).

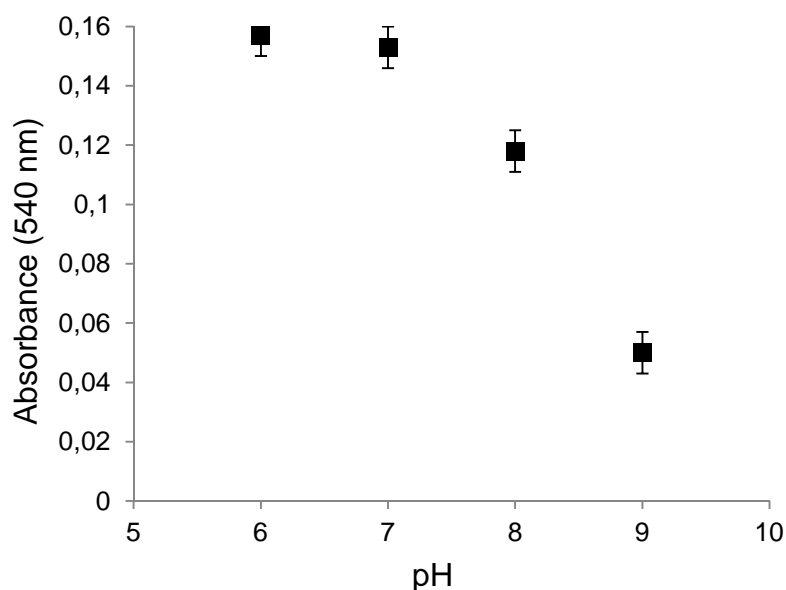


Figure 71 : Effets du pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-convicine/caséine β , calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massique et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Interactions entre les facteurs

Les interactions significatives concentration totale*ratio massique, concentration totale*pH, ratio massique*pH et pH*concentration en NaCl (tableau 19) montrent les variations de solubilité de la protéine végétale. Mais elles n'ont pas permis de mettre en évidence d'informations sur des interactions viciline-convicine/caséine β .

L'évolution de la turbidité en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de mélange pour le couple viciline/caséine β ne peut être reliée qu'aux variations de solubilité de la viciline. Aucune interaction entre les deux protéines n'a pu donc être identifiée.

2.1.2.1.2. Légumine (11S)/caséine β

Le couple légumine/caséine β mélange une grosse protéine polymérique (>300 kDa) et une petite protéine monomérique non structurée (24 kDa) de charges globales négatives aux pH 6, 7, 8 et 9. Les analyses statistiques des résultats de turbidité des solutions ont montré un effet significatif des facteurs concentration totale, ratio massique, pH et concentration en NaCl ainsi que de toutes les interactions entre facteurs. Les résultats sont présentés ci-dessous sans l'effet de la concentration totale qui ne provoque qu'une augmentation de la turbidité.

Effet du rapport massique en protéines

La figure 72 montre les effets du rapport massique en protéines sur la turbidité des mélanges légumine/caséine β . Les solutions pures de caséine β étaient transparentes dans toutes les conditions, tout comme les mélanges du rapport massique légumine/caséine β 10/90. Lorsque la proportion de légumine atteignait et dépassait 50%, la turbidité augmentait fortement. La turbidité des solutions était fortement corrélée à la quantité de légumine dans les solutions.

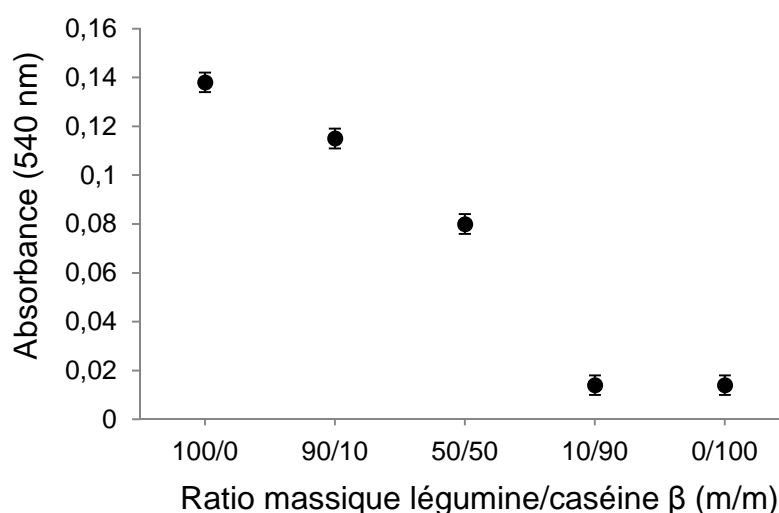


Figure 72 : Effets du ratio massique en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange légumine/caséine β calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les pH et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du pH

Le pH a également un impact sur la turbidité des solutions (figure 73). Entre pH 7 et 9, la turbidité baissait fortement lorsque le pH augmentait. Comme la solubilité de la légumine augmente entre pH 7 et 9 (Kimura et al., 2008), cette baisse de turbidité correspond à la solubilisation de la légumine. Cependant, la solubilité de la protéine végétale, qui est la même aux pH 6 et 7 quelle que soit la concentration en NaCl (entre 0,08 et 0,5 M), ne permet pas d'expliquer la valeur de turbidité plus basse qui était mesurée à pH 6 (Kimura et al., 2008).

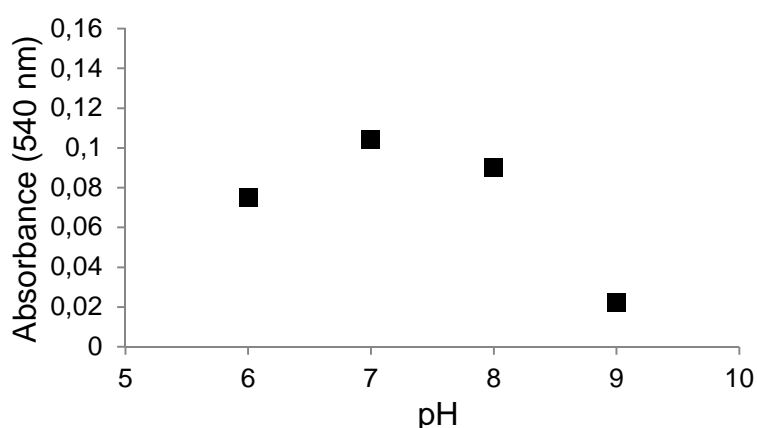


Figure 73 : Effets du pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange légumine/caséine β , calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massique et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet de la concentration en NaCl

Finalement, les effets de la concentration en NaCl sur les solutions de légumine et caséine β sont présentés sur la figure 74. La valeur moyenne de turbidité a diminué lorsque la concentration en NaCl a augmenté. Entre les deux concentrations extrêmes en NaCl, la turbidité a été divisée par 2,5. Cette chute de la turbidité s'explique par la solubilisation de la légumine en présence de NaCl.

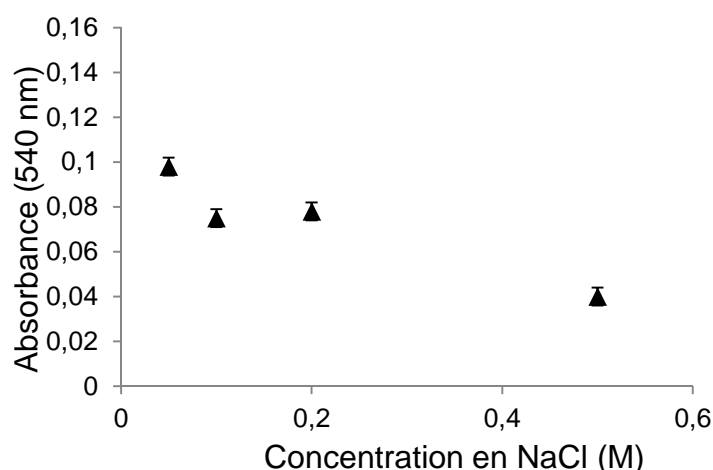


Figure 74 : Effets de la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange légumine/caséine β , calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massiques et les pH. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Interactions entre les facteurs

Pour le couple légumine/caséine β , toutes les interactions entre les facteurs ont un effet significatif (tableau 19), relié aux variations de solubilité de la légumine, mais qui ne met pas en évidence d'interactions entre les deux protéines.

L'évolution de la turbidité en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de mélange pour le couple légumine/caséine β ne peut être reliée qu'aux variations de solubilité de la légumine. Aucune interaction entre les deux protéines n'a donc été détectée.

2.1.2.2. Soja

2.1.2.2.1. Conglycinine (7S)/caséine β

Le couple conglycinine/caséine β est similaire au couple viciline-convicine/caséine β . La principale différence se situe au niveau des charges de surface de la protéine végétale. Les analyses statistiques ont montré un effet faible mais significatif des trois facteurs (ratio massique, pH, concentration en NaCl). Les résultats sont présentés facteur par facteur.

Effet du rapport massique

La figure 75 présente l'effet du rapport massique sur la turbidité. Les valeurs d'absorbance mesurées étaient très faibles. Cependant, la turbidité était tout de même significativement plus importante dans des solutions comprenant au moins 50% de conglycinine. Cette turbidité légèrement supérieure s'explique par la présence de conglycinine non solubilisée aux pH étudiés (Kimura et al., 2008).

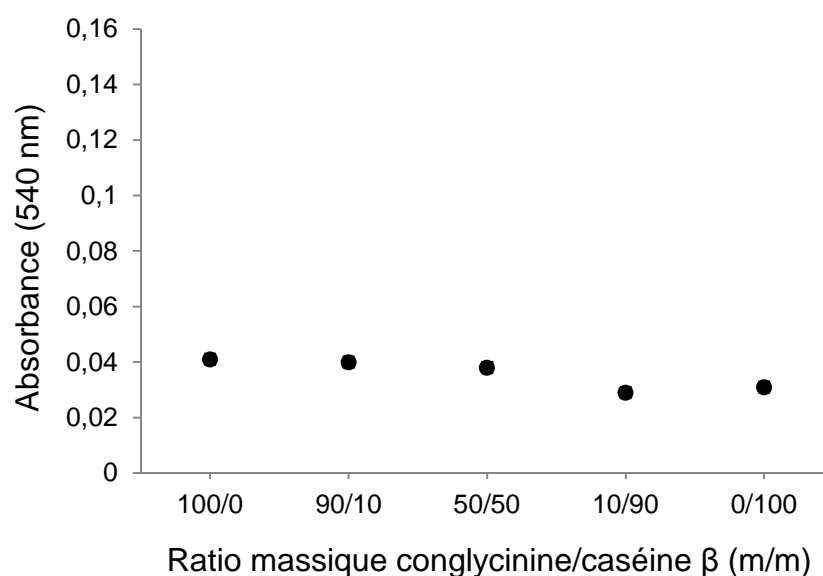


Figure 75 : Effets du ratio massique en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange conglycinine/caséine β calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour tous les pH et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du pH

La figure 76 montre l'effet du pH sur la valeur moyenne de l'absorbance qui diminuait légèrement lorsque le pH augmentait. Cette diminution est due à la plus grande solubilité de la conglycinine à des pH supérieurs à 8.

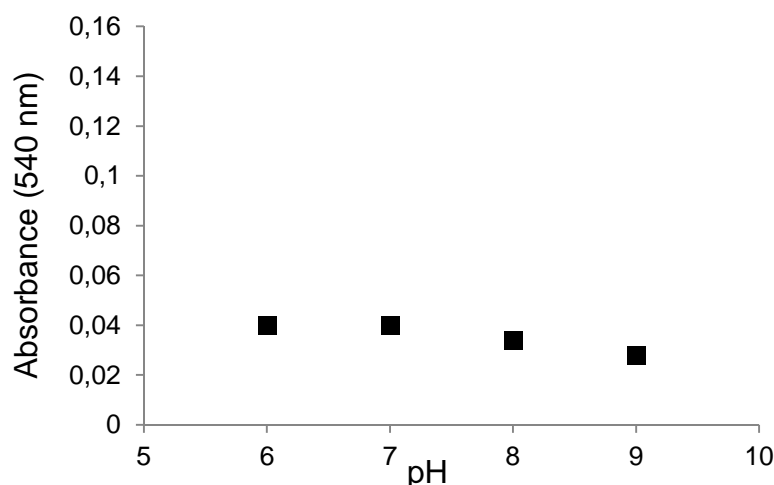


Figure 76 : Effets du pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange conglycinine/caséine β , calculées en utilisant les valeurs du modèle pour tous les ratios massique et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet de la concentration en NaCl

L'effet de la concentration en NaCl est présenté sur la figure 77. Il n'y avait pas de différence significative dans la valeur de la turbidité entre les concentrations en NaCl de 0,05 et 0,1 mol/L ainsi qu'entre les concentrations de 0,2 et 0,5 mol/L. Mais la turbidité diminuait légèrement lorsque la concentration en NaCl dépassait 0,1 mol/L.

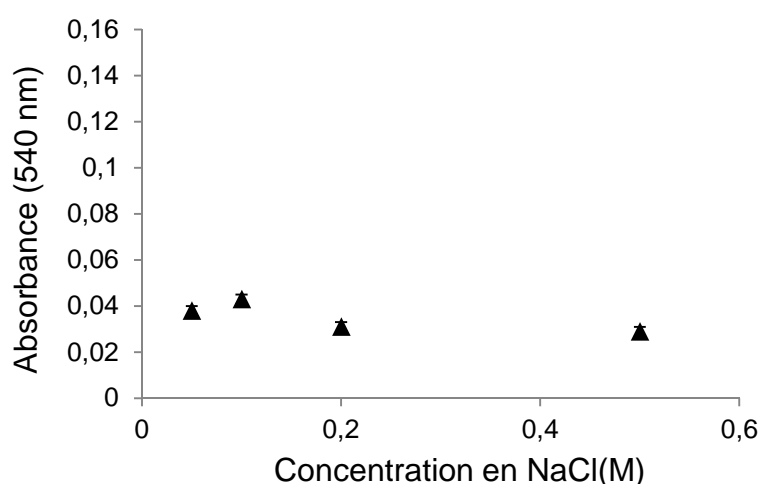


Figure 77 : Effets de la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange conglycinine/caséine β , calculées en utilisant les valeurs du modèle pour tous les ratios massiques et les pH. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Interactions entre les facteurs

Toutes les interactions entre les facteurs ont un effet significatif (tableau 19). Cependant, ces dernières ne démontrent pas l'existence d'interaction entre la conglycinine et la caséine β et expriment les changements de solubilité de la protéine végétale en fonction des conditions physico-chimiques.

L'évolution de la turbidité en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de mélange pour le couple conglycinine/caséine β est très faible et ne peut être reliée qu'aux variations de solubilité de la glycinine. En conclusion, aucune interaction entre les deux protéines n'a pu être mise en évidence.

2.1.2.2.2. Glycinine (11S)/caséine β

Le couple glycinine/caséine β ressemble au couple légumine/caséine β de par la masse moléculaire et le point isoélectrique des deux protéines végétales et diffère principalement par leurs charges de surface. Les analyses statistiques réalisées sur ce couple ont montré un effet significatif de seulement deux facteurs (ratio massique, pH). Les résultats sont présentés facteur par facteur.

Effet du rapport massique

Les effets du rapport massique sont montrés sur la figure 78. La turbidité était plus élevée pour des concentrations en glycinine élevées. Aux ratios massiques 100/0 et 90/10 (m/m), la turbidité était maximale. Elle diminuait ensuite au ratio 50/50 avant de tomber à la valeur minimale aux ratios 10/90 et 0/100 (m/m). Plus il y a de glycinine dans la solution, plus les solutions sont troubles.

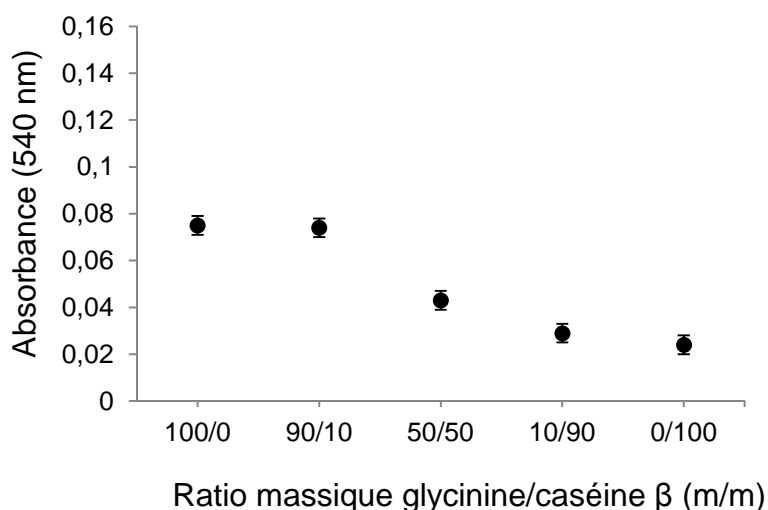


Figure 78 : Effets du ratio massique en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange glycine/caséine β calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour tous les pH et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du pH

La turbidité diminuait avec le pH même si la seule différence significative était entre le groupe de valeurs 6, 7, 8 et le pH 9 (figure 79). Cette baisse de la turbidité était due à la solubilisation de la protéine végétale avec l'augmentation du pH (Kimura et al., 2008).

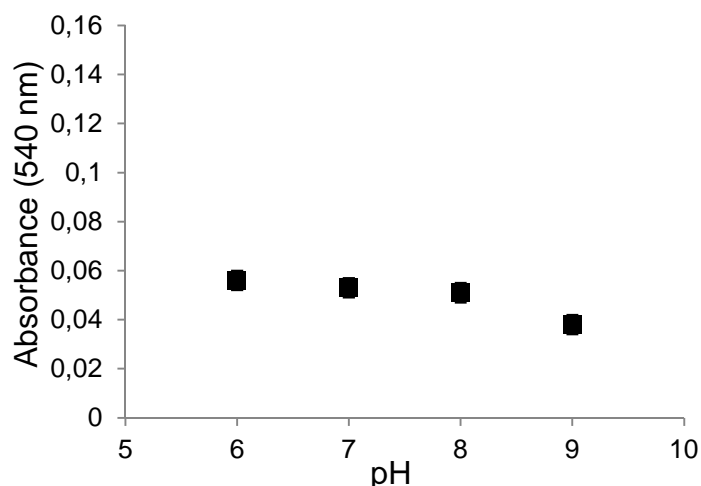


Figure 79 : Effets du pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange glycine/caséine β , calculées en utilisant les valeurs du modèle pour tous les ratios massique et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Interactions entre les facteurs

L'interaction entre les facteurs pH et ratio massique est bien statistiquement significative (tableau 19) mais son interprétation ne permet pas de montrer l'existence d'interactions entre les deux protéines et exprime les variations de solubilité de la glycine.

L'évolution de la turbidité en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de mélange pour le couple glycine/caséine β ne peut être reliée qu'aux variations de solubilité de la glycine et aucune interaction entre les deux protéines n'a pu être mise en évidence.

2.1.2.3. Colza

2.1.2.3.1. Napine (2S) de colza/caséine β

Le couple napine/caséine β est un couple protéine végétale/protéine animale différent de tous les autres couples étudiés lors du criblage du fait qu'il est le seul à impliquer deux protéines de faibles poids moléculaires et de charges globales opposées aux pH d'étude (contrairement au couple napine/lysozyme qui associe deux petites protéines mais possédant la même charge globale). Suite aux résultats obtenus aux pH 6, 7, 8 et 9, une cinquième condition de pH a été ajoutée (pH=4) dans laquelle les deux protéines ont le même signe de charge globale. Les analyses statistiques ont montré que le ratio massique, le pH et la concentration en NaCl avaient un effet significatif quel que soit la concentration totale en protéine (1 et 5 g/L). Les données à pH 4 n'ont cependant pas été incluses dans l'analyse statistique car aucune agrégation n'a été observée dans ces conditions. Les résultats sont donc présentés facteur par facteur sans inclure également la concentration totale qui provoque une hausse de la turbidité des solutions.

Effet du rapport massique

L'évolution de la turbidité en fonction du rapport massique est présentée sur la figure 80. Les solutions pures de napine et de caséine β étaient transparentes dans toutes les conditions de concentration totale en protéines, de pH et de concentration en NaCl. Aux rapports napine/caséine β de 90/10 et 10/90 (m/m), la turbidité n'a changé que très peu par rapport aux solutions pures. Par contre, la turbidité a augmenté significativement lorsque les rapports entre les deux protéines devenaient plus équilibrés (70/30, 50/50, 30/70). Ces rapports massiques correspondent aux rapports molaires 0,82, 1,92, 4,48 respectivement. La plus haute valeur de turbidité a été obtenue pour un mélange napine/caséine β ayant un rapport massique de 50/50 (m/m). Ces résultats montrent que la napine et la caséine β forment des agrégats qui diffèrent selon le rapport massique entre les deux protéines.

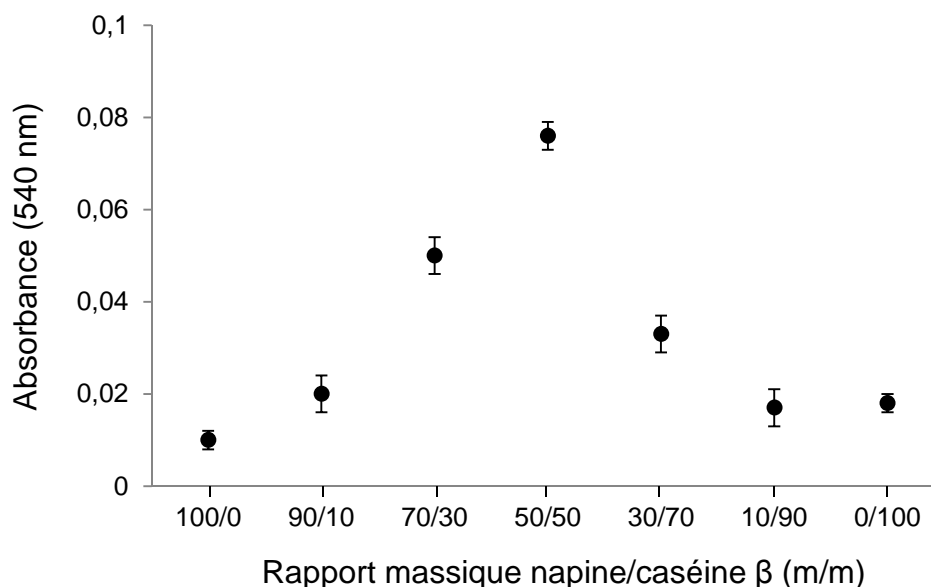


Figure 80 : Effets du ratio massique en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange napine/caséine β calculées, en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les pH et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet du pH

La figure 81 présente l'effet du pH sur l'agrégation entre la napine et la caséine β . Sur cette figure, la valeur moyenne à pH 4 a été ajoutée sans être prise en compte dans le reste de l'analyse statistique. A ce pH, la turbidité de toutes les solutions était proche de 0 et il n'y a donc pas eu d'agrégation entre les deux protéines. Cependant, à pH 6, la turbidité des mélanges de protéines a significativement augmenté. De plus, entre les pH 6 et 9, la valeur moyenne de turbidité diminue progressivement. Il y a donc agrégation entre la napine et la caséine β et elle est très dépendante du pH.

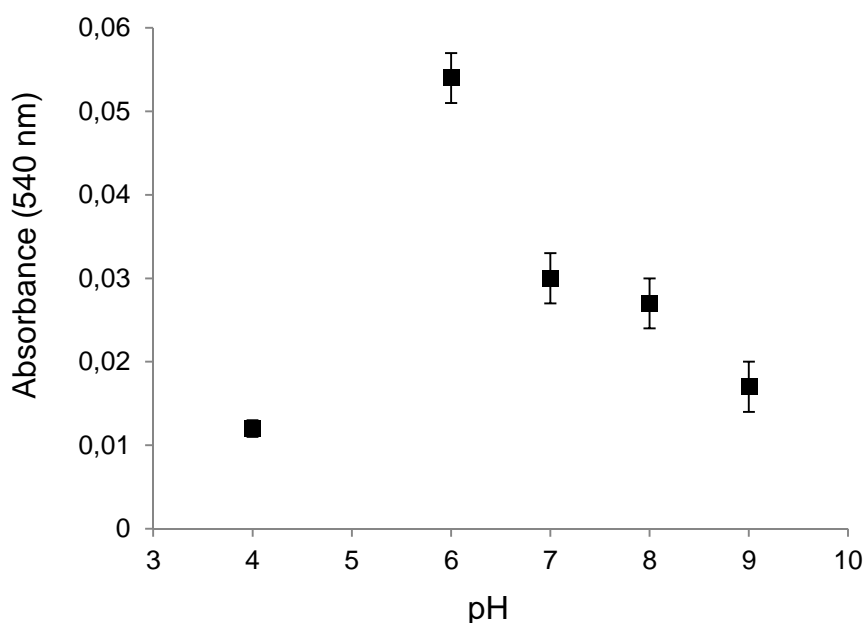


Figure 81 : Effets du pH sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange napine/caséine β , calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massique et les concentrations en NaCl. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Effet de la concentration en NaCl

En dernier lieu, les effets de la concentration en NaCl sur les interactions entre la napine et la caséine β sont montrés dans la figure 82. La valeur moyenne de turbidité a diminué fortement lorsque la concentration en NaCl a augmenté. Par exemple, une hausse de l'apport en NaCl de 0,05 mol/L à 0,1 mol/L a divisé la turbidité par un facteur 2.

