Utilisation et fonctionnalisation de protéines pour la conception de nouvelles microsphères permettant la protection et le relargage contrôlé de vitamine A

Nicolas Joguet

▶ **To cite this version:**

Nicolas Joguet. Utilisation et fonctionnalisation de protéines pour la conception de nouvelles microsphères permettant la protection et le relargage contrôlé de vitamine A. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2014. Français. NNT : 2014LAROS037 . tel-02918084

HAL Id: tel-02918084
https://theses.hal.science/tel-02918084

Submitted on 20 Aug 2020

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

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

Université de la Rochelle

Ecole Doctorale

Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Laboratoire LIENSs (Littoral, Environnement et Société) UMR 7266

Equipe AMES (Approche Moléculaire Environnement Santé)

THESE CONFIDENTIELLE

Présentée par :

Nicolas JOGUET

Soutenance prévue le : 17 décembre 2014

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de la Rochelle

Discipline : Valorisation chimique et biologique des agro-ressources

Utilisation et fonctionnalisation de protéines pour la conception de nouvelles microsphères permettant la protection et le relargage contrôlé de vitamine A

Jury :

P. Buisson	Président Directeur Général d'INNOV'IA, Encadrant scientifique
P. Dhulster	Professeur, Université de Lille 1, Rapporteur
T. Maugard	Professeur, Université de la Rochelle, Directeur de thèse
J.M. Piot	Professeur, Université de la Rochelle
V. Schmitt	Directrice de Recherche CNRS, CRPP, Bordeaux, Rapporteur
J.E. Vendeville	Directeur Scientifique d'IDCAPS, Encadrant scientifique

A toute ma famille

A tous mes amis

A tous mes collègues

C'est à la fin que l'on comprend à quel point votre présence était nécessaire

A tous celles et ceux qui sont partis.

Comment leur en vouloir ?

Contributions Scientifiques :

En lien direct avec ce travail :

Conforto E., **Joguet N**., Buisson P., Vendeville J.E., Chaigneau C., Maugard T. 2014. A new methodology to analyze biopolymer capsule by Environmental Scanning Electron Microscopy. Materials Science and Engineering C, ***soumis***

[1]**Joguet N**., Maugard T, Vendeville J.E. 2013. Utilisation et fonctionnalisation de biopolymères pour l'élaboration de nouvelles microcapsules permettant la protection et la libération contrôlée d'actif. Colloque des Doctorants, 2013, La Rochelle, France

[1]**Joguet N**., Vendeville J.E., Maugard T. 2013. Use and functionalization of biopolymers for the elaboration of new microcapsules allowing drug protection and controlled release. Cosm'ing 2013, Saint-Malo, France

[1]**Joguet N**., Vendeville J.E. 2013. Use and functionalization of biopolymers for the elaboration of new microcapsules allowing the drug protection and controlled release. Food Ingredient Europe, 19-21 novembre, Francfort, Allemagne.

Autres :

Joguet N., & Maugard T. 2013. Characterization and quantification of phenolic compounds of *Argania spinosa* leaves by HPLC-PDA-ESI-MS analyses and their antioxidant activity. Chemistry of Natural Compounds 48 (6), 1069-1071.

Camille J., Picot L., Chérouvrier J.R, Thiéry V., Gagez A.L., Bérard J.B., **Joguet N**., Kaas R., Cadoret, J.P. 2014. Microwave-assisted extraction of phycobiliproteins from *Porphyridium purpureum.* Applied Biochemistry and Biotechnology, *In Press.*

[1] Communications affichée

Remerciements

Les travaux de recherche décrits dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire **LIENSs** (Littoral, Environnement et Sociétés) de **l'Université de la Rochelle** en collaboration avec la société **INNOV'IA** et sa filiale R&D, **IDCAPS**, dans le cadre d'une convention CIFRE.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr **Olivier de Viron** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et Mr **Pierre Buisson**, Président d'INNOV'IA de m'avoir accepté au sein de son entreprise et de m'avoir donné sa confiance sur ce projet.

J'adresse mes remerciements les plus sincères au Pr**. Thierry Maugard**, mon directeur de thèse, qui a su, pendant ces trois ans, dispenser un encadrement plein de professionnalisme et d'humour, me faire part de ses conseils et de son expérience, tout en me laissant assez d'autonomie pour mener à bien ce projet d'étude.

Des remerciements tout aussi sincères sont également dû à Mr **Jean-Eudes Vendeville**, directeur scientifique d'IDCAPS, pour avoir été un encadrant scientifique et « industriel » avec qui ce fut un plaisir de travailler. Jean-Eudes, vos conseils, votre vision des choses et votre expérience ont été d'une aide très précieuse autant sur le déroulement du projet que pour mon apprentissage du monde de la R&D.

Je voudrais remercier Mme **Véronique Schmitt** et Mr **Pascal Dhulster** qui ont accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs et membres du jury de thèse.

Merci à Mr **Jean-Marie Piot** de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse, et ainsi couronner ces années de travail.

Bien sûr je ne peux pas oublier dans ces remerciements **les membres de l'équipe R&D d'IDCAPS**, qui ont participé à leur façon à ce travail, que ce soit directement en donnant leurs avis ou en me formant, ou bien en entretenant l'entente et la bonne humeur ambiante. Ce fut une expérience formidable que de travailler avec vous, et une joie que de se lever chaque matin avec le sourire aux lèvres à l'idée de perdre quelques doigts pendant une partie de ballon porté, ou quelques neurones suite à une blague bien nulle !

Merci **Carine** d'avoir co-encadré ce travail, merci à toi pour tes formations, ton humour, tes conseils et ton immense expérience dans ce domaine. Tu vas devoir encore me former à beaucoup de choses !

Merci **Sébastien**, même si trois ans après mon arrivée tu ne savais toujours pas sur quoi je bossais, l'intelligence que tu mets dans tous les projets que tu mènes et ton professionnalisme ont été un exemple pour moi tout au long de ces années de travail parmi vous.

Merci **Jean-René** pour ta bonne humeur et ta participation active à plusieurs parties de ce projet, merci pour ta capacité à toujours donner un coup de main en cas de besoin.

Merci **Fabien**, même si tu ne fais plus partie de l'équipe aujourd'hui, travailler en collaboration avec toi sur certains projets a été une expérience inestimable et un véritable plaisir. Merci **Emilie**, toi non plus tu ne fais plus partie de l'équipe actuellement, mais sache que ta présence a été fortement instructive sur beaucoup de choses ! **Fabien et Emilie**, ne changez rien surtout !

Je remercie **Emmanuelle**, **Dominique**, **Julien** et **Bastien**. Si je vous regroupe, c'est que vous êtes arrivés sur la fin de ma collaboration doctorale avec IDCAPS. Les autres je les connais depuis 4 ans[1/2] ! Mais cela ne m'empêche pas de vous remercier pour tous ce que vous avez partagés avec moi, professionnellement et humainement. Un Big Up spécial pour **Dom**', que les autres me pardonnent, mais ayant collaboré avec toi et ayant subi tes chansons dans la halle technique, je ne pouvais pas faire moins ! Et merci à tous ceux qui ont fait une apparition plus ou moins furtive et rapide à IDCAPS : **Margaux, Aurélie** et **Audrey** !

Cette liste ne serait pas complète si je ne citais pas également les autres membres d'IDCAPS, l'équipe Qualité, **Géraldine** en tête : continue de régner sur ta petite coure **! Marion, Ingrid**, **Marie**, et **Rémy**, merci à vous d'avoir supporté mes pitreries au sein du labo ! Merci **Laurine** pour ta présence toujours discrète, mais toujours pleine d'humour, et puisses tu me pardonner un jour de te viser systématiquement au ballon !

Merci à **Richard Lacaze**, responsable des achats à INNOV'IA, pour avoir collaboré activement avec moi et pour m'avoir immensément aidé dans la recherche des matières premières. Tu as su prendre en compte mes recherches les plus bizarres avec tout le professionnalisme et l'humour qui te caractérisent. J'espère avoir encore l'occasion de te poser des colles de ce genre à l'avenir !

Je tiens à remercier tous les autres personnes d'INNOV'IA : **Alain Grizeau**, Directeur Général, de m'avoir fait confiance sur un projet en particulier, **Fabrice Richard**, responsable Qualité et Environnement, **Philipe Auger**, Responsable Export, et tous les autres (la liste est trop longue !). Tous sans exception m'avaient apporté quelque chose.

Ces remerciements ne concernent pas uniquement l'entreprise. Ce travail a été la collaboration entre deux mondes, auquel je me suis autant attaché l'un que l'autre. Tous les membres du laboratoire LIENSs, et plus particulièrement les membres de l'équipe AMES, peuvent être remerciés ici.

Merci à mes collègues doctorants, passés et présents. Mon statut d'ancien stagiaire m'a fait connaitre la vieille garde des docs et post-doc : **Guillaume, Pierre, Nico, Manu, Matthieu Hervé, Mickael, Zsuszanna, Betty, Rana, Vanessa, Régis, Andrea, Hélène**… Merci à vous tous pour les fous rires, l'ambiance particulière et les coups de pied au c… . Ce fut un plaisir.

Un merci spécial à **Delphine**, qui fut m'on encadrante pour mon premier stage, celui de licence, qui m'a donné véritablement l'envie de continuer dans la recherche scientifique.

Un grand merci à la relève actuelle, compagnons de galères et de stress, mais aussi de rires et de fêtes : **Nico P., Amandine, Boris, Benjamin, Antoine, Meriem, Yesmine** et **Ibtissem**. Un merci tout spécial à **Oussama et Rachida**, qui ont su embellir ce labo de leurs bonnes humeurs et de leurs amitiés.

Je ne pouvais pas faire moins que de citer **Valérie Sopena**, et de la remercier du fond du cœur. **Valérie**, si on t'a surnommé **Mama-Crobio** ce n'est pas pour rien. Ta présence, nos discussions, ton engagement dans l'équipe et dans ton travail, a toujours été un exemple pour moi, et je tiens à te remercier pour tout ce que tu sais faire pour les doctorants et les stagiaires.

Merci également à **Vivianne**, pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta bonne humeur. Le laboratoire serait différent sans toi ! Et sans tes bonbons !

Je voudrais remercier ici les maîtres de conférences et professeurs des universités qui assurent tous les jours le fonctionnement et la bonne ambiance de l'équipe. Un remerciement tout particulier à **Isabelle Goubet** de m'avoir aidé dans la galère que fut la maintenance d'un certain appareillage !

Je tiens à remercier **Egle Conforto**, qui a su me transmettre la passion de la microscopie électronique à balayage, pour sa bonne humeur et sa disponibilité. Collaborer avec vous fut un plaisir et je suis sûr qu'il reste tant à faire dans ce domaine !

Je tiens également à remercier **Ludovic Landemarre** et **Carine Cancellieri**, pour leur collaboration active dans la dernière partie de cette thèse.

Enfin et si je les place à la fin, ce n'est pas par ordre d'importance, j'aimerais remercier tous les stagiaires, d'IDCAPS ou de l'équipe AMES.

Tous celles et ceux que j'ai eu l'honneur d'encadrer d'abord : **Henri, Macodou, Gaëlle, Maroua, Florent, Florian et Juliette** : merci à tous pour votre aide et votre participation à ce projet de recherche. J'espère avoir été un encadrant efficace, et de vous avoir appris autant de chose que votre encadrement m'a enseigné.

Je remercie tous les stagiaires passés par IDCAPS et avec lesquels j'ai plus ou moins joué le rôle de co-encadrant, ou en tout cas de correcteur de rapport : **Celia, Sarah, Laura, Priscillia et Tiphaine**. Evidemment, que des filles ce qui m'a valu une réputation bien particulière au sein de l'équipe !

Et pour finir, Je remercie du fond du cœur **ma famille** et plus particulièrement mes parents pour leur soutien. Ce n'est pas facile d'avoir un fils en thèse.

Table des Matières

Liste des Abréviations et des Unités 18
Liste des Figures 21
Liste des Tableaux 25
Introduction Générale 28

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 33

1er PARTIE : La vitamine A 35
I. La vitamine A : caractéristiques et utilisations 36
I.1 Historique 36
I.2 Caractéristiques chimiques 37
I.3 Les sources et formes de la vitamine A 38
II. Formes galéniques et application de la vitamine A : chez l'homme et chez l'animal 39
II.1 Chez l'homme 39
II.2 Chez l'animal 40

2eme PARTIE : L'encapsulation d'actif : techniques et applications à la vitamine A 43
I. L'encapsulation d'actif : techniques et applications à la vitamine A 44
I.1 La microencapsulation 44
II. Les techniques de microencapsulation 46
II.1 Le procédé de microencapsulation par atomisation 48
II.1.1 L'étape d'homogénéisation 49
II.1.2 L'étape de séchage par atomisation 51
III. Application des techniques de microencapsulation à la vitamine A 55

3eme PARTIE : Le parcours digestif des microparticules et le relargage de l'actif 61
I. Le parcours digestif chez les monogastriques : présentation rapide 62
I.1 la phase buccale 63
I.2 La digestion gastrique 63
I.3 La digestion entérique 63
II. L'absorption des molécules liposolubles 64
III. Le mucus intestinal : généralités 65

III.1 Les mucines : protéines du mucus intestinal 66
III.2 Le phénomène de mucoadhésion..... 69
III.2.1 Les interactions particules/mucus 69
III.2.2 Les théories de la mucoadhésion..... 70
III.2.3 Les interactions fortes particule/mucus : les ponts disulfures..... 72
III.2.4 Les biopolymères mucoadhésifs 73
IV. Le relargage de l'actif 73

4eme PARTIE : La fonctionnalisation des protéines……77

Partie A : Principe de la fonctionnalisation et choix des biopolymères……78
I. Principe de la fonctionnalisation..... 79
II. Choix des biopolymères..... 81
III. Les molécules fonctionnalisées : les protéines 82
III.1 Les protéines de pois 82
III.1.1 Composition et structure des protéines de pois..... 83
III.1.2 Caractéristiques et applications des protéines de pois 85
III.2 Le caséinate de sodium..... 86
III.2.1 Composition et structure du caséinate de sodium 87
III.2.3 Caractéristique et application du caséinate de sodium..... 88
III.3 Les gélatines 90
III.3.1 Composition et structure de la gélatine..... 92
III.3.2 Caractéristiques et application de la gélatine..... 94

Partie B : Réactions de la fonctionnalisation……..96
I. Fonctionnalisation des protéines par les sucres : la réaction de Maillard 97
I.1 La réaction de Maillard : généralité et principe 97
I.2 Les aspects fonctionnels des mélanoïdes issus de la réaction de Maillard..... 99
I.2.1 La méthode en voie sèche : mélange de poudre..... 99
I.2.2 La méthode en voie liquide : réaction en solution 102
II. Fonctionnalisation des protéines par les polyphénols..... 103
II.1 Les polyphénols de raisin : généralité et identification..... 104
II.1.1 Généralité sur les polyphénols 104
II.1.2 les polyphénols de raisin..... 105
II. 2 Les interactions covalentes protéine/polyphénol 108
II.2.1 Les réactions par oxydation..... 108

II.2.2 Réaction avec changement de pH : la rupture des liaisons inter-flavonol 109
II.2.3 Les techniques historiques : utilisation empirique de ces réactions 109
II.3 Les interactions provoquées : propriétés des conjugués 112
II.3.1 Gélatine et polyphénols 112
II.3.2 Protéine de lait et polyphénols 115
II.3.3 Protéine végétale et polyphénols 117

MATERIELS ET METHODES 119
I. Matériels……120
I.1 Les biopolymères 120
I.2 Les actifs liposolubles encapsulés 121
I.3 Les produits chimiques 122
I.4 Le matériel biologique 123
II. Méthode analytique……..124
II.1 Méthode d'analyses par HPLC 124
II.1.1 Méthode d'analyse HPLC pour les biopolymères fonctionnalisés 124
II.1.2 Méthode d'analyse HPLC pour le dosage de la vitamine A 125
II.2 Analyse par électrophorèse SDS-PAGE 125
II.3 Détermination du degré de substitution des protéines…….. 126
II.4 Quantification du brunissement des conjugués issus de la réaction de Maillard sur les protéines……126
III. Fonctionnalisation des protéines……127
III.1 Fonctionnalisation des protéines de pois par les sucres 127
III.2 Fonctionnalisation du caséinate de sodium de lait de vache et de la gélatine de type A porcine par les sucres……127
III.3 Fonctionnalisation des protéines par les polyphénols de raisin 127
IV. Formulation des émulsions et analyses de la stabilité dans le temps par granulométrie laser .. 128
V. Formulation des microsphères de vitamine A……..…….129
VI. Séchage des émulsions par atomisation : production des microsphères de vitamine A 130
VII. Etudes des microsphères de vitamine A……130
VII.1 Etude morphologique de surface par microscopie électronique à balayage (MEB) 131
VII.2 Etude de la stabilité de la vitamine A au sein des microsphères 131
VII.3 Etude du relargage gastrique et entérique de la vitamine A 131
VI.4 Etude de la perméabilité de la matrice des microsphères au géraniol 133
VI.5 Analyse du potentiel mucoadhésif des microsphères 135

RESULTATS ET DISCUSSION 137

Chapitre A : Etude de la fonctionnalisation des protéines..... 138

A.1 : Fonctionnalisation des protéines de pois par les sucres……...139

A1.1 Dénaturation thermique des protéines de pois..... 139

A1.2 Greffage des sucres sur les protéines de pois 142

A.2 : Fonctionnalisation des protéines de pois par les polyphénols…….150

A2.1 Greffage des polyphénols de raisin sur les protéines de pois 150

A2.2 Analyse du pouvoir antioxydant des complexes protéines/polyphénols 154

A.3 : Fonctionnalisation des caséinate de sodium de lait de vache et de la gélatine de type A porcine par les sucres et les polyphénols de raisin……158

A3.1 Fonctionnalisation du caséinate de sodium de lait de vache par les sucre 158

A3.2 Fonctionnalisation du caséinate de sodium de lait de vache par les polyphénols de raisin 161

A3.3 Fonctionnalisation de la gélatine de type A porcine par la maltodextrine DE38 et les polyphénols de raisin……163

A.4 : Analyse des propriétés émulsifiantes des protéines fonctionnalisées……166

A4.1 Analyse des propriétés émulsifiantes des protéines de pois fonctionnalisées par les sucres……167

A4.2 Analyse des propriétés émulsifiantes du caséinate de sodium de lait de vache fonctionnalisé par la maltodextrine DE38……170

A4.3 Analyse des propriétés émulsifiantes de la gélatine de type A porcine fonctionnalisée par la maltodextrine DE38……..172

A4.4 Analyse des propriétés émulsifiantes des protéines fonctionnalisées par les polyphénols de raisin……..174

Chapitre B : Conception et observation morphologique des microsphères..... 179

B.1 Conception des microsphères…….180

B.2 Observation au microscope électronique à balayage des microsphères de vitamine A..... 182

B2.1 Observation des microsphères formulées dans ce projet 182

B2.2 Observation des microsphères par MEB : méthodologie d'exploitation des résultats..... 187

Chapitre C : Etude de l'influence de la fonctionnalisation sur le comportement des microsphères ... 195

C.1 Etude de la stabilité de la vitamine A en condition de stockage……...197

C1.1 Microsphères de protéine de pois et leurs fonctionnalisations 198

C1.2 Microsphères de caséinate de sodium de lait de vache et leurs fonctionnalisations..... 199

C1.3 Microsphères de gélatine de type A porcine et leurs fonctionnalisations..... 200

C1.4 Discussion des résultats : la stabilité de la vitamine A sous forme de microsphère 201

C1.4.1 Premier phénomène de protection possible : la présence de molécules antioxydantes 202

C1.4.2 Deuxième phénomène de protection possible : caractéristique physico- chimique de la matrice……..203

C.2 Etude de la stabilité des microsphères et du relargage de la vitamine A dans des milieux de digestion gastriques et entériques simulés……208