Après cette forte diminution, les différences de turbidité entre les concentrations en NaCl de 0,1 et de 0,5 mol/L sont restées significatives mais avec une diminution lente de la valeur moyenne.

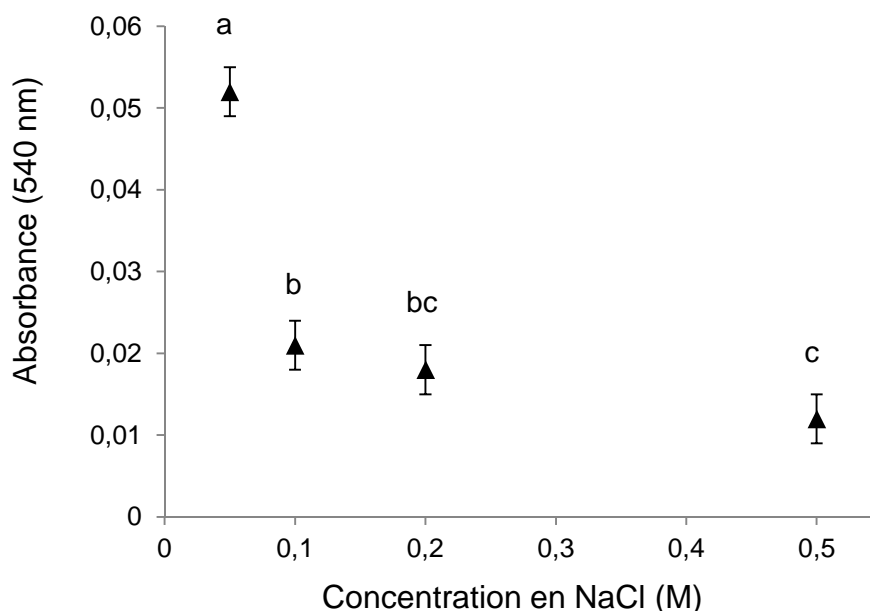


Figure 82 : Effets de la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange napine/caséine β , calculées en utilisant les valeurs du modèle pour toutes les concentrations totales, les ratios massiques et les pH. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Interactions entre les facteurs

Toutes les interactions entre les facteurs ont un effet significatif (tableau 19) mais celles-ci n'apportent pas d'informations supplémentaires pour comprendre l'agrégation entre la napine et la caséine β .

L'évolution de la turbidité en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de mélange pour le couple napine/caséine β montre un maximum à pH 6 et à des ratios massiques de napine compris entre 30/70 et 70/30. Cette augmentation de la turbidité est fortement réduite en présence de sel. Cette interaction est vraisemblablement due à des interactions électrostatiques entre protéines de charges opposées.

2.2. Taille des particules

Pour affiner les observations faites avec les mesures de turbidité, nous avons analysé les différents mélanges par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ce qui devait permettre de mesurer la taille des protéines et des agrégats présents dans tous les mélanges et pour toutes les conditions physico-chimiques.

En présence de solutions contenant plusieurs populations de tailles différentes, la taille moyenne des particules de l'échantillon (z-average), mesurée par la méthode des cumulants, est inexploitable pour identifier des variations précises de taille des populations. L'étude de mélanges protéiques dans lesquels se forment potentiellement des agrégats implique plusieurs populations différentes et la mesure de la taille moyenne des particules de la solution ne peut donc pas être utilisée. D'autres algorithmes implémentés dans le logiciel de traitement des données (Contin, General purpose) permettent d'obtenir des informations de distribution de taille. Il est ainsi possible de caractériser la taille des particules correspondant à maximum trois populations et la représentativité de ces populations par rapport à l'échantillon global ou une répartition globale des tailles de particules subdivisées en 300 classes de 0,1 à 10000 nm.

De par le nombre d'expériences réalisées lors du criblage (1600 échantillons) et de la complexité des données de diffusion dynamique de la lumière lors du criblage, les résultats ne pouvaient être analysés individuellement dans un temps raisonnable. Un système de tri et de traitement permettant de faire ressortir les informations intéressantes sur l'apparition ou la solubilisation de particules résultant d'interactions entre les protéines devait donc être mis en place. Plusieurs méthodes de traitement ont été successivement testées.

2.2.1. Première méthode de traitement

La première méthode mise en place pour traiter les données de DLS consistait à récupérer la taille moyenne de la ou des populations majeures présentes dans l'échantillon

(au maximum, trois populations ont été prises en compte) et à les trier de la plus petite à la plus grande afin de séparer les petites et grosses particules de nos mélanges.

Les données étaient préalablement triées pour ne garder que les mesures avec des corrélogrammes dont les intercepts étaient supérieurs à 0,7. Les corrélogrammes avec des intercepts compris entre 0,5 et 0,7 étaient analysés un par un afin de prendre en compte ou non la mesure. Une fois le tri réalisé, les populations de tailles minimum et maximum étaient analysées séparément en utilisant un modèle linéaire généralisé (GLM).

Ce modèle devait permettre d'observer les effets de la force ionique, du pH et du ratio massique sur la taille des plus grosses particules, supposées être des assemblages d'une protéine végétale et d'une protéine animale. L'analyse des petites particules avait pour but de récupérer la taille des protéines seules et de vérifier si, en cas d'interactions, il restait des protéines non-complexées dans le milieu.

Malgré plusieurs essais d'ajustement en limitant la taille maximale des particules à 1000 nm et en ne prenant en compte que les populations représentant au moins 5% de la population globale, cette méthode n'a pas permis de révéler d'effets significatifs des facteurs sur les tailles d'agrégats au sein des différents mélanges de protéines.

2.2.2. Seconde méthode de traitement

Une autre méthode a donc été testée. La même méthode de tri a été utilisée pour séparer les trois populations majeures et les ordonner de la plus petite à la plus grande mais nous avons récupéré les aires des pics correspondant à ces populations. L'influence des facteurs physico-chimiques sur l'aire des pics correspondant à chacune des trois populations était alors analysée par GLM. Les deux concentrations totales étaient toujours analysées séparément.

Ce traitement avait pour but d'analyser les variations d'aire des pics en fonction des facteurs physico-chimiques et d'observer ainsi l'évolution de l'importance de chaque population. Ainsi, on aurait pu identifier un phénomène d'agrégation si l'aire du pic

correspondant aux particules de plus grandes tailles avait augmenté avec la variation d'un ou plusieurs facteurs.

Cette seconde méthode n'a pas non plus permis de mettre en évidence l'impact des facteurs physico-chimiques sur l'évolution des populations dans les mélanges. Se limiter à 3 populations n'était pas satisfaisant pour des solutions aussi poly-dispersées et entraînait la comparaison de particules très différentes.

2.2.3. Troisième méthode de traitement

Afin de prendre en compte la polydispersité des mélanges, nous avons choisi de prendre en compte les distributions de taille des échantillons dans leur intégralité sans chercher à identifier des populations particulières. Cette distribution globale est fournie par le logiciel sous forme d'un tableau répartissant la population (en intensité et en volume) en 300 classes de taille comprises entre 0,1 et 10000 nm. Il n'était pas pertinent d'analyser l'influence des paramètres (concentration totale, ratio massique, pH, force ionique) sur chacune des 300 classes de taille. Nous avons donc choisi de réaliser une analyse en composantes principales qui permettait d'intégrer toutes ces classes de taille en une seule analyse pour en extraire quelques composantes principales synthétisant les variations de distribution de tailles de façon indépendante et d'essayer de relier les valeurs de chaque mélanges pour ces composantes, aux différents paramètres testés, en utilisant un modèle général linéaire (GLM) sur ces composantes. L'analyse en composantes principales permet d'extraire pour chaque composante, un vecteur propre qui a la forme d'une distribution de taille permettant de comprendre à quelle évolution de la distribution de taille correspond chaque composante.

Pour le couple légumine/caséine β , la matrice analysée était composée, après tri des données, de 587 lignes et 150 colonnes pour des classes de taille comprises entre 3 et 3000 nm. Le tri des données a été réalisé en fonction de l'intercept selon la même méthode que celle utilisé pour le premier traitement de données. Les classes de taille ont été limitées à 3 nm pour les plus petites particules car la napine, qui est la plus petite protéine utilisée lors

de l'étude, possède un diamètre d'environ 4 nm et à 3000 nm pour les plus grandes particules car l'analyse devient trop peu précise à partir de tailles aussi grandes. L'ACP a donné les composantes principales présentées dans le tableau 20.

Composante	% de variance expliqué	% de variance cumulé
1	17,31	17,31
2	12,95	30,26
3	10,15	40,41
4	7,41	47,82
5	5,66	53,47
6	4,45	57,92
7	3,85	61,77
8	3,78	65,55
9	3,26	68,81
10	3,04	71,85
11	2,47	74,33
12	2,07	76,40
13	1,92	78,32
14	1,79	80,10
15	1,63	81,73
16	1,61	83,34
17	1,41	84,75
18	1,28	86,03
19	1,17	87,20
20	1,06	88,26

Tableau 20 : 20 premières composantes principales de l'ACP du couple légumine/caséine β .

Les trois premières composantes permettent d'expliquer 40 % de la variance du système. Il faut cependant plus de 20 composantes pour que 90% de la variabilité soit représentée. Les premières composantes de l'ACP ne suffisent pas à expliquer l'effet de nos facteurs. Il a donc été nécessaire de prendre en compte un nombre important de composantes, compliquant l'analyse, même si les trois premières composantes principales, représentant chacune plus de 10 % de la variance étaient les plus intéressantes.

Les figures 83 à 88 montrent les vecteurs propres correspondant à différentes composantes principales de cette ACP.

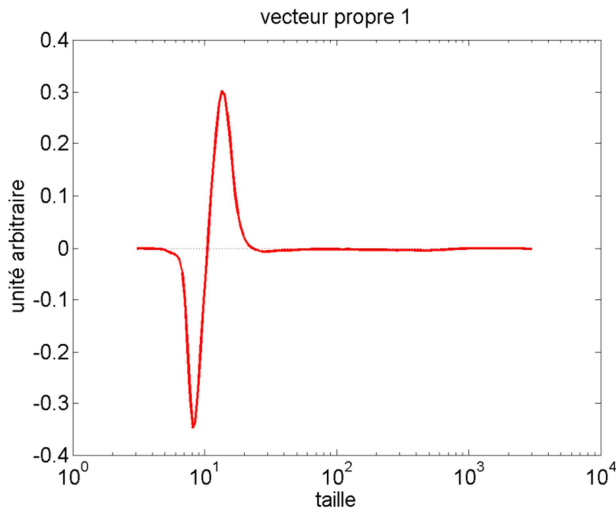


Figure 83 : Vecteur propre 1 pour l'ACP du couple légumine/caséine β (taille = diamètre (nm)).

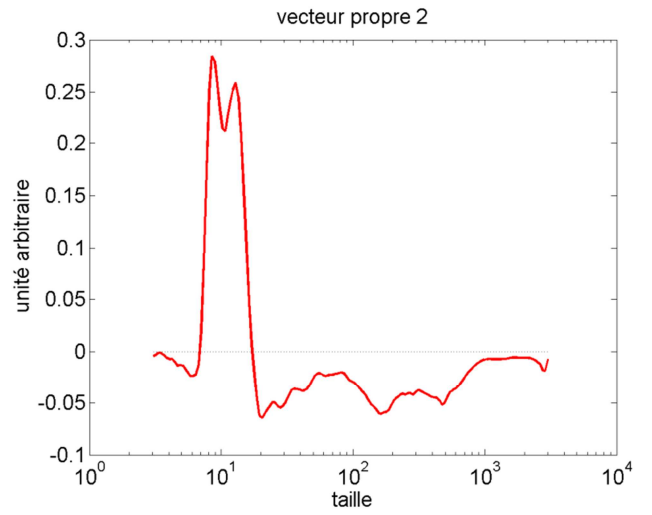


Figure 84 : Vecteur propre 2 pour l'ACP du couple légumine/caséine β (taille = diamètre (nm)).

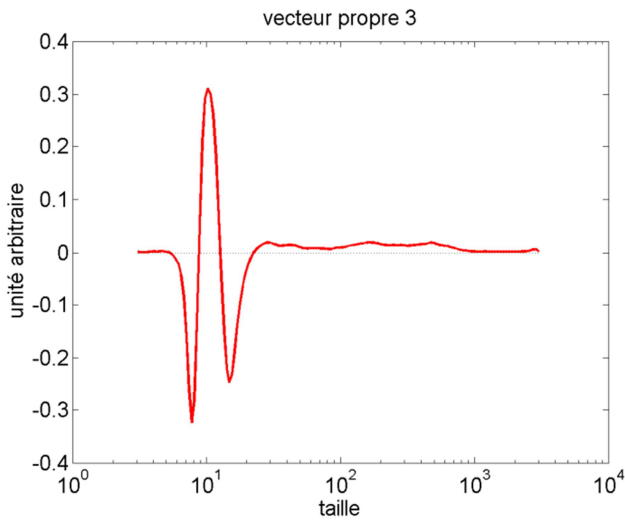


Figure 85 : Vecteur propre 3 pour l'ACP du couple légumine/caséine β (taille = diamètre (nm)).

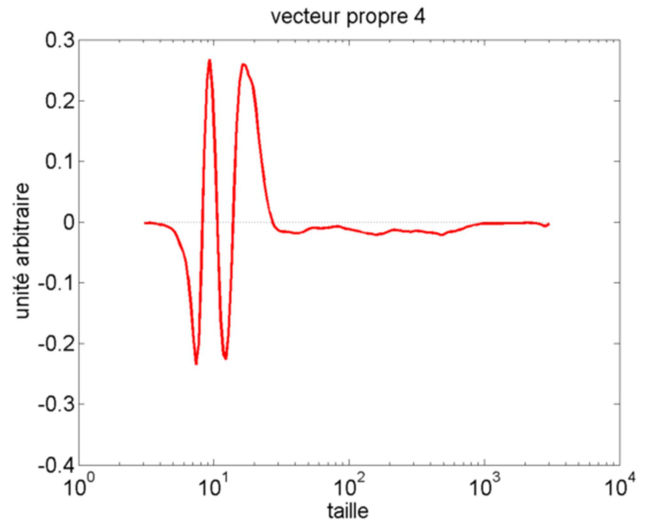


Figure 86 : Vecteur propre 4 pour l'ACP du couple légumine/caséine β (taille = diamètre (nm)).

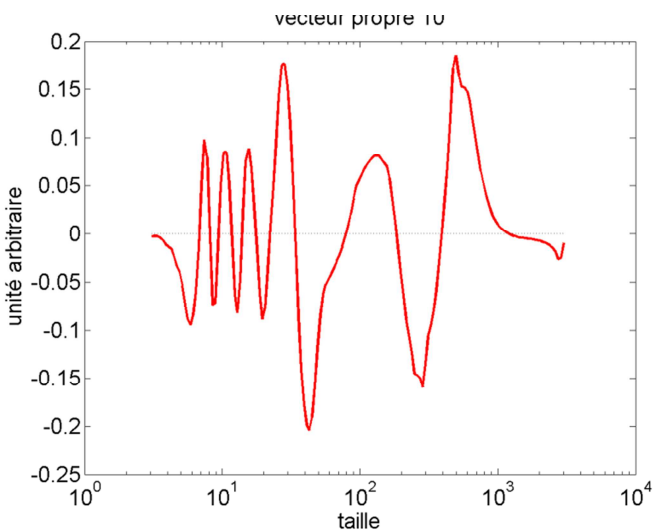


Figure 87 : Vecteur propre 10 pour l'ACP du couple légumine/caséine β (taille = diamètre (nm)).

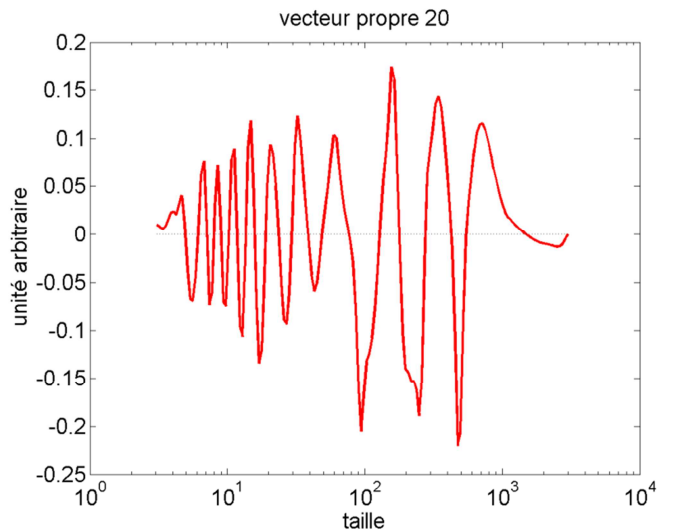


Figure 88 : Vecteur propre 20 pour l'ACP du couple légumine/caséine β (taille = diamètre (nm)).

Les vecteurs propres sont des représentations graphiques du sens de chaque composante principale. Par exemple, le vecteur propre 1 correspondait à une augmentation de la taille des particules de 8 vers 15 nm. Le vecteur 2 représentait une augmentation du nombre de petites particules de 8 et 15 nm (deux pics correspondant à la variation de population du vecteur 1). Le vecteur 3 montrait un affinement du pic de la population autour de 10 nm. Au-delà du vecteur propre 4 (figure 86 : Vecteur propre 4 pour l'ACP du couple légumine/caséine β (taille = diamètre (nm))). Ces vecteurs devenaient très difficiles à interpréter comme on peut le voir pour les vecteurs 10 et 20.

De plus, la projection des résultats des mesures sur les composantes principales ne permettait pas d'interprétation directe (figure 89). En effet, aucune différenciation claire n'apparaissait en fonction des facteurs physico-chimiques quel que soit le facteur sélectionné et la composante principale étudiée.

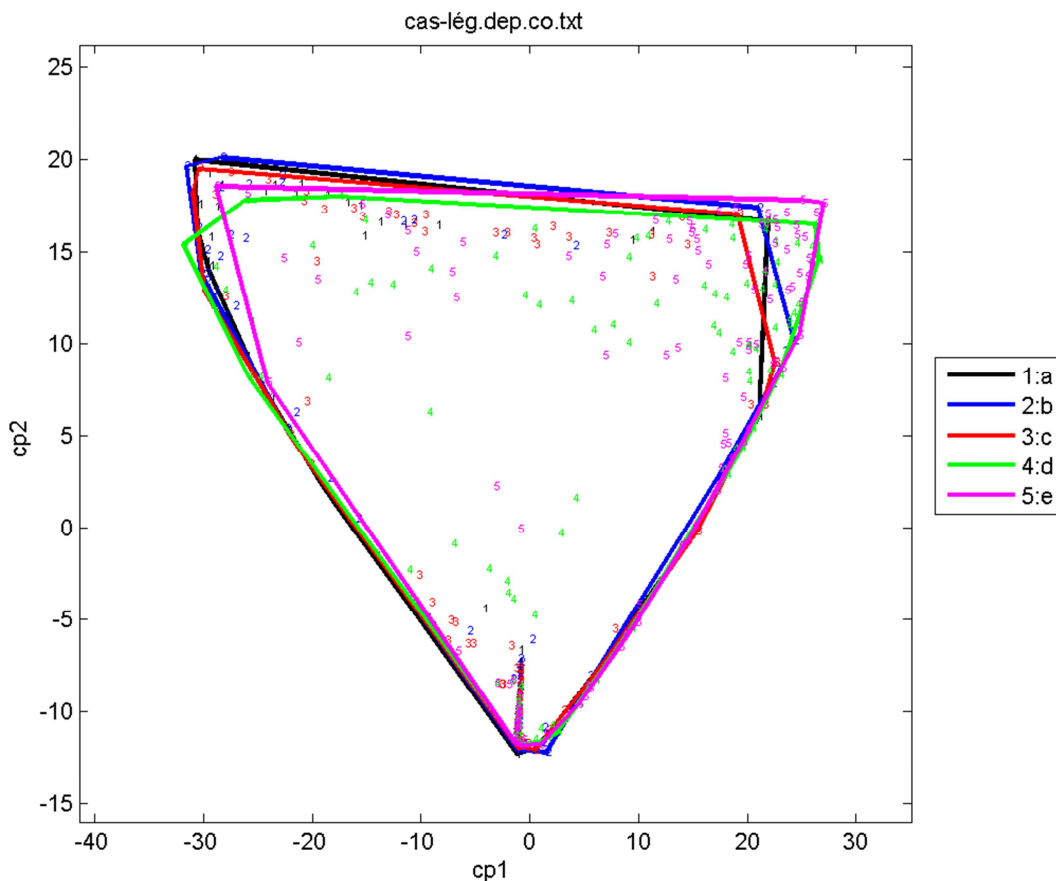


Figure 89 : Projection du nuage de points sur les composantes principales 1 et 2 de l'ACP du couple légumine/caséine β (Ratio massique légumine/caséine β (m/m) : a=100/0, b=90/10, c=50/50, d=10/90, e=0/100).

Les données de sortie de l'ACP ont alors été à nouveau analysées grâce à un modèle linéaire généralisé (GLM). La force ionique, le pH et le ratio massique étaient toujours considérés comme des facteurs qualitatifs expliquant la variable « composante principale » de l'ACP. Cette analyse a été réalisée pour les 4 premières composantes principales. Ce nouveau traitement n'a rien donné car les facteurs n'avaient pas d'effets significatifs sur les composantes principales. De plus, les vecteurs propres qui expliquaient le plus de variance ne montraient pas de variations de taille de population pouvant être interprétées comme des interactions entre la légumine et la caséine β .

Ces méthodes de traitement et d'analyse des données ont été testées sur plusieurs couples protéine végétale/protéine animale et n'ont dans aucun des cas permis de mettre en évidence d'interactions entre les protéines. Les résultats obtenus ne seront donc pas présentés dans cette étude.

2.2.4. Quatrième méthode de traitement

2.2.4.1. Colza

2.2.4.1.1. Napine (2S) de colza/caséine β

Comme les résultats de turbidité montraient la présence d'interactions entre la napine et la caséine β et que les méthodes de traitement des résultats de diffusion dynamique de lumière ne permettaient pas de mettre en évidence, une quatrième méthode a été testée uniquement sur le couple napine/caséine β .

Comme pour l'ACP, la répartition de la population sur les 300 classes de taille (en volume) a été récupérée. Les données sur les populations entre 1 et 3000 nm ont été conservées et regroupées en 5 grandes catégories (tableau 21).

Population 1	Population 2	Population 3	Population 4	Population 5
1 – 10 nm	10 – 100 nm	100 – 250 nm	250 – 500 nm	500 – 3000 nm
Napine seule	Caséine seule ou en micelle	Assemblages de petite taille	Assemblages de taille moyenne	Assemblages de grande taille

Tableau 21 : Répartition des populations du couple napine/caséine β pour l'analyse statistique.

Chaque population était ensuite analysée indépendamment grâce à un modèle linéaire généralisé (GLM) couplé à une analyse de la variance (ANOVA). La force ionique, le pH et le ratio entre les protéines étaient considérés comme des facteurs qualitatifs expliquant la variable Population. Ce nouveau traitement devait permettre d'identifier différents changements dans la répartition des populations en fonction de nos facteurs (tableau 21).

Les résultats obtenus en fonction des ratios pour chaque population sont tracés sur les figures 90 à 94.

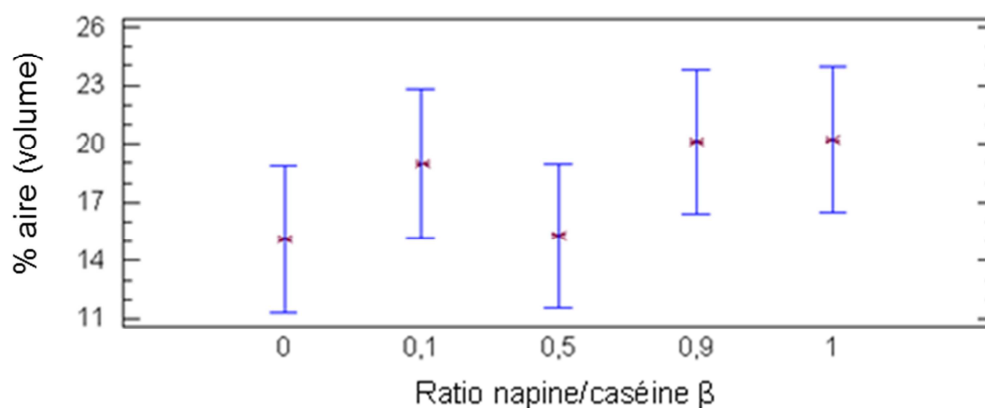


Figure 90 : Pourcentage de l'aire de la courbe (volume) de la population 1 en fonction du ratio napine/caséine β (m/m).

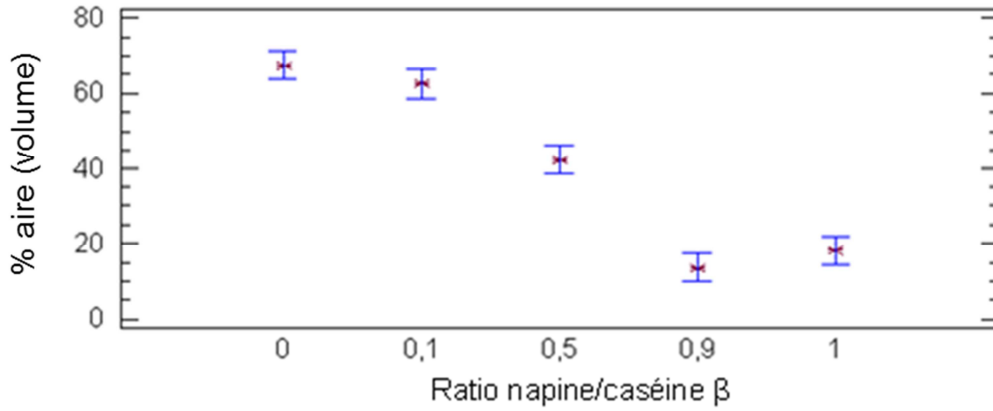


Figure 91 : Pourcentage de l'aire de la courbe (volume) de la population 2 en fonction du ratio napine/caséine β (m/m).