C2.1 Les formulations issues des protéines de pois 209

C2.2 Les formulations issues du caséinate de sodium de lait de vache..... 213

C2.3 Les formulations issues de la gélatine de type A porcine..... 215

C.3 Etude de la perméabilité des microsphères aux molécules volatiles : étude sur le géraniol coencapsulé avec la vitamine A……220

C3.1 Etude préliminaire du géraniol adsorbé sur laine de verre: détermination des conditions d'analyses……..222

C3.2 Etude de l'influence de la masse de microsphère dans la cartouche d'analyse 225

C3.3 Influence des différentes voies de fonctionnalisation sur la perméabilité de la matrice au géraniol…….227

C3.3.1Influence de la fonctionnalisation par la maltodextrine DE38 sur le relargage du géraniol…….230

C3.3.2 Influence de la fonctionnalisation par les polyphénols sur le relargage du géraniol . 231

C3.4 Relargage des microsphères de gélatine de type A..... 232

C.4 Etude du potentiel muco-adhésif des microsphères……..236

C4.1 Potentiel mucoadhésif des microsphères : méthode de calcul et résultats..... 239

C4.2 Interprétation des résultats du potentiel mucoadhésif..... 241

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES..... 245

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 253

Liste des Abréviations et des Unités

abs : absorbance

BSA : Bovine Serum Albumin

BSE : Backscattered Electrons

°C : degrés Celsius

CIPO : Code International des Pratiques Œnologiques

cm/min : centimètre par minute

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CMC : CarboxyMéthylCelluose

COV : Composés Organique Volatile

GC : Chromatographie Phase Gaz

Da : dalton

DE : Dextrose Equivalent

DMSO : Diméthylsulfoxide

DS : Degrés de Substitution

DSC : Differential Scanning Calorimetery

FAO: Food and Agricultural Organization

FID: Flame Ionization Detector

FITC : fluorescein isothiocyanate

g: gramme

Gal : Galactose

Glc : Glucose

GME: Gelatin Manufacturers of Europe

g/mol^{-1} : gramme par mol

h : heure

HMF : Hydroxy-Méthyl-Furfural

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HR: Humidité Relative

Hz: Hertz

J.C : Jésus Christ

kDa: kilodalton

kg/mol: kilogramme par mol

l/j : litre par jour

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

PBS : Phosphate Buffer Solution

pH : potentiel Hydrogène

pHi : potentiel Hydrogène isoélectrique

M : Molaire

m^2 : mètre carré

mDa : mégadalton

ml/min : millilitre par minute

mm : millimètre

mM : millimolaire

$m.s^{-1}$: mètre par seconde

Gal-Nac : N-acétylgalactosamine

nm : nanomètre

s : seconde

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SE : Secondary Electron

SPR : Surface Plasmon Resonance

TFA : Trifluoroacetic Acid

TNBS : Trinitrobenzenesulfonic acid

TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane

µm : micromètre

UV : ultraviolet

V : volt

% v/v : pourcentage volume pour volume

% m/m : pourcentage masse pour masse

Liste des Figures

Figure 1 : en A : structure chimique du β-carotène. En B : structure chimique du rétinol ____ 37
Figure 2 : en A : structure chimique du rétinal. En B : structure chimique de l'acide rétinoïque____ 37
Figure 3 : structure chimique de l'acétate de rétinol ____ 38
Figure 4 : a gauche : capsules molles de vitamine A pour voie orale et à droite, vitamine A sous forme de pommade pour application cutanée____ 40
Figure 5 : photo de gauche : supplément nutritionnel sous forme de granule sèche. Photo de gauche : distribution de nourriture dans un élevage industriel ____ 41
Figure 6 : morphologie des microparticules. En A : structure en microcapsule. En B : structure en microsphère____ 45
Figure 7 : les différentes étapes de la voie d'encapsulation choisie dans ce projet de recherche____ 49
Figure 8 : schémas du principe de l'homogénéisation haute pression (Roustel 2010) ____ 50
Figure 9 : évolution de la granulométrie du lait suivant la pression appliqué pendant l'étape d'homogénéisation pression. A droite, produit avant homogénéisation (A) et après homogénéisation (B)____ 51
Figure 10 : schéma du principe d'une tour d'atomisation (Charreau & Cavaillé 2012)____ 52
Figure 11 : type de pulvérisateur-disperseur-atomiseur rencontrés dans les procédés d'atomisation : à gauche une turbine, à droite une buse mono fluide (NIRO) ____ 53
Figure 12 : exemple de tour d'atomisation semi-industrielle (à gauche) et industrielle (à droite) (Drytech International)____ 54
Figure 13 : anatomie du système digestif (Marieb, 1999)____ 62
Figure 14 : structure des deux principaux sels biliaires ____ 65
Figure 15 : structure en bicouche et épaisseur variable du mucus intestinal (Ensign et al. 2012) ____ 67
Figure 16 : structure des glycoprotéines (Ensign et al. 2012) ____ 67
Figure 17 : étape de la mucoadhésivité d'une particule (Smart 2005)____ 70
Figure 18 : principe de l'interpénétration entre deux polymères. (Smart 2005) ____ 71
Figure 19 : schéma de la théorie de la déshydratation du mucus (Smart 2005) ____ 72
Figure 20 : formation des ponts disulfure entre le polymère et les mucines (Leitner et al. 2003)____ 72
Figure 21 : différent modèle de relargage contrôlé____ 74
Figure 22 : profils de libération obtenus à partir de différents types de microparticules ____ 74
Figure 23 : comportement d'une microsphère mucoadhésive dans le tractus intestinal (adapté de Ponchel et al. 1997) ____ 75
Figure 24 : principe de la fonctionnalisation de biopolymère pour la formulation de microsphère. En pointillé les formulations de témoins négatif, qui servirons de comparaison avec les formulations utilisant la voie de fonctionnalisation (en trait plein) ____ 80
Figure 25 : fractions des protéines de pois ____ 84
Figure 26 : structure chimique d'une chaîne de collagène____ 94
Figure 27 : étapes de la réaction de Maillard (Bridiau 2011) ____ 98
Figure 28 : structure de base des flavonoïdes : 2-phényl-1-benzopyrane ____ 105
Figure 29 : structures chimiques des principaux anthocyanes rencontrés chez le raisin ____ 106
Figure 30 : Structure chimique des principaux tanins condensés rencontrés chez le raisin ____ 106
Figure 31 : greffage d'un acide phénolique avec un groupement aminé d'une chaîne peptidique en présence d'oxydant (Strauss & Gibson 2004) ____ 108
Figure 32 : interaction protéine/polyphénols entrainant la formation du trouble et de la sédimentation. (Selon : Siebert 2006) ____ 110
Figure 33 : mécanisme conceptuel de l'interaction protéine/polyphénols (selon : Siebert et al. 1996a)____ 111
Figure 34 : mécanisme possible de la formation du trouble en 2 phases : (A) polymérisation (B) activation (selon : Gardner & Mc Guinness, 1977) ____ 111

Figure 35 *: structure chimique de l'acide férulique (A), de l'acide chlorogénique (B) et de l'acide caféique (C)* ____ *113*
Figure 36 *: structure chimique de la rutine (A) et de l'acide gallique (B)* ____ *114*
Figure 37 *: structure chimique de l'acide tannique* ____ *114*
Figure 38 *: réaction de réticulation entre deux biomolécule (BM) par la génépine* ____ *115*
Figure 39 *: principaux polyphénols du thé* ____ *116*
Figure 40 *: en (A) : formule de l'acétate de rétinol (vitamine A). En (B) : formule du géraniol* ____ *122*
Figure 41 *schéma du principe d'un sécheur – atomiseur (Charreau & Cavaillé 2012)* ____ *130*
Figure 42 *: schéma du montage pour l'étude du relargage du géraniol libéré des microsphères* ____ *134*
Figure 43 *: quantification des fonctions amines libres sur les protéines de pois avant et après l'étape de dénaturation thermique (15min à 100°C)* ____ *140*
Figure 44 *: profil chromatographique UV obtenu par gel perméation (colonne Biosuite 250, eau + TFA 0.1 %, 1 ml/min) des protéines de pois avant traitement thermique (A) et après traitement thermique (B)* ____ *141*
Figure 45 *: les étapes de la dénaturation thermique des protéines (adapté de Nishinari et al. 2014)* ____ *142*
Figure 46 *: profil chromatographique UV obtenu par gel perméation (colonne Biosuite 250, eau + TFA 0.1 %, 1 ml/min) représentant les protéines de pois dénaturées thermiquement (en A) et les conjugué obtenus par greffage des différentes maltodextrines (B) : en bleu MD6 ; en vert MD12 ; en rouge MD38* ____ *145*
Figure 47 *: gel d'électrophorèse SDS-PAGE des protéines de pois et des greffages des différents sucres* ___ *146*
Figure 48 *: histogramme : évolution du pourcentage d''amine libre sur les protéines de pois selon le taux de polyphénol rajouté. Courbe : évolution du pH de la solution selon le taux de polyphénol ajouté* ____ *151*
Figure 49 *: profil chromatographique UV obtenu par gel perméation (colonne TSKGEL GW3000, tampon phosphate 0.1 M, 0.5 ml/min). En A : profil chromatographique des protéines de pois. En B : profil chromatographique du complexe protéine/polyphénol à 26% de polyphénol* ____ *152*
Figure 50 *: gel d'électrophorèse des protéines de pois et des complexes protéines de pois/polyphénol* ____ *153*
Figure 51 *: mesure de l'activité antioxydante par DPPH, des protéines de pois, des complexes protéines de pois et polyphénols et des polyphénols seuls* ____ *154*
Figure 52 *: en A : gel d'électrophorèse du caséinate de sodium (puits n°1) et du caséinate de sodium greffé avec la maltodextrine DE38 (puits n°3). Le puits n°2 correspond au standard. En B : Profil chromatographique UV obtenu en gel perméation (colonne Biosuite 250, eau + 0.1 % TFA, 1 ml/min) du caséinate de sodium (en bleu) et du caséinate de sodium greffé avec la maltodextrine DE38 (en vert)* ____ *160*
Figure 53 *: en A : gel d'électrophorèse du caséinate de sodium (puits n°1) et du caséinate de sodium greffé avec 26% de polyphénol de raisin (puits n°3). Le puits n°2 correspond au standard. En B : Profil chromatographique UV obtenu en gel perméation (colonne TSKGEL GW3000, tampon phosphate 0.1 M, 0.5 ml/min) du caséinate de sodium (en bleu) et du caséinate de sodium greffé avec 26% de polyphénol de raisin(en rouge)* ____ *162*
Figure 54 *: analyse granulométrique des émulsions formulées à partir des protéines de poids (♦), des protéines de pois après l'étape de dénaturation thermique (■), des protéines de pois greffées avec le glucose (▲) et les protéines de pois greffées avec le lactose (●), a t= 0jours (A) et à t= 7 jours (B)* ____ *167*
Figure 55 *: analyse granulométrique des émulsions formulées à partir des protéines de pois (♦), des protéines de pois greffées avec le glucose (▲) et les protéines de pois greffées avec le lactose (●), a t=21 jours* ____ *168*
Figure 56 *: analyse granulométrique des émulsions formulées à partir des protéines de pois greffées avec les maltodextrines DE 6 (●), DE12 (●) et DE38 (●). A t= 0 jours (A) et t= 21 jours (B)* ____ *169*
Figure 57 *: analyse granulométrique des émulsions formulées à partir de caséinate de sodium (♦) et de caséinate de sodium greffé avec la maltodextrine DE38 (●). (A) à t = 0 jours, (B) à t = 7 jours* ____ *171*
Figure 58 *: analyse granulométrique des émulsions formulées à partir de gélatine de type A (♦) et de gélatine greffée avec la maltodextrine DE 38 (●) à t= 0 jours* ____ *173*
Figure 59 *: analyse granulométrique des émulsions formulées avec les protéines de pois (♦), les protéines de pois mélangées avec les polyphénols de raisin sans fonctionnalisation (▲) et le complexe protéine de pois / polyphénol de raisin (●)* ____ *174*
Figure 60 *: analyse granulométrique des émulsions formulées avec : en A1 : (♦) PP à t= 0 jours, (♦) PP t= 21 jours ; en B1 : (♦) CA t=0 jours, (♦) CA t=7 jours ; en C1 : (♦) GEL t= 0 jours. En A2 : (●) PP-TAN t= 0 jours ;*

(●) PP-TAN t=21 jours ; en B2 : (●) CA-TAN t= 0jours ; (●) CA-TAN t=21jours ; En C2 : (●) GEL-TAN t=0 jours ; (●) GEL-TAN t=21 jours 176
***Figure 61** : observation MEB. A1 : microsphère PP x 400, A2 : microsphère PP x 6000 B1 : microsphère PP-MD38 x 400, B2 : microsphère PP-MD38 x 6000. C1 : microsphère PP-TAN x 400. C2 : microsphère PP-TAN x 6000* 184
***Figure 62** : observation MEB. A1 : microsphère Ca x 400. A2 : microsphère CA x 6000. B1 : microsphère CA-MD38 x 400, B2 : microsphère CA-MD38 x 6000. C1 : microsphère CA-TAN x 400. C2 : microsphère CA-TAN x 6000* 185
***Figure 63** : observation MEB. A1 : microsphère GEL x 400. A2 : microsphère GEL x 6000. B1 : microsphère GEL-MD38 x 400, B2 : microsphère GEL-MD38 x 6000. C1 : microsphère GEL-TAN x 400. C2 : microsphère GEL-TAN x 6000* 186
***Figure 64** : représentation schématique de la microencapsulation d'un actif liposoluble par des protéines (adapté de Nesterenko (2012)* 188
***Figure 65** : exemples de formes de particules obtenues par atomisation (adapté de Spray Drying Handbook, 1985)* 189
***Figure 66** : en A : microcapsule schématique selon Nesterenko (2012). En B : Cliché MEB de l'intérieur d'une microsphère atomisée (PP) x 3000* 190
***Figure 67** : schéma du principe de pénétration des électrons lors de l'observation SE ou BSE : en A, si l'électron entre en contact avec une zone de matière dense. En B : si l'électron rentre en contact avec une zone moins dense ou de composition chimique différente : création d'un contraste chimique* 191
***Figure 68** : schéma du principe général de séchage des émulsions, et l'influences des différents paramètres sur la forme de la particule finale. En A : la goutte d'émulsion est soumis à 2 types de facteurs : les facteurs physiques (vitesse d'air) et les facteurs thermiques (T°C de l'air d'entré). En B : 1er étape de séchage les facteurs physiques induise un transfert d'eau par modification de la tension superficielle à la surface de la goutte, ce qui a pour conséquence le séchage d'un film à la surface. En C : 2eme étape de séchage, la goutte se réchauffe de l'extérieur vers l'intérieur par transfert thermique et l'eau se vaporise, créant ainsi une cavité centrale. En D : la particule finale voit son film de surface se contracter de par la perte d'eau.* 193
***Figure 69** : pourcentage de vitamine A retrouvé dans les microsphères de protéines de pois et de leur conjugué, après un stockage de 28 jours à température ambiante (en bleu), à 40°C (en rouge) et à 40°C et 75% d'humidité relative (en vert)* 198
***Figure 70** : pourcentage de vitamine A retrouvé dans les microsphères de caséinate de sodium et de leur conjugué, après un stockage de 28 jours à température ambiante (en bleu), à 40°C (en rouge) et à 40°C et 75% d'humidité relative (en vert)* 199
***Figure 71** : pourcentage de vitamine A retrouvé dans les microsphères de gélatine de type A et de leur conjugué, après un stockage de 28 jours à température ambiante (en bleu), à 40°C (en rouge) et à 40°C et 75% d'humidité relative (en vert)* 201
***Figure 72** : cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères PP (jaune), PP-MD38 (marron) et PP-TAN (violet) dans un milieu de digestion gastrique simulé (pH 2, pepsine)* 209
***Figure 73** : cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères PP (jaune), PP-MD38 (marron) et PP-TAN (violet) dans un milieu de digestion entérique simulé (pH 5.5, enzyme, sel biliaire)* 210
***Figure 74** : cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères CA (bleu), CA-MD38 (marron) et CA-TAN (violet) dans un milieu de digestion gastrique simulé (pH 2, pepsine)* 213
***Figure 75 :** cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères CA (bleu), CA-MD38 (marron) et CA-TAN (violet) dans un milieu de digestion entérique simulé (pH 5.5, enzyme, sels biliaire)* 214
***Figure 76** : Cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères GEL (vert), GEL-MD38 (marron) et GEL-TAN (violet) dans un milieu de digestion gastrique simulé (pH 2, pepsine)* 215
***Figure 77** : cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères GEL (vert), GEL-MD38 (marron) et GEL-Tan (violet) dans un milieu de digestion entérique simulé (pH 5.5, enzyme, sel biliaires)* 216
***Figure 78** : en A : principe de la technique de l'espace de tête statique. En B : principe de la technique de l'espace de tête dynamique* 221

Figure 79 *: principe du système d'analyse utilisé pour étudier la libération du géraniol coencapsulé dans les microsphères de vitamine A* _____ *222*
Figure 80 *: spectre FID du pic de géraniol à t= 30min de relargage, et à t= 20h, pour 9.22 mg de géraniol sur laine de verre*_____ *223*
Figure 81 : *cinétique de relargage du géraniol adsorbé sur laine de verre : 9.22 mg, 7.64 mg , 6.16 mg 4.17 mg*_____ *223*
Figure 82 *: somme des aires du pic de géraniol sur un relargage total par rapport à la masse de géraniol adsorbé sur la laine de verre.* _____ *224*
Figure 83 *: cinétique de relargage du géraniol selon la masse de microsphère analysée : 100 mg, 75 mg, 50 mg 25 mg*_____*226*
Figure 84 *: droite représentant la somme des aires du pic de géraniol sur un relargage total par rapport à la masse de microsphère inséré dans le réacteur solide/gaz* _____ *226*
Figure 85 *: cinétique de relargage du géraniol dans le temps pour les microsphères PP, PP-MD38, et PP-TAN :* _____ *228*
Figure 86 *: cinétique de relargage du géraniol dans le temps pour les microsphères Ca, Ca-MD38, et Ca-TAN :* _____ *228*
Figure 87 *: cinétique de relargage du géraniol dans le temps : Microsphère GEL*_____ *232*
Figure 88 *: principe de l'analyse du potentiel mucoadhésif des microsphères* _____ *238*
Figure 89 *: intensités de fluorescence obtenues avec les microsphères GEL : en bleu : sans contact avec la mucine, en rouge : après contact avec la mucine*_____ *239*
Figure 90 *: pourcentage d'inhibition de la fluorescence calculé pour les microsphères PP, PP-MD38, PP-TAN, CA, CA-TAN, GEL et GEL-MD38. Le pourcentage d'inhibition de la fluorescence est proportionnel au potentiel mucoadhésif de la microsphère*_____ *241*
Figure 91 *: schéma récapitulatif des interactions microsphères/mucine, pour les microsphères PP, PP-MD38, GEL et GEL-MD38* _____ *243*

Liste des Tableaux

__Tableau 1__: procédés de microencapsulation 47
__Tableau 2__ : principaux type de particule utilisé pour l'encapsulation de la vitamine A pour une application en agro-alimentaire (adapté de Sauvant et al. 2012) 57
__Tableau 3__: compositions et caractéristique du mucus 68
__Tableau 4__ : composition en acide aminé des protéines de pois (Gueguen et al. 1988) 83
__Tableau 5__ : exemple de technique d'encapsulation d'actif utilisant les protéines de pois 86
__Tableau 6__: composition en acide aminé du caséinate de sodium (d'après Beaufrand et al. 1977) 88
__Tableau 7__ : exemple d'encapsulation utilisant du caséinate de sodium 89
__Tableau 8__ : composition en acide aminé des différentes gélatine : gélatine de type A, gélatine de type B et gélatine de poisson d'eau froide 93
__Tableau 9__ : exemple d'utilisation de la gélatine pour l'encapsulation d'actif 95
__Tableau 10__ : récapitulatifs des études portant sur la formation des conjugués de Maillard par mélange de poudre à température et humidité contrôlée 100
__Tableau 11__ : exemples d'études portant sur la formation des conjugués de Maillard par la voie liquide 102
__Tableau 12__ : synthèse des différents polyphénols retrouvé dans le raisin 107
__Tableau 13__: références des biopolymères 120
__Tableau 14__ : références des actifs liposolubles 121
__Tableau 15__: références des produits chimiques 122
__Tableau 16__: références du matériel biologique 123
__Tableau 17__ : condition d'analyse HPLC des protéines fonctionnalisées 124
__Tableau 18__ : condition d'analyse HPLC de la vitamine A 125
__Tableau 19__ : formulation des microsphères de vitamine A séché par atomisation 129
__Tableau 20__: condition d'analyse en chromatographie gazeuse du géraniol libéré des microsphères 134
__Tableau 21__ : résultat de la fonctionnalisation des protéines de pois par les sucres : taux de greffage, absorbance à 420 nm et évolution du pH 143
__Tableau 22__ : résultats du greffage des différents sucres obtenus pour le caséinate de sodium de lait de vache 158
__Tableau 23__ : résultat de la fonctionnalisation de la gélatine de type A par la maltodextrine DE38 163
__Tableau 24__ : composition et caractéristiques des microsphères de vitamine A formulées pour ce projet de recherche 181
__Tableau 25__ : caractéristiques des lectines sélectionnées pour le test du potentiel mucoadhésif des microsphères 237

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'aliment fonctionnel peut être défini comme un aliment qui, par le biais d'un ingrédient alimentaire physiologiquement actif, procure un avantage pour la santé et ce, en marge de ses caractéristiques nutritionnelles de base (IFIF 2012).

Ces produits sont des ingrédients alimentaires, des additifs, des préparations formulées ou encore des compléments alimentaires qui associent des vertus thérapeutiques à la valeur nutritionnelle d'un produit et qui ont des effets bénéfiques supérieurs à ceux apportés par un aliment dit « normal ».

La gamme des aliments fonctionnels est très étendue, allant des nutriments isolés aux compléments alimentaires, en passant par les aliments spéciaux contenant des composants génétiquement modifiés, ou encore des produits alimentaires transformés. Cette appellation d'aliment fonctionnel peut aussi bien s'appliquer au domaine de l'agro-alimentaire qu'à celui de la nutrition animale.

Les précurseurs dans ce domaine furent les Japonais qui, dès 1984, inventèrent l'aliment à usage médicinal spécifié (FOSHU, Food of Specified Health Use). Bientôt suivis par les Etats-Unis et les pays du Pacifique, puis de l'Europe Occidentale. Les termes nutraceutiques, alicaments et pharma-foods découlent directement de ce nouveau marché.

En France, le marché de l'aliment santé a atteint un chiffre de 10 milliards d'euros en 2012 (il représentait 5.1 milliard en 2002). Dans le domaine de la nutrition animale, la production a atteint un volume de plus de 21,2 millions de tonnes d'aliments composés pour animaux d'élevage (toutes espèces confondues).

Les aliments peuvent voir leurs formules être complétées par diverses molécules ayant une action bénéfique sur le métabolisme, que l'alimentation seule ne pourrait amener en quantité suffisante. Ainsi, les rations animales en élevage sont souvent complétées par des ajouts sous formes de granules afin d'améliorer la performance de prise de poids ou la résistance à certaines pathologies.

Ces molécules apportées peuvent être d'origine et de familles diverses : acides aminés et dérivés, vitamines hydrosolubles ou liposolubles, minéraux, acides gras essentiels, antibiotiques, antioxydant, etc…. Ces molécules ont souvent une forte valeur ajoutée et une

sensibilité aux facteurs environnementaux, qui peut induire une dégradation ou une baisse de leur activité.

Depuis plusieurs décennies, les procédés d'encapsulation d'actifs ont su prouver leur utilité dans la maîtrise de la qualité et de la stabilité de nombreuses substances chimiques ou biologiques. Le fait de devoir manipuler, protéger et vectoriser un actif sensible a toujours été une problématique majeure pour les industriels.

La microencapsulation, et plus précisément la formulation d'émulsions directes suivis d'une étape de séchage par atomisation est la technique la plus utilisée et la moins onéreuse pour protéger des actifs liposolubles de type vitamines (Vitamine A, E….) ou molécules volatiles (géraniol, menthol, huile essentielle…). Quel que soit la substance encapsulée, la stabilité de la matrice est une condition primordiale pour préserver ses propriétés. De nombreux facteurs physiques (température, lumière) ou chimiques (humidité, oxygène, métaux) peuvent en effet altérer la matrice et les substances qu'elle protège.

De plus en plus de formulations, dans un souci de chimie verte et d'un retour au naturel voulu par les consommateurs, se détournent des émulsifiants synthétiques ou semi-synthétiques pour choisir des molécules d'origine naturelles. Ces biopolymères peuvent être choisis dans la famille des protéines, des sucres, des gommes naturelles, des polyphénols ou des acides gras. Chaque biopolymère a ses propriétés propres. Au sein d'une famille de molécule, l'origine, les traitements chimiques ou mécaniques et les processus de purification peuvent influencer les caractéristiques de la matière première.

Les propriétés intéressantes de certains enrobant synthétiques n'ont pas d'équivalent dans le monde naturel, ou ces équivalents sont difficilement transposables aux procédés industriels. Ce contexte oblige les industriels de la microencapsulation à avoir une connaissance fine des différents biopolymères disponibles sur le marché et de choisir avec précision les matières premières rentrant dans leurs formulations, suivant l'application voulue.

C'est dans cette large problématique que s'inscrit ce projet de recherche, en partenariat avec la société INNOV'IA, et sa filiale Recherche et Développement, IDCAPS. Ces entreprises ont une longue expérience des technologies des poudres et maîtrisent parfaitement les procédés de microencapsulation pour des applications diverses et variées. Nous avons étudiés ensemble les transformations que nous pourrions apporter aux biopolymères déjà disponibles sur le marché, pour les adapter spécifiquement à la microencapsulation. Dans le

présent travail, nous avons appliqué la technique de la fonctionnalisation à trois protéines déjà couramment utilisées pour la microencapsulation : les protéines de pois, le caséinate de sodium de lait de vache et la gélatine de type A porcine. Pour fonctionnaliser ces protéines, deux familles des molécules ont été sélectionnées : les sucres simples (glucose lactose..) et complexes (maltodextrine) et les polyphénols de raisin.

Cette fonctionnalisation doit faire intervenir des réactions considérées comme alimentaires, c'est-à-dire n'utilisant aucun produit chimique et dont les produits sont eux même connus. Nous avons donc utilisé dans cette étude des réactions courantes dans le domaine alimentaire :

- La réaction de Maillard, permettant de greffer des sucres sur des protéines, et connue pour produire des composés mélanoïdiques responsables du brunissement non enzymatique des aliments à la cuisson.
- La formation de complexes protéines/polyphénols, qui permet de greffer des composés polyphénoliques sur les protéines, réactions connues dans le processus de collage du vin ou du trouble de la bière, ainsi que dans le tannage naturel des peaux.

Ces différentes voies de fonctionnalisation ont été étudiées avec pour objectif d'améliorer les propriétés des biopolymères, et d'en faire apparaître de nouvelles, compatibles avec le procédé d'encapsulation.

Ces différentes voies de fonctionnalisation appliquées sur les trois protéines de départ nous ont permis d'encapsuler une vitamine liposoluble modèle, la vitamine A, couramment utilisée dans le domaine alimentaire et de la nutrition animale. Cette vitamine est connue pour être très sensibles aux facteurs environnementaux. Plusieurs formulations de microsphères ont donc été formulées à partir des protéines et de leurs fonctionnalisations. L'ajout d'une quantité connue d'un traceur volatil, le géraniol, dans la formulation nous a permis d'obtenir des informations sur la perméabilité des matrices des microsphères.

Notre travail sera présenté de la façon suivante :

Dans une étude bibliographique, nous ferons tout d'abord le point sur :

- Un état de l'art sur la vitamine A, ses caractéristiques, sa sensibilité aux facteurs environnementaux et ses applications

- L'état de l'art concernant la technologie de microencapsulation, notamment appliquée plus spécifiquement à la vitamine A.
- Une étude sur le parcours digestif, décrivant les différentes étapes de digestion, le phénomène de mucoadhésion et les différentes formes de relargage de l'actif encapsulé dans une microsphère.
- Une étude sur le principe de la fonctionnalisation par les sucres et les polyphénols appliqué aux protéines, avec une description préalable des molécules choisies et un état de l'art des réactions de fonctionnalisation.

La synthèse bibliographique sera suivie par une description du matériel et des méthodes utilisés dans cette étude. Les différentes méthodes d'analyses des biopolymères fonctionnalisés et du comportement des microsphères formulés seront également décris dans cette partie.

La partie suivante présentera les résultats :

Le premier chapitre décrira la fonctionnalisation des protéines de pois par les sucres et par les polyphénols de raisin. Le chapitre suivant présentera l'influence des différents produits fonctionnalisés sur la stabilité des émulsions.

L'étude de la fonctionnalisation sur les matières premières sera suivie par la production de neuf microsphères, qui seront observées dans une partie consacrée à l'étude des observations au microscope électronique à balayage.

Ensuite viendra les descriptions de l'influence des deux voies de fonctionnalisation :

- Sur la stabilité de la vitamine A encapsulée au cours du temps dans différentes conditions de stockage
- Sur le relargage de la vitamine A dans deux milieux de digestion simulé : milieu gastrique et entérique
- Sur la libération d'une molécule volatile, le géraniol, coencapsulé ave la vitamine A
- Sur le potentiel mucoadhésif des microsphères.

Enfin une partie conclusion et perspective viendra conclure ce travail en rappelant les principaux résultats et en présentant les pistes de travail mises en perspective.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette étude bibliographique, plusieurs aspects de ce projet de recherche vont être abordés, afin de mieux identifier et de mieux comprendre les différents éléments et les différents processus utilisés.

Un projet de recherche ayant pour sujet l'encapsulation d'actif a deux éléments primordiaux : l'actif, et le procédé d'encapsulation. Ainsi, dans une première partie, l'actif liposoluble modèle, la vitamine A, sera présenté, ainsi que ses formes galéniques actuelles et ses applications. Dans une seconde partie, la technologie de l'encapsulation d'actif et plus particulièrement l'atomisation d'émulsions sera décrite. Afin de faire le lien avec la première partie, l'encapsulation appliquée à la vitamine A sera explorée en présentant une synthèse de la littérature à ce sujet.

Après que ces deux premières parties aient permis de mieux comprendre l'intérêt et les formes que peuvent prendre l'encapsulation de la vitamine A, une troisième partie va se concentrer sur le devenir du vecteur formulé s'il est utilisé en voie orale. Ainsi dans la troisième partie sera faite une présentation synthétique des différentes étapes du tractus digestif chez les monogastrique, afin d'identifier les milieux que le vecteur rencontre au sein de l'organisme. Cette partie se concentrera également sur le phénomène de mucoadhésion, en faisant une synthèse de l'état de l'art à ce sujet.

Enfin la dernière partie se concentrera sur les biopolymères choisis pour formuler les microsphères de vitamine A : tout d'abord par la présentation des propriétés physico-chimiques des molécules choisies, puis par la description des voies de fonctionnalisation que nous allons utiliser.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1er PARTIE : La vitamine A

I. La vitamine A : caractéristiques et utilisations

I.1 Historique

La vitamine A a depuis longtemps entraîné un intérêt scientifique important. Ces vingt dernières années ce ne sont pas moins de 5 articles scientifiques par jour en moyenne ayant pour sujet la vitamine A qui sont publiés dans les bases de données scientifiques (d'après PubMed®)

Depuis son utilisation intuitive sous forme d'extrait de foie pour guérir la cécité nocturne dans l'Egypte Antique (papyrus de Ebers), la vitamine A n'a cessé d'être l'objet d'études scientifiques croissantes.

Cette vitamine fut découverte par McCollum entre 1907 et 1913 (McCollum & Davis, 1913, 1915). Il cite dans son étude que :

...Il existe dans beaucoup d'aliment, un facteur de croissance liposoluble (d'abord nommé 'facteur liposoluble A', en opposition aux autres facteurs de croissance appelés 'facteurs hydrosolubles B'), qui est d'une autre nature que les lipides eux-mêmes…. Ce facteur peut être transféré d'une matière grasse à une autre…. Il est essentiel à la croissance et à la vie….

Steenbook va plus loin en 1919 en associant ce facteur liposoluble A à un pigment jaune (connu maintenant comme le β-carotène). Il soumet même l'hypothèse que ce pigment jaune peut donner une forme moins colorée biologiquement active, le rétinol (Steenbock, 1919). Cette théorie se voit confirmée en 1930 par Moore. Il faut attendre 1931 pour que l'équipe de Karrer réussissent à déterminer la structure chimique du β-carotène et du rétinol (Karrer *et al.* 1931) et 1947 pour que Isler aboutissent à la synthèse totale du rétinol, ouvrant ainsi un immense champ d'étude sur la vitamine A et son application médicale et industrielle (Isler *et al.* 1947) (figure 1).

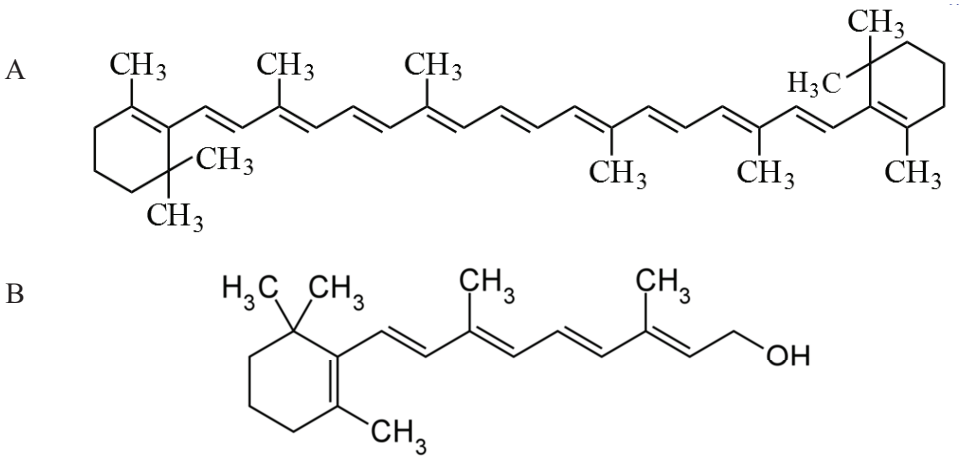


Figure 1 : en A : structure chimique du β-carotène, en B : structure chimique du rétinol

I.2 Caractéristiques chimiques

« Vitamine A » est un terme regroupant le rétinol et ses différentes formes. Le rétinol, ou (2E,4E,6E,8E)-3,7-diméthyl-9-(2,6,6-triméthyl-1-cyclohéxen-1-yl)-nona-2,4,6,8-tétraen-1-ol, peut être retrouvé dans la nature sous différentes formes, les plus courantes étant le rétinal, l'acide rétinoïque (figure 2) et les formes d'esters de rétinol.

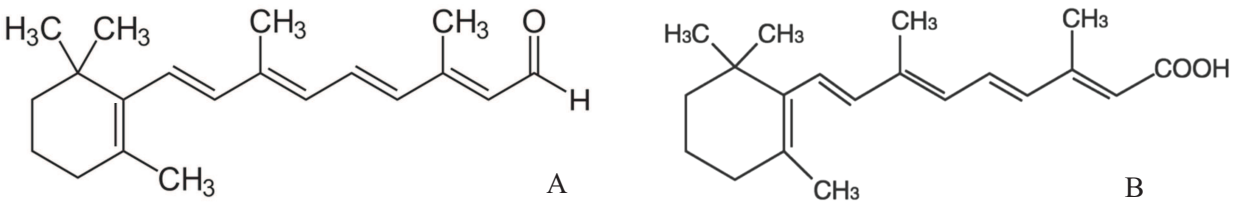


Figure 2 : en A : structure chimique du rétinal, en B : structure chimique de l'acide rétinoïque

D'un point de vue chimique, le trans-rétinol et ses dérivés présentent tous une région riche en électron qui est attractive pour les espèces déficientes en électrons, comme les radicaux. Ce qui entraîne une instabilité en présence d'oxydant, de métaux de transitions, de molécules productrices de radicaux libre et de lumière (et plus spécialement d'UV, pour des longueurs d'onde inférieures à 415 nm). Tous ces facteurs peuvent entraîner une dégradation

oxydative et/ou une isomérisation (en position 9, 11 et 13) (Carlotti *et al.* 2002) (Loveday & Singh 2008).

Les rétinoïdes peuvent également subir une isomérisation thermique pouvant produire des isomères 13-cis (Panfili *et al.* 1998). Des études ont également montré une rapide dégradation de la vitamine A dans des solvants aqueux (Semenova *et al.* 2002).

De plus, de par sa faible polarité, la vitamine A montre une faible solubilité dans l'eau. L'activité maximum est relevée pour la forme trans-rétinol, et toutes isomérisations ou modifications de cette molécule entraînent une baisse de son activité (Sauvant *et al.* 2012). Néanmoins, les formes d'ester de rétinol, comme le rétinol acétate (figure 3) ou le rétinol palmitate permet une meilleure stabilité de la molécule dans le temps.

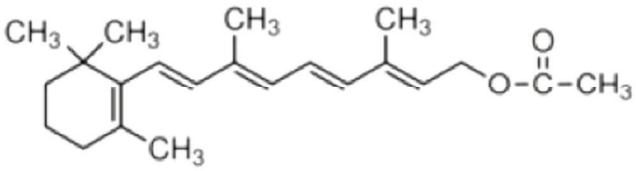


Figure 3 : structure chimique de l'acétate de rétinol

I.3 Les sources et formes de la vitamine A

La vitamine A ne peut pas être synthétisée *de novo* dans le règne animal, elle doit provenir de l'alimentation. Les plantes et les micro-organismes peuvent synthétiser les caroténoïdes. Beaucoup d'entre eux, que l'on appelle les caroténoïdes pro-vitamines A, peuvent être convertis en rétinol via un clivage oxydatif par l'enzyme β-carotène 15-15' dioxygénase. Ce clivage peut également avoir lieu dans le tractus intestinal chez les animaux avec la carotène monoxygénase (Borel *et al*. 2005) (Goodman *et al.* 1966). Beaucoup de ces caroténoïdes peuvent être également absorbés directement au niveau de l'intestin. Les animaux et les humains peuvent également trouver la vitamine A nécessaire dans l'alimentation, le plus souvent sous forme estérifié (palmitate de rétinol, par exemple).

Les formes rétinol, rétinal ou leurs esters ne se retrouvent que dans les aliments d'origine animale. Les carotènes pro-vitamine A se retrouvent dans les aliments d'origine végétale.

Dans les pays occidentaux, les formes pré-formées de la vitamine A apportées via l'alimentation représente entre 25 et 75% de la prise totale de vitamine A, le reste pouvant provenir des caroténoïdes pro-vitamine A (Harrison, 2005).

En France, une étude récente de l'INCA2 (ANSES, 2006-2007) a montré qu'environ 50% de la prise de vitamine A venait des formes préformées estérifiées, et environs 50% provenait des caroténoïdes pro-vitamine A. une source non négligeable de cet apport se fait sous forme de compléments alimentaires ou d'alimentation enrichie, pratique en constante augmentation depuis ces 20 dernières années (Sauvant *et al.* 2012). La vitamine A peut également rentrer dans l'alimentation sous la forme d'additifs alimentaires, comme pigment ou anti-oxydant (E160).