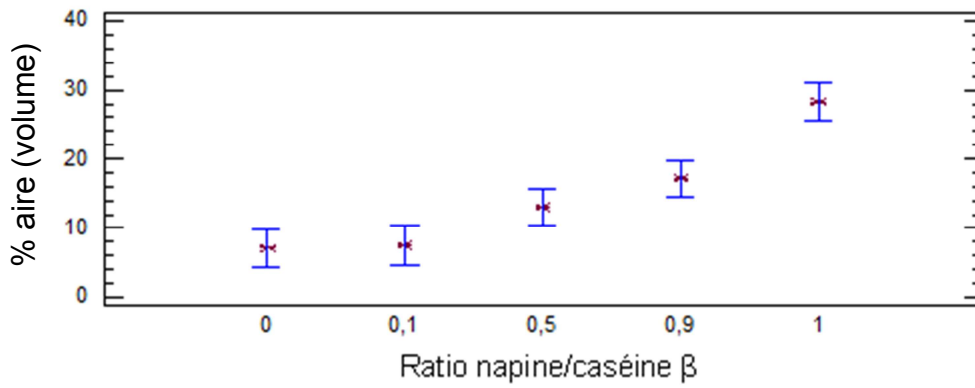


Figure 92 : Pourcentage de l'aire de la courbe (volume) de la population 3 en fonction du ratio napine/caséine β (m/m).

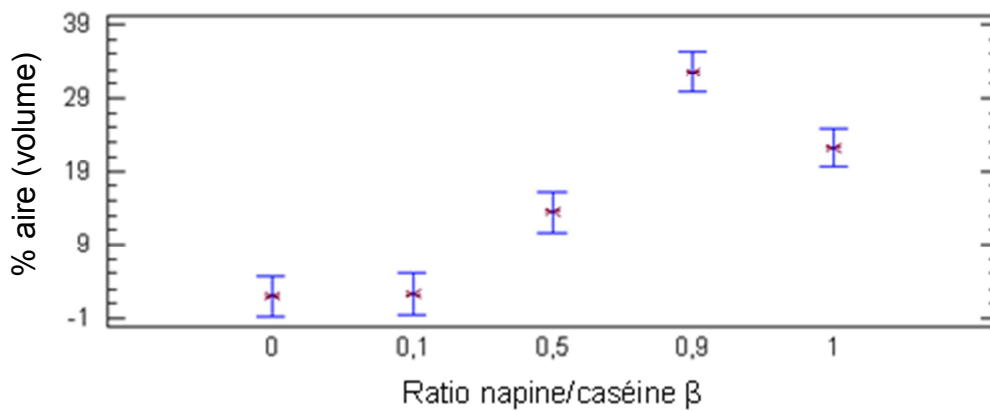


Figure 93 : Pourcentage de l'aire de la courbe (volume) de la population 4 en fonction du ratio napine/caséine β (m/m).

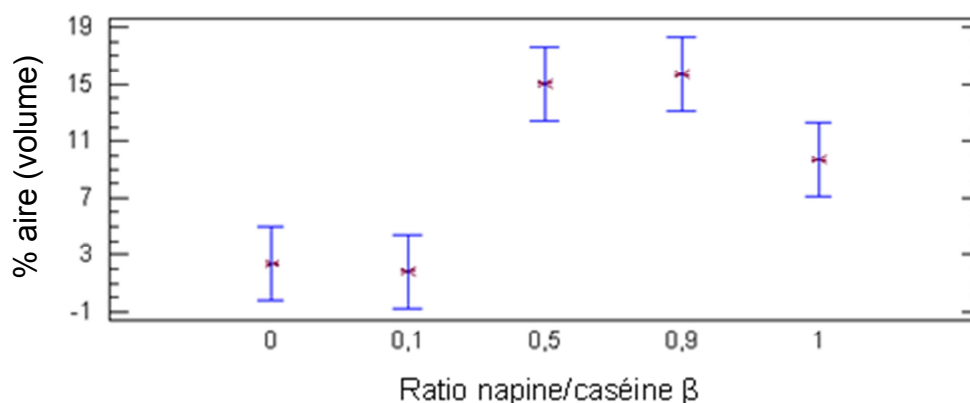


Figure 94 : Pourcentage de l'aire de la courbe (volume) de la population 5 en fonction du ratio napine/caséine β (m/m).

Ce nouveau tri en population n'a pas permis de mettre en évidence la présence de la napine (figure 90). Quel que soit le ratio, la DLS détectait toujours la même quantité de particules dont la taille est comprise entre 1 et 10 nm. Ce problème de détection pouvait être dû aux paramètres de la mesure : angle de détection, durée des acquisitions. Par contre, la présence de caséine β était facilement observée (figure 91). Lorsqu'il y avait 90 % (w) de caséine β dans la solution, la population majoritaire détectée était bien celle entre 10 et 100 nm.

Les figures 92, 93 et 94 montrent la présence de grosses particules (> 100 nm) dès que la napine devient majoritaire dans le milieu. Ces particules ne sont pas forcément des agrégats entre les deux protéines car elles sont également présentes lorsque la napine est seule. Cependant, en couplant ces résultats avec nos données de turbidité sur le couple napine/caséine β , on peut conclure qu'une partie des particules détectées en DLS dont la taille est supérieure à 100 nm sont bien des agrégats napine/caséine β .

2.3. Conclusion

Parmi les deux méthodes de criblage, l'analyse turbidimétrique s'est révélée beaucoup plus simple et facile d'interprétation que l'analyse des distributions de taille. Ainsi, l'analyse turbidimétrique a mis en évidence les systèmes où les protéines animales interagissaient avec les protéines végétales et les conditions d'obtention de ces assemblages (tableau 22). Les mélanges entre la légumine (11S) de pois et les deux protéines animales (caséine β ou lysozyme) ne présentent aucune interaction : l'ajout de la légumine dans des solutions de protéine animale n'a pas d'impact sur son état d'agglomération. La même conclusion est tirée pour les mélanges napine (2S)/lysozyme et viciline (7S)/caséine β . A contrario, les mélanges napine/caséine β et viciline-convicine/lysozyme semblent générer des agrégats par des interactions électrostatiques. Pour le système viciline-convicine/lysozyme, l'interaction se produit à pH 8 et 9 et l'effet du sel sur ces interactions n'est pas clair. La mesure de la turbidité des solutions de protéines végétales seules à des concentrations correspondant aux concentrations en protéines végétales à chaque ratio aurait pu permettre de différencier la turbidité apportée par la protéine végétale non solubilisée et celle apportée par les interactions entre protéines animales et végétales. Cette mesure systématique aurait peut-être permis de détecter des interactions entre d'autres protéines végétales et animales de charges nettes opposées (comme pour le couple conglycinine/lysozyme) malgré la faible solubilité des protéines végétales. Pour la napine et la caséine β , une large gamme de ratio massique, pH et concentration en NaCl permet de générer des assemblages. Pour la suite de l'étude, nous avons sélectionné ce couple afin de comprendre la formation de ces agrégats et leurs propriétés.

Protéine animale	Protéine végétale	Interactions ?	Conditions
Caséine β	Viciline-convicine (7S pois)	-	-
	Légumine (11S pois)	-	-
	Napine (2S Colza)	+	6 < pH < 9 NaCl < 0.1M
	Soja (7S et 11S)	-	-
Lysozyme	Viciline-convicine (7S pois)	+	pH 8-9 NaCl ?
	Légumine (11S pois)	-	-
	Napine (2S Colza)	-	-
	Soja (7S et 11S)	-	-

Tableau 22 : Bilan des analyses turbidimétriques sur les interactions entre protéine végétale et protéine animale.

3. Caractérisation des assemblages napine/caséine β

A la lecture des résultats du screening, il apparaît clairement que la formation d'agrégats entre la napine ($pI > 10$) et la caséine β ($pI \sim 5$) est induite par le pH ($pH > 6$) (Figure 81) et le ratio massique (70/30, 50/50, 30/70) (Figure 80) alors qu'elle est fortement réduite par l'augmentation de la concentration en NaCl (Figure 82). De façon similaire, les effets du ratio massique, du pH et de la concentration en sel ont été observés pour des agrégats entre la caséine β et le lysozyme (Anema & de Kruif, 2013). Le lysozyme est très proche de la napine sur plusieurs aspects. Ce sont des petites protéines basiques ayant une masse moléculaire de 14 kDa avec un point isoélectrique supérieur à 9 (Warner, 1954). Donc la napine et le lysozyme ont le même signe de charge globale entre pH 4 et 9. Pour des pH inférieurs à 5, lorsque le lysozyme et la caséine β étaient chargés positivement, il n'y avait pas d'affinité entre les deux protéines alors que pour des pH supérieurs ou égaux à 6, des agrégats étaient formés (De Roos et al., 1998 ; Anema & de Kruif, 2013). Dans ces deux études, les auteurs concluaient que l'association entre les deux protéines était due aux interactions électrostatiques. De la même manière, la napine et la caséine β forment des agrégats seulement lorsque le pH est supérieur ou égal à 6 (Figure 82). Les deux couples lysozyme/caséine β et napine/caséine β ont le même comportement vis-à-vis du pH. En tenant compte de l'analogie entre la napine et le lysozyme, on peut dire que les interactions électrostatiques sont aussi la cause de l'agrégation entre la napine et la caséine β . Cette hypothèse est confirmée par l'influence négative de la concentration en NaCl sur l'agrégation puisque les interactions électrostatiques sont très dépendantes du pH et de la force ionique (Koning & Visser, 1992).

Le ratio massique, le pH et la concentration en NaCl ne sont pas nécessairement les seuls facteurs modulant l'agrégation entre la napine et la caséine β . Par exemple, il a été observé que les agrégats formés entre le lysozyme et l' α -lactalbumine, par des interactions électrostatiques, grossissent lors d'une augmentation de la température de 25 à 45°C (Salvatore et al., 2011 ; Nigen et al., 2007) et donc que la température modifie le comportement associatif des macrostructures formées par les deux protéines. Comme la

production de denrées alimentaires comprend souvent des procédés thermiques, l'effet de tels traitements a été étudié sur l'agrégation entre la napine et la caséine β .

3.1. Stabilité à la température

Nous nous sommes focalisés sur les échantillons où l'agrégation était la plus forte (turbidité importante), c'est à dire obtenus dans les conditions suivantes : pH 6, NaCl 50 mmol/L et ratios massiques 70/30, 50/50 et 30/70 correspondant respectivement aux ratios molaires 0,82, 1,92, 4,48. Les échantillons ont été préparés manuellement comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes.

L'agrégation entre la napine et la caséine β a été étudiée en fonction de la température et identifiée par l'intermédiaire de mesures de turbidité. Les résultats des échantillons préparés à pH 6, NaCl 50 mmol/L avec différents ratios massiques 70/30, 50/50, 30/70 à 20°C sont présentés dans la figure 95.

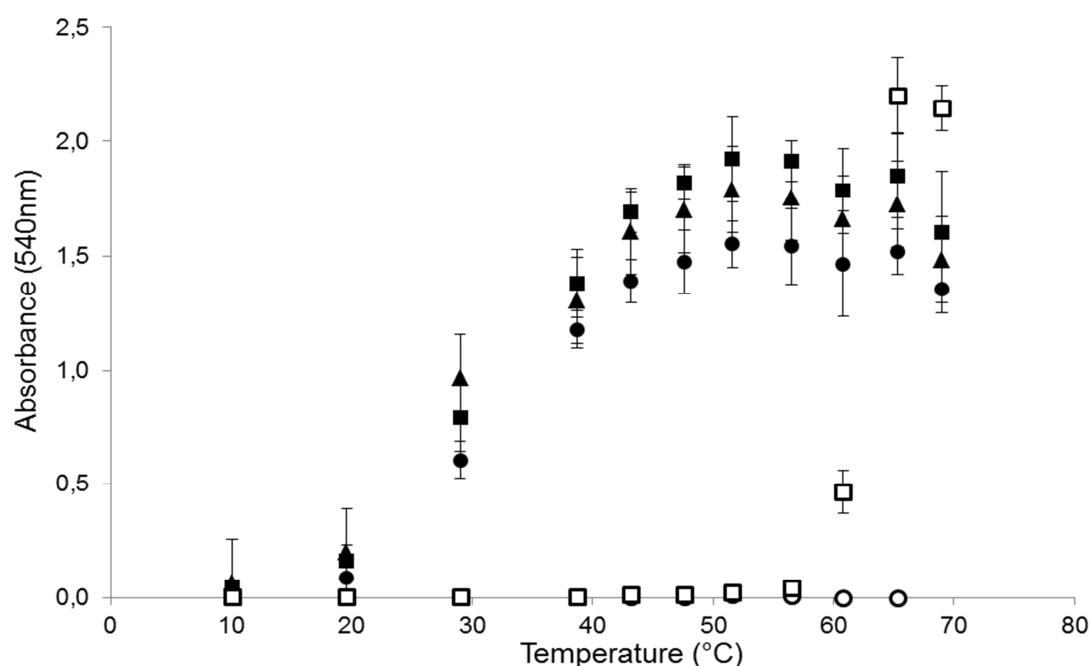


Figure 95 : Turbidité des solutions de napine/caséine β (pH 6, NaCl 50 mmol/L) en fonction de la température pour plusieurs ratios massiques (3 mesures sur 3 échantillons indépendants) : (\square) caséine β 100%, (\blacksquare) napine/caséine β 30/70, (\blacktriangle) napine/caséine β 50/50, (\bullet) napine/caséine β 70/30, (\circ) napine 100%. Les solutions étaient équilibrées à la température de mesure pendant 30 minutes.

De 10 à 50°C, la turbidité des mélanges de protéines a fortement augmenté (figure 95) alors que les solutions pures de protéine restaient limpides avec une turbidité proche de zéro dans cette gamme de température. Cette hausse de turbidité à des températures inférieures à 50°C était donc due à une modification de l'état d'association de la napine et de la caséine β . Au-dessus de 50°C, la turbidité des mélanges était constante et élevée (la légère baisse avec la température n'est pas significative). De même, la solution de napine restait limpide. En revanche, la solution de caséine β devenait turbide à partir de 60°C à cause de l'auto-agrégation de la caséine résultant d'interactions hydrophobes entre les molécules de caséine β (Dauphas et al., 2005).

La formation des agrégats de protéines en fonction de la température a été observée par microscopie optique sur 2 échantillons (figure 96). De basse température et jusqu'à 20°C, aucun objet de taille microscopique n'a été observé. Lorsque les échantillons ont été chauffés à 30°C, de petits objets sphériques (autour d'1 μm) ont été détectés (figure 96a). Ces particules correspondaient probablement aux gros agrégats de napine et caséine β induits par la température. Le nombre et la taille de ces agrégats augmentaient simultanément lorsque le ratio massique diminuait de 50/50 à 30/70 (figure 96b). A des températures plus élevés, il n'était plus possible d'observer des agrégats car une couche ressemblant à un gel se formait entre la lame et la lamelle.

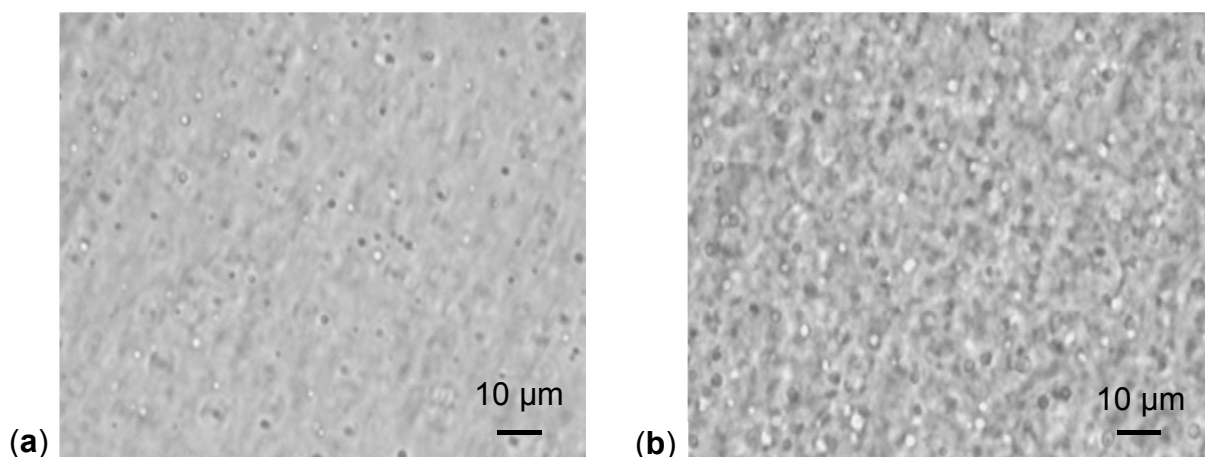


Figure 96 : Observations microscopiques de solutions de napine/caséine β dans un tampon Tris 50 mmol/L pH6 NaCl 50 mmol/L (a: napine/caséine β ratio massique 50/50 – 30°C; b: napine/caséine β ratio massique 30/70 – 30°C).

Durant la préparation de produits alimentaires, plusieurs traitements thermiques sont utilisés pour assurer, par exemple, la qualité sanitaire de l'aliment. Pour tester l'impact de tels procédés, des mélanges de napine/caséine β à pH 6 and à une concentration en NaCl de 50 mmol/L ont été soumis à des cycles de chauffage/refroidissement. A chaque changement de température, l'échantillon était stabilisé pendant 30 minutes avant de relever l'absorbance. La figure 97 présente la turbidité à chaque palier de température pour les 5 rapports massiques.

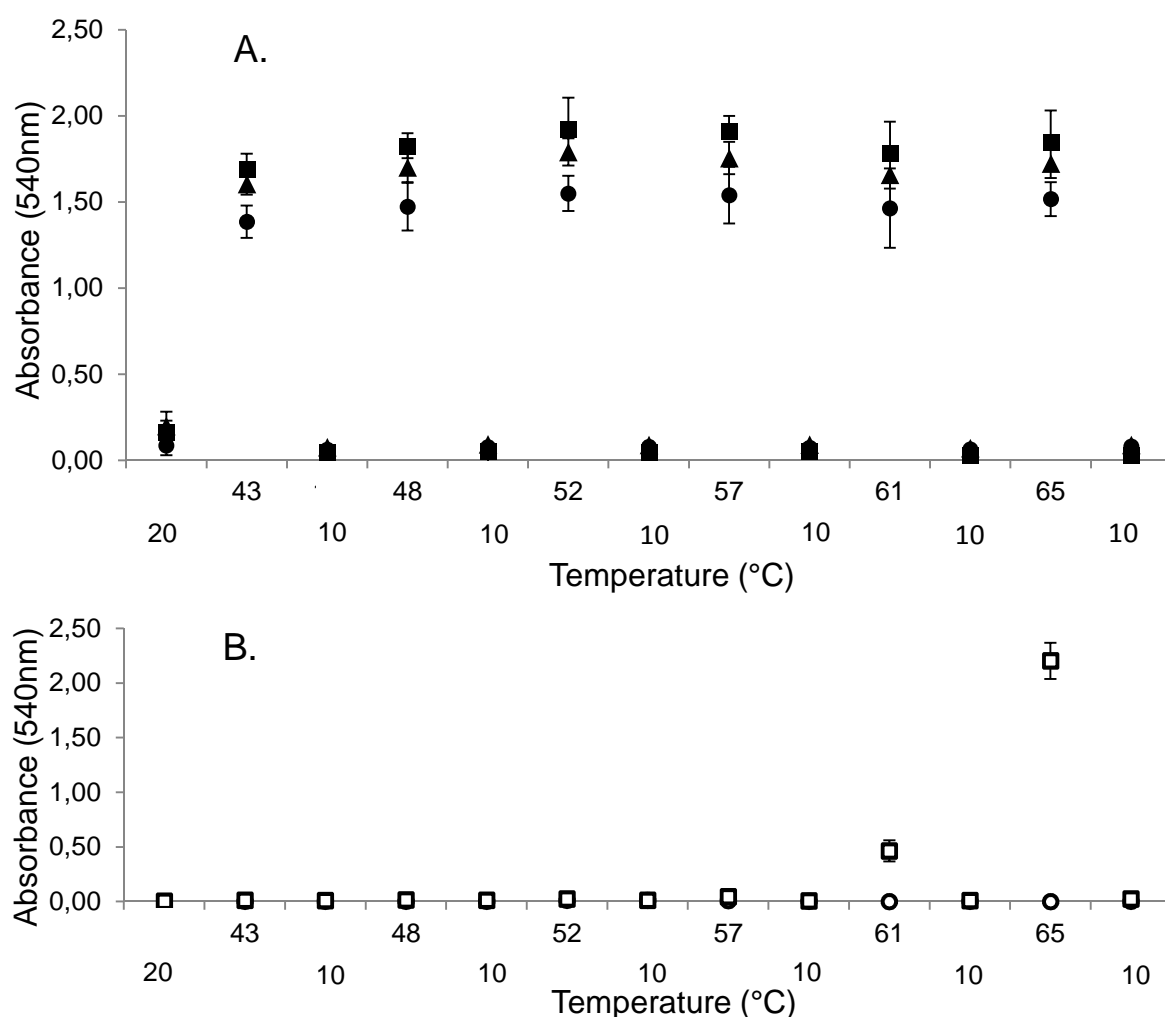


Figure 97 : Turbidité des solutions de napine/caséine β en fonction de la température dans un tampon Tris pH6 50 mmol/L NaCl 50 mmol/L (3 mesures sur 3 échantillons indépendants) et à différents ratios napine/caséine β : (A) (■) 30/70, (▲) 50/50, (●) 70/30 et pour les solutions de protéines pures (B) (□) caséine β 100%, (○) napine 100%. Le temps d'équilibration était de 30 minutes. Les deux flèches indiquent la montée et la baisse de la température lors de l'expérimentation.

Etonnamment, l'agrégation entre la napine et la caséine β , caractérisée par une hausse de la turbidité, était réversible pour chaque cycle de température jusqu'à au moins 70°C (les températures supérieures n'ont pas été testées car l'élément chauffant du spectrophotomètre ne permettait pas des mesures au-delà). En chauffant, les solutions devenaient turbides et en refroidissant, elles retournaient dans leur état initial translucide.

Comme la force ionique a un impact important sur la turbidité des mélanges (Figure 82), le comportement thermo-dépendant et réversible de l'agrégation napine/caséine β a été étudié dans des solutions avec une grande force ionique. Les mélanges ont été préparés à une concentration en NaCl de 500 mmol/L (Figure 98) en suivant le même protocole que précédemment.

Dans la solution avec une forte concentration en NaCl, la turbidité n'a augmenté de façon significative qu'à 80°C en présence des deux protéines. La solution de caséine β pure était à peine turbide dans ces conditions même à des températures supérieures à 60°C. La turbidité des mélanges de protéines provenait donc des interactions entre la napine et la caséine β . Après refroidissement, toutes les solutions redevenaient transparentes. L'agrégation est donc possible et reste réversible même à de fortes forces ioniques.

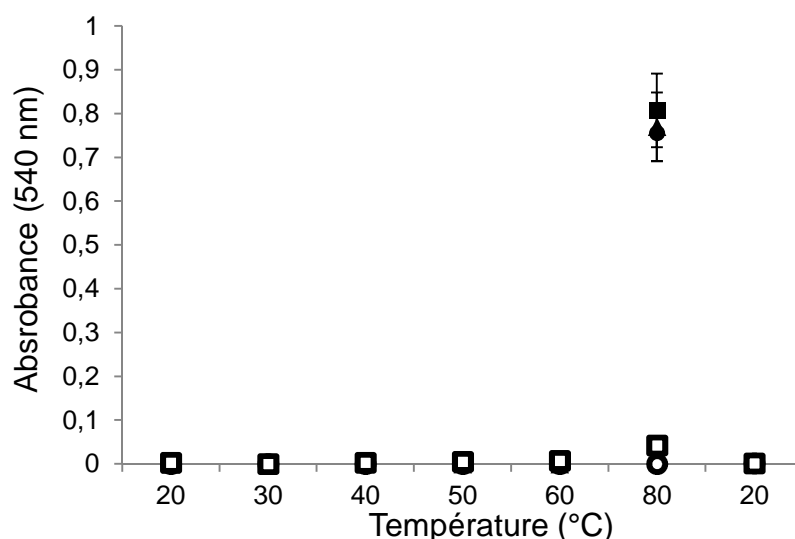


Figure 98 : Turbidité des solutions de napine/caséine β en fonction de la température dans un tampon Tris pH6 50 mmol/L NaCl 500 mmol/L (3 mesures sur 3 échantillons indépendants) et à différents ratios napine/caséine β : (□) caséine β 100%, (■) napine/caséine β 30/70, (▲) napine/caséine β 50/50, (●) napine/caséine β 70/30, (○) napine 100%. Le temps d'équilibration était de 30 minutes.

L'effet de notre tampon sur l'agrégation a également été étudié par rapport à la thermoreversibilité. Les mélanges de protéines ont été préparés dans l'eau à une concentration en NaCl de 50 mmol/L. Dans ces solutions, la turbidité augmente plus rapidement que dans les solutions contenant le tampon (figure 99). Dès 10°C, les mélanges sont plus turbides que les solutions pures de protéines ce qui n'était pas le cas en présence de tampon (figure 96). De plus, le plateau d'absorbance observé à partir de 50°C pour les mélanges dans un tampon Tris apparaît ici dès 30°C.