Cet engouement récent pour les compléments alimentaires et l'alimentation enrichie dans les pays industrialisés et les pays en voie de développement oblige les industriels à utiliser la vitamine A sous forme de concentrés avec une protection de la molécule appropriée. L'objectif étant d'obtenir une meilleure solubilité de la vitamine dans les milieux aqueux et une meilleure stabilité à l'oxydation. Un des objectifs les plus importants pour les industriels est d'obtenir le même dosage et la même activité du produit pendant la formulation, après le stockage, et pendant l'utilisation.

Différentes formes galéniques, qui correspondent souvent à une application données, sont actuellement utilisées par les industriels.

II. Formes galéniques et application de la vitamine A : chez l'homme et chez l'animal

II.1 Chez l'homme

La vitamine A peut avoir deux formes d'applications : un rôle pharmacologique, où l'objectif est de réduire une carence, et un rôle purement cosmétique, où l'objectif est de profiter du caractère antioxydants de la vitamine.

La vitamine A prend le plus souvent la forme d'huile enrichie, sous forme de capsules molles ou d'ampoule sécable en verre, pour une prise par voie orale. Une des formes

galéniques les plus courantes est présentée sous forme de pommade, pour voie cutanée (figure 4). Dans les cas les plus urgents de carence, une injection sous-cutanée peut également être envisagée.

Figure 4 : à gauche : capsules molles de vitamine A pour voie orale et à droite, vitamine A sous forme de pommade pour application cutanée

Le suivi médical ou la posologie indiquée sur les produits évitent généralement le phénomène d'hypervitamose. Les faibles pourcentages dans les produits cosmétiques ne peuvent pas entraîner ce phénomène.

II.2 Chez l'animal

Dans le secteur de la nutrition animale, l'apport en supplément vitaminique dans la ration peut prendre deux formes : la médication vétérinaire ou/et le supplément nutritionnel (Rapport Affsa 2008).

Dans le premier cas, l'apport vitaminique en tant que médicament se fait généralement sous forme d'ester tel que l'acétate, le propionate et le palmitate de rétinol par voie orale, soit par voie intramusculaire avec la nécessité de respecter un délai avant l'abattage. La durée du traitement par voie orale est de un jour renouvelable si nécessaire. L'injection intramusculaire de vitamine A est unique car entraîne la formation d'un dépôt et d'un stockage hépatique suffisant pour couvrir les besoins pendant plusieurs semaines.

Les apports vétérinaires de vitamines se font le plus souvent sur des cas d'animaux isolés, après diagnostique par un professionnel, qui administre quelquefois lui-même la vitamine à l'animal en carence. Il s'agit donc la plupart du temps d'un traitement au cas par cas, utilisant des posologies liquides sous forme d'ampoules sécables en verre ou d'injection, difficilement utilisable pour traiter un élevage entier.

Dans le second cas, celui des suppléments nutritionnels, l'éleveur apporte lui-même le supplément vitaminique sous forme de prémix dans la ration, pour une durée plus ou moins longue, correspondant à une étape spécifique de l'élevage (allaitement, croissance, etc…).

Le prémix assure la couverture des besoins de base des animaux en vitamine et oligo-éléments. Il peut également contenir certains acides aminés ainsi que des additifs nutritionnels. Il est incorporé à un taux généralement compris entre 0,5 et 1% m/m lors de la fabrication de l'aliment complet.

Le marché des produits manufacturés pour la nutrition animale représente 21.2 millions de tonnes par ans, et des multinationales comme les groupe Adisseo®, Cargil®et Altech® proposent des gammes complètes de produits manufacturés sous forme de granule, de microgranule (figure 5) et de poudre. Le nombre d'animaux à traiter par ces suppléments nutritionnels rend le traitement au cas par cas impossible dans les grandes exploitations.

Figure 5 : photo de gauche : supplément nutritionnel sous forme de granule sèche. Photo de gauche : distribution de nourriture dans un élevage industriel

L'utilisation des formes galéniques les plus pratiques d'utilisation que sont les granules et les poudres peuvent poser plusieurs problématiques :

La première est celle de la stabilité de la vitamine. Comme nous l'avons vu précédemment, la vitamine A est sujet à la dégradation, notamment par les facteurs environnementaux et les radicaux libres. Sa mise sous forme de granule par le procédé d'extrusion humide peut entrainer une dégradation importante de la molécule. Il est donc important que la vitamine A soit protégée, afin de garder son activité dans le produit fini.

La deuxième problématique est celle de la vectorisation et du dosage. En effet, la vitamine directement rajoutée dans la ration subit le même transit que l'aliment. Afin de rationaliser au mieux le supplément nutritionnel, il est important de définir quelle quantité doit être rajoutée pour quelle quantité absorbée réellement par l'animal.

La dernière problématique concerne surtout l'aquaculture, ou les suppléments nutritionnels doivent avoir une forme galénique compatible avec le milieu où ils sont utilisés, notamment leur flottabilité et leur visibilité dans l'eau.

Synthèse du chapitre : 1er partie : la vitamine A

- La vitamine A est une vitamine liposoluble issus du carotène qui doit être apportée par des sources exogènes : alimentation, compléments alimentaires ou médicaments
- La vitamine A est très utilisée dans les domaines pharmacologique, agro-alimentaire et de la nutrition animale
- Son instabilité et sa sensibilité aux facteurs environnementaux obligent de l'utiliser sous des formes galéniques apportant une stabilité dans le temps et une facilité d'utilisation

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2eme PARTIE : L'encapsulation d'actif : techniques et applications à la vitamine A

I. L'encapsulation d'actif : techniques et applications à la vitamine A

L'encapsulation consiste à piéger un principe actif au sein d'un vecteur particulaire dont la taille est comprise entre quelques dizaines de nanomètres et quelques millimètres. Ces particules sont dispersées dans un véhicule approprié et administrées par différentes voies: orale, nasale, cutanée etc… Le vecteur administré par voie orale remplit des rôles multiples, par exemple :

- Il permet un meilleur confort d'utilisation
- Il assure la protection de la molécule active vis-à-vis des dégradations dans le tractus gastro-intestinal en l'isolant des milieux biologiques traversés
- Il augmente la cinétique de dissolution du principe actif liposoluble en le présentant sous une forme hydrosoluble finement dispersée (forme pulvérulente = poudre)
- Il peut favoriser l'absorption du principe actif à travers la muqueuse intestinale.
- Il peut servir pour le masquage de goûts ou d'arômes non souhaités en alimentaire

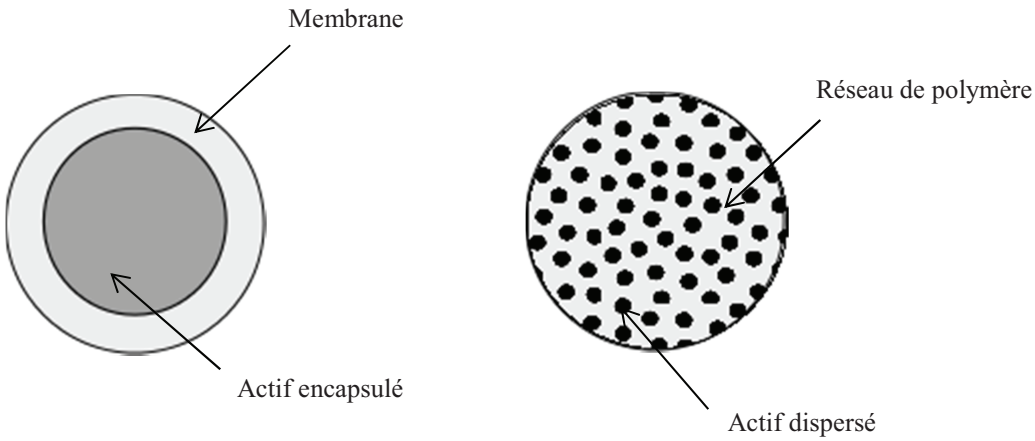
Ainsi, la recherche galénique s'intéresse tout particulièrement à la conception de nouveaux systèmes principe actif/ transporteur, assemblés sous forme de particules.

I.1 La microencapsulation

La microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active. Les microparticules présentent une taille comprise entre environ 1 µm et 1 mm et contiennent typiquement entre 5 et 90 % (en masse) de matière active. Les matières actives sont d'origines très variées : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes, cellules, ou encore catalyseurs de réactions chimiques... Les matériaux enrobant peuvent être des polymères d'origines naturelles (protéines, polysaccharides, polyphénols…) ou synthétiques (hydrocarbures, vinyles….). Les vecteurs obtenus présentent deux types de structure (Richard & Benoit 2000) :

- une structure dite de « **microcapsule** », c'est-à-dire une **particule réservoir** constituée d'un cœur de matière active liquide ou solide, entouré d'une écorce solide continue de matériau enrobant (figure 6, A)

- une structure dite de « **microsphère** », c'est-à-dire une **particule matricielle**, constituée d'un réseau macromoléculaire ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve finement dispersée la matière active, à l'état de molécules, de fines particules solides ou encore de gouttelettes de solutions (figure 6 B).



A : microcapsule (système réservoir, ou *core shell*) B : microsphère (système matriciel)

Figure 6 : morphologie des microparticules. En A : structure en microcapsule. En B : structure en microsphère

Dans les faits, toutes les structures intermédiaires sont possibles et la frontière entre microcapsule et microsphère n'est pas toujours bien définie. Pour ce qui concerne le facteur forme, les microcapsules ne sont pas nécessairement sphériques. Lorsqu'une particule solide est encapsulée, la membrane de la microcapsule épouse généralement les contours de la particule, ce qui conduit à une grande variété de formes. En revanche, la taille est un dénominateur commun à ces systèmes : elle est comprise entre 1 et 1 000 µm. En deçà, on parlera de nanoparticules, au-delà c'est le domaine des mini-granules.

Sur le plan physico-chimique, un certain nombre de facteurs permettront de caractériser la membrane d'une microcapsule ou la matrice d'une microsphère : charge électrique de surface (potentiel zêta), mouillabilité, porosité, degré de gonflement... Pour les

microcapsules, l'épaisseur de la membrane peut également être déterminée. Dans le cas des microsphères, l'état physique de la matière active dispersée dans une matrice polymère ou lipidique est important à déterminer, car il peut influer sur la cinétique de libération de l'actif ou encore sur la stabilité de ce dernier au sein du système.

La production de microparticules s'accompagne fréquemment d'une certaine polydispersité en taille : distribution gaussienne ou apparition de deux ou plusieurs populations. La taille moyenne et la distribution granulométrique vont influer sur des propriétés telles que la libération de la matière active dans le milieu environnant ou la capacité d'écoulement de la poudre.

La teneur en matière active (ou taux d'encapsulation) peut être très élevée dans les microcapsules, de l'ordre de 85 à 90 % (masse de matière active/masse de microparticules). Au contraire, les teneurs habituellement rencontrées dans les microsphères sont plus faibles, de l'ordre de 10 à 50 %.

Sur le plan industriel, la microencapsulation est mise en œuvre pour remplir les objectifs suivants : assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation d'une matière active dans une formulation, réaliser une mise en forme adaptée, améliorer la présentation d'un produit, masquer un goût ou une odeur, modifier et maîtriser le profil de libération d'une matière active pour obtenir, par exemple, un effet prolongé ou déclenché.

II. Les techniques de microencapsulation

Les procédés de microencapsulation sont nombreux et variés. Il existe une classification (Richard & Benoit 2000) selon plusieurs paramètres comme l'utilisation de solvants organiques, le procédé de mise en forme, et les mécanismes chimiques mis en jeux (voir tableau 1).

Les procédés physico-chimiques sont basés sur la maitrise des variations de solubilité et des conditions de précipitation des agents enrobant. Ces variations peuvent être dues par exemple pour la coacervation, à la modification du pH, de la force ionique, du type de solvant

majoritaire du milieu, entraînant une insolubilité de la molécule enrobante. Ce phénomène peut être produit également par l'ajout d'une molécule incompatible (de charge opposée par exemple) entraînant la formation de complexes insolubles. Les changements d'états (fusion ou cristallisation) peuvent être également à l'origine de ce phénomène (gélification thermique).

Tableau 1: procédés de microencapsulation

Procédés chimiques	Procédés physico-chimiques	Procédés physico-mécaniques
▪ Polymérisation interfaciale ▪ Polymérisation en milieu dispersé ▪ Polymérisation radicalaire ou anionique	▪ Coacervation ▪ Evaporation de solvant ▪ Gélification thermique	▪ Atomisation ▪ Gélification des gouttes ▪ Enrobage en lit d'air fluidisé ▪ Extrusion ▪ Procédé basé sur la technologie des fluides supercritiques

Les procédés mécaniques mettent en œuvre des techniques de pulvérisation (spray-drying, spray-coating, spray-cooling), de formation de gouttes ou de gouttelettes (prilling) et d'extrusion.

Les procédés chimiques quant à eux sont basés sur la formation in-situ du matériau enrobant par polycondensation, polymérisation ou polyaddition anionique d'unités monomères. Les agents enrobant ne sont pas ici préformés, comme c'est le cas le plus souvent pour les procédés mécaniques et physico-chimiques, mais l'étape d'assemblage de l'enrobage est conjointe à l'étape d'encapsulation (Richard & Benoit 2000).

Ces procédés s'appliquent aussi bien à des actifs liposolubles qu'hydrosolubles. Dans le cas des procédés physico-chimiques et mécaniques, la formulation des microparticules (microcapsule ou microsphère) met en œuvre des matériaux enrobant d'origines très variées :

- **Les polymères d'origine naturelle**, animale ou végétale, comme par exemple la gélatine, le caséinate de sodium, le chitosan, l'alginate de sodium, les amidons, la cellulose, le xanthane….
- **Les polymères semi-synthétiques** que sont les dérivés d'amidon (octenylsuccinate d'amidons) et les dérivés de cellulose (ethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, carboxymethylcellulose…)
- **Les polymères synthétiques** comme les polymères d'esters acryliques et méthacryliques, le polyéthylène, les copolymères d'acide lactiques etc…
- **Les lipides solides**, tels que les acides gras (acide palmitiques, acide stéariques), les triglycérides d'acide gras et les cires d'origine végétale (cire de Carnauba, cire de Candellila) et animale (cire d'abeille…)
- **Les cires d'origines pétrolières** (dites cires minérales) telle que la paraffine, les composés paraffiniques et les hydrocarbures.

Au cours de ce projet de recherche, c'est le procédé d'encapsulation par atomisation qui a été choisi comme modèle d'étude, en utilisant uniquement des polymères d'origine naturelle (dit biopolymères). C'est ce procédé qui sera présenté plus explicitement dans la suite de ce chapitre.

II.1 Le procédé de microencapsulation par atomisation

La technique d'encapsulation choisie pour ce travail de thèse passe par différentes étapes schématisées dans la figure 7. Un état de l'art succinct décrira ensuite dans les chapitres suivants le principe de chaque étape : l'étape d'émulsification/homogénéisation et l'étape de séchage par atomisation.

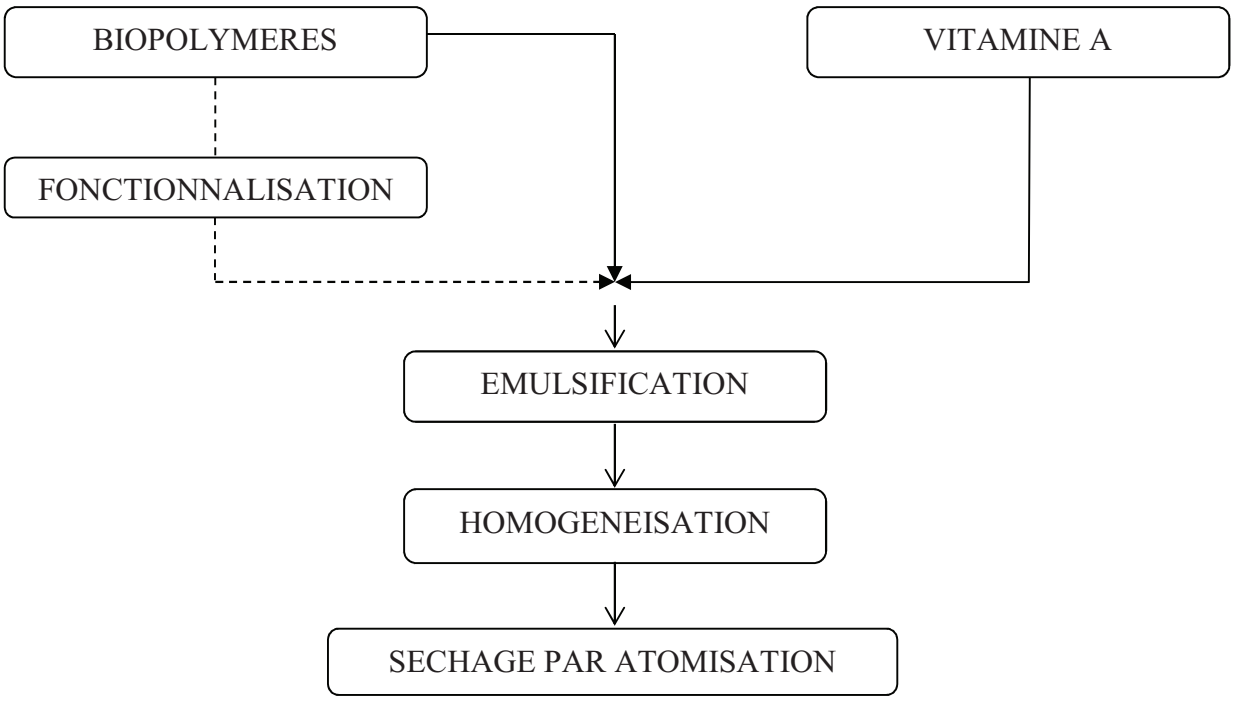


Figure 7 : les différentes étapes de la voie d'encapsulation choisie dans ce projet de recherche

II.1.1 L'étape d'homogénéisation

Ce procédé a été présenté pour la première fois à l'Exposition Universelle de Paris en 1900, par Auguste Gaulin. L'homogénéisation était alors décrite comme un procédé permettant de « fixer la composition des liquides **»,** avec des applications essentiellement dans le domaine de l'industrie laitière. La machine de l'époque était alors centrée autour d'un clapet de détente fabriqué en agate ou le produit était laminé sous une pression de l'ordre de 100 bars (Gravlund 1986).

Depuis, l'opération d'homogénéisation est devenue une étape clé dans différents process des produits liquides ou pâteux alimentaires. C'est un traitement physique au cours duquel un produit liquide ou pâteux est projeté sous forte pression (30 à 1000 bars) à travers une tête d'homogénéisation de géométrie particulière. Sa principale fonction est de participer à la stabilisation des émulsions grasses en phase aqueuse, en permettant de réduire la taille des gouttelettes lipidiques stabilisées par l'émulsifiant. Elle permet ainsi d'obtenir une faible granulométrie au sein d'une émulsion ou d'une dispersion de solides dans la phase liquide.

Dans le cas des émulsions, et selon les propriétés de la matrice alimentaire, la taille des éléments dispersés peut atteindre des dimensions de 0.1 à 5 µm, tandis que pour des dispersions de solides (suspension), l'optimum de dé-agglomération se situe de 0,5 à 3 µm (Lecluse 1979).

Le produit, après être entré le long de l'axe du siège, et rejeté radicalement à angle droit et est laminé dans l'étroite lumière qui sépare le siège et le clapet (ce dernier est décollé de son siège en raison de la pression du produit). Le produit est alors projeté à une vitesse de l'ordre de 100 à 400 $m.s^{-1}$ sur l'anneau de choc avant d'être refoulé à l'extérieur. La contre pression qui est créée par la lumière du clapet est maintenue, soit par un ressort puissant disposé à l'arrière du clapet, soit par un dispositif hydraulique. Le temps de séjour du produit est très court, environs $3x10^{-6}$ secondes (Roustel 2010) (figure 8).