L'agrégation est donc induite à des températures plus basses. Cet effet du tampon est attribué à la force ionique de ce dernier ce qui prouve son importance par rapport à la formation des agrégats napine/caséine β .

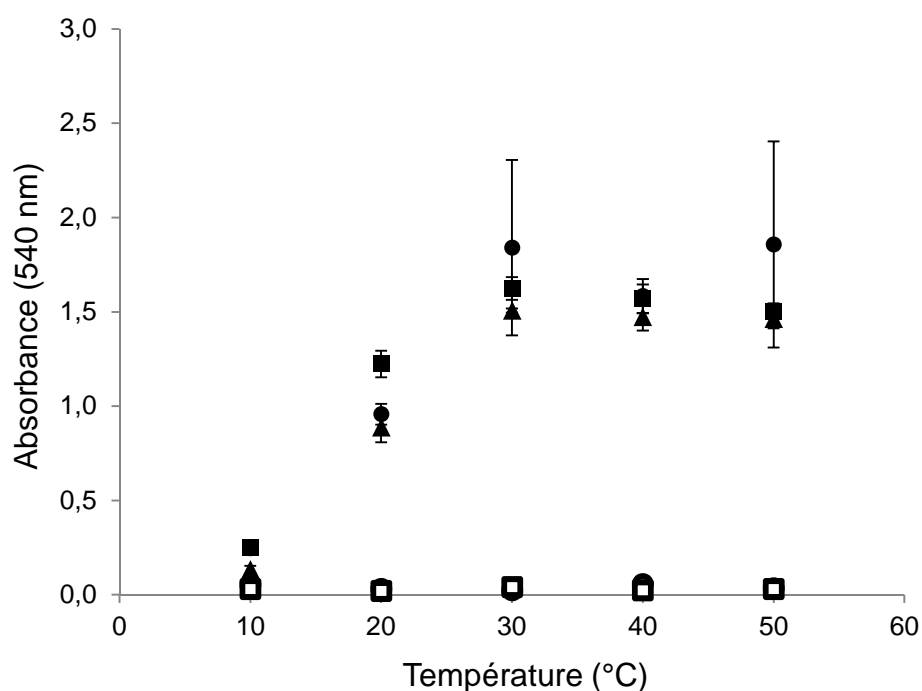


Figure 99 : Turbidité des solutions de napine/caséine β dans l'eau (pH 6, NaCl 50 mmol/L) en fonction de la température pour plusieurs ratios massiques (3 mesures sur 3 échantillons indépendants) : (□) caséine β 100%, (■) napine/caséine β 30/70, (▲) napine/caséine β 50/50, (●) napine/caséine β 70/30, (○) napine 100%. Les solutions étaient équilibrées à la température de mesure pendant 30 minutes.

3.2. Analyse du rôle du calcium dans l'agrégation napine/caséine β

Sachant que les interactions électrostatiques sont impliquées dans la formation d'agrégats napine/caséine β et que le calcium est impliqué dans l'agrégation de la caséine β , le rôle du calcium dans l'agrégation napine/caséine β a été étudié en introduisant l'EDTA comme complexant du calcium. La turbidité de solutions de napine et de caséine β (30/70) préparées dans un tampon phosphate pH 6 NaCl 50 mmol/L a été mesurée en fonction de la concentration en EDTA à 20 et 40°C. La valeur de l'absorbance était lue 30 minutes après l'introduction de l'EDTA et reportée sur la figure 100 pour des solutions de protéines pures ainsi qu'un mélange avec un ratio massique de 30/70 à 20°C. A partir de la concentration en EDTA de 10^{-3} mol/L, la turbidité des solutions a significativement diminué.

La chute de la turbidité s'est arrêtée à une concentration d'EDTA de $6,4 \times 10^{-3}$ mol/L. La même baisse de turbidité et le même seuil de concentration ont été observés à 40°C (figure 101). La diminution de l'absorbance pouvant résulter de l'augmentation de la force ionique dans le milieu, l'équivalent en NaCl de l'ajout de $6,4 \times 10^{-3}$ mol/L de complexant EDTA a été déterminé (0.057 mol/L) et les valeurs d'absorbance des solutions à 0.05 mol/L en NaCl ont été comparées à celles des solutions à 0.1 mol/L. Il en ressort que la diminution d'absorbance occasionnée par l'EDTA est d'un facteur 7 alors que la diminution d'absorbance liée à l'augmentation équivalente en salinité est d'un facteur 3. Le calcium a donc un rôle dans l'association entre la napine et la caséine β . Ce résultat sera néanmoins à confirmer par des mesures effectuées dans la même solution tampon. La forte quantité d'EDTA à utiliser, 100 fois supérieure à la quantité nécessaire pour fixer la quantité de calcium mesurée dans nos échantillons n'est, à ce stade, pas expliquée.

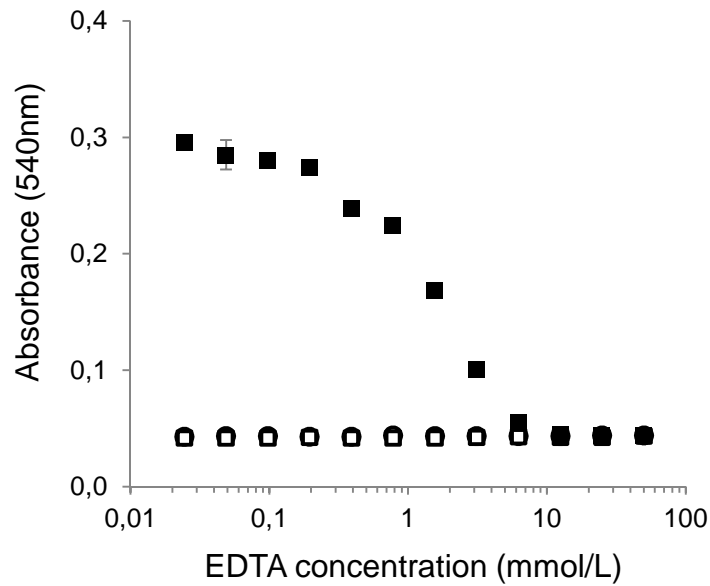


Figure 100 : Turbidité des solutions de napine/caséine β (concentration totale 1g/L) en fonction de la concentration en EDTA dans un tampon phosphate 50 mmol/L pH6 NaCl 50 mmol/L à 20°C (2 mesures sur 2 échantillons indépendants): (□) caséine β 100%, (■) napine/caséine β 30/70, (○) napine 100%.

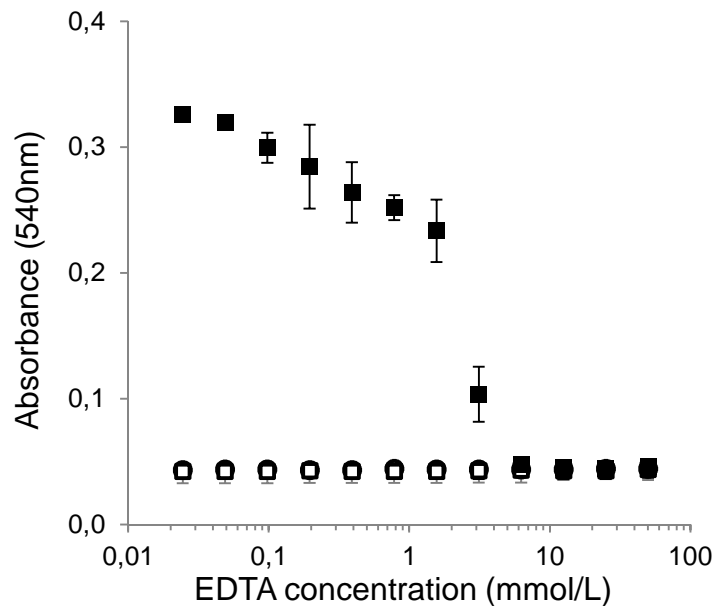


Figure 101 : Turbidité des solutions de napine/caséine β (concentration totale 1g/L) en fonction de la concentration en EDTA dans un tampon phosphate 50 mmol/L pH6 NaCl 50 mmol/L à 40°C (2 mesures sur 2 échantillons indépendants): (□) caséine β 100%, (■) napine/caséine β 30/70, (○) napine 100%.

3.3. Coexistence d'interactions hydrophobes et électrostatiques

3.3.1. Formation des agrégats napine/caséine β par interactions électrostatiques

La formation d'assemblages entre la napine et la caséine β par le biais d'interactions électrostatiques peut être vue à l'échelle moléculaire en considérant la charge et sa répartition dans les deux molécules. L'une des faces de la napine comporte tous les résidus à charges négatives et quelques résidus chargés positivement. En revanche, l'autre face comporte uniquement des résidus à charges positives (figure 102). A pH 7, la charge nette portée par la napine est de 10,5 (Schmidt, 2004). Le point isoélectrique de la caséine β étant de 5.2, la protéine est globalement chargée négativement pour des valeurs de pH entre 6 et 9. Cette charge est notamment apportée par les groupes phosphosérines du domaine N-terminal. Aux concentrations étudiées, la concentration en caséine β est toujours au-dessus de sa concentration micellaire. La structure de l'assemblage formé entre la napine et la caséine pourrait donc être une micelle (taille 20-25 nm, avec ses groupes phosphosérines orientées vers l'extérieur) entourée des molécules de napine orientant leurs faces riches en résidus de charge positive vers la micelle de caséine β . Cependant, cet objet ne présente pas une taille suffisante pour diffuser la lumière de façon importante. Pour expliquer la formation d'assemblages plus gros, on peut supposer que le calcium, apporté par la caséine β intervient. Ceci est conforté par le fait que plus la concentration en caséine augmente, plus la turbidité du mélange augmente et par le calcul de la concentration en calcium apporté par la caséine β (tableau 23). Le rapport des concentrations montre qu'il peut y avoir autant de pontages que de molécule de caséine β soit autant que le nombre de molécules de caséine par micelle (20 à 50 molécules d'après O'Connell et al., 2003). La formation d'assemblages de grosse taille entre la napine et la caséine β peut donc être vue comme la résultante d'association directe entre les faces chargées positivement de la caséine et la caséine β d'une part et d'associations indirecte par pontage avec le calcium. Ces assemblages sont représentés sur la figure 104.

Ratio massique (%)	0	70/30	30/70	100
Concentration en caséine β (mol/L)	0	$1,3 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-5}$
Concentration en napine (mol/L)	$7,0 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-5}$	0
Concentration en calcium (mol/L)	0	$1,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$4,8 \times 10^{-5}$

Tableau 23. Concentrations en calcium et napine dans les mélanges napine/caséine à plusieurs ratios massiques et à une concentration totale de 1g/L.

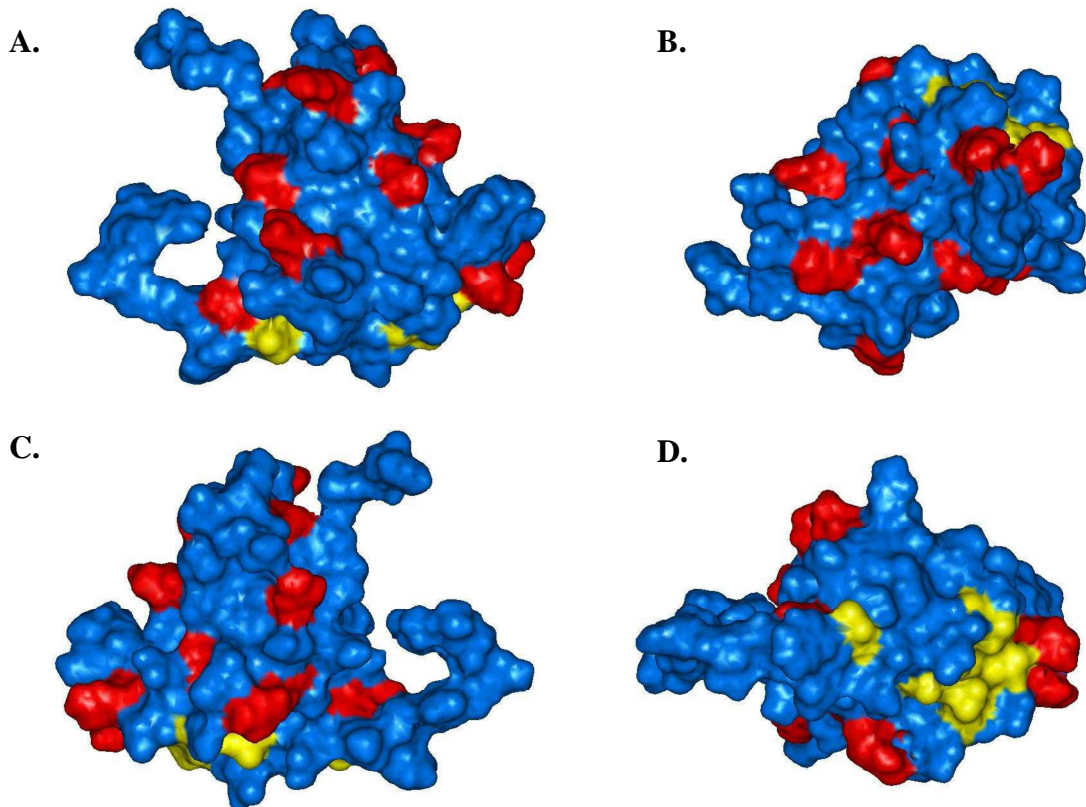


Figure 102 : Répartition des charges sur la napine à pH 7 (Schmidt, 2004). En rouge, les résidus chargés positivement (Arg, Lys, His) ; en jaune, les résidus chargés négativement (Asp, Glu) ; (B) : vue du dessus de l'image A, (C) : représentation à 180° dans le plan de la feuille de l'image A, (D) vue du dessous de l'image A.

La formation de ces assemblages est limitée par la présence de sel NaCl qui va venir écranter les charges de surfaces et diminuer les possibilités d'interactions entre les deux protéines (figure 104). A forte concentration, il n'y a plus aucune charge de surface de sorte que les molécules sont indépendantes l'une de l'autre.

3.3.2. Renforcement de l'agrégation par la température

La formation de micelles de caséine β est supposée être gouvernée par un équilibre dynamique entre des interactions hydrophobes attractives et électrostatiques répulsives (Horne, 1998). N'importe quel changement de température, que ce soit une hausse ou une baisse, modifiera cette balance en affectant les interactions hydrophobes.

En présence de napine, l'agrégation a également augmenté avec la température (figure 96). Sachant que la napine n'a pas de propriétés d'agrégation dans la gamme de température testée (Krzyzaniak et al., 1998), l'agrégation induite par la température ne peut que provenir de deux phénomènes :

- d'une part, l'augmentation des forces hydrophobes entre les molécules de caséine β qui entraînerait l'agrégation de plus grosses micelles de caséines β agrégée entre elles par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques avec la napine;
- d'autre part, l'apparition d'interactions hydrophobes favorisées par la température entre la protéine végétale et la protéine animale qui augmenterait l'agrégation. Cette hypothèse a été utilisée pour expliquer un phénomène similaire observé pour le couple protéique lysozyme/ α -lactalbumine (Nigen et al., 2007).

La napine étant très stable (nombreux ponts disulfures qui stabilisent sa structure), la formation d'associations hydrophobes entre la napine et la caséine est nettement moins probable qu'entre micelles de caséines.

L'ensemble des résultats nous permettent de dresser un schéma de variation des structures des assemblages entre le napine et la caséine β suivant la concentration et la température (figure 104). En étendant ces résultats aux concentrations où la caséine est sous forme de monomère, on peut voir que la napine et la caséine β s'associent pour former des assemblages soit directes soit indirectes par pontage avec le calcium. Le sel permet de dissocier l'assemblage et la température permet de former des assemblages plus gros quand la napine est complexée avec la caséine β . La thermo-réversibilité des assemblages est expliquée par la seule intervention de la caséine β dans ce phénomène.

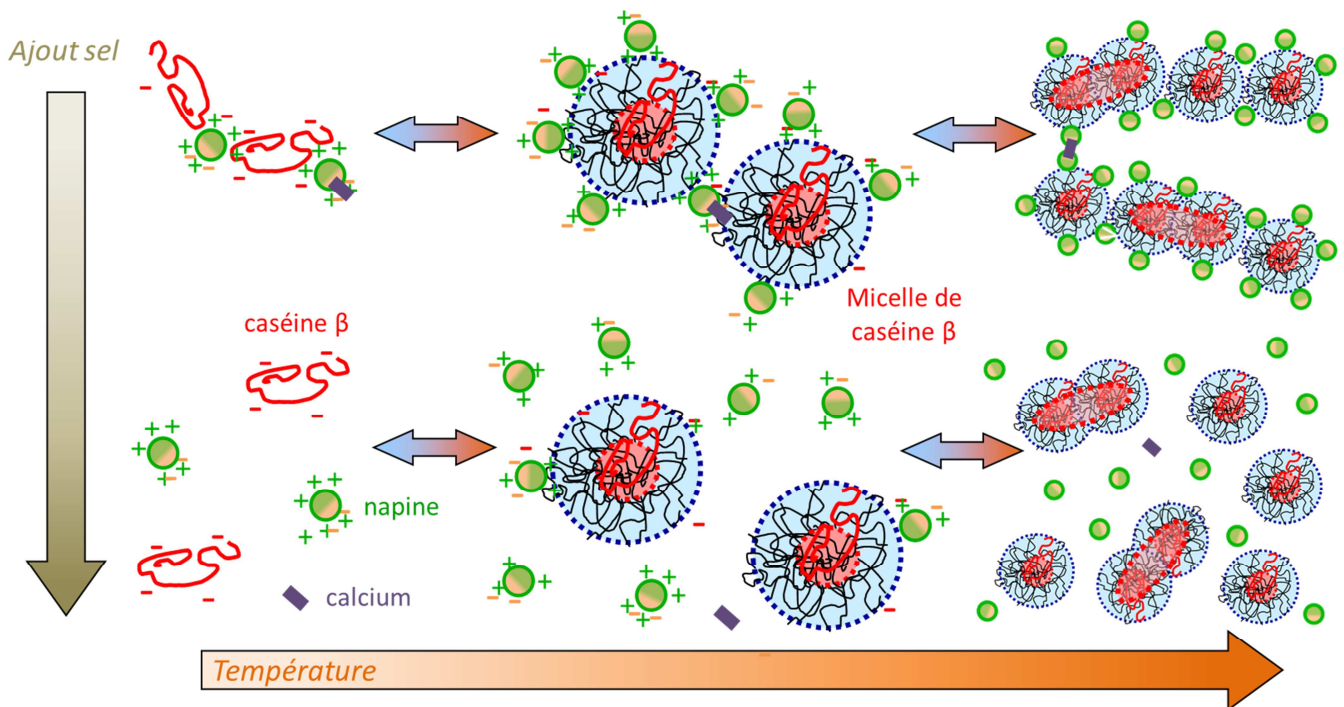


Figure 104 : Représentations hypothétiques des assemblages napine/caséine β en fonction du sel et de la température.

3.4. Composition des agrégats

Comme les interactions hydrophobes et électrostatiques influencent l'agrégation napine/caséine β et que seule la caséine β est sensible à l'influence de la température, la répartition de chaque protéine dans l'agrégat et dans la phase soluble a été déterminée pour différents ratios et à deux températures différentes. Des solutions à une concentration de 1 mg/mL ont été préparées sur plaque dans un tampon Tris 50 mM pH6 NaCl 50 mM. Deux ratios (30/70 et 70/30) ont été testés à deux températures (20 et 50°C) qui correspondent à des turbidités très différentes et donc à deux états d'agrégations distincts (figure 97). Après 30 minutes de stabilisation à la température cible, l'ultrafiltration (UF) est utilisée dans le but de séparer les gros agrégats formés des protéines monomériques. Les dispersions sont centrifugées à 4000 g pendant 10 minutes et filtrées avec un seuil de coupure à 100 KDa. Le filtrat (passé par le filtre) et le rétentat (retenu par le filtre) sont ensuite analysés en turbidimétrie et par électrophorèse SDS-PAGE. Les résultats sont comparés à ceux obtenus pour les solutions de protéines seules et pour le mélange initial.

On peut voir sur la figure 102 que les deux protéines sont retrouvées aux poids moléculaires attendus (caséine β : 24 kDa, napine : 15 kDa). La présence des deux protéines dans le rétentat corrobore l'hypothèse de leur implication dans l'agrégation quels que soit la température ou le ratio massique. En revanche, la caséine β se retrouve majoritairement dans les rétentats alors que la napine est, quant à elle, répartie équitablement entre le rétentat et le filtrat. Cela montre que la caséine est majoritaire dans l'agrégat.

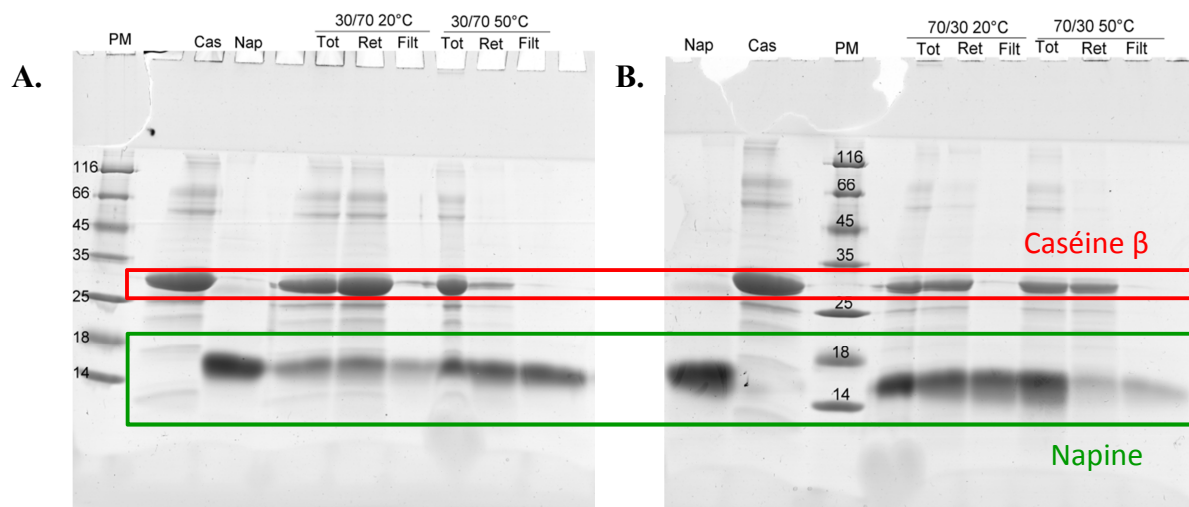


Figure 102 : Profil SDS PAGE 15% de la napine et de la caséine β à 20°C ainsi que des mélanges napine/caséine β à 20 et 50°C avec leur rétentat et filtrat (PM : marqueur de poids moléculaire, Cas : caséine β , Nap : napine, Tot : protéines totales du mélange, Ret : rétentat, Filt : filtrat) (A : nap/cas 30/70, B : nap/cas 70/30).

Une analyse de l'intensité de chaque bande avec le logiciel Multigauge confirme ces premières observations. En représentant le rapport de l'intensité des bandes correspondant à la napine sur l'intensité des bandes de la caséine β (figure 103), on peut voir que la valeur du rapport change peu entre la solution totale et le rétentat. La caséine est légèrement majoritaire dans le rétentat sauf dans le cas du mélange 30/70 à 50°C. Tous les filtrats sont extrêmement riches en napine en comparaison du mélange total. Les agrégats sont donc composés des deux protéines mais avec un ratio de napine moins important que dans la solution initiale.

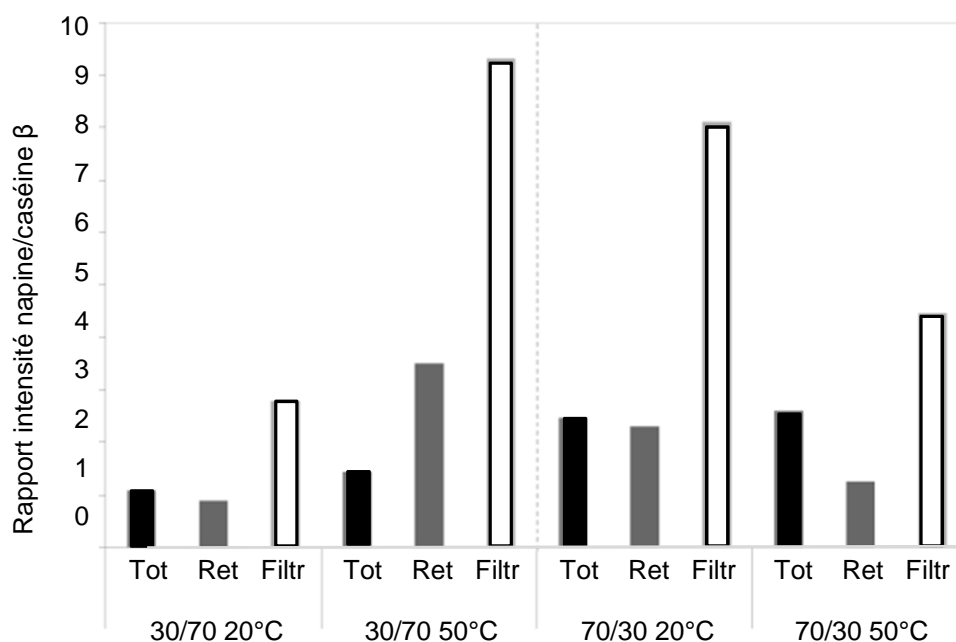


Figure 103 : Comparaison de l'intensité des bandes de la napine et de la caséine β sur des électrophorèses SDS PAGE 15% de mélanges napine/caséine β à 20 et 50°C à deux ratios massiques (m/m) (Tot : protéines totales du mélange, Ret : rétentat, Filtr : filtrat).

Ces résultats sont cependant à modérer car la turbidité mesurée dans la solution de mélange initiale n'est jamais retrouvée dans les rétentats, là où devraient rester les agrégats de napine/caséine β (tableau 23). Les rétentats sont quasiment translucides sauf dans le cas du mélange 30/70 à 20°C pour lequel la turbidité est très importante. Dans ce dernier cas, on a noté que la température montait tout de même à 36°C lors de la centrifugation. L'agrégation était donc peut être plus importante qu'à 20°C à cause de l'ultrafiltration. Cependant, on retrouve de la caséine β et de la napine sur les électrophorèses de tous les rétentats. Il semble donc que les agrégats se solubilisent après la filtration. De manière semblable aux rétentats, les filtrats sont tous parfaitement translucides mais en accord avec la nature non agrégée des protéines de cette fraction. Ces résultats correspondent par contre aux protéines monomériques solubles qu'on s'attend à trouver après filtration.

Vol (ml)	30/70 20°C	30/70 50°C	70/30 20°C	70/30 50°C
Rétentat	1	0.2	0.5	0.4
A540 (UA)	30/70 20°C	30/70 50°C	70/30 20°C	70/30 50°C
Total	0,166	0,608	0,107	0,362
Rétentat	0,526	0,075	0,071	0,040
Filtrat	0,037	0,038	0,038	0,037

Tableau 23 : Volumes de rétentat récupérés et valeurs d'absorbance mesurées à 540 nm pour la solution totale, le rétentat et le filtrat de mélanges de napine/caséine β à des rapports massiques de 70/30 et 30/70 à 20 et 50°C (Valeur du blanc réalisé sur le tampon : 0.038).

On a donc pu confirmer l'implication des deux protéines dans la formation d'agrégats. Les électrophorèses ont montré que l'agrégation met en jeu plus de caséine β que de napine par rapport aux rapports initiaux fixés lors du mélange des deux protéines. La température n'influe pas sur cette composition des agrégats puisqu'on retrouve des rapports similaires entre napine et caséine β à 20 et 50°C. Cependant, il faut relativiser ces résultats car les mesures de turbidité réalisées ne permettent pas de les corroborer. De plus, pour les mesures à 20°C, la centrifugation a provoqué un réchauffement des solutions jusqu'à 36°C pouvant expliquer l'absence de différences entre les électrophorèses des solutions à 20 et 50°C.

3.5. Fonctionnalités aux interfaces et dans les mousses

Les propriétés fonctionnelles des mélanges napine/caséine β ont été étudiées dans les mêmes conditions que précédemment, c'est-à-dire : pH 6, NaCl 50 mmol/L et ratios massiques 70/30, 50/50 et 30/70. Les échantillons ont été préparés manuellement comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes.

3.5.1. Tension superficielle

La concentration micellaire critique (CMC) de la caséine β a été déterminée par la méthode de la goutte pendante et mesurée à l'obtention d'un plateau. La figure 104 représente les résultats obtenus.

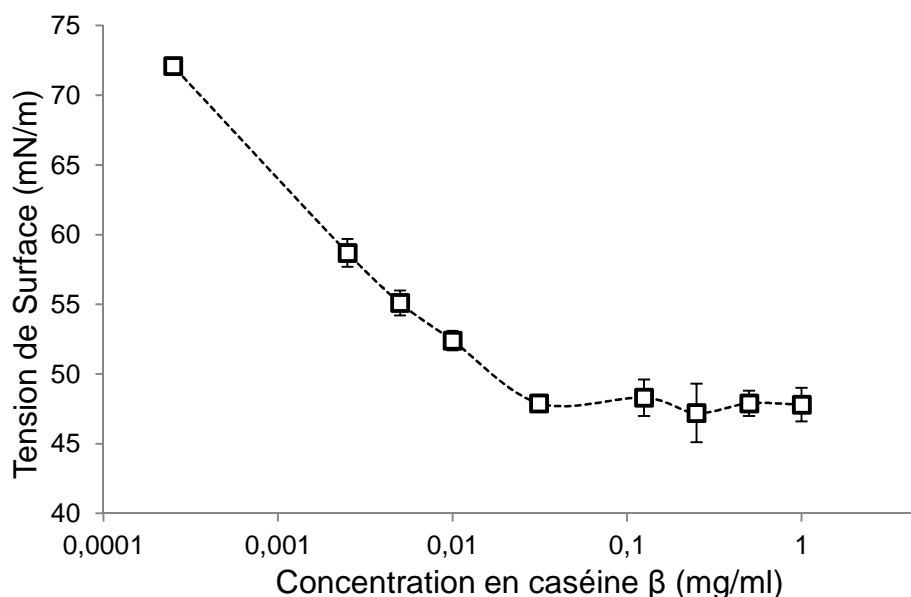


Figure 104 : Valeurs de tension de surface à 20°C et à l'équilibre de la caséine β dans un tampon Tris 50 mmol/L pH 6 NaCl 50 mmol/L en fonction de la concentration.

Les valeurs de tension de surface correspondent à celles trouvées dans la littérature pour des conditions physico-chimiques proches (pH 7 et sans force ionique) (Wustneck et al., 1996). La concentration micellaire critique (CMC) se situe à 0,02 g/L dans ces conditions de pH et de salinité. Ainsi, dans les mélanges étudiés à la concentration d'1 g/L et aux rapports 30/70, 50/50, 70/30, la concentration en caséine β (0,7, 0,5 et 0,3 g/L respectivement) est largement supérieure à la CMC. Dans des conditions proches (pH 7, NaCl 25 mM), la napine a une tension de surface qui varie de 49,7 à 1 g/L à 54,1 à 0,1 g/L (Schmidt, 2004). A une concentration totale en protéines de 1 g/L, si l'agrégation ne mobilise pas toutes les protéines présentes en solution, il pourra être difficile d'observer son influence sur les propriétés tensioactives. Nous l'avons tout de même vérifié à une concentration totale en protéines de 1 g/L pour tous les ratios massiques (m/m) (figures 105 et 106).

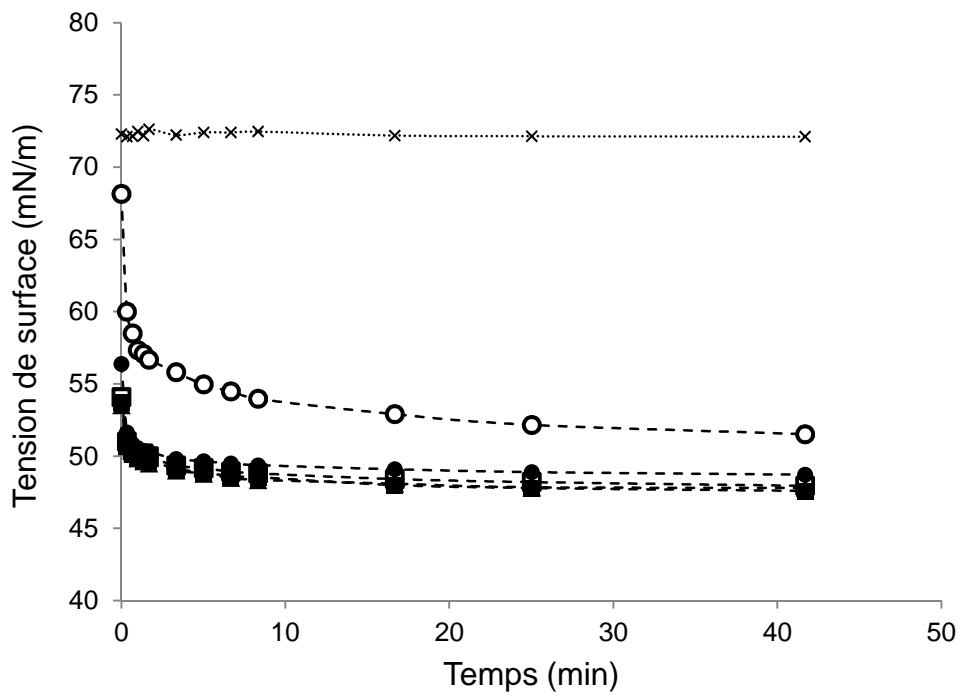


Figure 105 : Cinétiques d'adsorption des mélanges napine/caséine β à 20°C à l'interface air-tampon (Tris 50 mmol/L pH 6 NaCl 50 mmol/L) pour une concentration en protéines de 1 g/L et à différents ratios napine/caséine β : (□) caséine β 100%, (■) napine/ caséine β 30/70, (▲) napine/ caséine β 50/50, (●) napine/ caséine β 70/30, (○) napine 100%, (x) eau millipore.

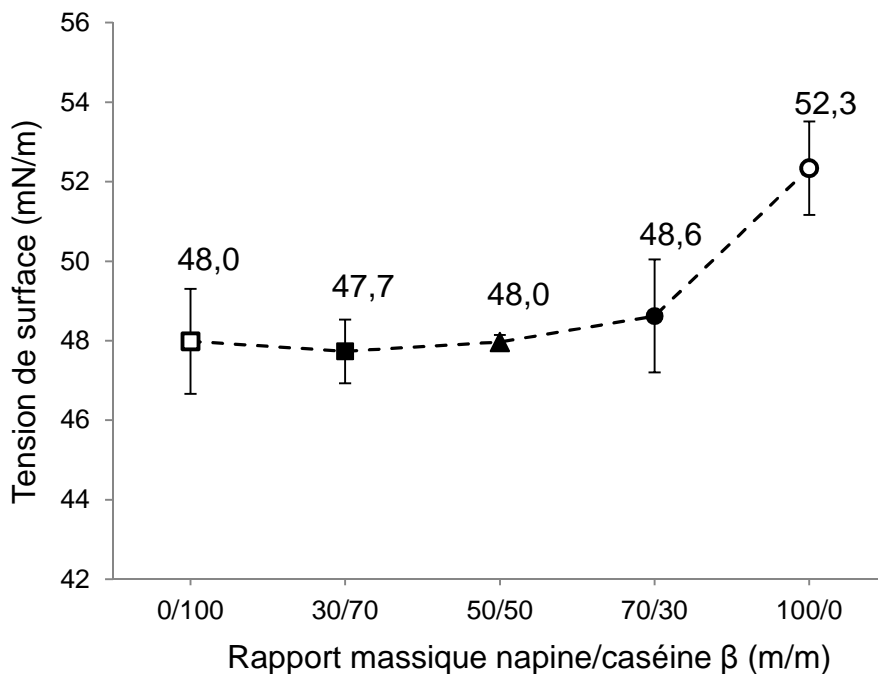


Figure 106 : Valeurs de tension de surface à l'équilibre à 20°C des mélanges napine/caséine β dans un tampon Tris 50 mmol/L pH 6 NaCl 50 mmol/L pour une concentration en protéines de 1 g/L et à différents ratios napine/caséine β : (□) caséine β 100%, (■) napine/ caséine β 30/70, (▲) napine/ caséine β 50/50, (●) napine/ caséine β 70/30, (○) napine 100%.

Quel que soit le ratio, la tension de surface a diminué rapidement et les valeurs finales atteintes étaient identiques pour les mélanges et significativement différentes de la valeur de la solution de napine. Les solutions pures de napine avaient une valeur moyenne de tension de 52,3 mN/m, semblable aux valeurs trouvées par Schmidt (2004) qui observait une tension de 50,7 mN/m pour des solutions de napine à 1 g/L et 148 mM de force ionique, sachant que cette dernière avait peu d'influence sur la tension superficielle des solutions. Les solutions contenant de la caséine β avaient toutes une tension de surface égale à celle de la caséine β pure. Comme supposé, l'agrégation napine/caséine β n'a donc aucun effet sur la tension de surface à ces concentrations. La concentration totale en protéine a donc été réduite à 0,01 mg/mL pour observer une influence éventuelle de l'ajout de napine dans la solution de caséine β . La tension de surface a d'abord été mesurée pour la solution pure de caséine β puis la napine a été ajoutée dans la solution à l'aide d'une seringue pour obtenir un ratio massique de 30/70 (m/m) tout en continuant à mesurer la tension de surface. La figure 107 présente les résultats obtenus.

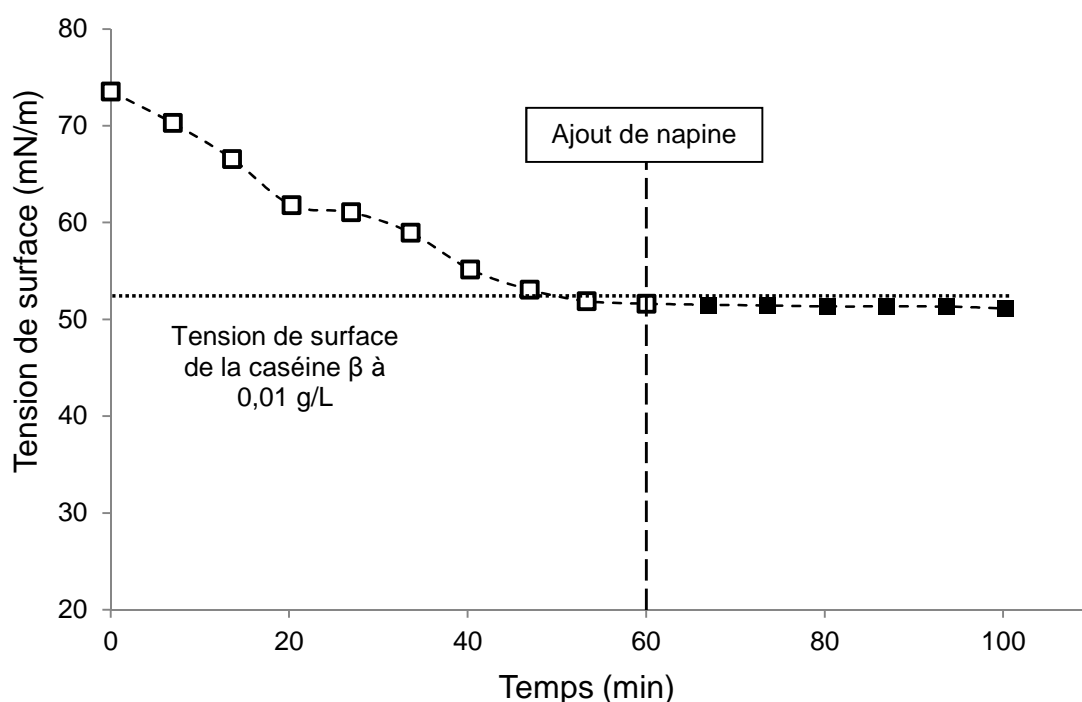


Figure 107 : Cinétique d'adsorption de la caséine β à 20°C à l'interface air-tampon (Tris 50 mmol/L pH 6 NaCl 50 mmol/L) pour une concentration en protéines de 0,01 g/L avant et après ajout de napine à hauteur de 30% (m/m).

Avant l'ajout de napine, la tension de surface de la solution de caséine β avait lentement diminué jusqu'à une valeur de plateau de 51,6 mN/m. Suite à l'ajout de napine (équivalent à 0,3 g/L), la solution n'est pas devenue trouble mais la transparence de la solution ne correspond pas forcément à une absence d'agrégation car à ces très faibles concentrations, la formation d'agrégats ne provoque pas de turbidité. La tension n'a pas plus diminué et est restée stable pendant les 40 minutes finales de la mesure. Le remplacement de la caséine β par la napine ou l'ajout simple de cette dernière n'a pas d'effet sur la tension de surface de la solution et ne modifie donc pas les propriétés interfaciales de la caséine β .

3.5.2. Propriétés moussantes

Les propriétés moussantes des mélanges napine/caséine β n'ont été étudiées qu'au ratio 30/70 afin de limiter la consommation de napine. Les mélanges ont été caractérisés par l'évolution du volume de mousse (figure 108), le temps de formation et le temps de déstabilisation des mousses (figure 109). Les mousses formées avec la napine pure étaient très instables et perdaient environ la moitié de leur volume en moins de cinq minutes. Les mousses de napine/caséine β 30/70 (m/m) et de caséine β pure suivaient une cinétique identique mais avec une déstabilisation initiale plus importante pour la mousse formée par le mélange. Les deux solutions ont de très bonnes capacités moussantes. La caséine β a de meilleures propriétés moussantes que la napine et le mélange présente des propriétés intermédiaires.

Le volume de mousse visé (35 cm³) était atteint après environ 60 secondes pour les solutions contenant de la caséine β et après 86 secondes pour la solution de napine (figure 109). Le remplacement de 30% de caséine β par la napine n'a pas d'effet significatif sur la formation de la mousse. En revanche, les mousses formées à partir du mélange de protéine végétale/animale mettaient deux fois moins de temps pour retomber à un volume de 22 cm³ en comparaison aux mousses de caséine β (figure 109).

Les propriétés moussantes d'une solution de caséine β sont donc affectées par le remplacement d'une partie de la caséine par de la napine à hauteur de 30% (m/m).

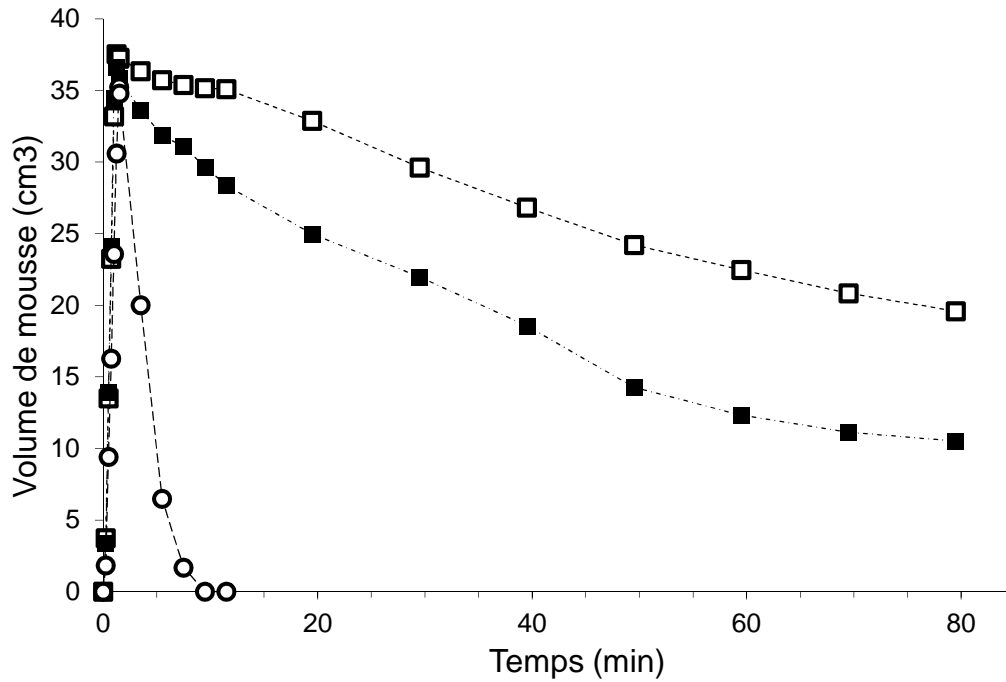


Figure 108 : Volumes de mousse formée au cours du temps pour des mélanges napine/caséine β dans un tampon Tris 50 mmol/L pH 6 NaCl 50 mmol/L pour une concentration en protéines de 1 g/L et à différents ratios napine/caséine β : (\square) caséine β 100%, (\blacksquare) napine/ caséine β 30/70, (\circ) napine 100%.

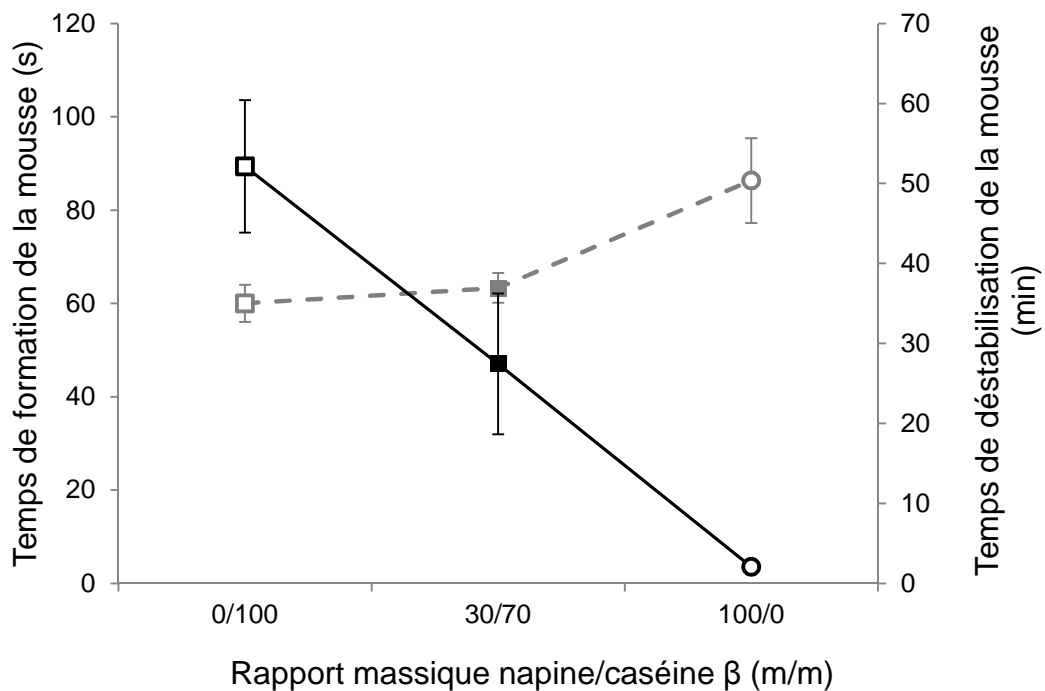


Figure 109 : Temps mis pour atteindre 35 cm³ de mousse (- - - -) et temps de déstabilisation jusqu'à 22 cm³ de mousse (_____) pour des mélanges napine/caséine β dans un tampon Tris 50 mmol/L pH 6 NaCl 50 mmol/L pour une concentration en protéines de 1 g/L et à différents ratios napine/caséine β (m/m) : (\square) caséine β 100%, (\blacksquare) napine/ caséine β 30/70, (\circ) napine 100%.

3.6. Stabilité dans le Temps

Les résultats obtenus par électrophorèse SDS-PAGE et par turbidimétrie sur la composition des agrégats diffèrent et cela pourrait s'expliquer par des laps de temps différents entre la préparation de l'échantillon et la mesure pour les deux méthodes. En effet, si les agrégats évoluent dans le temps, il se peut qu'ils ne soient plus visibles lors de la mesure d'absorbance sur les filtrats et rétentats (soit 60 minutes après formation de l'agrégat). Or, jusqu'à maintenant, les mesures étaient toujours effectuées après le même temps de stabilisation des mélanges, soit 30 minutes. Cependant, dans les industries agroalimentaires, les temps de stockage peuvent énormément varier pour un même produit. Il était donc très intéressant d'étudier la cinétique de formation de ces assemblages de napine/caséine β en fonction du temps.

La turbidité des mélanges napine/caséine β a donc été mesurée à 540 nm pour des solutions à 1 mg/ml dans un tampon Tris 50 mM NaCl 50 mM à pH 6 pour lesquelles l'agrégation était la plus forte. Ces mesures ont été réalisées à 20°C de deux façons différentes : des mesures ponctuelles à partir de 15 heures et toutes les heures avec une agitation au vortex à 600 rpm pendant 10 secondes et une cinétique complète sans agitation des solutions avec une mesure de turbidité prise toutes les minutes.

La figure 110 montre l'évolution de la turbidité dans le temps pour les mélanges napine/caséine β à différents ratios massiques. Pour tous les ratios, la turbidité des solutions augmente rapidement suite au mélange dès la mise en contact des deux protéines puis diminue et se stabilise à des valeurs d'absorbance négligeables après 14 heures. La taille et/ou le nombre des agrégats diminue donc avec le temps et la majorité des agrégats a disparu après 24 heures. Les agrégats formés par les interactions électrostatiques ne sont donc pas stables au cours du temps et la complexation entre la napine et la caséine β résulte d'un équilibre long à stabiliser.

L'effet du ratio est bien visible sur cette figure. Les solutions plus concentrées en caséine β montrent une agrégation plus importante dans les premiers moments du mélange avant que la turbidité ne chute très rapidement.