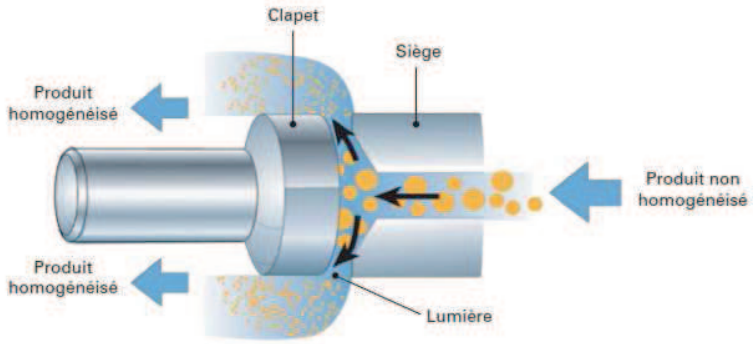


Figure 8 : schémas du principe de l'homogénéisation haute pression (Roustel 2010)

Le mécanisme de réduction des éléments à travers la tête d'homogénéisation peut être expliqué par quatre phénomènes :

- **Le cisaillement**, qui est le résultat du laminage et des variations brutales de vitesse du produit.
- **Les micro-turbulences,** dues aux variations de direction et à l'alternance d'accélération/décélération
- **La cavitation**, qui ne s'applique que pour les dispersions liquide/liquide (type émulsion).

- **Les percussions sur l'anneau de choc**

Les pressions d'homogénéisation mises en œuvre sont différentes en fonction de plusieurs facteurs, dont la proportion de la phase dispersée et de sa nature, le type de matière grasse utilisée, le rapport quantité de matière grasse/quantité d'agent tensio-actif, la température, la viscosité du produit et la position de l'homogénéisateur dans le process.

L'homogénéisation permet des modifications sensibles du produit traité. Elle permet notamment une conservation améliorée, une plus grande aptitude à absorber l'eau, une modification de la texture ou des propriétés rhéologiques (augmentation de la viscosité), une augmentation de la brillance et une modification de la couleur (par une augmentation du phénomène de diffraction de la lumière à cause de la diminution de la taille des agents dispersés) (figure 9) (Roustel 2010).

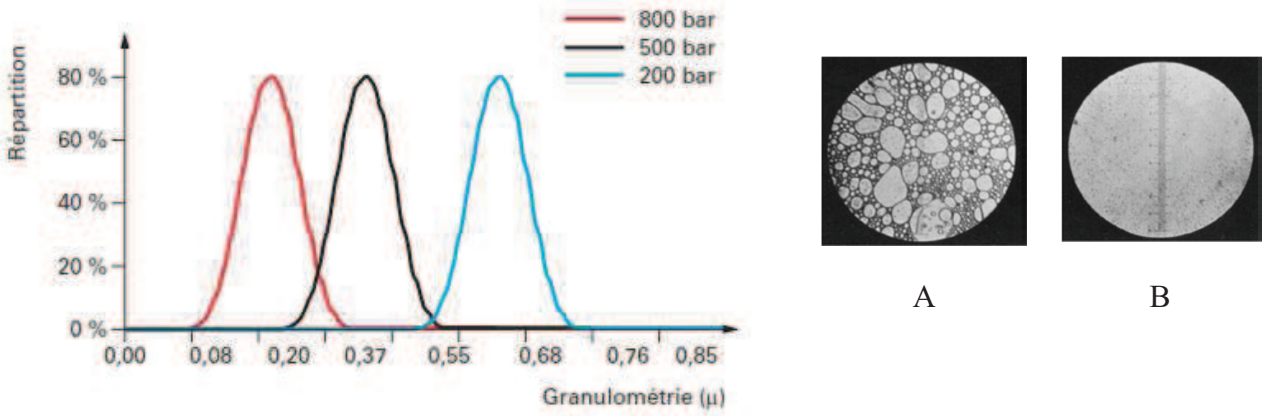


Figure 9 : évolution de la granulométrie du lait suivant la pression appliqué pendant l'étape d'homogénéisation pression. A droite, produit avant homogénéisation (A) et après homogénéisation (B)

Les émulsions formulées et homogénéisées sont ensuite séchées par le principe de l'atomisation, décrit dans le chapitre suivant.

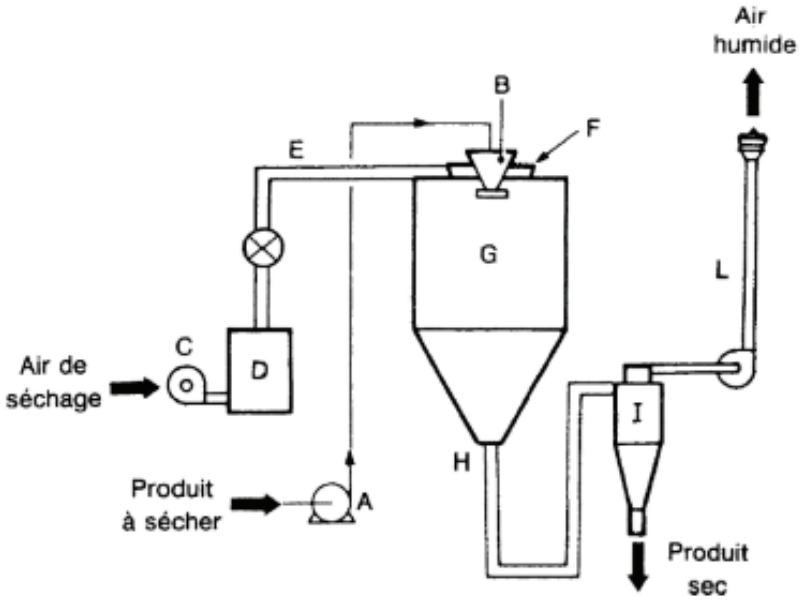
II.1.2 L'étape de séchage par atomisation

Le procédé de nébulisation/séchage est un procédé continu en une seule étape qui permet de transformer une formulation liquide initiale en une forme micro particulaire sèche (forme pulvérulente) (figure 10). La formulation liquide initiale peut être constituée :

- soit d'une solution de matière active et de matériau enrobant
- soit d'une dispersion de particules solides de matière active dans une solution ou une émulsion de matériau enrobant
- soit encore d'une émulsion de matière active dans une solution de matériau enrobant

Ce procédé comprend les 4 étapes séquentielles suivantes :

- **La nébulisation** de la formulation liquide initiale pour former un aérosol ;
- **La mise en contact de l'aérosol avec un flux d'air**, porté à une température contrôlée ;
- **Le séchage rapide** de l'aérosol pour former des microparticules solides ;
- **La séparation de la poudre** de microparticules et de l'air contenant le solvant vaporisé.



A : pompe d'alimentation de la solution
B : atomiseur (turbine ou buse)
C : ventilateur d'entrée d'air
D : réchauffeur d'air
E : entrée d'air
F : diffuseur d'air
G : chambre de séchage
H : prise de l'extraction de l'air humide
I : cyclone
J : cheminé d'évacuation

Figure 10 : schéma du principe d'une tour d'atomisation (Charreau & Cavaillé 2012)

L'appareillage est classiquement constitué d'une haute tour, au sommet de laquelle la formulation liquide initiale est nébulisée. La nébulisation s'effectue soit par passage à travers une buse d'atomisation pneumatique ou ultrasonore, soit par un système de type système tournant (turbine ou buse rotative) (voir figure 11). Les microgouttelettes formées entrent en

contact avec un flux d'air établi à co-courant (ou à contre-courant), préalablement filtré et chauffé. Les microparticules se forment dans la chambre de dessiccation par vaporisation rapide et entraînement du solvant. Elles sont collectées à la base de cette chambre après séparation du flux d'air par passage dans un cyclone. Le procédé peut être mis en œuvre à partir de formulations en phase aqueuse ou en phase organique. Dans ce dernier cas, pour des raisons de sécurité et de conformité vis-à-vis des réglementations relatives aux émissions de composés organiques volatils (COV), le solvant vaporisé, qui est transporté par le flux d'air, est condensé et recueilli après le cyclone, avant évacuation de l'air (Masters 1985).

Figure 11 : type de pulvérisateur-disperseur-atomiseur rencontrés dans les procédés d'atomisation : à gauche une turbine, à droite une buse mono fluide (NIRO)

La taille moyenne des microparticules obtenues par atomisation est typiquement comprise entre environ 1 µm et 50 µm, pour un séchage à cocourant. Le séchage à contre-courant permet d'obtenir des microparticules de taille moyenne plus élevée, comprise entre environ 50 et 200 µm, car celles-ci résultent alors de l'agrégation de plus petites particules. La distribution granulométrique est large avec des écarts-types du même ordre de grandeur que la valeur moyenne du diamètre moyen. Le taux d'encapsulation est limité à environ 40 % (en masse). Le rendement de production (rapport masse de microparticules recueillies / masse de matière sèche dans la formulation initiale) est couramment compris entre 80 % et 98 %, les principales pertes provenant de l'adhésion des microparticules sur les parois de la chambre de dessiccation et du conduit de transfert entre la chambre et le cyclone.

La morphologie des microparticules obtenues est le plus souvent de type microsphère, avec une forme sphérique quelquefois perturbée par la présence de défauts ou déformations tels que des cratères ou des structures spongieuses. Il en résulte une structure microsphère (actif dispersé dans une matrice de polymère). Le procédé d'atomisation est un procédé

facilement industrialisable, bien que la transposition d'échelle du laboratoire à la production demande la maîtrise de nombreux facteurs. Il s'agit aussi bien de facteurs liés à la formulation tels que la concentration en matière active ou en matériau enrobant, le taux global de matière non volatile dans la formulation (entre environ 3 % et 40 % m/m), la viscosité de la formulation, que de paramètres de procédé tels que la température d'entrée d'air (entre 40 °C et 200 °C), ou le débit de la formulation à nébuliser et sécher (entre 3 ml/min et plusieurs litres par minute) (Masters 1985).

Ce procédé est un procédé d'encapsulation basé sur une technologie déjà bien établie, de coût relativement faible, qui nécessite un équipement bien connu et déjà utilisé dans de nombreux secteurs industriels (agroalimentaire, pharmaceutique et chimique) (Gouin 2004)

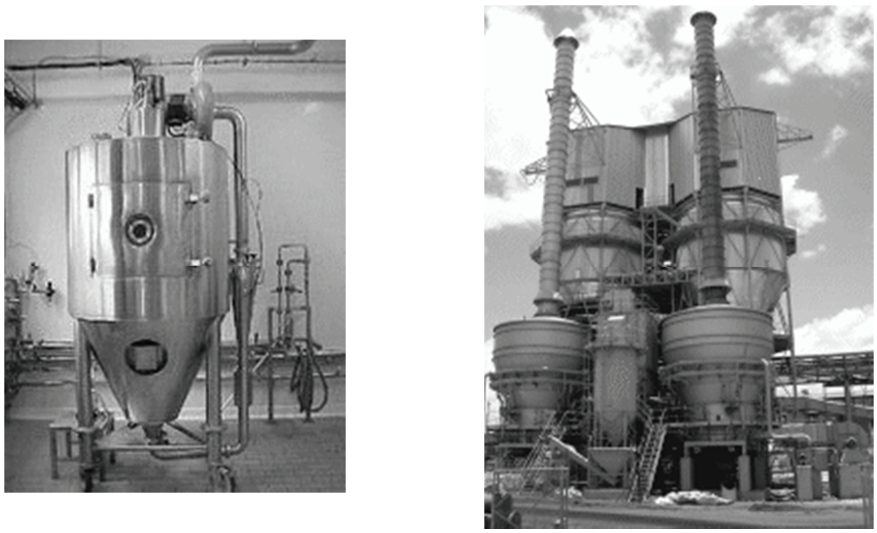


Figure 12 : exemple de tour d'atomisation semi-industrielle (à gauche) et industrielle (à droite) (Drytech International)

III. Application des techniques de microencapsulation à la vitamine A

La littérature concernant l'encapsulation appliquée au domaine alimentaire et à la nutrition animale est prolifique, et la vitamine A est souvent cité comme exemple d'actif liposoluble à protéger. Le but d'encapsuler de la vitamine A est souvent d'améliorer sa solubilité dans les milieux aqueux, sa stabilité au cours du temps, et de contrôler sa vectorisation jusqu'au site d'absorption des lipides : l'intestin grêle.

Pour améliorer sa solubilité, différentes méthodes ont été explorées, mais la plus commune est celle d'intégrer la molécule de vitamine A au sein d'un polymère hydrophile, comme une protéine, un liposome ou une cyclodextrine. Par exemple, la solubilité dans l'eau d'un ester de vitamine A a été multipliée par 100 après la complexation avec une β-cyclodextrine (Qi & Shieh 2002), et a été multipliée par plus de 10 000 après la complexation avec une β-cyclodextrine modifiée (l'hydroxypropyl β-cyclodextrine) (Lin *et al.* 2000). D'autre travaux ont utilisé les cyclodextrines comme vecteur pour la vitamine A (Lin et *al.* 2007 ; Munoz-Botella *et al.* 2002), mais l'utilisation de telles molécules est limitée par leurs faibles capacités à se charger en vitamine et par leurs prix d'achat souvent plus élevés que d'autres polymères naturels.

L'association de la vitamine A avec d'autres biopolymères a été reportée, comme par exemple les protéines (Puyol *et al.* 1995), la gliadine (Ezpeleta *et al.* 1996), l'ethylcellulose (Markus & Pelah, 1989), la gélatine (Markus & Pelah 1989) ou le chitosan (Kim *et al*. 2006). Plusieurs formulations à base de polymères synthétiques ont également été testées, notamment une à base de poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) (Cirpanli *et al.* 2005) qui a été accepté par la FDA (Food and Drug Administration).

Une autre méthode d'encapsulation souvent utilisé pour les vitamines liposolubles en générale est l'encapsulation par émulsification. Ces émulsions peuvent être directes (huile dans eau, ou H/E), inverses (eau dans huile, ou E/H) ou multiples (eau dans huile dans eau, ou E/H/E). L'étude de Yoshida *et al.* (1999) a montré que la stabilité de la vitamine A était meilleure dans le temps dans une émulsion multiple : après un stockage pendant 4 semaines à 50°C, 60% de rétinol de départ a été retrouvé dans l'émulsion multiple, 46% dans l'émulsion inverse et 32% dans l'émulsion directe. L'effet de stabilisation de l'émulsion multiple peut

être attribué à l'exclusion de l'oxygène de la phase lipidique par l'ajout d'une couche d'eau (Yoshida *et al.* 1999).

Pour obtenir des particules solides contenant de la vitamine A, la technique la plus communément utilisé est l'atomisation (de Vos *et al.* 2010 ; Gharsallaoui *et al*. 2007) avec comme molécule enrobant plusieurs choix possibles dans la famille des polysaccharides et des protéines (Gharsallaoui *et al.* 2007). Une autre technique, utilisant des lipides comme matériaux enrobant (spray-chilling), a été utilisée dans l'étude de Jee *et al.* (2006) et de Jenning & Gohla (2001). Mais cette technique, d'après la dernière étude, ne donne pas des résultats satisfaisant sur la conservation à long terme de la vitamine A (étude effectuée sur 5 mois).

La vitamine A peut également être intégrée dans des structures de type liposome, avec un haut taux d'encapsulation (95% m/m) (Lee *et al.* 2002). Plusieurs études utilisent cette technique qui fait intervenir de multiples membranes concentriques stabilisées par des lipides polaires ayant des caractéristiques d'auto assemblage (comme les phospholipides, par exemple) (Arsic & Vuleta 1999) (Singh & Das 1998) (Tesoriere *et al.* 1997). Ce type de formulation est d'ailleurs commercialisé (Keller, 2001).

Des formulations plus complexes mariant plusieurs techniques sont également décrites, comme une émulsion multiple H/E/H stabilisée par des particules de silice (Lee *et al.* 2001), ou des liposomes contenant des β-cyclodextrines piégeant du palmitate de rétinol (McCormack & Gregoriadis, 1998).

Toutes ces techniques d'encapsulation sont résumées dans le tableau ci-dessous (tableau 2), avec leurs avantages et leur inconvénients, inhérents à la formulation ou à la technique elle-même.

Tableau 2 : principaux types de particules utilisées pour l'encapsulation de la vitamine A pour une application en agro-alimentaire (adapté de Sauvant *et al.* 2012)

Type de particule	Avantages	Inconvénients
Particule solide (atomisation ou spray chilling)	Technique simple et peu onéreuse	Contrôler la formulation des polymères utilisés dans la formulation pour permettre la stabilité de l'encapsulation
Complexe moléculaire (cyclodextrine)	Possible modification des cyclodextrines pour amélioration de la solubilité	Capacité d'encapsulation limitée, et coût élevé
Emulsion (directe, inverse, multiple)	Taille de gouttelettes variable suivant l'application Possibilité d'utiliser une huile riche en anti-oxydant	Partition de la vitamine A entre la phase aqueuse et la phase lipidique suivant la formulation Possible oxydation de l'huile La stabilité du rétinol dépend de la présence d'impureté dans l'huile, comme des péroxydes
Liposomes	Possibilité d'inclure des liposomes dans des capsules, des comprimés et des hydrogels Biocompatibilité, biodégradabilité et structure non toxique Propriété de certains phospholipides pouvant prévenir la dégradation oxydative de la vitamine A	La dégradation de la vitamine A est fonction de la phase cristalline du lipide utilisé Technique complexe et onéreuse

Assurer une bonne rétention et une stabilité accrue de la vitamine A n'est pas le seul objectif de l'encapsulation. La vitamine doit être libérée au plus près de son site d'action, ou de son site d'absorption. La voie de vectorisation sur laquelle se concentre ce travail étant la voie orale, la suite de cette étude se focalisera sur l'ingestion des particules par voie orale et les études comportementales dans des milieux de digestions. Très peu d'étude ont été faite sur le relargage de la vitamine A dans des conditions mimant celles du tractus gastro-intestinal.

Dans leurs travaux, Ezpeleta *et al.* (1996) ont montré que la trypsine était capable d'hydrolyser les nanoparticules de gliadine encapsulant la vitamine A, avec seulement 10% des particules encore intacte après 3h en présence de l'enzyme. Mais aucune analyse du relargage de la vitamine A n'a été effectué dans ces conditions.

Markus & Pelah (1989) porte sur l'utilisation de vitamine A encapsulée pour la nutrition animale. Ces travaux montrent que la vitamine A encapsulée dans des particules de gélatine est relarguée à hauteur de 30% dans le premier estomac des ruminants après 48h d'incubation, ce qui est approximativement le temps que la vitamine nécessite pour traverser les 4 estomacs jusqu'à l'intestin, site d'absorption. L'utilisation de particules à base d'ethylcellulose permet d'éviter ce relargage, ce qui est dû au temps plus important que prennent les ruminants pour dégrader les composés cellulosiques (Markus & Pelah, 1989).

Des études un peu plus nombreuses ont été effectué sur l'amélioration de l'absorption de la vitamine A grâce aux procédé d'encapsulation, sans étudier vraiment le comportement du vecteur utilisé. Pour cela le principe actif est dosé dans le sang ou dans l'organe de stockage après la prise d'une quantité connue d'actif, encapsulé ou non.

Les informations concernant l'absorption orale de vitamine A sont assez peu nombreuses dans la littérature. Une émulsion directe de palmitate de rétinol dans de l'huile de colza a été comparé à une solution aqueuse de la même vitamine, sur des rats présentant des carences sévères ou modérées en vitamine A. Les résultats montrent que l'émulsion est plus efficace dans le cas d'une déficience sévère et permet de diminuer les symptômes plus rapidement (Grolier *et al.* 1995).

Une autre étude plus récente (Taha *et al.* 2007) a montré que l'utilisation d'ester de vitamine A encapsulée permettait de multiplier par deux la biodisponibilité de la vitamine en comparaison avec une solution huileuse non encapsulée.

Synthèse du chapitre : 2eme partie : l'encapsulation d'actif : techniques et application à la vitamine A

- La technique d'encapsulation par émulsion et atomisation est adaptée à la formulation de microsphères d'actifs liposolubles
- Cette technique permet d'utiliser un large panel de polymères encapsulants, et plus spécialement des biopolymères d'origine naturelle
- La vitamine A a déjà été formulée sous diverses formes d'encapsulation afin d'améliorer sa stabilité dans le temps et sa solubilité
- L'encapsulation de la vitamine A permet également d'améliorer sa biodisponibilité

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

3eme PARTIE : Le parcours digestif des microparticules et le relargage de l'actif

I. Le parcours digestif chez les monogastriques : présentation rapide

Comme évoqué précédemment, l'ingestion par voie orale est la voie la plus confortable et efficace pour la prise de compléments alimentaires. Le vecteur permettant d'apporter la molécule active à son site d'absorption doit être conçu en prévision des différents milieux et contraintes qu'il peut rencontrer.

Le modèle de notre étude est la vectorisation d'un actif liposoluble (la vitamine A), chez les monogastriques. Le but étant d'amener le vecteur jusqu'au site d'absorption spécifiques des actifs liposolubles : l'intestin grêle. Dans cette partie seront présentées les différentes étapes du parcours digestifs que rencontrera la microsphère avant d'arriver à sa destination finale (figure 13).

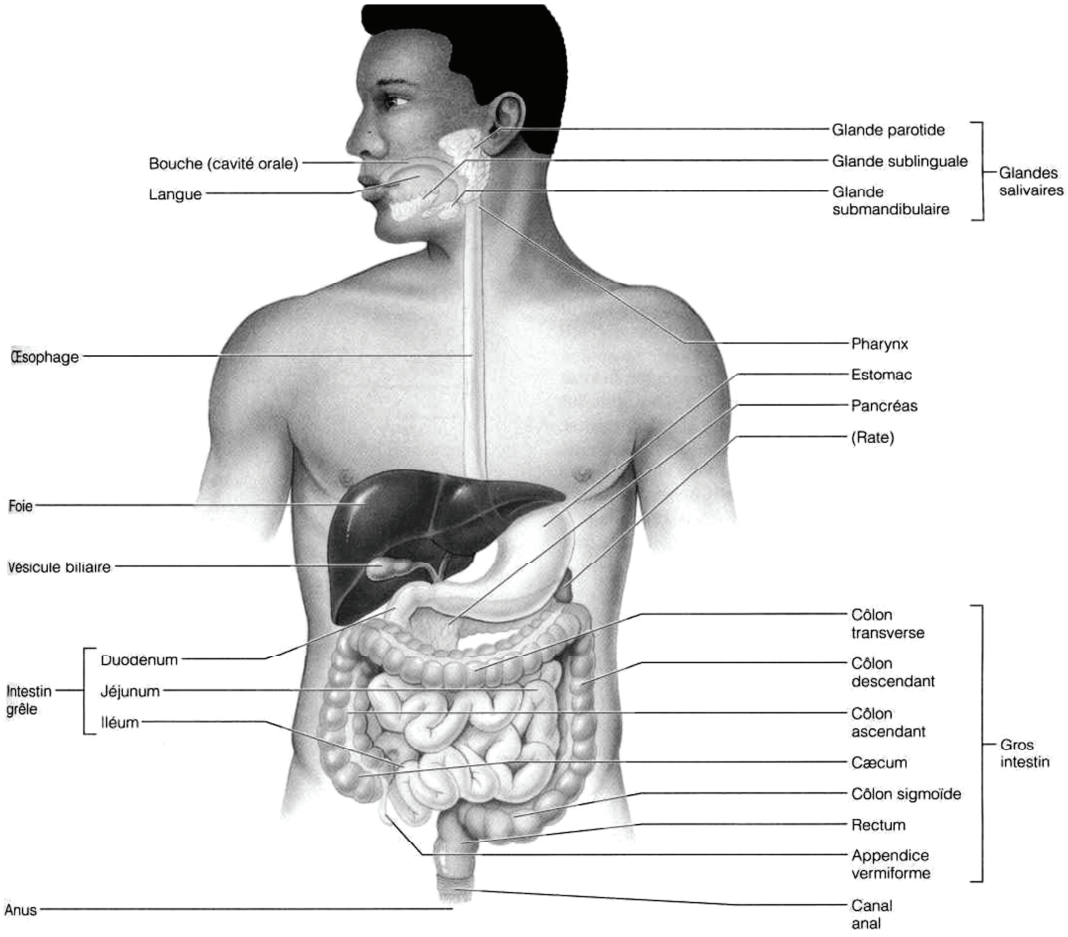


Figure 13 : anatomie du système digestif (Marieb 1999)

I.1 la phase buccale

Chez l'homme, la digestion buccale sert à l'imprégnation du bol alimentaire par la salive, le broyage des aliments par les dents et la langue, et l'hydrolyse partielle de l'amidon par l'amylase salivaire. La salive humaine a un pH d'environ 6.8 proche du pH optimum de l'amylase à pH 7 (Humphrey & Williamson 2001).

I.2 La digestion gastrique

Le bol alimentaire passé par la cavité buccale tombe directement via l'œsophage dans l'estomac. Le milieu gastrique est un milieu extrêmement agressif, avec un pH compris entre 1 et 2 à jeun, qui peut augmenter jusqu'à 5 après la prise d'un repas. L'acidité de l'estomac est due à la présence d'acide chlorhydrique. Les particules alimentaires sont propagées et mélangées avec les secrétions gastriques grâce à l'action des vagues contractiles. La sécrétion gastrique, 2 à 2.5 litre par jour, contient de l'acide chlorhydrique, des enzymes protéolytiques (pepsinogène, produit une pepsine), une lipase et du mucus (McClements & Li 2010) (Shing & Sarkar 2011). A la fin du temps gastrique, les aliments constituent avec les sécrétions un mélange semi liquide, le chyme, contenant environs 50% d'eau. L'estomac est normalement vidé en 1 à 4 h. Ce temps de vidange est très dépendant de la qualité et de la quantité des aliments ingérés. Par exemples les glucides quittent l'estomac plus rapidement que les protéines ou les lipides.

I.3 La digestion entérique

L'intestin grêle est divisé en plusieurs segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La plupart des phénomènes digestifs sont réalisés dans le duodénum, les autres segments participent principalement à l'absorption des nutriments.

Le chyme gastrique acide est éjecté, à travers le pylore, par pulses de quelques millilitres dans le duodénum. Là, le chyme est mélangé avec les sécrétions duodénales, pancréatiques et biliaires. Le chyme traverse l'intestin à une vitesse de 1 cm/min et prend 3 à

10 h pour atteindre la valvule iléocaecale (excrétion). Les sels biliaires, par leurs propriétés émulsifiantes, permettent la digestion et l'absorption des lipides**.**

Les sécrétions, constitués principalement de bile, sont sécrétées par le foie, puis collectées et concentrées dans la vésicule biliaire. L'excrétion dans le duodénum se fait sous l'action de la cholécystokinine, elle-même stimulée par la présence de lipide dans le tube digestif. Les sécrétions pancréatiques comportent deux composantes : une séreuse (trypsine, chymotrypsine, carboxypolypeptidase, ribonucléase, desoxyribonucléase) et l'autre hydro-minérale (eau et sel minéraux). Les enzymes protéolytiques sont sécrétées sous forme de proenzymes activées par l'entérokinase, elle-même sécrétées par la muqueuse intestinale en réponse à la présence du chyme dans la lumière. La sécrétion hydrominérale, sous l'influence de la sécrétine, neutralise l'acidité du chyme : le pH est ramené à 5.5 – 6 (Golding *et al.* 2009) (Singh *et al.* 2011).

II. L'absorption des molécules liposolubles

L'entrée des lipides et de composés liposolubles dans le duodénum stimule la libération d'entogastrone, hormone qui inhibe la sécrétion et la motricité gastrique et donc ralentit la vidange gastrique, donc la délivrance des graisses vers le duodénum. La vidange gastrique d'un repas riche en lipide peut prendre 4 à 6 h chez un individu normal.

Chez les monogastriques, la majeure partie de la digestion des composés liposolubles s'effectue dans l'intestin grêle. La digestion repose sur l'action lipolytique de la lipase pancréatique qui se trouve déversée par l'arrivé des lipides dans l'intestin grêle avec une sécrétion accrue de suc pancréatique (1 l/j chez l'homme, 7 à 8 l/j chez le porc par exemple). Les sécrétions pancréatiques ont une teneur en matière sèche variant de 1 à 10 % et son pH est légèrement alcalin, qui favorise la lipolyse qui ne peut s'effectuer qu'à un pH relativement alcalin (entre 6 et 8) (Singh *et al.* 2002).

La sécrétion pancréatique contient différentes enzymes lipolytiques dont la plus importante est la lipase. Il s'agit d'une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 45 000 Da. Le second facteur impliqué dans la digestion des lipides est la bile. Secrétés par le foie, les éléments essentiels pour la digestion des lipides sont les sels biliaires. Ils sont synthétisés par les hépatocytes à partir du cholestérol. Ils sont constitués en partie égale d'acide choliques et

d'acide chénodéoxycholique qui sont conjugués soit à la glycine, soit à la taurine, pour donner des acides glyco- et taurocholiques qui sont sécrétés dans le duodénum (figure 14).

Chez l'homme le foie fabrique environs 0.5 g de sels biliaires par jour. Au pH de l'intestin grêles, ils sont sous formes ionisées, donc sous forme de sel de sodium. Les acides biliaires, ou sels biliaires ont pour rôle principal l'émulsification des lipides grâce à leurs propriétés amphiphiles (Golding *et al.* 2010).

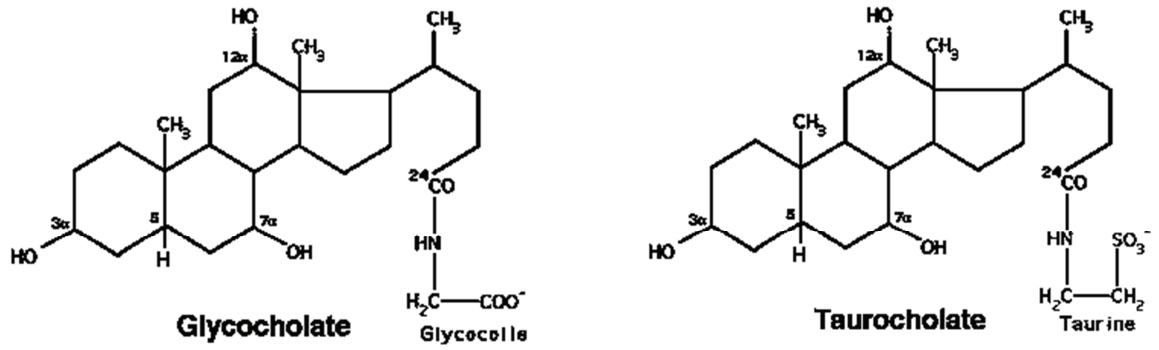


Figure 14 : structure des deux principaux sels biliaires

La quasi-totalité des sels biliaires est réabsorbée de façon active par l'iléon. Il y a donc un cycle entérohépatique des sels biliaires, une molécule faisant en moyenne une vingtaine de cycle avant d'être éliminée par les fèces.

La formation de micelle grâce aux propriétés émulsifiantes des sels biliaires permet l'absorption des acides gras, des mono glycérides issues de la lipolyse des triglycérides. Cette absorption se fait par diffusion au niveau des membranes des entérocytes.

III. Le mucus intestinal : généralités

Une étape importante de la vectorisation des particules jusqu'au relargage est celle du temps de résidence au plus près du site d'absorption. Comme vu précédemment, l'intestin grêle est le site d'absorption des lipides. L'objectif est donc de rallonger le temps de résidence des microsphères au sein du mucus intestinal afin de tenter d'augmenter la biodisponibilité de l'actif relargué.

L'épithélium intestinal est composé de *villi* (structure en brosse) qui augmentent la surface d'absorption gastro-intestinale jusqu'à 300-400 m². Les entérocytes (cellules qui vont absorber les molécules) et les cellules sécrétrices de mucus constituent la majeure partie des *villis.* Des régions dites lymphoïdes, les zones de Peyers, sont recouvertes par des cellules M, spécialisées dans la détection d'antigène. Leurs rôles est majoritairement immunitaire. Le mucus a pour rôle de protéger les parties exposées des cellules épithéliales dans la lumière de l'intestin, en captant les pathogènes et en les éliminant rapidement. Il a aussi un rôle de lubrification du tractus digestif (Ensign *et al.* 2012).

III.1 Les mucines : protéines du mucus intestinal

Le mucus est un gel hydraté formé essentiellement par une glycoprotéine particulière : la mucine. Les mucines sont des glycoprotéines de hauts poids moléculaires, qui diffèrent chimiquement et structurellement des autres glycoprotéines. Le squelette protéique est composé d'un haut taux de serine, thréonine, alanine, glycine et proline, et d'un faible taux d'amino-acides aromatiques. La chaîne oligosaccharidique représente 50 à 80% du poids de la glycoprotéine. Les chaines de polysaccharides sont constituées de 1 à 20 monosaccharides de type galactose, fucose, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine et d'acide N-acetylneuraminique (acide sialique). Ces oligosaccharides sont liés de façon covalente avec une liaison labile O-glycosidique au hydroxy-amino acide sérine et thréonine. L'acide sialique et le L-fucose sont principalement situés en bout de la chaîne polysaccharidique. Il peut exister aussi une N-glycosylation sur l'amine du résidu asparagine.

Les résidus de type sucre sont directement reliés au squelette protéique de la mucine, par un motif répété de Gal β(1-3) et GlcNac β (1-4) terminé par GalNac, galactose, fucose, acide sialique ou des groupements sulfates (Ensign *et al.* 2012) (figure 16).

Le recouvrement des mucines par les chaines de polysaccharides est dense : environs 25-30 chaines pour 100 acides aminés. Les mucines peuvent être séparées en 2 familles : les mucines ancrées aux cellules, qui ont un domaine transmembranaire les reliant à la membrane des cellules épithéliales, et les mucines sécrétées. Cela engendre une structure en bicouche du mucus avec une couche adhérente aux cellules et une couche « éphémère » en surface (voir figure 15).

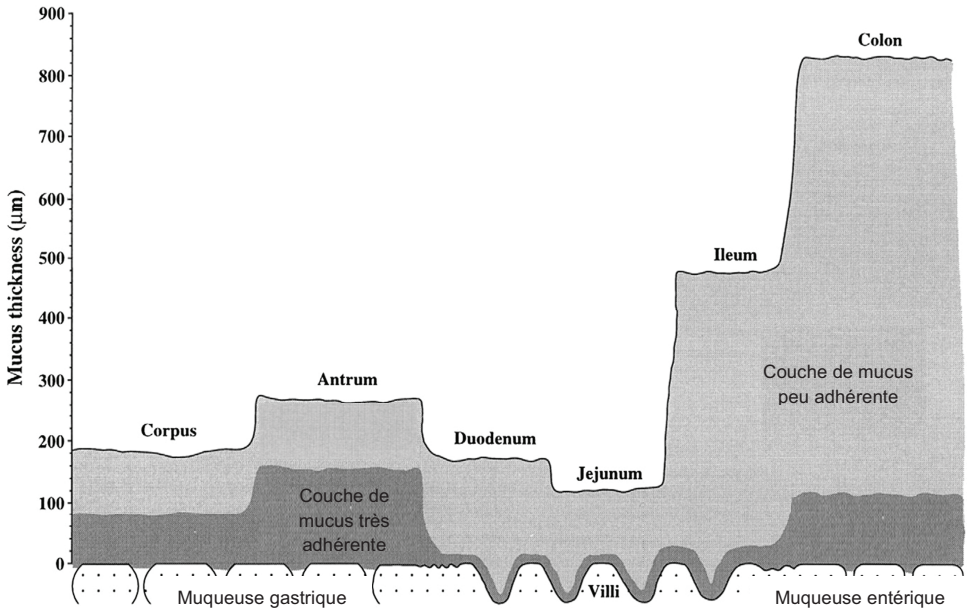


Figure 15 : structure en bicouche et épaisseur variable du mucus intestinal (Ensign *et al.* 2012)

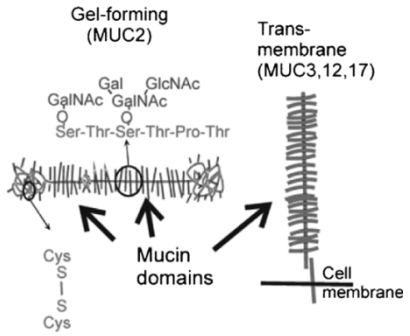


Figure 16 : structure des glycoprotéines (Ensign *et al.* 2012)

Le poids moléculaire des mucines varie entre 5000 Da et 50 000 Da. Elles sont structurées en 4 sous unités reliées entre elles par des ponts disulfures. Ces zones de pontage entre les sous unités sont des zones riches en pont disulfure et correspondrais au zones nues, sans chaîne de polysaccharide. Les fibres de mucines ont un diamètre de 3-10 nm de diamètre (voir figure 16) (Samuel *et al.* 2009). Le tableau 3 présente les principales caractéristiques du mucus intestinal.

Tableau 3: compositions et caractéristique du mucus

Caractéristiques	Informations	Référence
Composition	Eau (95-99.5%) Glycoprotéine (95%) Lipide (1-2%) / 20%/ 37% ADN (0.02%) Minéraux (1%) Protéine libre (immunoglobuline etc…) et débris cellulaire	**Samuel *et al.* 2009** **Ensign *et al.* 2012**
Epaisseur	Duodénum : 154 µm Jejunum : 108 µm Ileum : 447 µm Colon : 714 µm	**Ensign *et al.* 2012**
Rhéologie	Macro-rhéologie : gel visco-élastique, viscosité non-Newtonienne, forte résistance pour de faible déformation, et faible résistance à des déformations importantes Micro-rhéologie : fluide basse viscosité	**Samuel et *al.* 2009**
Charge globale	Négative faible à pH neutre	**Sigurdsson *et al.* 2013**
Caractère hydrophobe/hydrophile	Hydrophobe de par sa composition en lipide Hydrophile de par sa composition en glycoprotéine Zone sans glycoprotéine fortement hydrophobe	**Sigurdsson *et al.* 2013**
Taille des pores/maillage du gel	< 1.09 µm	**Khanvilkar et *al.* 2001**
Renouvellement	24-48h 47-270 min chez le rat	**Khanvilkar *et al.* 2001** **Sigurdsson *et al.* 2013**

III.2 Le phénomène de mucoadhésion

La mucoadhésion (ou bio-adhésion) peut être définie comme l'état ou deux matériaux, avec au moins l'un d'eux d'origine biologique, sont liés entre eux pour une période donnée par des forces interfaciales. Dans le domaine qui nous intéresse, quand l'adhésivité se fait avec un mucus, le phénomène est appelé mucoadhésion.

III.2.1 Les interactions particules/mucus

Il existe plusieurs types d'intéraction possible entre la particule arrivées jusqu'à la surface de l'intestin et le mucus qui la tapisse, qui sont dépendant à la fois de la composition de la particule et de celle du mucus :

Les interactions ioniques : quand deux ions de charges opposées s'attirent mutuellement via des interactions électrostatiques pour former des liaisons solides (dans un sel par exemple)

Les liaisons hydrogènes : quand un atome d'hydrogène, lié de façon covalente avec un atome comme l'oxygène, le fluor ou l'azote, obtient une charge légèrement positive et est attiré par un atome électronégatif. La liaison hydrogène est en général moins solide que l'interaction ionique ou la liaison covalente.

La liaison de Van der Waals, une des liaisons le plus faibles, mettant en jeu des dipôles dans des molécules polaires.