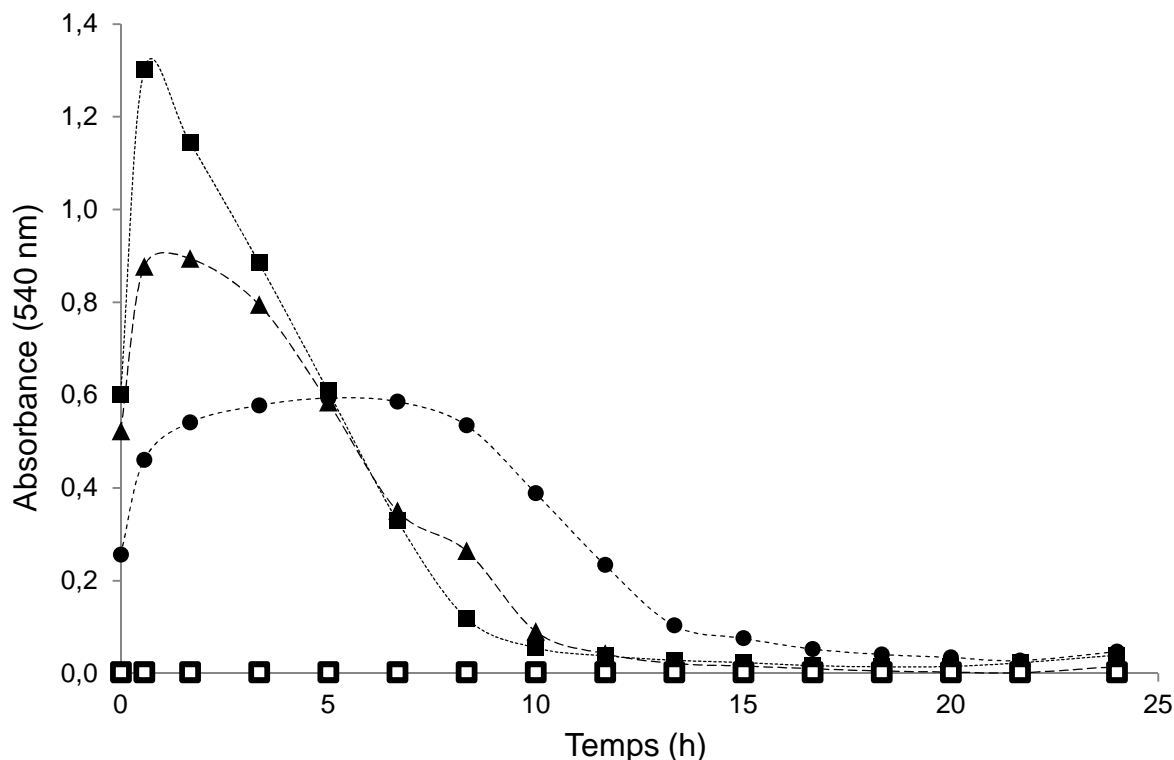


Figure 110 : Absorbance à 540 nm des mélanges napine/caséine β (w/w) à 1mg/ml en fonction du temps et sans agitation dans un tampon Tris 50mM pH 6 NaCl 50 mM à 20°C (n=1, mesures toutes les minutes) : (□) caséine β 100%, (■) napine/caséine β 30/70, (▲) napine/caséine β 50/50, (●) napine/caséine β 70/30, (○) napine 100%.

Sachant qu'il n'y a pas d'agitation des cuves durant 24 heures, cette disparition des agrégats peut être causée par un phénomène de sédimentation des grosses particules formées par l'assemblage de napine et de caséine β . Bien que nous n'ayons rien vu à l'œil nu, des mesures de turbidité après 15 heures ont été réalisées cette fois-ci avec une agitation par vortex des cuves avant chaque point permettant d'éviter la sédimentation ou du moins de remettre les particules en suspension dans la solution. Les résultats sont présentés sur la figure 111. Les valeurs de turbidité initiale des différents mélanges sont similaires à celles mesurées lors de la cinétique continue. Cependant, la turbidité semble être plus longue à se stabiliser lorsqu'il y a agitation des solutions. En effet, les valeurs d'absorbance sont plus élevées avec agitation que sans agitation et ne se stabilisent

qu'après 20 heures et à des valeurs bien plus importantes que lors de la cinétique sans agitation. Les différences d'absorbance entre cinétiques prouvent qu'il y a bien une sédimentation des agrégats permettant d'expliquer une partie de la baisse de l'absorbance au cours du temps mais comme la turbidité continue de diminuer, la baisse de turbidité est aussi attribuable à une rupture des agrégats. De plus, malgré cette sédimentation, les mélanges de protéines restent légèrement turbides après 24 heures lors de la cinétique avec agitation. On en conclut que des agrégats sont toujours présents en solution après 24 heures. Il y a donc bien une dynamique de formation des agrégats napine/caséine β .

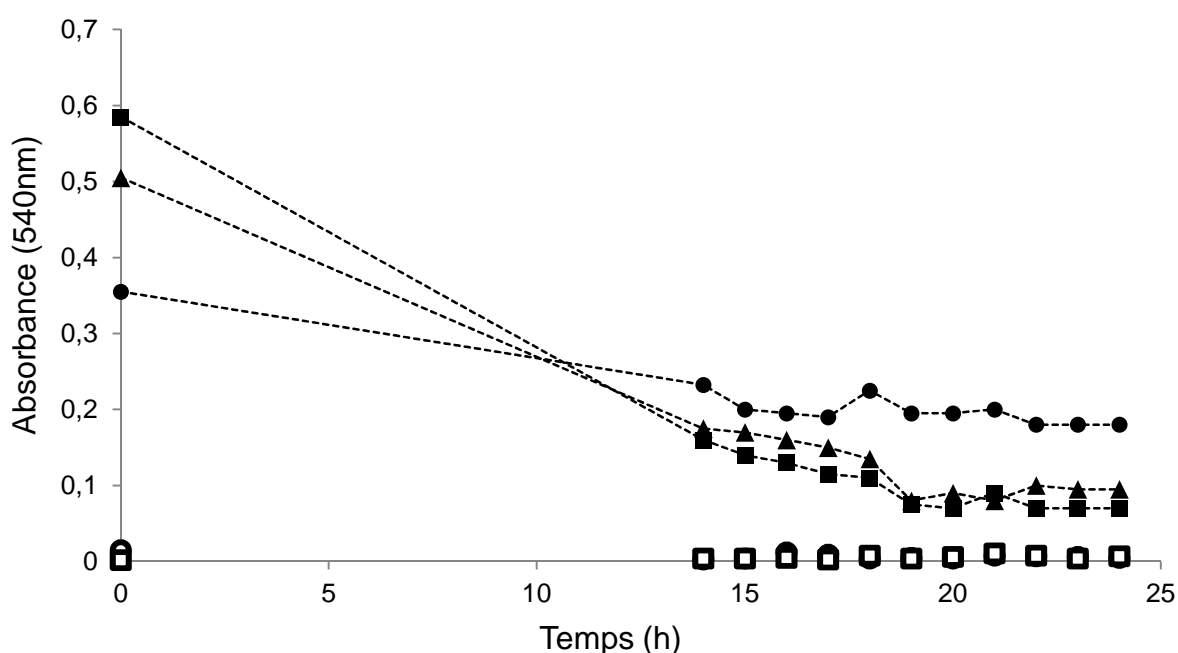


Figure 111 : Absorbance à 540 nm des mélanges Napine/Caséine β (w/w) à 1mg/ml en fonction du temps dans un tampon Tris 50mM pH 6 NaCl 50 mM à 20°C (n=3, mesures toutes les heures, 1 mesure montrée) : (□) caséine β 100%, (■) napine/caséine β 30/70, (▲) napine/caséine β 50/50, (●) napine/caséine β 70/30, (○) napine 100%.

En résumé, les assemblages napine/caséine β évoluent dans le temps. Durant la première heure, la turbidité des solutions augmente ce qui indique que la taille et ou le nombre des complexes augmente. Ensuite, la turbidité des solutions diminue jusqu'à trouver un équilibre après environ 20 heures à des valeurs inférieures à celles mesurées à T_0 indiquant sûrement des assemblages de plus petites tailles.

Pour confirmer cette hypothèse de diminution de taille des assemblages avec le temps, des mesures de diffusion dynamique de la lumière ont été effectuées sur des solutions napine/caséine β à 1 mg/ml dans un tampon tris 50 mM pH 6 NaCl 50 mM après 24 heures à 20°C et avec agitation au vortex à 600 rpm pendant 10 secondes avant la mesure.

La figure 112 montre les résultats obtenus en intensité dans les mêmes conditions que les mesures de turbidité après 24 heures. On observe ainsi la présence dans tous les échantillons de protéines libres non agrégées correspondant à la napine entre 4 et 5 nm et à la caséine β , seulement pour le ratio 30/70, autour de 20 nm. Ces observations indiquent que toutes les protéines ne sont pas impliquées dans les agrégats après 24 heures.

De plus grosses particules d'environ 700 nm de diamètre sont également visibles pour les trois ratios. Cependant, malgré la répétabilité des mesures, ces particules ne sont peut-être pas représentatives de toute la population car la taille moyenne indiquée lors de ces mesures reste supérieure à 2000 nm ce qui montre que les particules présentes dans les solutions de napine/caséine β sont toujours, même après 24 heures, trop grosses et polydisperses pour être correctement analysées en diffusion dynamique de la lumière.

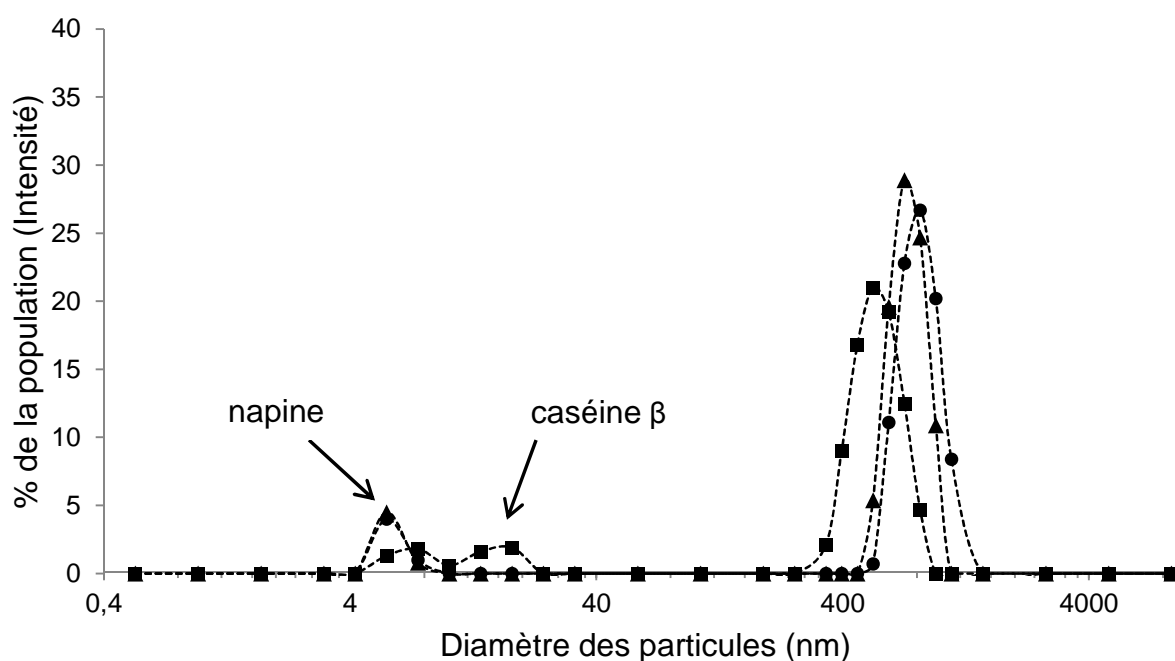


Figure 112 : Taille des particules dans des solutions napine/caséine β dans un tampon Tris 50mM pH6 NaCl 50mM après 24 heures à 20°C : (■) napine/caséine β 30/70, (▲) napine/caséine β 50/50, (●) napine/caséine β 70/30.

3.7. Conclusion

La napine et la caséine β forment des agrégats mixtes dont la formation est non seulement contrôlée par la salinité, la concentration et le ratio entre protéines, mais également par la température et la présence de cations divalents. L'effet de la température, qui est réversible, a, en revanche, une portée limitée aux faibles concentrations en sel. A la concentration totale de 1 g/L, la caséine β est majoritairement sous forme de micelles. Cela peut expliquer pourquoi les caséines sont quasiment toutes impliquées dans la formation des agrégats alors que la napine n'est pas totalement associée même en concentration limitante. La mousse formée à partir du mélange 30/70 a un comportement très similaire à celui de la caséine β mais intermédiaire entre celui de la napine et la caséine beta. L'ajout de napine ne modifie pas l'activité de surface de la caséine β , même aux rapports élevés en napine (70/30). Ces agrégats, étudiés dès leur formation, présentent la particularité de se dissocier plus ou moins rapidement selon le ratio et d'avoir, dans tous les cas, diminué de taille ou disparu au bout d'une dizaine d'heures. Cette inversion du phénomène d'agrégation avec le temps reste cependant à confirmer par des études de l'évolution de la structure de l'agrégat. En effet, les analyses turbidimétriques ne permettent pas de conclure définitivement sur ce phénomène car sujettes à l'influence de nombreux autres paramètres comme on a pu le voir avec la sédimentation.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Dans l'objectif de nourrir 9 Milliards d'individus à l'horizon 2050 en alliant qualités organoleptique, nutritionnelle et sanitaire, protection de l'environnement, et rentabilité des économies de production et de transformation, l'un des verrous technologiques à surmonter est la substitution d'une partie des protéines animales par des protéines végétales dans l'alimentation et notamment les produits transformés sans perdre les propriétés fonctionnelles des protéines et la qualité organoleptique des produits finaux. L'objectif de ce travail était ainsi d'étudier des couples de protéines animales/végétales en mélange dans différentes conditions physico-chimiques (concentration totale, ratio massique, pH, force ionique) afin de caractériser leurs assemblages potentiels, et leur apport positif ou négatif pour un système alimentaire. Le choix des systèmes étudiés s'est porté sur des mélanges de protéines 7S (viciline et convicine) et 11S (légumine) de pois, 7S (conglycinine) et 11S (glycinine) de soja et 2S (napine) de colza avec de la caséine β ou du lysozyme. Outre leurs propriétés nutritionnelles, ces protéines présentaient l'intérêt d'avoir des propriétés contrastées en termes de taille, de point isoélectrique et de structure.

Les deux protéines de pois et la protéine 11S de soja issues de farine de pois et d'isolat de protéine 11S de soja ont nécessité des étapes de purification. La caractérisation de toutes les protéines a mis en évidence une pureté supérieure ou égale à 80% dans tous les échantillons et un taux de cendres inférieur à 15%. Les mesures de solubilité ont montré que les deux protéines animales (>95%) et la napine (2S) (90%) de colza étaient très solubles dans les conditions étudiées alors que les protéines de pois et de soja avaient une solubilité beaucoup plus faible (entre 50 et 75 %).

Le criblage par analyse de la taille des particules sur plaques ne s'est pas avéré être un outil efficace pour identifier les phénomènes associatifs entre les protéines. En effet, des problèmes techniques (obturation des capillaires par les agrégats de protéines) empêchaient toute mesure passant après un puits rempli d'agrégats et l'analyse, lorsqu'elle a pu avoir lieu, a été rendue difficile par le nombre total de populations présentes dans les

échantillons. L'analyse des échantillons sur plaques par turbidimétrie s'est révélée en revanche très efficace pour identifier les phénomènes associatifs entre les protéines.

Les mélanges binaires entre une protéine d'origine végétale (pois, soja, colza) et une protéine d'origine animale (caséine, lysozyme) ont présenté des aspects très différents. A l'exclusion des mélanges 7S de pois/lysozyme et napine/caséine β , les autres mélanges entre les protéines végétales et les deux protéines animales ne présentaient aucun trouble et les tailles des objets correspondaient aux protéines individuelles. Pour ces couples de protéines, l'introduction d'une protéine végétale ne semble pas perturber la fonctionnalité de la protéine animale. Ceci sera à vérifier pour plusieurs autres propriétés telles que la moussabilité, pour le lysozyme ou la gélification, pour la caséine.

Les mélanges entre les protéines 7S de pois (Viciline et Convicine) et le lysozyme présentent une augmentation de la turbidité pour des ratios massique compris 50/50 et 90/10 pour des pH basiques. Cette agrégation semble contrôlée principalement par des interactions électrostatiques. Les conditions de pH auxquelles cette agrégation se produit étant peu commune dans les aliments, celle-ci ne devrait pas perturber les fonctionnalités des protéines dans des aliments neutres ou acides.

Les mélanges entre la napine, protéine 2S basique du colza, et la caséine présentaient, en revanche une forte turbidité et une taille importante dans les premières 24 heures. Les analyses statistiques ont montré que cette agrégation est contrôlée par les facteurs physico-chimiques étudiés (pH, concentration en NaCl, ratio massique) mais que ces facteurs sont indépendants. L'agrégation est ainsi rapidement éliminée en ajoutant du sel qui écrante les charges, montrant l'existence d'interactions électrostatiques entre les deux protéines. La caractérisation des agrégats a bien mis en évidence leur formation à partir de napine et de β -caséine. Contrairement à l'effet de la concentration en NaCl, la température favorise la formation d'autres types d'assemblages entre les deux protéines. Sachant que la température influence les liaisons hydrophobes, ces dernières et les interactions électrostatiques co-existent dans les agrégats napine/caséine β . De façon remarquable,

l'effet de la température est réversible, apportant des potentialités de modulation par stimuli externe de ce genre de système.

Le suivi dans le temps des agrégats de napine et caséine a révélé une propriété particulière : les assemblages entre ces deux protéines se défont au-delà de 12h et les solutions redeviennent limpides au bout de 24h. De même, ces agrégats disparaissent par ajout d'un chélatant de cations divalents. Cette dernière propriété nous a conduits à proposer l'implication du calcium dans la formation des agrégats napine/caséine mais ce phénomène reste à élucider car les quantités de calcium détectées ne sont pas très élevées. Au final, la formation d'assemblages napine/caséine β peut être contrôlée en ajustant la concentration, la salinité du milieu et/ou en introduisant un agent chélatant des ions divalents.

La prochaine étape est d'explorer en profondeur les caractéristiques de ces agrégats (taille, structure, densité, ...) et de vérifier les propriétés fonctionnelles (propriétés émulsifiantes et moussantes par exemple) d'assemblages formés dans des conditions précises en les comparant aux propriétés de solutions de caséine β pure à des fins d'utilisation commerciale. Dans cette optique, les mélanges napine/caséine β pourraient remplacer des solutions de caséine β dans des sauces de plats préparés ou dans des préparations de chair à saucisse où la thermo-réversibilité des assemblages pourrait apporter de nouvelles fonctionnalités.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K., Kitamura, K., Mikami, B., & Utsumi, S. (2003). Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(12), 7395–400.
- Aluko, R. E., Mofolasayo, O. A., & Watts, B. M. (2009). Emulsifying and foaming properties of commercial yellow pea (*Pisum sativum* L.) seed flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(20), 9793–800.
- Anema, S. G., & (Kees) de Kruif, C. G. (2012). Co-acervates of lactoferrin and caseins. *Soft Matter*, *8*(16), 4471–4478.
- Anema, S. G., & de Kruif, C. G. K. (2014). Complex coacervates of lactotransferrin and β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, *430*, 214–220.
- Anema, S. G., & De Kruif, K. G. (2013). Coacervates of lysozyme and β -casein. *Journal of Colloid and Interface Science*, *398*, 255–261.
- l'Anson, K. J., Miles, M. J., Bacon, J. R., Carr, H. J., Lambert, N., Morris, V. J., & Wright, D. J. (1988). Structure of the 7S globulin (vicilin) from pea (*Pisum sativum*). *International Journal of Biological Macromolecules*, *10*(5), 311–317.
- Arnaudov, L. N., & de Vries, R. (2005). Thermally Induced Fibrillar Aggregation of Hen Egg White Lysozyme. *Biophysical Journal*, *88*(1), 515–526.
- Arnaudov, L. N., & de Vries, R. (2006). Strong impact of ionic strength on the kinetics of fibrillar aggregation of bovine beta-lactoglobulin. *Biomacromolecules*, *7*(12), 3490–3498.
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, *38*(4), 902–912.
- Awadé, J. C., Guérin-Dublard, C., Nau, F., & Thapon, J. L. (1994). Utilisations actuelles et potentielles des protéines de blanc d'oeuf de poule. *Journées de La Recherche Avicole*, 295–300.
- Azegami, S., Tsuboi, A., Izumi, T., Hirata, M., Dubin, P. L., Wang, B., & Kokufuta, E. (1999). Formation of an Intrapolymer Complex from Human Serum Albumin and Poly(ethylene glycol). *Langmuir*, *15*(4), 940–947.

B

- Bacon, J. R., Lambert, N., Phalp, M., Plumb, G. W., & Wright, D. J. (1987). Resolution of pea legumin subunits by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, *160*(1), 202–210.
- Badley, R. A., Atkinson, D., Hauser, H., Oldani, D., Green, J. P., & Stubbs, J. M. (1975). The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, *412*(2), 214–228.
- Bandura, D. R., Baranov, V. I., & Tanner, S. D. (2002). Detection of ultratrace phosphorus and sulfur by quadrupole ICPMS with dynamic reaction cell. *Analytical Chemistry*, *74*(7), 1497–1502.
- Baniel, A., Bertrand, D., Lelion, A., & Gueguen, J. (1998). Variability in Protein Composition of Pea Seed Studied by FPLC and Multidimensional Analysis. *Crop Science*, *38*, 1568–1575.
- Barać, M. B., Stanojević, S. P., Jovanović, S. T., & Pešić, M. B. (2004). Soy protein modification: A review. *Acta Periodica Technologica*, (35), 3–16.
- Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M., Stanojevic, S., Zilic, S., Macej, O., & Ristic, N. (2010). Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(12), 4973–4990.
- Barciszewski, J., Szymański, M., & Haertlé, T. (2000). Minireview: analysis of rape seed napin structure and potential roles of the storage protein. *Journal of Protein Chemistry*, *19*(4), 249–254.
- Bengoechea, C., Peinado, I., & McClements, D. J. (2011). Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: Factors affecting particle characteristics. *Food Hydrocolloids*, *25*(5), 1354–1360.
- Berk, Z. (1993). *Technologie de production de farines alimentaires et de produits protéiques issus du soja*. Bulletin des services agricoles de la FAO, Food & Agriculture Org.
- Bérot, S., Compoin, J. P., Larré, C., Malabat, C., & Guéguen, J. (2005). Large scale purification of rapeseed proteins (*Brassica napus* L.). *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *818*(1), 35–42.
- Biesheuvel, P. M., Lindhoud, S., Vries, R. De, & Stuart, M. a C. (2006). Phase Behavior of Mixtures of Oppositely Charged Nanoparticles : Heterogeneous Poisson - Boltzmann Cell Model Applied to Lysozyme and Succinylated Lysozyme, (10), 1291–1300.
- Borman, A., & Wood, T. R. (1946). The role of arginine in growth with some observations on the effects of argininic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, *166*(2), 585–594.

- Bos, C., Airinei, G., Mariotti, F., Benamouzig, R., Bérot, S., Evrard, J., ... Gaudichon, C. (2007). The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 594–600.
- Bouhallab, S., & Croguennec, T. (2014). Spontaneous Assembly and Induced Aggregation of Food Proteins. *Advances in Polymer Science*, 256, 67–102.
- Bouhallab, S., Henry, G., Caussin, F., Croguennec, T., Fauquant, J., & Mollé, D. (2004). Copper-catalyzed formation of disulfide-linked dimer of bovine β -lactoglobulin. *Dairy Science and Technology*, 84(6), 517–525.
- Boulter, D. (1984). Cloning of Pea Storage Protein Genes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 304(1120), 323–332.
- Boulter, D. A. (1977). Quality problems in “Protein Plants” with special attention paid to the proteins of legumes. In *Protein Quality From Leguminous Crops* (pp. 11–47). Luxembourg: Commission of the European Communities.
- Bowers, K., Lottridge, J., Helliwell, S. B., Goldthwaite, L. M., Luzio, J. P., & Stevens, T. H. (2004). Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic*, 5(3), 194–210.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414–431.
- Braudo, E. E., & Antonov, Y. A. (1993). Non-coulombic complex formation of proteins as a structure forming factor in food systems. In K. D. Schwenke & R. Mothes (Eds.), *Proteins, Structure and Functionality* (p. 210). Weinheim: VCH.
- Bromley, E. H. C., Krebs, M. R. H., & Donald, A. M. (2006). Mechanisms of structure formation in particulate gels of β -lactoglobulin formed near the isoelectric point. *The European Physical Journal E*, 21(2), 145–152.
- Bromley, E. H., Krebs, M. R. H., & Donald, A. M. (2005). Aggregation across the length-scales in beta-lactoglobulin. *Faraday Discussions*, 128, 13–27.
- Bungenberg de Jong, H. G. (1949). *Colloid Science II*. (H. R. Kruyt, Ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Byler, M. D., Farrell, H. M., & Susi, H. (1988). Raman Spectroscopic Study of Casein Structure. *Journal of Dairy Science*, 71(10), 2622–2629.

C

- Campbell, T., & Campbell, T. C. (2005). *The China Study*. Dallas: BenBella Books.
- Casey, R. (1979). Immunoaffinity chromatography as a means of purifying legumin from *Pisum* (pea) seeds. *The Biochemical Journal*, *177*(2), 509–20.
- Casey, R., March, J. F., & Sanger, E. (1981). N-terminal amino acid sequence of β -subunits of legumin from *Pisum sativum*. *Phytochemistry*, *20*(1), 161–163.
- Casey, R., Sharman, J. E., Wright, D. J., Bacon, J. R., & Guldager, P. (1982). Quantitative variability in *Pisum* seed globulins: its assessment and significance. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, *31*(4), 333–346.
- Cayot, P., & Laurent, D. (1998). *Structures et technofonctions des protéines du lait*. (A. Recherches, Ed.) (Tec & Doc). Paris: Lavoisier.
- Chambers, S. J., Carr, H. J., & Lambert, N. (1990). An investigation of the dissociation and denaturation of legumin by salts using laser light scattering and circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1037*(1), 66–72.
- Chang, J.-Y., & Li, L. (2002). The unfolding mechanism and the disulfide structures of denatured lysozyme. *FEBS Letters*, *511*(1-3), 73–78.
- Chaumet, J.-M., Delpeuch, F., Dorin, B., Gherzi, G., Bernard, H., Tristan, L. C., ... Treyer, S. (2009). *Agrimonde: Agricultures et alimentations du monde en 2050: scénarios et défis pour un développement durable*.
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L., & Lorient, D. (1985). *Food proteins. Biochemistry, functional properties, nutritional value, chemical modifications*. Paris: Lavoisier.
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, *75*, 333–66.
- Clarke, A. W., Arnsperg, E. C., Mithieux, S. M., Korkmaz, E., Braet, F., & Weiss, A. S. (2006). Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres. *Biochemistry*, *45*(33), 9989–96.
- Combris, P., & Martin, P. (2013). *Evolution de la consommation des protéines dans le monde (1961-2009) : La croissance de la consommation des protéines animales peut-elle se généraliser ?* Paris.
- Croguennec, T., O’Kennedy, B. T., & Mehra, R. (2004). Heat-induced denaturation/aggregation of β -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, *14*(5), 399–409.