Les liaisons hydrophobes : se produisent quand des groupes non-polaires se retrouvent en solution aqueuse. Les molécules d'eau forment des liaisons hydrogène entre elles et les groupements polaires, ce qui amène les groupements apolaires à s'associer entre eux pour former un système stable.

La liaison covalente : quand il y a un partage d'électrons entre deux atomes (liaison la plus « solide »)

III.2.2 Les théories de la mucoadhésion

Plus généralement l'étude des interactions particules/mucus a donné lieu à plusieurs théories qui reprennent le principe des liaisons vu plus haut, mais en les adaptant aux structures spécifiques des particules (Smart 2005) :

La théorie électronique : suggère un transfert d'électron pendant le contact entre les deux surfaces adhérentes de par leurs différences de charges électroniques

La théorie d'adsorption décrit l'attachement des deux matières adhésives par des liaisons hydrogènes et des liaisons de Van der Waals. Elle a été proposée comme la force la plus importante dans les interactions bio-adhésives.

La théorie d'interpénétration (ou de diffusion) décris l'interpénétration des chaînes de polymère dans une surface adhésive. Ce procédé est induit par les gradients de concentration et est affecté par la structure des chaînes moléculaires et leurs mobilités. La force de l'interpénétration est dépendante du coefficient de diffusion et du temps de contacte.

De par sa relative complexité, le phénomène de mucoadhésion ne peut être décrit uniquement par ces trois théories. On considère que plusieurs scénarii sont possibles pour l'adhérence d'une particule. Le scénario qui se rapproche le plus de notre problématique est celui d'une particule complètement hydratée dans la lumière de l'intestin en contact avec une couche substantielle de mucus intestinal.

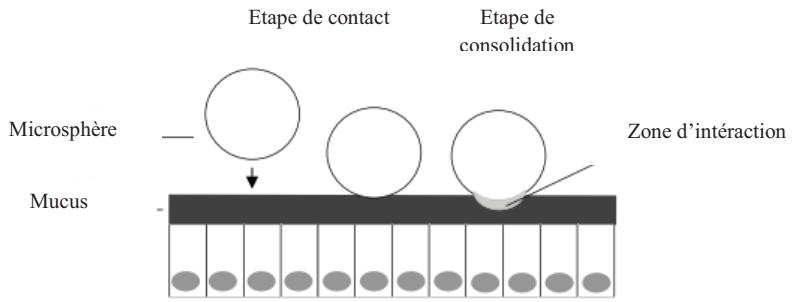


Figure 17 : étape de la mucoadhésivité d'une particule (Smart 2005)

Deux étapes du processus d'adhésion ont été identifiées (voir figure 17):

Etape 1 : l'étape de contact : contact intime entre la particule et la couche de mucus. Le milieu gastro-intestinal est un exemple de mucus inaccessible où la particule ne peut être placée directement sur la surface visée ou déposée directement par un procédé d'injection. Pour des particules de taille importante, en général, les mouvements péristaltiques peuvent aider la particule à rentrer en contact avec la couche de mucus. Pour une particule plus petite s'approchant d'une surface, elle peut être soumise à des forces de répulsion ou d'attraction. La puissance relative de ces deux types d'interactions opposées est dépendante de la nature de la particule, la nature du milieu aqueux, la distance entre la particule et le mucus.

Etape 2 : l'étape de consolidation : implique des interactions physicochimiques diverses et variées pour consolider de façon forte le joint adhésif, pour prolonger l'adhésion. Le matériel muco-adhésif adhère plus fortement à des surfaces solides (comme le mucus) quand ce dernier est activé par la présence d'humidité. L'humidité plastifie le système, libère les molécules et permet des interactions de type van der Waals ou hydrogènes. Les liaisons chimique ou physique impliquées dans la mucoadhésion sont par nature très hétérogènes et il est extrêmement difficile d'identifier parfaitement celles en jeu.

Il y a essentiellement deux théories qui expliqueraient les méta-phénomènes en jeu dans la phase de consolidation :

La première théorie est celle de l'interpénétration des chaînes de polymère, (voir figure 18) induisant que la molécule muco-adhésive interpénètre les molécules de mucines et se lie avec le mucus. Les facteurs rhéologiques des polymères hydratés sont donc des facteurs déterminants.

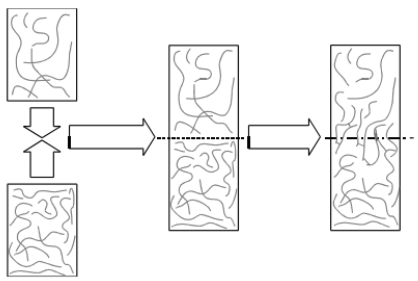


Figure 18 : principe de l'interpénétration entre deux polymères. (Smart 2005)

La deuxième théorie est celle de la déshydratation. Quand une particule capable d'une gélation rapide dans un environnement aqueux est mise en contact avec la couche de mucus hydratée (que l'on peut considérer comme un gel), alors un mouvement d'eau se créé entre les deux gels, jusqu'à ce que l'équilibre se produise. Un gel avec une forte affinité pour l'eau, rentrant en contact avec la couche hydratée de mucus, va rapidement déshydrater ce dernier en produisant une force de consolidation importante à l'interface. Cette théorie n'est valable que si la particule n'est que faiblement hydraté pendant sa phase de contact avec le mucus (figure 19).

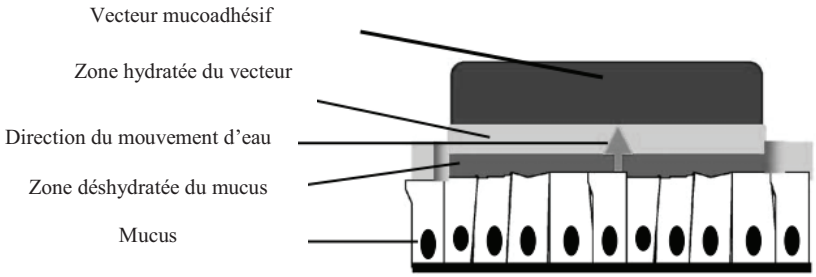


Figure 19 : schéma de la théorie de la déshydratation du mucus (Smart 2005)

III.2.3 Les interactions fortes particule/mucus : les ponts disulfures

Les biopolymères ayant des groupements thiols, aussi appelé thiomer sont le plus souvent des biopolymères hydrophiles comme les poly-acrylates ou le chitosan. A un niveau moléculaire, la capacité muco-adhésive des thiomers est possible grâce à l'interaction entre le eux et les zones riches en cystéines du mucus. Cette interaction aboutie à une liaison de type « pont disulfure » qui est une liaison covalente forte. Il peut y avoir un remplacement d'une chaîne de mucine par le polymère, ou la création d'un pont disulfure par réaction d'oxydation (voir figure 20) (Leitner *et al.* 2003).

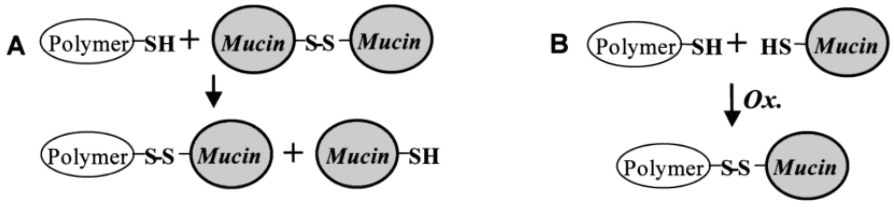


Figure 20 : formation des ponts disulfure entre le polymère et les mucines (Leitner *et al*. 2003)

III.2.4 Les biopolymères mucoadhésifs

Certain biopolymères ont plus de capacité à interagir avec le mucus intestinal que d'autre. Ainsi, les polysaccharides de hauts poids moléculaire, avec des chaînes moléculaires flexibles et une charge anionique sont plus susceptibles de rentrer en intéraction avec le gel de mucine (Vasir *et al.* 2003). Les alginates, les pectines, les carraghénane, le chitosan, l'acide hyaluronique, les dérivés cellulosiques sont ainsi utilisés pour formuler des vecteurs avec des propriétés autoadhésives. Parmi les polymères équipés de groupement thiol, les plus connus sont les protéines, mais la littérature ne présente pas de vecteurs particulaire mucoadhésif avec ce genre de biopolymère.

IV. Le relargage de l'actif

Lorsque l'on considère les interactions matière active/milieu extérieur, les microparticules peuvent être classées en deux catégories : celles qui ne doivent pas libérer leur contenu telles que les microréacteurs contenant des enzymes ou des bactéries, et celles qui sont formulées de façon à libérer la matière active encapsulée. Dans ce dernier cas, il faut distinguer les systèmes à libération déclenchée des systèmes à libération prolongée.

Les systèmes à libération déclenchée sont généralement des microcapsules formées d'une membrane étanche, qui vont libérer brutalement leur contenu par éclatement sous l'effet d'une pression (mécanique ou osmotique) ou par fusion sous l'effet de la température. De nombreux exemples de systèmes sensibles à la pression se rencontrent dans les domaines de la papeterie et de la visserie. Les systèmes à libération prolongée se distinguent les uns des autres par les mécanismes de libération mis en jeu (diffusion passive, dégradation/dissolution du matériau enrobant, échange d'ions...) et par leur structure (microcapsule ou microsphère) qui va directement influer sur la cinétique de libération résultante (figure 21).

Dans le cas des microsphères, ou l'actif est dispersé au sein d'un réseau de polymère, soit la molécule est de taille assez réduite pour diffuser à travers le réseau et se libère de façon continu jusqu'à épuisement, soit la molécule est de taille trop importante pour se frayer un

chemin. Dans ce cas-là, une déstructuration de la matrice est nécessaire pour provoquer le relargage. Cette déstructuration peut être due à un changement d'état de la matrice, provoqué par exemple par un changement de pH du milieu. La libération est alors rapide et immédiate. Mais si la déstructuration est due à une érosion lente de la matrice, par exemple par une hydrolyse enzymatique, alors c'est un relargage pouvant se rapprocher d'une diffusion qui est visible.

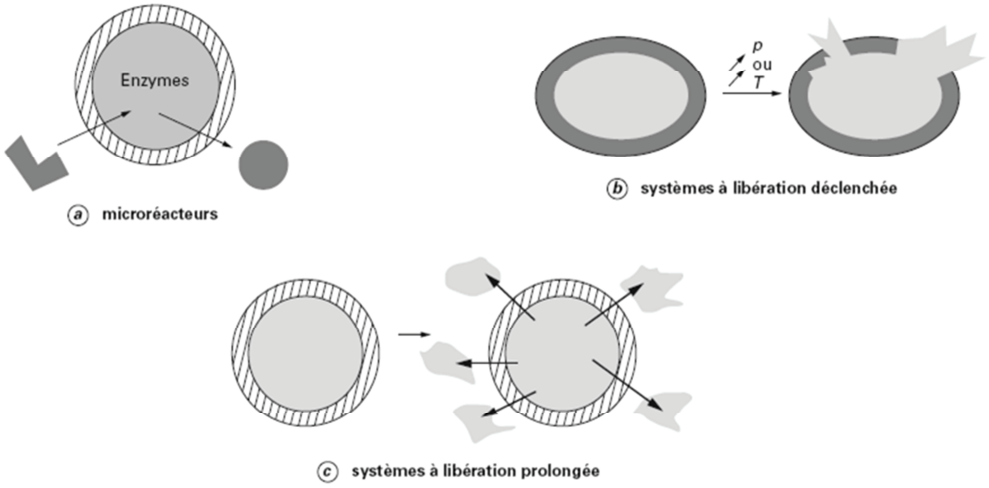


Figure 21 : différent modèle de relargage contrôlé

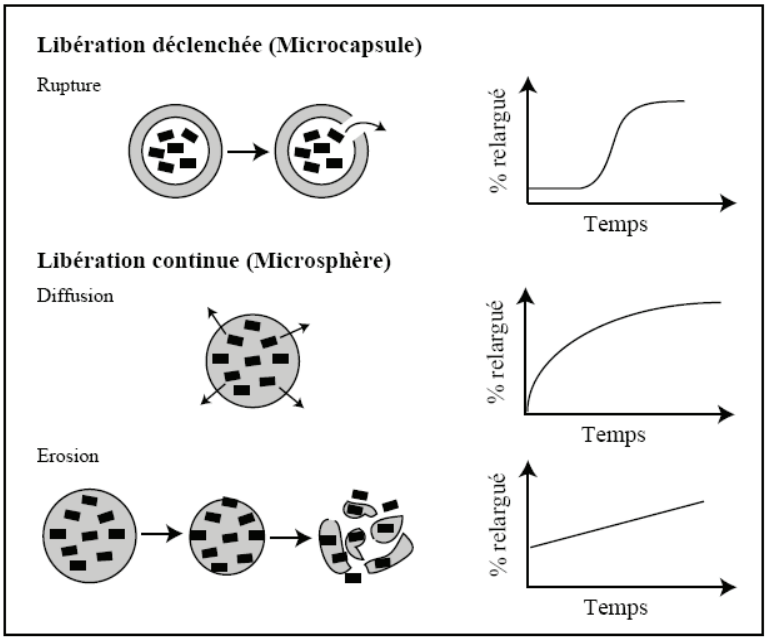


Figure 22 : profils de libération obtenus à partir de différents types de microparticules

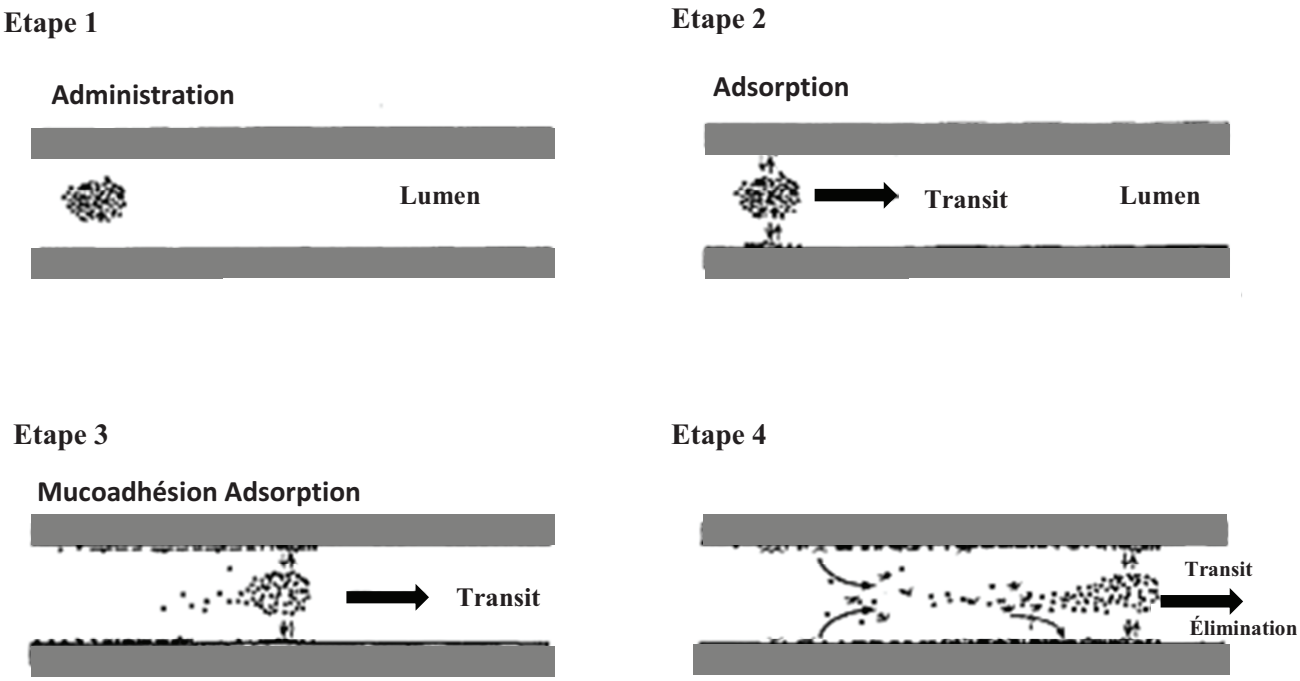


Figure 23 : Comportement d'une microsphère mucoadhésive dans le tractus intestinal (adapté de Ponchel *et al.* 1997)

La figure 23 présente le comportement que peux avoir une microsphère ayant des propriétés de relargage contrôlée et des propriétés de mucoadhésion. La première étape est l'arrivé dans le lumen, ou la microsphère va entrer en contact avec les différents facteurs du milieu (enzyme, pH etc…) L'étape 2 est celle ou la microsphère va entrer en contact avec le mucus intestinal. Cette étape peut être parallèle à la dégradation du vecteur. Le vecteur subit, dans les étapes 3 et 4, le transit intestinal, poussé par le bol alimentaire de la ration, jusqu'à l'élimination. En théorie, la mucoadhésivité du vecteur permet d'allonger le temps de résidence de la microsphère au site d'absorption spécifique de l'actif qu'elle contient (Ponchel *et al.* 1997)

Synthèse du chapitre : 3eme partie : le parcours digestif des microsphères, le phénomène de mucoadhésion et le relargage d'actif

- Une microsphère ayant une application d'ingestion par voie orale doit passer par deux grande étapes de digestion : La digestion gastrique (pH acide + protéase) et la digestion entérique (pH 5.5, sels biliaires et enzymes digestives)

- Le site d'absorption spécifique des composés liposolubles est l'intestin grêle

- Une microsphère de vitamine A à relargage contrôlé devra donc résister à la digestion gastrique et libérer son actif au sein de l'intestin grêle

- Une microsphère pouvant avoir des interactions avec le mucus intestinal pourrait voir son temps de résidence au sein du site d'absorption augmenter. Elle pourrait ainsi améliorer l'efficacité de son relargage contrôlé et la biodisponibilité de la vitamine A

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

4eme PARTIE : La fonctionnalisation des protéines

Partie A : Principe de la fonctionnalisation et choix des biopolymères

Partie B : Réactions de fonctionnalisation

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

4eme PARTIE : La fonctionnalisation des biopolymères

Partie A : Principe de la fonctionnalisation et choix des biopolymères

I. Principe de la fonctionnalisation

Fonctionnaliser est un terme désignant l'action de rendre fonctionnel, d'ajouter une fonction à quelque chose. Dans le domaine de la chimie des matériaux ou des nanotechnologies, c'est un terme souvent utilisé pour désigner l'action d'ajouter un groupement fonctionnel sur un support « inerte », comme par exemple la fonctionnalisation des nanotubes de carbone.

La fonctionnalisation est un procédé appartenant surtout au monde des biomatériaux, et ce terme est utilisé en biochimie principalement pour le greffage de fonctions chimiques sur une autre molécule (Nesterenko, 2012).

Dans ce projet de recherche, la fonctionnalisation des biopolymères a pour principe de considérer ces derniers comme simple matrice de la microsphère. En elle-même, la matrice de biopolymère à déjà plusieurs fonctions : celle de stabiliser l'émulsion et de créer une barrière protectrice entre l'actif encapsulé et l'environnement extérieur.

Cette matrice va être le support au greffage d'autres molécules lui apportant d'autres fonctionnalités ou modifiant celles déjà existantes.

Là où la science des biomatériaux se concentre sur la fixation de groupement d'atome sur une surface de polymère synthétique inerte, la fonctionnalisation des biopolymères propose de greffer des molécules fonctionnelles entières sur une autre molécule fonctionnelle, pour obtenir de nouvelles applications, ou modifier celles existante.

Dans les faits, les interactions entre molécules est chose courante et indispensable dans le monde du vivant. La première étape du processus de fonctionnalisation est de sélectionner qu'elle interaction entre différente famille de biomolécule peut avoir un impact sur le comportement d'une matrice de microsphère (figure 24).