Crouch, M. L., Tenbarge, K. M., Simon, A. E., & Ferl, R. (1983). cDNA clones for Brassica napus seed storage proteins: evidence from nucleotide sequence analysis that both subunits of napin are cleaved from a precursor polypeptide. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 2(3), 273–83.

Croy, R., Gatehouse, J., Tyler, M., & Boulter, D. (1980). The Purification and characterization of a 3RD storage protein (convicilin) from the seeds of pea (*pisum sativum l.*). *Biochemical Journal*, 191(2), 509–516.

D

Dauphas, S. (2005). Propriétés interfaciales d'assemblages protéique et lipoprotéique. Université de Nantes.

Dauphas, S., Mouhous-Riou, N., Metro, B., MacKie, a. R., Wilde, P. J., Anton, M., & Riaublanc, A. (2005). The supramolecular organisation of β -casein: Effect on interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 387–393.

Davey, R. A., & Dudman, W. F. (1979). The carbonyl of storage glycoproteins from seed of *pisum sativum* : characterization and distribution of component polypeptides. *Austrian Journal of Plant Physiology*, 6, 435–447.

De Kruif, C., & Grinberg, V. (2002). Micellisation of β -casein. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 210(2-3), 183–190.

De la Fuente, M. A., Singh, H., & Hemar, Y. (2002). Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 13(8), 262–274.

De Roos, A. L., Walstra, P., & Geurts, T. J. (1998). The association of lysozyme with casein. *International Dairy Journal*, 8(4), 319–324.

Derbyshire, E., Wright, D. J., & Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, 15(1), 3–24.

Desfougères, Y., Croguennec, T., Lechevalier, V., Bouhallab, S., & Nau, F. (2010). Charge and size drive spontaneous self-assembly of oppositely charged globular proteins into microspheres. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 114(12), 4138–44.

Desfougères, Y., Lechevalier, V., Pezennec, S., Artzner, F., & Nau, F. (2008). Dry-heating makes hen egg white lysozyme an efficient foaming agent and enables its bulk aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 5120–8.

Diamond, R. (1974). Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 82(3), 371–91. Retrieved from

Domoney, C., & Casey, R. (1985). Measurement of gene number for seed storage proteins in *Pisum*. *Nucleic Acids Research*, 13(3), 687–699. 687

Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y., & Boury, F. (2004). Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 232(2-3), 239–247.

E

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). (2013). Scientific Opinion on the safety of “rapeseed protein isolate” as a Novel Food ingredient. *EFSA Journal* 2013, 11(10), 3420-3423.

Evans, D. F., & Wennerstrom, H. (1994). *The Colloidal Domain : Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*. New York: VCH Publishers.

F

Faizullin, D. A., Konnova, T. A., Haertle, T., & Zuev, Y. F. (2013). Self-assembly and secondary structure of beta-casein. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39(4), 366–372.

FAO/WHO/ONU. (1985). *Energy and protein requirements*. Genève.

FAO/WHO/ONU. (2007). *Protein and amino acid requirements in human nutrition*. Genève.

FAOSTAT. (2013). Production-Emission/Culture. Récupéré le 11/04/2014 sur <http://faostat3.fao.org/home/E>

FAOSTAT. (2015). Food Balance. Récupéré le 7 juillet 2015 sur http://faostat3.fao.org/browse/FB/*/E

Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., ... Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674.

- Farrell Jr, H. M., Cooke, P. H., Wickham, E. D., Piotrowski, E. G., & Hoagland, P. D. (2003). Environmental Influences on Bovine κ -Casein: Reduction and Conversion to Fibrillar (Amyloid) Structures. *Journal of Protein Chemistry*, 22(3), 259–273.
- Feillet, P. (2014, September). Les protéines de l'avenir. *Vigie Alimentation - Les Futuribles*, 1–24.
- FNB/IOM. (2002). Protein and amino acids. In FNB/IOM (Ed.), *Dietary reference intakes for energy, carbohydrates, fiber, fat, protein and amino acids (macronutrients)*. (pp. 1–143). Washington D.C.: The National Academies Press.
- Folawiyo, Y. L., & Apenten, R. K. O. (1997). The effect of heat- and acid-treatment on the structure of rapeseed albumin (napin). *Food Chemistry*, 58(3), 237–243.
- FranceAgrimer. (2014). Publications FranceAfrimer. Récupéré le 13/08/2015 sur <http://www.franceagrimer.fr/fam/filiere-lait/En-un-clic/Publications>
- Frost & Sullivan. (2014). Strategic Insight into the Global Plant Protein Ingredients Market.

G

- Gatehouse, J. A., Croy, R. R. D., Boulter, D., & Shewry, P. R. (1984). The synthesis and structure of pea storage proteins. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1(4), 287–314.
- Gatehouse, J. A., Croy, R. R. D., McIntosh, R., Paul, C., Boulter, D., & Bond, D. A. (1980). Quantitative and qualitative variation in the storage proteins of material from the EEC joint field bean test. (pp. 173–190). Martinus Nijhoff. World crops: production, utilization and description, volume 3.
- Gatehouse, J. A., Croy, R. R. D., Morton, H., Tyler, M., & Boulter, D. (1981). Characterisation and subunit structures of the vicilin storage proteins of pea (*Pisum Sativum* L.). *European Journal of Biochemistry*, 118, 627–633.
- Gatehouse, J. A., Lycett, G. W., Croy, R. R., & Boulter, D. (1982). The post-translational proteolysis of the subunits of vicilin from pea (*Pisum sativum* L.). *The Biochemical Journal*, 207(3), 629–632.
- Gehrig, P. M., & Biemann, K. (1996). Assignment of the disulfide bonds in napin, a seed storage protein from *Brassica napus*, using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Peptide Research*, 9(6), 308–314.
- Gell, D., & Jackson, S. P. (1999). Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Research*, 27(17), 3494–3502.

- Goers, J., Permyakov, S. E., Permyakov, E. A., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2002). Conformational prerequisites for alpha-lactalbumin fibrillation. *Biochemistry*, *41*(41), 12546–12551.
- Grant, D. R., & Lawrence, J. M.. (1964). Effects of sodium dodecylsulfate and other dissociating reagents on the globulins of pea. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *108*, 552–561.
- Grigg, D. (1995). The pattern of world protein consumption. *Geoforum*, *26*(1), 1–17.
- Gueguen, J. (1989). Relation between conformation and surface hydrophobicity of pea (*Pisum sativum* L.) globulins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *37*(5), 1236–1241.
- Gueguen, J., & Barbot, J. (1988). Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisum sativum* L.) protein composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *42*(3), 209–224.
- Gueguen, J., Chevalier, M., And, J. B., & Schaeffer, F. (1988). Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic strength. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *44*(2), 167–182.
- Gueguen, J., Vu, A. T., & Schaeffer, F. (1984). Large-scale purification and characterisation of pea globulins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *35*(9), 1024–1033.
- Gwiazda, S., Schwenke, K. D., & Rutkowski, A. (1980). Isolation and partial characterization of proteins from pea (*Pisum sativum* L.). *Food / Nahrung*, *24*(10), 939–950.

H

- Hambardzumyan, A., Aguié-Béghin, V., Daoud, M., & Douillard, R. (2004). β -Casein and Symmetrical Triblock Copolymer (PEO–PPO–PEO and PPO–PEO–PPO) Surface Properties at the Air–Water Interface. *Langmuir*, *20*(3), 756–763.
- Hanczakowska, E., & Świątkiewicz, M. (2014). Legume Seeds and Rapeseed Press Cake as Replacers of Soybean Meal in Feed for Fattening Pigs. *Annals of Animal Science*, *14*(4), 921–934.
- Harrington, D. J., Adachi, K., & Royer, W. E. (1997). The high resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S. *Journal of Molecular Biology*, *272*(3), 398–407.
- Hoekstra, A. Y., & Chapagain, A. K. (2007). Water footprints of nations: Water use by people as a function of their consumption pattern. *Water Resource Management*, *21*, 32–48.

Horne, D. S. (1998). Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *International Dairy Journal*, 8(3), 171–177.

Howard, S. B., Twigg, P. J., Baird, J. K., & Meehan, E. J. (1988). The solubility of hen egg-white lysozyme. *Journal of Crystal Growth*, 90(1-3), 94–104.

Howell, N. K., Yeboah, N. A., & Lewis, D. F. V. (1995). Studies on the electrostatic interactions of lysozyme with α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *International Journal of Food Science & Technology*, 30(6), 813–824.

Hu, J., Yu, S., & Yao, P. (2007). Stable amphoteric nanogels made of ovalbumin and ovotransferrin via self-assembly. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 23(11), 6358–6364.

J

Johnson, P., & Richards, E. G. (1962). The study of legumin by depolarization of fluorescence and other physicochemical methods. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 97(2), 260–276.

K

Kajiwara, K., Niki, R., Urakawa, H., Hiragi, Y., Donkai, N., & Nagura, M. (1988). Micellar structure of beta-casein observed by small-angle X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 955(2), 128–34.

Kimura, A., Takako, F., Meili, Z., Shiori, M., Maruyama, N., & Utsumi, S. (2008). Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fava bean, cowpea, and French bean with those of soybean-french bean 7S globulin exhibits excellent properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10273–10279.

Kong, C. Y., & Muthukumar, M. (1998). Monte Carlo study of adsorption of a polyelectrolyte onto charged surfaces. *The Journal of Chemical Physics*, 109(4), 1522.

Koning, M. M., & Visser, H. (1992). Protein Interactions, An Overview. In H. Visser (Ed.), *Protein Interactions* (pp. 1–24). Weinheim: VCH.

Kortemme, T., & Baker, D. (2002). A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14116–14121.

- Koshiyama, I. (1968). Chromatographic and Sedimentation Behavior of a Purified 7S Protein in Soybean Globulins. *Cereal Chemistry*, 45, 405–412.
- Koshiyama, I. (1972). Purification and physico-chemical properties of 11S globulin in soybean seeds. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 4(3), 167–176.
- Koshiyama, I., & Fukushima, D. (1976). Identification of the 7S globulin with β -conglycinin in soybean seeds. *Phytochemistry*, 15(1), 157–159.
- Koyoro, H., & Powers, J. R. (1987). Functional Properties of Pea Globulin Fractions. *Journal of Cereal Chemistry*, 64(2), 97–101.
- Krause, J. P., & Schwenke, K. D. (2001). Behaviour of a protein isolate from rapeseed (*Brassica napus*) and its main protein components - globulin and albumin - at air/solution and solid interfaces, and in emulsions. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 21(1-3), 29–36.
- Krebs, M. R. H., Devlin, G. L., & Donald, A. M. (2007). Protein particulates: another generic form of protein aggregation? *Biophysical Journal*, 92(4), 1336–42.
- Krebs, M. R., Wilkins, D. K., Chung, E. W., Pitkeathly, M. C., Chamberlain, A. K., Zurdo, J., ... Dobson, C. M. (2000a). Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the beta-domain. *Journal of Molecular Biology*, 300(3), 541–549.
- Krzyzaniak, A., Burova, T., Haertlé, T., & Barciszewski, J. (1998). The structure and properties of Napin-seed storage protein from rape (*Brassica napus* L.). *Food / Nahrung*, 42(03-04), 201–204.
- Kumosinski, T. F., Brown, E. M., & Farrell, H. M. (1993). Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy-minimized beta-casein structure. *Journal of Dairy Science*, 76(4), 931–945.

L

- Lambert, N., Plumb, G. W., & Wright, D. J. (1987). Application of high-performance liquid chromatography to the assessment of subunit heterogeneity in plant 11S storage globulins. *Journal of Chromatography*, 402, 159–72.
- Lechevalier, V., Croguennec, T., Pezennec, S., Guerindubard, C., Pasco, M., & Nau, F. (2005). Evidence for synergy in the denaturation at the air?water interface of ovalbumin, ovotransferrin and lysozyme in ternary mixture. *Food Chemistry*, 92(1), 79–87.

- Lechevalier, V., Nau, F., & Anton, M. (2007). De l'oeuf aux ovoproduits. In *Science des aliments: Technologie des produits alimentaires* (TEC & DOC, pp. 107–133). Paris.
- Leclerc, E., & Calmettes, P. (1997a). Interactions in micellar solutions of β -casein. *Physica B: Condensed Matter*, 234-236, 207–209.
- Leclerc, E., & Calmettes, P. (1997b). Structure of β -casein micelles. *Physica B: Condensed Matter*, 241-243, 1141–1143.
- Leonil, J., Henry, G., Jouanneau, D., Delage, M.-M., Forge, V., & Putaux, J.-L. (2008). Kinetics of fibril formation of bovine kappa-casein indicate a conformational rearrangement as a critical step in the process. *Journal of Molecular Biology*, 381(5), 1267–80.

M

- Majhi, P. R., Ganta, R. R., Vanam, R. P., Seyrek, E., Giger, K., & Dubin, P. L. (2006). Electrostatically driven protein aggregation: beta-lactoglobulin at low ionic strength. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 22(22), 9150–9159.
- Maninder, K., Sandhu, K. S., & Singh, N. (2007). Comparative study of the functional, thermal and pasting properties of flours from different field pea (*Pisum sativum* L.) and pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 104(1), 259–267.
- Marcone, M. F., Bondi, M.-C., & Yada, R. Y. (1994). Isolation of Soybean 11S Globulin by Isoelectric Precipitation and Sephacryl S-300 Gel Filtration Chromatography: A New Purification Technique. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(2), 413–415.
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Yada, R. Y. (1998a). Immunochemical examination of the surface physico-chemical properties of various dicotyledonous and monocotyledonous globulin seed storage proteins. *Food Chemistry*, 63(1), 85–95.
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Yada, R. Y. (1998b). Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. *Food Chemistry*, 63(2), 265–274.
- Martin, A. (2000). *Apports nutritionnels conseillés pour la population française. 3ème édition.* (T. & Doc, Ed.). Paris.
- Martin, A. ., Bos, M. ., & van Vliet, T. (2002). Interfacial rheological properties and conformational aspects of soy glycinin at the air/water interface. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 63–71.

- Maruyama, N., Mohamed Salleh, M. R., Takahashi, K., Yagasaki, K., Goto, H., Hontani, N., ... Utsumi, S. (2002). Structure–Physicochemical Function Relationships of Soybean β -Conglycinin Heterotrimers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4323–4326.
- Matsudomi, N., Yamamura, Y., & Kobayashi, K. (1987). Aggregation between Lysozyme and Heat-denatured Ovalbumin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(7), 1811–1817.
- Matta, N. K., Gatehouse, J. A., & Boulter, D. (1981). Molecular and Subunit Heterogeneity of Legumin of *Pisum sativum* L. (Garden Pea)— A Multi-Dimensional Gel Electrophoretic Study. *Journal of Experimental Botany*, 32(6), 1295–1307.
- McClements, D. J. (1999). *Food Emulsions : Principles, Practice and Techniques*. Londres: CRC Press.
- McKenzie, H. A., & White, F. H. (1991). Lysozyme and alpha-lactalbumin: structure, function, and interrelationships. *Advances in Protein Chemistry*, 41, 173–315.
- McSwiney, M., Singh, H., & Campanella, O. H. (1994). Thermal aggregation and gelation of bovine β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 8(5), 441–453.
- Mela, I., Aumaitre, E., Williamson, A.-M., & Yakubov, G. E. (2010). Charge reversal by salt-induced aggregation in aqueous lactoferrin solutions. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 78(1), 53–60.
- Meunier, J. C., & Fouques, D. (1997). Les protéines animales. In *Dossier scientifique de l'IFN n°9: Les protéines: Tome 2: Caractéristiques des différentes sources de protéines alimentaires* (pp. 13–18).
- Mezdour, S., Boyaval, P., & Korolczuk, J. (2008). Solubility of α S1 - , β - and κ -casein in water-ethanol solutions, 88, 313–325.
- Mezzenga, R., & Fischer, P. (2013). The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. *Reports on Progress in Physics. Physical Society (Great Britain)*, 76(4), 46601-46643.
- Mezzenga, R., Schurtenberger, P., Burbidge, A., & Michel, M. (2005). Understanding foods as soft materials. *Nature Materials*, 4(10), 729–740.
- Mikheeva, L. M., Grinberg, N. V., Grinberg, V. Y., Khokhlov, A. R., & de Kruif, C. G. (2003). Thermodynamics of Micellization of Bovine β -Casein Studied by High-Sensitivity Differential Scanning Calorimetry. *Langmuir*, 19(7), 2913–2921.
- Milligan, R. A. (1996). Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 21–26.

- Mintel. (2015). *The Protein Report: Meat Alternatives*.
- Moitzi, C., Portnaya, I., Glatter, O., Ramon, O., & Danino, D. (2008). Effect of temperature on self-assembly of bovine beta-casein above and below isoelectric pH. Structural analysis by cryogenic-transmission electron microscopy and small-angle X-ray scattering. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 24(7), 3020–3029.
- Monsalve, R. I., & Rodriguez, R. (1990). Purification and Characterization of Proteins from the 2S Fraction from Seeds of the Brassicaceae Family. *Journal of Experimental Botany*, 41(1), 89–94.
- Mossa, S., Sciortino, F., Tartaglia, P., & Zaccarelli, E. (2004). Ground-state clusters for short-range attractive and long-range repulsive potentials. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 20(24), 10756–10763.
- Müntz, K. (1989). Intracellular Protein Sorting and the Formation of Protein Reserves in Storage Tissue Cells of Plant Seeds. *Biochimie Und Physiologie Der Pflanzen*, 185(5-6), 315–335.
- Muren, E., Ek, B., & Rask, L. (1995). Processing of the 2S Storage Protein Pronapin in *Brassica napus* and in Transformed Tobacco. *European Journal of Biochemistry*, 227(1-2), 316–321.

N

- Netz, R. R., & Joanny, J.-F. (1999). Adsorption of Semiflexible Polyelectrolytes on Charged Planar Surfaces: Charge Compensation, Charge Reversal, and Multilayer Formation. *Macromolecules*, 32(26), 9013–9025.
- Newbigin, E. J., Delumen, B. O., Chandler, P. M., Gould, A., Blagrove, R. J., March, J. F., ... Higgins, T. J. (1990). Pea convicilin: structure and primary sequence of the protein and expression of a gene in the seeds of transgenic tobacco. *Planta*, 180(4), 461–470.
- Nielsen, N. C. (1985). The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(12), 1680–1686.
- Nigen, M. (2008). *Interactions et assemblages entre l'α-Lactalbumine et le Lysozyme : mécanismes, structures et stabilité*. Agrocampus Ouest.
- Nigen, M., Croguennec, T., Renard, D., & Bouhallab, S. (2007). Temperature Affects the Supramolecular Structures Resulting from α-Lactalbumin–Lysozyme Interaction. *Biochemistry*, 46(5), 1248–1255.

Nigen, M., Gaillard, C., Croguennec, T., Madec, M. N., & Bouhallab, S. (2010). Dynamic and supramolecular organisation of α -lactalbumin/lysozyme microspheres: A microscopic study. *Biophysical Chemistry*, 146(1), 30–35.

Nocek, J. M., Zhou, J. S., De Forest, S., Priyadarshy, S., Beratan, D. N., Onuchic, J. N., & Hoffman, B. M. (1996). Theory and Practice of Electron Transfer within Protein–Protein Complexes: Application to the Multidomain Binding of Cytochrome c by Cytochrome c Peroxidase. *Chemical Reviews*, 96(7), 2459–2490.

Nosenko, T., Kot, T., & Kichshenko, V. (2014). Rape Seeds as a Source of Feed and Food Proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(2), 109–114.

O

O’Connell, J. E., Grinberg, V. Y., & de Kruif, C. G. (2003). Association behavior of beta-casein. *Journal of Colloid and Interface Science*, 258(1), 33–39.

O’Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & van Boekel, M. A. J. S. (2004a). Characterization of pea vicilin. 1. Denoting convicilin as the alpha-subunit of the Pisum vicilin family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3141–3148.

O’Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & van Boekel, M. A. J. S. (2004b). Heat-induced gelation of pea legumin: comparison with soybean glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5071–5078.

Okamura-Ikeda, K., Kameoka, N., Fujiwara, K., & Motokawa, Y. (2003). Probing the H-protein-induced conformational change and the function of the N-terminal region of Escherichia coli T-protein of the glycine cleavage system by limited proteolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10067–10072.

ONU. (2004). *World Population To 2300*. New York

Orlich, M. J., Singh, P. N., Sabaté, J., Jaceldo-Siegl, K., Fan, J., Knutsen, S., ... Fraser, G. E. (2013). Vegetarian dietary patterns and mortality in Adventist Health Study 2. *JAMA Internal Medicine*, 173(13), 1230–1238.

Osborne, T. (1907). *The proteins of wheat kernel*. Washington: Carnegie Institute Publication.

Osborne, T. B., & Campbell, G. F. (1898). Proteins of the soy bean. 1 (Glycine hispida.). *Journal of the American Chemical Society*, 20(6), 419–428.

P

- Pan, X., Yu, S., Yao, P., & Shao, Z. (2007). Self-assembly of β -casein and lysozyme. *Journal of Colloid and Interface Science*, 316(2), 405–412.
- Pedersen, J. B., Fojan, P., Sorensen, J., & Petersen, S. B. (2006). Towards control of aggregational behaviour of alpha-lactalbumin at acidic pH. *Journal of Fluorescence*, 16(4), 611–621.
- Peng, I. C., Quass, D. W., Dayton, W. R., & Allen, C. E. (1984). Physico chemical properties of soybean 11S globulin-A Review. *Cereal Chemistry*, 61(6), 480–490.
- Périsse, J., Sizaret, F., & François, P. (1969). Effet du revenu sur la structure de la ration alimentaire. *Bulletin de Nutrition FAO*, 7(6), 1–10.
- Petrucelli, S., & Añón, M. C. (1996). pH-Induced Modifications in the Thermal Stability of Soybean Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 3005–3009
- Plietz, P., Damaschun, G., Muller, J. J., & Schwenke, K.-D. (1983). The Structure of 11-S Globulins from Sunflower and Rape Seed. A Small-Angle X-Ray Scattering Study. *European Journal of Biochemistry*, 130(2), 315–320.
- Pogodina, N. V., & Tsvetkov, N. V. (1997). Structure and Dynamics of the Polyelectrolyte Complex Formation †. *Macromolecules*, 30(17), 4897–4904.
- Powrie, W. D., & Nakai, S. (1986). The chemistry of egg and egg products. In *Egg Science and technology* (3d ed., pp. 97–139). Wesport: AVI Publishing Co.
- Prat, A. (2009). *Mise au point d'un protocole de purification à l'échelle pilote des protéines de 7S et 11S de soja*. IUT Chimie Rennes.
- Proctor, V. A., & Cunningham, F. E. (1988). The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 26(4), 359–395.

Q

- Qi, M., Hettiarachy, N. S., & Kalapathy, U. (1997). Solubility and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolates Modified by Pancreatin. *Journal of Food Science*, 62(6), 1110–1115.

Quillien, L., & Guéguen, J. (1997). Les protéines végétales. In *Dossier scientifique de l'IFN n°9: Les protéines: Tome 2: Caractéristiques des différentes sources de protéines alimentaires* (pp. 5–13).

R

Raab, B., Leman, H., Schwenke, K. D., & Kozłowska, H. (1992). Comparative study of the protein patterns of some rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties by means of polyacrylamide gel electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Food / Nahrung*, *36*(3), 239–247.

Rabiller-Baudry, M., Chaufer, B., Lucas, D., & Michel, F. (2001). Ultrafiltration of mixed protein solutions of lysozyme and lactoferrin: role of modified inorganic membranes and ionic strength on the selectivity. *Journal of Membrane Science*, *184*(1), 137–148.

Ratanyake, W. S., Geera, B., & Rybak, D. A. (2012). Effects of egg and egg replacers on yellow cake product quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, *36*(1), 21–29.

Reeds, P. (2001). The biology of amino acid requirements: what do they mean and can we measure them? *The Proceedings of the Nutrition Society*, *60*(1), 13–14.

Renkema, J. M. ., Lakemond, C. M. ., de Jongh, H. H. ., Gruppen, H., & van Vliet, T. (2000). The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. *Journal of Biotechnology*, *79*(3), 223–230.

Ribadeau-Dumas, B., & Grappin, R. (1989). Milk protein analysis. *Le Lait*, *69*(5), 357–416.

Rickert, D. A., Johnson, L. A., & Murphy, P. A. (2006). Functional Properties of Improved Glycinin and β -conglycinin Fractions. *Journal of Food Science*, *69*(4), FCT303–FCT311.

Rico, M., Bruix, M., González, C., Monsalve, R. I., & Rodríguez, R. (1996). ¹H NMR assignment and global fold of napin Bn1b, a representative 2S albumin seed protein. *Biochemistry*, *35*(49), 15672–15682.

Rollema, H. S. (1992). Casein association and micelle formation. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry I, Proteins* (pp. 111–140). Londres: Elsevier Applied Science.

Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, *10 Suppl*, S10–7.

S

- Salvatore, D., Croguennec, T., Bouhallab, S., Forge, V., & Nicolai, T. (2011). Kinetics and structure during self-assembly of oppositely charged proteins in aqueous solution. *Biomacromolecules*, *12*(5), 1920–1926.
- Samoto, M., Maebuchi, M., Miyazaki, C., Kugitani, H., Kohno, M., Hirotsuka, M., & Kito, M. (2007). Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. *Food Chemistry*, *102*(1), 317–322.
- Santé, O. mondiale de la. (2003). *Rapport sur la santé dans le monde : 2003 : façonner l'avenir*.
- Schmidt, I. (2004). *Structures et propriétés tensioactives des assemblages complexes protéines basiques / pectines*. Université de Nantes.
- Schmidt, I., Renard, D., Rondeau, D., Richomme, P., Popineau, Y., & Axelos, M. A.-V. (2004). Detailed physicochemical characterization of the 2S storage protein from rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(19), 5995–6001.
- Schmitt, C., Bovay, C., Vuilliomenet, A.-M., Rouvet, M., & Bovetto, L. (2011). Influence of protein and mineral composition on the formation of whey protein heat-induced microgels. *Food Hydrocolloids*, *25*(4), 558–567.
- Schmitt, C., Bovay, C., Vuilliomenet, A.-M., Rouvet, M., Bovetto, L., Barbar, R., & Sanchez, C. (2009). Multiscale characterization of individualized beta-lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, *25*(14), 7899–909.
- Schokker, E. P., Singh, H., & Creamer, L. K. (2000). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, *10*(12), 843–853.
- Schroeder, H. E. (1982). Quantitative studies on the cotyledonary proteins in the genus *Pisum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *33*(7), 623–633.
- Schwenke, K. D. (1994). Rapeseed proteins. In B. J. F. Hudson (Ed.), *New and developing sources of food proteins* (Chapman & , pp. 281–306). Londres.
- Schwenke, K. D., Drescher, B., Zirwer, D., & Raab, B. (1988). Structural Studies on the Native and Chemically Modified Low-Molecular Mass Basic Storage Protein (Napin) from Rapeseed (*Brassica napus*L.). *Biochimie Und Physiologie Der Pflanzen*, *183*(2-3), 219–224.
- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, *53*(370), 947–958.

- Shih, P., & Kirsch, J. F. (1995). Design and structural analysis of an engineered thermostable chicken lysozyme. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 4(10), 2063–2072.
- Sidelmann, J. J., Gram, J., Jespersen, J., & Kluft, C. (2000). Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 26(6), 605–618.
- Soyfoods. (2014). Soy Products. Consulté le 10/06/2015 sur <http://www.soyfoods.org/soy-products/sales-and-trends>
- Stevens, L. (1991). Egg white proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 100(1), 1–9.
- Stone, A. K., Teymurova, A., Dang, Q., Abeysekara, S., Karalash, A., & Nickerson, M. T. (2014). Formation and functional attributes of electrostatic complexes involving napin protein isolate and anionic polysaccharides. *European Food Research and Technology*, 238(5), 773–780.
- Stradner, A., Sedgwick, H., Cardinaux, F., Poon, W. C. K., Egelhaaf, S. U., & Schurtenberger, P. (2004). Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature*, 432(7016), 492–495.
- Subirade, M., Gueguen, J., & Schwenke, K. D. (1992). Effect of dissociation and conformational changes on the surface behavior of pea legumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 152(2), 442–454.
- SugimotoYasushi, KamadaYoshiki, TokunagaYuhei, ShinoharaHiroshi, MatsumotoMitsuharu, KusakabeTakahiro, ... UedaTadashi. (2011). Aggregates with lysozyme and ovalbumin show features of amyloid-like fibrils. *Biochemistry and Cell Biology*.

T

- Takase, K. (1998). Reactions of denatured proteins with other cellular components to form insoluble aggregates and protection by lactoferrin. *FEBS Letters*, 441(2), 271–274.
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Hamon, P., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2015). Selective coacervation between lactoferrin and the two isoforms of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 48, 238–247.
- Thanh, V. H., & Shibasaki, K. (1976). Heterogeneity of beta-conglycinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 439(2), 326–338.
- Thanh, V., & Shibasaki, K. (1978). Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of .beta.-conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 692–695.

- Thapon, J. L., & Brule, G. (1986). Effets du pH et de la forme ionique sur l'affinité lysozyme-caséines. *Le Lait*, 66(1), 19–30.
- Thompson, M. P., Tarassuk, N. P., Jenness, R., Lillevik, H. A., Ashworth, U. S., & Rose, D. (1965). Nomenclature of the Proteins of Cow's Milk—Second Revision. *Journal of Dairy Science*, 48(2), 159–169.
- Thomson, J., Schroeder, H., & Dudman, W. (1978). Cotyledonary Storage Proteins in *Pisum sativum*. I. Molecular Heterogeneity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 5(3), 263.
- Thomson, J., Schroeder, H., & Tassie, A. (1980). Cotyledonary Storage Proteins in *Pisum sativum*. V. Further Studies on Molecular Heterogeneity in the Vicilin Series of Holoproteins. *Australian Journal of Plant Physiology*, 7(3), 271–282.
- Thorn, D. C., Meehan, S., Sunde, M., Rekas, A., Gras, S. L., MacPhee, C. E., ... Carver, J. A. (2005). Amyloid fibril formation by bovine milk kappa-casein and its inhibition by the molecular chaperones alphaS- and beta-casein. *Biochemistry*, 44(51), 17027–17036.
- Tiwari, A., Bindal, S., & Bohidar, H. B. (2009). Kinetics of protein-protein complex coacervation and biphasic release of salbutamol sulfate from coacervate matrix. *Biomacromolecules*, 10(1), 184–189.
- Tolstoguzov, V. B. (1997). Protein-polysaccharide interactions. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 171–198). New York: Marcel Dekker.
- Tzitzikas, E. N., Vincken, J.-P., de Groot, J., Gruppen, H., & Visser, R. G. F. (2006). Genetic variation in pea seed globulin composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 425–33.

U

- Ubbink, J., Burbidge, A., & Mezzenga, R. (2008). Food structure and functionality: a soft matter perspective. *Soft Matter*, 4(8), 1569–1581.
- Utsumi, S., Kohno, M., Mori, T., & Kito, M. (1987). An alternate cDNA encoding glycinin A1aBx subunit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(2), 210–214.
- Utsumi, S., Matsumura, Y., & Mori, T. (1997). Structure-Function Relationships of Soy Proteins. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 257–285). New York: Marcel Dekker.
- Uzzan, A., & Delfly, P. (1996). Utilisation des protéines végétales dans les industries alimentaires et diététiques. In T. & Doc (Ed.), *Protéines végétales* (pp. 612–639). Paris.

V

Van der Linden, E., & Venema, P. (2007). Self-assembly and aggregation of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4-5), 158–165.

W

Warner, R. C. (1954). Egg Proteins. In H. Neurath & K. Bailey (Eds.), *The Proteins Chemistry, Biological Activity, and Methods* (pp. 435–485). Elsevier.

Weijers, M., Barneveld, P. A., Cohen Stuart, M. A., & Visschers, R. W. (2003). Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 12(12), 2693–703.

Westhoek, H., Rood, T., van den Berg, M., Janse, J., Nijdam, D., Reudink, M., & Stehfest, E. (2011). *The proTein puzzle*. La Hague.

Wolf, W. J. (1970). Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(6), 969–976.

Wustneck, R., Kragel, J., Miller, R., Fainerman, V., Wilde, P., Sarker, D., & Clark, D. (1996). Dynamic surface tension and adsorption properties of beta-casein and beta-lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 10(4), 395–405.

Y

Yan, Y., Kizilay, E., Seeman, D., Flanagan, S., Dubin, P. L., Bovetto, L., ... Schmitt, C. (2013). Heteroprotein complex coacervation: bovine β -lactoglobulin and lactoferrin. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 29(50), 15614–15623.

Yu, S., Hu, J., Pan, X., Yao, P., & Jiang, M. (2006). Stable and pH-sensitive nanogels prepared by self-assembly of chitosan and ovalbumin. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 22(6), 2754–2459.

Z

Zhang, J., Qin, M., & Wang, W. (2005). Multiple folding mechanisms of protein ubiquitin. *Proteins*, 59(3), 565–579.

Zúñiga, R. N., Tolkach, A., Kulozik, U., & Aguilera, J. M. (2010). Kinetics of formation and physicochemical characterization of thermally-induced beta-lactoglobulin aggregates. *Journal of Food Science*, 75(5), E261–268.

Annexes

Annexes

Effets des facteurs principaux non montrés dans la partie [Criblage des couples protéines végétales/protéines animales en fonction des conditions physico-chimiques](#) :

Légumine/lysozyme

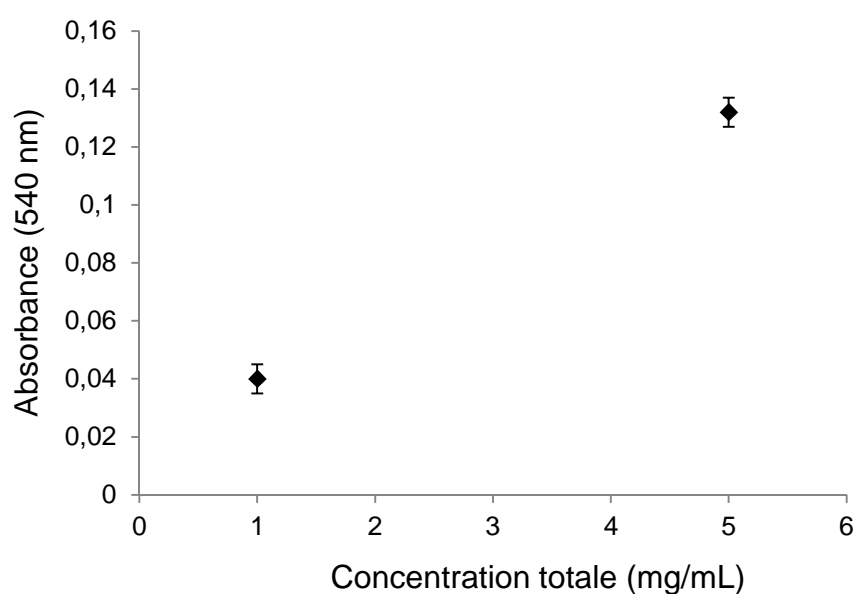


Figure 113 : Effets de la concentration totale en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange légumine/lysozyme calculées, en utilisant les valeurs du modèle. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

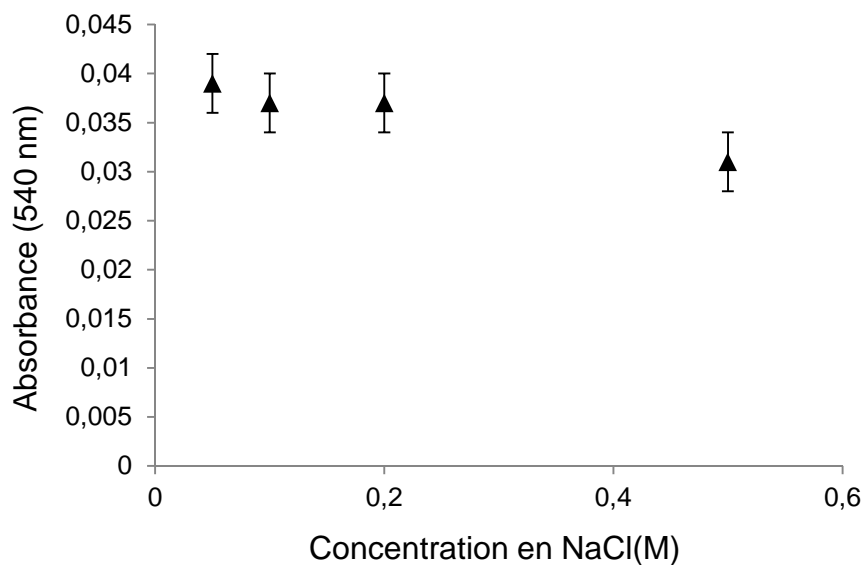
Conglycinine/lysozyme

Figure 114 : Effets de la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange conglycinine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

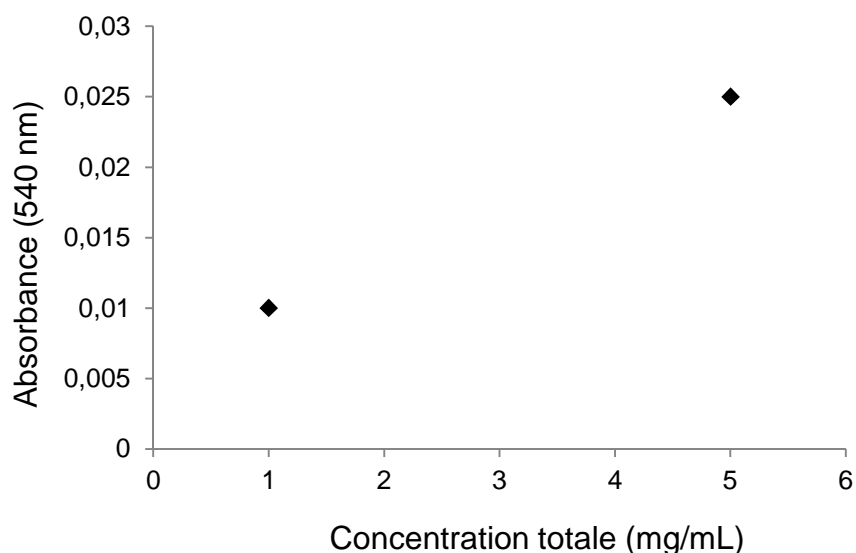
Napine/lysozyme

Figure 115 : Effets de la concentration totale en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange napine/lysozyme calculées, en utilisant les valeurs du modèle. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

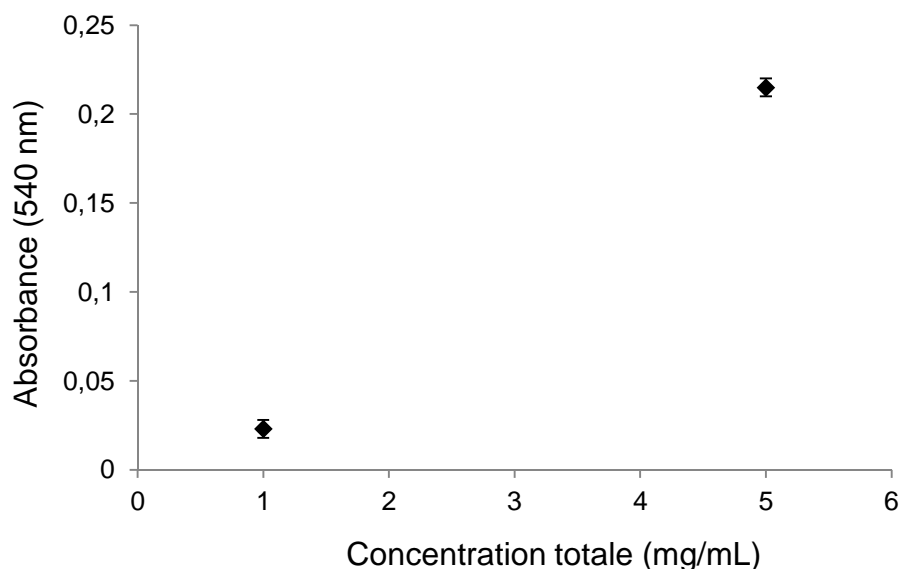
Viciline-conviciline/caséine β 

Figure 116 : Effets de la concentration totale en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-conviciline/caséine β calculées, en utilisant les valeurs du modèle. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

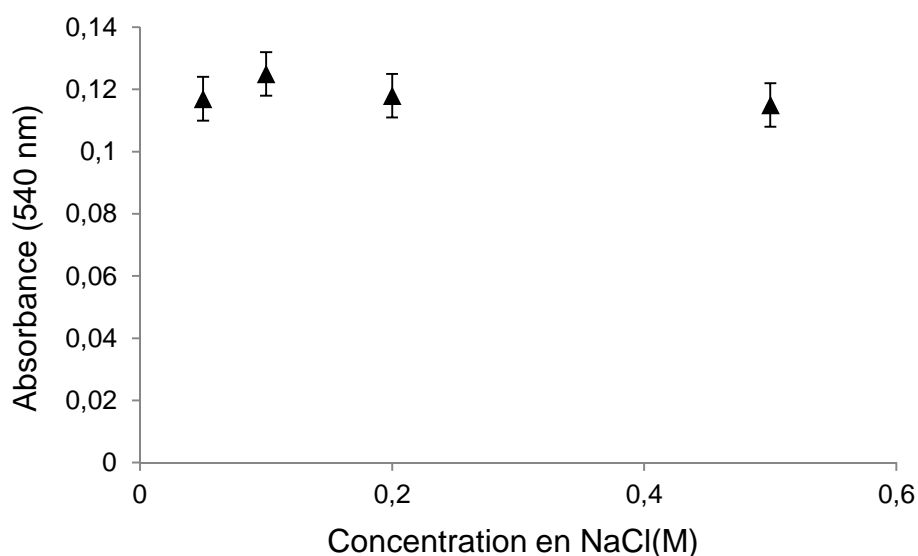


Figure 117 : Effets de la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange viciline-conviciline/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Légumine/caséine β

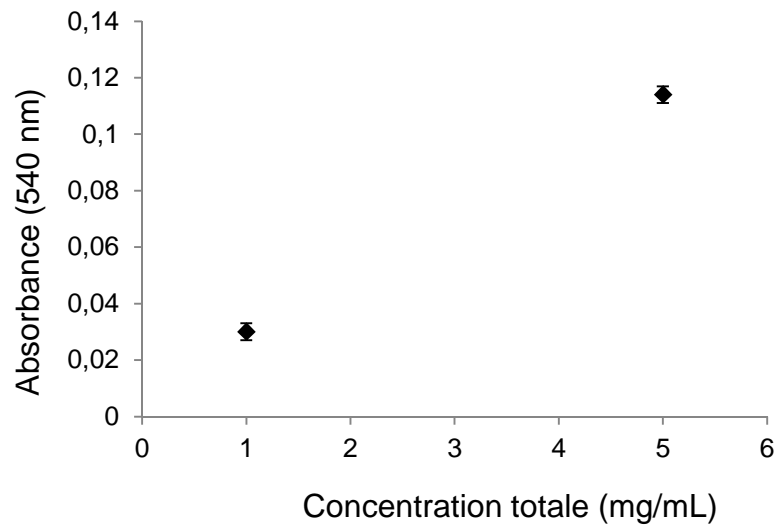


Figure 118 : Effets de la concentration totale en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange légumine/caséine β calculées, en utilisant les valeurs du modèle. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Glycine/caséine β

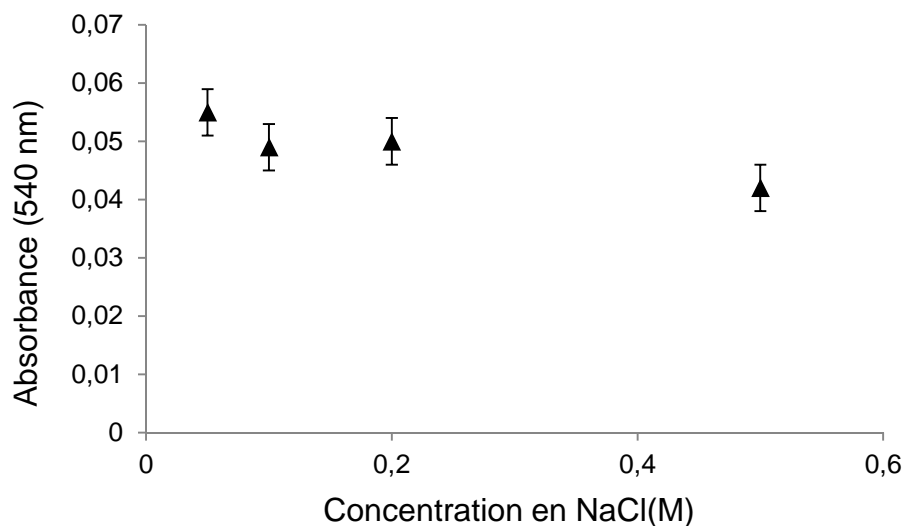


Figure 119 : Effets de la concentration en NaCl sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange glycine/lysozyme, calculées en utilisant les valeurs du modèle. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

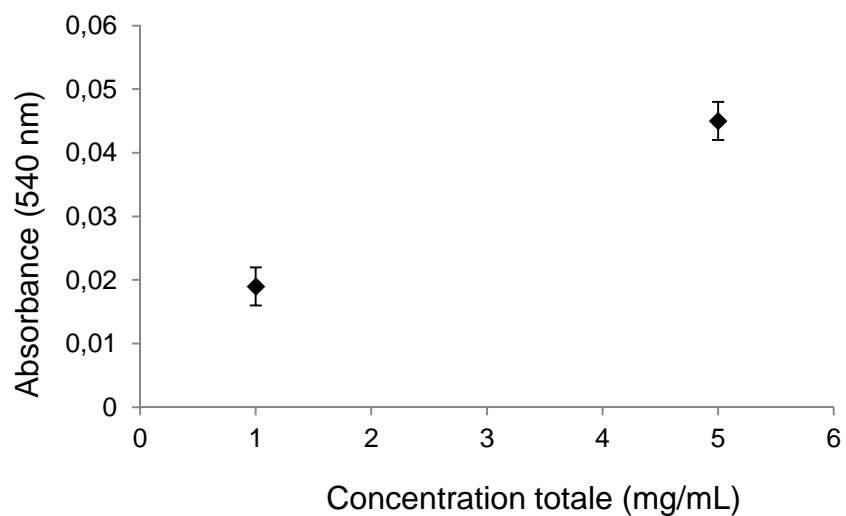
Napine/caséine β 

Figure 120 : Effets de la concentration totale en protéines sur les valeurs moyennes de turbidité du mélange napine/caséine β calculées, en utilisant les valeurs du modèle. Les barres d'incertitudes portées sur le graphique ne représentent pas la variance totale des expérimentations mais seulement celle qui n'est pas expliquée par le modèle.

Thèse de Doctorat

Jean-Marc SCHWARTZ

Criblage d'assemblages à base de protéines végétales et animales : influence des conditions physico-chimiques

Screening of protein assemblies formed between plant and animal proteins
according to physico-chemical conditions

Résumé

Dans un contexte de transitions nutritionnelles et de contraintes environnementales, l'utilisation d'ingrédients provenant de la matière végétale est de plus en plus recherchée. Ceci pousse les industriels de l'agro-alimentaire à accroître la part des protéines végétales dans leurs produits formulés. Cependant, la combinaison de protéines végétales et animales n'est pas facile à mettre en œuvre en raison de leurs propriétés physico-chimiques différentes. Des études en amont sont donc indispensables pour mieux comprendre les phénomènes associatifs et les interactions entre les protéines végétale et animale au sein des solutions aqueuses modèles.

Dix mélanges associant une protéine végétale (pois : viciline (7S) ou légumine (11S), soja : β -conglycinine (7S) ou glycinine (11S), colza : napine (2S)) à une protéine animale (caséine β ou lysozyme) ont été étudiés en fonction de la concentration totale en protéine, du ratio massique, du pH et de la concentration en sel, en combinant la turbidimétrie et la diffusion dynamique de la lumière. Ce criblage n'a pas mis en évidence d'interactions entre les protéines végétales et animales sauf dans le cas de l'association napine/caséine β . Pour ce couple de protéines, l'agrégation est dépendante du ratio massique, du pH, de la concentration en sel et de la température. Les agrégats napine/caséine β , engendrés par des interactions électrostatiques à basse température et renforcés par des interactions hydrophobes à haute température, ont la particularité d'être thermoréversibles et d'être désagrégés au bout de 24 heures suivant un mécanisme qui impliquerait le calcium.

Mots clés

pois, colza, napine, caséine β , agrégat, turbidimétrie, diffusion dynamique de la lumière, thermoréversible

Abstract

Due to nutritional transitions and environmental constraints, the interest for ingredients from plants is rapidly growing. This leads manufacturers to blend more and more plant proteins into their processed foods. However the combination of plant and animal proteins is not easy to implement due to their different physicochemical properties. Consequently, upstream studies are required to understand the associative phenomena taking place in aqueous solutions between plant and animal proteins.

Ten pairs of purified proteins combining one plant protein (from pea: vicilin (7S) or legumin (11S), from soybean: β -conglycinin (7S) or glycinin (11S) or from rapeseed: napin (2S)) with one animal protein (β -casein or lysozyme) were investigated by UV-visible spectroscopy and dynamic light scattering as a function of mass ratio, pH, sodium chloride concentration and temperature. Screening the interactions by turbidity measurements showed that plant proteins from soy and pea do not interact with β -casein or lysozyme while napin from rapeseed and β -casein associate together according to mass ratio, pH, sodium chloride concentration and temperature. Napin/ β -casein aggregates, created by electrostatic interactions at low temperature and reinforced by hydrophobic interactions at high temperature, are unexpectedly thermo-reversible and disintegrated after 24 hours, following a mechanism which might involve calcium.

Key Words

pea, rapeseed, napin, β -casein, aggregate, turbidimetry, dynamic light scattering, thermoreversible