Considérant que la majorité des microsphères de la littérature est formulée à partir d'émulsifiant de type protéique, ces dernières nous ont paru être d'excellent choix pour constituer la cible de la fonctionnalisation. Le choix du fonctionnalisant est directement liée à

l'application visée de la microsphère finale. Le greffage des polyphénols de raisin par exemple a pour but d'ajouter leurs caractéristiques antioxydantes bien connues au pouvoir émulsifiant des protéines.

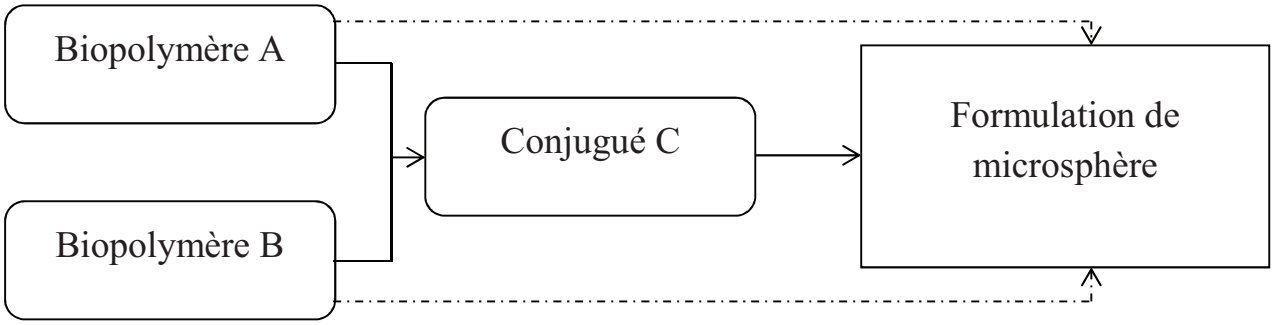


Figure 24 : principe de la fonctionnalisation de biopolymère pour la formulation de microsphère. En pointillé les formulations de témoins négatif, qui servirons de comparaison avec les formulations utilisant la voie de fonctionnalisation (en trait plein)

Dans ce projet, l'utilisation de biomolécule et de réactions considérées comme alimentaires permet d'utiliser les microsphères finales dans des formulations du même type. Ainsi, les réactions entre la molécule fonctionnalisée et la molécule fonctionnalisante ont été choisie parmi celles connues de la chimie alimentaire. Le greffage des sucres sur les protéines fait intervenir la réaction de Maillard, qui entraine la formation de composés bruns, et le greffage des polyphénols sur les protéines fait intervenir le même type de réaction décrit dans le trouble des boissons et la clarification des vins. Ces réactions ont été provoquées et rationnalisées dans des conditions optimum, pour pouvoir intégrer la formulation de microsphère en continu.

Dans le chapitre suivant, nous verrons quelles ont été les protéines à fonctionnaliser choisie pour cette étude, et ensuite quelles ont été les molécules choisies pour fonctionnaliser ces protéines, et par quel type de réaction.

II. Choix des biopolymères

Le screening des matières premières nécessaires à ce projet de recherche a demandé la mise en contact d'IDCAPS avec un nombre assez conséquent de fournisseur d'ingrédient. Notre choix s'est porté sur des matières premières dont la disponibilité sur le marché était significative. Nous avons préférentiellement choisi des ingrédients d'origine européenne autant d'un point de vue législatif que pour la facilité et la rapidité d'approvisionnement.

Nous avons choisi également et ce dès le début du projet de sélectionner des ingrédients les moins transformés possibles, et surtout d'origine non OGM pour respecter le cahier des charges de chimie verte. Ainsi, les protéines de pois européenne ont été préférées à la protéine de soja (pourtant ultra majoritaire sur le marché) de par leur proximité de production (produit en France) et pour leur provenance non OGM. Toutefois, à cause de l'engouement actuel des alternatives au soja, ces protéines deviennent de moins en moins disponibles, car ayant un volume de production actuellement limité. Le coût de la matière première a également été pris en compte pour étudier la viabilité économique de la formulation finale

Quatre produits commerciaux répondant à ces critères ont été choisis pour ce projet :

Les protéines de pois Nutralys® F85M, de chez Roquette, produites en France, et vendues pour leurs propriétés émulsifiantes, le caséinate de sodium de lait de vache de chez Armor Protein, pour sa pureté et sa facilité de dispersion dans l'eau. La gélatine de type A (140 bloom) d'origine porcine, la plus fréquemment rencontrée sur le marché et connue pour son excellente biodisponibilité et la nombreuse littérature la concernant. Les polyphénols de raisin Grap'Total®, de chez Grape Sud, ont été choisis pour leur richesse en anthocyane et en tanin condensés, et pour leur pouvoir antioxydant reconnu (Al-Awwadi *et al.* 2005). Les sucres ayant servis pour la réaction de Maillard ne seront pas décrit dans ce chapitre, mais leurs utilisation historique dans le domaine agroalimentaire en font des ingrédients extrêmement bien connus et documentés.

Dans ce manuscrit seront présentés la fonctionnalisation de ces trois protéines car elles sont de bon modèle de biopolymère fréquemment utilisés seul dans le process d'encapsulation d'actif.

III. Les molécules fonctionnalisées : les protéines

Les protéines sont des macromolécules naturelles composées de chaines linéaires d'acide aminé. Les séquences possibles utilisent 20 acides aminés les plus souvent rencontrés, ce qui donne à la composition des chaînes une importante diversité. Les protéines ont un rôle central dans tous les organismes vivants, avec un large spectre de fonction. Une grande gamme de protéine est directement utilisée comme nourriture, ainsi que pour des applications non-nutritionelles.

Les protéines peuvent être classées selon leurs origines, animales ou végétales. Dans cette partie seront décrites les trois protéines choisies pour ce projet de recherche : une protéine végétale, les protéines de pois, et deux protéines animales, la gélatine de type A porcine et le caséinate de sodium de lait de vache.

III.1 Les protéines de pois

Les protéines végétales sont dominées dans le monde par les protéines de soja, qui représentent une grande majorité de volume produit, échangé et utilisé par les différents secteurs de l'agro-alimentaire et de la nutrition animale (257,6 millions de tonne en 2011, chiffre FAO). La communication massive en faveur de la protéine de soja a éclipsé d'autres types de protéines végétales potentiellement intéressantes. Les choses sont cependant en train d'évoluer, notamment avec les protéines issues d'autre légumineuse, comme la fève ou le pois (*Pisum sativum*). Ce dernier puise probablement ses origines au Proche-Orient et plus particulièrement dans les pays qui bordent la Méditerranée, où les plats régionaux riches en protéines sont nombreux (Henk Hoogenkamp 2012). Dans une logique de choix de matière première non-OGM et d'origine européenne, nous avons choisi d'utiliser cette source comme modèle de protéine végétale pour notre étude.

III.1.1 Composition et structure des protéines de pois

Les protéines de pois sont formées comme la plupart des protéines d'origine végétale de deux composantes majeures, classées selon leurs coefficients de sédimentation (S). Il y a les protéines 11S, ou protéine légumineuses, et les 7S, ou protéines vicilines (Gueguen *et al.* 1988). Elles ont une structure quaternaire régulière : hexamèrique pour les protéines légumineuses et trimérique pour les protéines vicilines. Le tableau 4 reprend la composition en acides aminés des protéines de pois.

Tableau 4 : composition en acide aminé des protéines de pois (Gueguen *et al.* 1988)

Acide aminé	Farine de pois	Fraction albumines	Fraction globulines
ASX	12.5	1.90	12.99
THR	3.65	5.66	3.34
SER	4.79	5.03	5.30
GLX	17.41	14.95	18.66
PRO	3.91	4.46	4.36
GLY	4.29	5.97	3.89
ALA	4.06	5.85	3.97
CYS	1.39	3.15	0.80
VAL	4.69	4.41	4.73
MET	0.99	1.34	0.70
ILE	4.23	3.86	4.59
LEU	7.20	4.87	8.23
TYR	3.19	4.71	3.37
PHE	4.75	4.52	5.40
TRP	0.95	1.47	0.67
LYS	6.92	9.34	6.41
HIS	2.30	2.63	2.55
ARG	8.28	5.67	8.00

Les protéines 11S ont une structure riche en feuillet β et consistent en des polypeptides basiques et acides (de 40 et 21 kDa, respectivement), qui sont liés entre eux par des ponts disulfures. Le poids moléculaire total de l'unité légumineuse est d'environ 380 kDa. C'est une protéine globulaire très compacte dont les polypeptides acides sont localisés à la surface et les polypeptides basiques à l'intérieur, consistant le corps hydrophobique de la protéine. (Gueguen *et al.* 1988). Les protéines 7S sont des glycoprotéines avec un poids moléculaire d'environ 150 kDa. La structure quaternaire des protéines de pois dépendent du pH et de la concentration en sels. Par exemple, les protéines légumineuses sont présentes sous forme d'hexamères à pH 7 et au haute force ioniques, mais sont dissociés à pH 3.3 et 10 et donnent, selon la force ionique, un mélange de trimère, de dimère et monomère. Les conditions acides sont plus drastiques que les conditions alcalines et les protéines légumineuses sont complètement dissociées à pH 2.4, donnant des monomères avec de bonnes propriétés interfaciales (Gueguen *et al.* 1988). La figure 25 et le tableau 4 reprennent la composition en acide aminé et les différentes fractions protéiques retrouvées dans les protéines de pois.

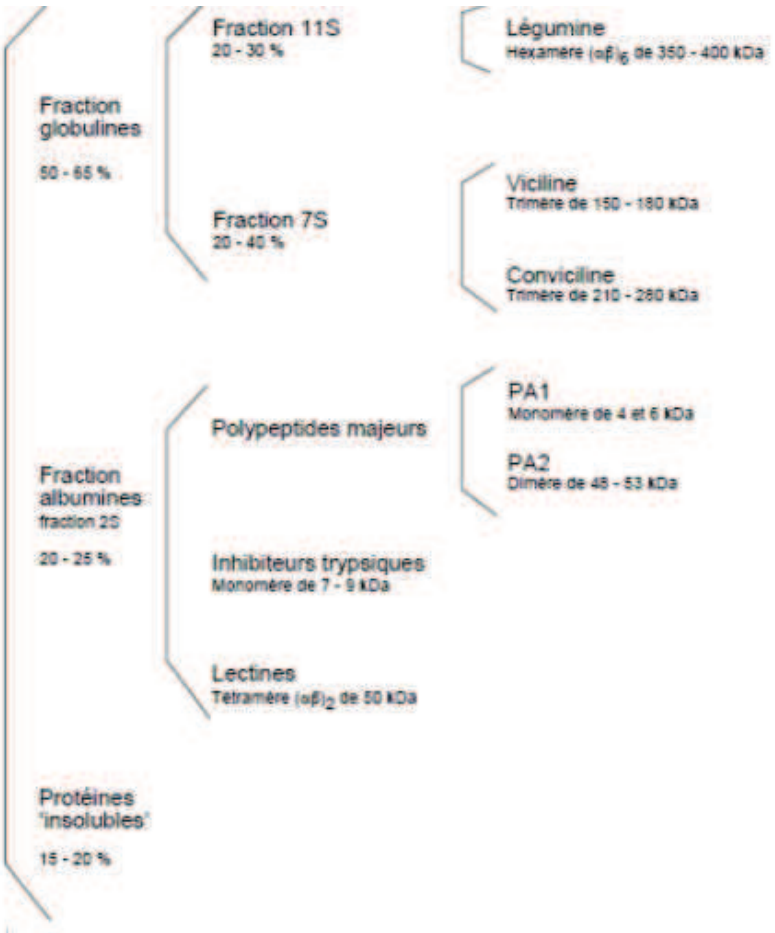


Figure 25 : fractions des protéines de pois

III.1.2 Caractéristiques et applications des protéines de pois

L'utilisation de ces protéines à des fins fonctionnelles commence à voir le jour depuis quelques années, notamment dans le domaine des émulsions et de l'encapsulation d'actif.

Ducel *et al.* (2004a, b) se sont servis des globulines de pois dans une réaction de coacervation complexe avec de la gomme arabique, de la carboxyméthylcellulose et de l'alginate de sodium afin d'encapsuler des triglycérides. Pierrucci et ses collaborateurs ont travaillé sur les protéines de pois en générale, en association avec de la maltodextrine afin d'encapsuler de l'acide ascorbique et de l'α-tocophérol (Pierrucci *et al.* 2006 ; 2007). En 2009, Pereira a également utilisé ces mêmes protéines en association avec la maltodextrine pour encapsuler de l'acide ascorbique (Pereira *et al.* 2009). A. Gharsallaoui *et al.* (2010) ont utilisé les protéines de pois pour former des émulsions en atomisation de type huile dans eau avec ou sans l'association avec de la pectine et de la maltodextrine.

Plus récemment, Costa *et al.* (2015) ont utilisé des isolats de protéines de pois en association avec une maltodextrine pour encapsuler de l'acide linoleique avec un bon taux d'encapsulation et un bon rendement de production, ainsi qu'une stabilité améliorée de l'actif sur 60 jours.

L'ajout de pectine dans la formulation de protéine de pois permet d'apporter une meilleure stabilité de l'émulsion pendant la phase de séchage, en formant une couche de protection autour du film interfaciale de protéine formant l'émulsion. L'incorporation de maltodextrine améliore la stabilité de l'émulsion et améliore la protection contre l'oxydation de l'actif (Young *et al*. 1993). L'ajout de maltodextrine semble également induire un grossissement des particules (Pierucci *et al.* 2006).

Le tableau 5 résume les différentes études qui ont été menées sur les protéines de pois et leurs capacités à encapsuler un actif :

Tableau 5 : exemple de technique d'encapsulation d'actif utilisant les protéines de pois

Technique d'encapsulation	Molécule encapsulante	Actif encapsulé	Références
Coacervation complexe	Globuline de pois, gomme arabique, CMC et alginate de sodium	Triglycérides	Ducel *et al.* 2004 a,b
Atomisation	Protéine de pois, maltodextrine	Acide ascorbique	Pierruci *et al.* 2006
Atomisation	Protéine de pois, maltodextrine	α-tocophérol	Pierruci *et al.* 2007
Atomisation	Protéine de pois, maltodextrine	Acide Ascorbique	Pereira *et al.* 2009
Atomisation	Protéine de pois, pectine, maltodextrine	Triglycéride	Gharsallaoui *et al.* 2010
atomisation	Protéine de pois, maltodextrine	Acide linoléique	Costa *et al.* 2015

III.2 Le caséinate de sodium

La caséine (du latin *Caseus* : fromage) est le principal constituant de la partie protéique du lait (80% pour le lait de vache). Cette protéine sert à stabiliser la partie lipidique sous forme de micelle, ce qui en fait un émulsifiant naturel. Elle est séparée du lait par des procédés d'ultrafiltration industriels, permettant une qualité du produit continue. Le caséinate de sodium est produit en faisant précipiter les caséines du lait par ajout de sel.

III.2.1 Composition et structure du caséinate de sodium

Le caséinate de sodium est utilisé comme ingrédient alimentaire pour ses propriétés émulsifiantes, texturantes et de captation de l'eau et des lipides. (Kinsella 1984 ; Southward 1989). La majeure partie du caséinate est composé de αs1, αs2, β et κ caséine, dans une proportion massique de 3 :0.8 :3 :1 respectivement (Aoki *et al*. 1996). Les protéines αs1-caséine et β-caséine, dans des proportions un peu près équivalent, correspondent à 75% des caséines totales du lait bovin (Casanova *et al.* 1998). Parmi ces protéines, la β-caséine a la meilleure propriété de surface (Mulvhill *et al.* 1989) et est quelque peu plus hydrophobe que αs1-caséine (Dickson *et al.* 1988). Les caséines peuvent être classées comme suit :

- α_{s1}-caséine (Ginger & Grigor 1999) (masse molaire 23 kg/mol, 199 résidus) : elle est constituée de 2 régions hydrophobes, séparées par une région hydrophile très chargée contenant 8 groupes de phosphate, ce qui en fait la protéine la plus chargée du lait. Elle peut être précipitée avec de très faibles quantités de calcium.

- α_{s2}-caséine (Brignon *et al.* 1977; Ginger & Grigor 1999) (masse molaire 25 kg/mol, 207 résidus) : Les charges négatives sont concentrées près de l'extrémité N-terminale et les charges positives près de l'extrémité C-terminale, ce qui en fait la protéine la plus hydrophile. Elle peut également être précipitée avec de très faibles quantités de calcium.

- β-caséine (Ginger & Grigor 1999; Rollema 1992) (masse molaire 24 kg/mol, 209 résidus) : Elle est composée d'une région N-terminale hydrophile très chargée négativement et d'une région C-terminale hydrophobe, ce qui lui donne une structure amphiphile. C'est la plus hydrophobe des protéines. Elle est très sensible à la température mais moins au calcium.

- κ-caséine (Ginger & Grigor 1999; Rollema 1992) (masse molaire 19 Kg/mol, 169 résidus) : Elle contient une région N-terminale hydrophobe et une région C-terminale hydrophile faiblement chargée. C'est un copolymère amphiphile. La région comprise entre les résidus peptidiques 20 et 115 est chargée positivement ; ces régions restent positives même à des pH alcalins (Snoeren 1975). Elle diffère des autres caséines par

sa faible sensibilité au calcium car elle ne possède qu'un seul groupement phosphoryle. Ainsi, elle permet de stabiliser les autres caséines.

Le tableau 6 présente la composition en acide aminé moyenne du caséinate de sodium (Beaufrand *et al.* 1977)

Tableau 6: composition en acide aminé du caséinate de sodium (d'après Beaufrand *et al.* 1977)

Acide aminé	% d'acide aminé pour 100 g de protéine
LYS	8.5
HIS	3.6
ARG	3.9
ASP	6.8
THR	3.8
SER	7
GLU	16.3
GLY	2.2
ALA	3.1
VAL	6.9
ILE	5.6
LEU	9.3
TYR	7.3
PHE	6.4

III.2.3 Caractéristique et application du caséinate de sodium

Le caséinate de sodium montre une thermo-stabilité remarquable à pH 6.5 (Guo *et al.* 1989) et une totale insolubilité à son point isoélectrique (pHi 4.6) (Lieske *et al.* 1994). Les propriétés physicochimiques et fonctionnelles du caséinate dépendent de la composition moléculaire (Swaisgood 1993) et de facteur extrinsèque comme le pH et la température (Lieske *et al.* 1994), la force ionique (Casanova *et al.* 1998) et les modifications éventuelles des groupes fonctionnels Le caséinate de sodium est la seule protéine laitière à montrer une

gélation thermique réversible. La solubilité des films de caséinate de sodium dépendent du pH de leur préparation.

D'après la littérature (Livney 2010), 95% de la caséine dans le lait est présent sous forme de micelle de caséine, particules colloïdales sphériques d'une taille comprise entre 50 et 500 nm (en moyenne 150 nm) de diamètre et qui ont une masse moléculaire comprise entre 106 et $3x10^9$ Da. Le micelle contient environs 2 grammes d'eau par grammes de protéine et il y a environs 10^{14} – 10^{16} micelles par ml de lait. De plus, de par sa richesse en proline et sa structure ouverte, le caséinate de sodium est facilement accessible pour le clivage protéolytique des enzymes digestives (Fox 2003).

L'utilisation du caséinate de sodium dans le domaine de l'encapsulation d'actif est assez ancien, car le bon pouvoir filmogène et émulsifiant de cette protéine en fait un candidat idéal. Son utilisation peut se faire seule, comme dans les études de Zhang *et al.* (2013) ou bien le plus souvent par association avec d'autres biopolymères de charge opposée, par la technique de coacervation complexe (Koupantsis *et al.* 2014) (Ilyasoglu *et al.* 2014). Le caséinate de sodium a été utilisé dans différentes techniques et pour encapsuler un nombre important d'actif différent. Le tableau 7 ci-dessous donne des exemples récents des encapsulations effectuées à base de caséinate de sodium

Tableau 7 : exemples d'encapsulation utilisant du caséinate de sodium

Molécule encapsulante	Actif encapsulé	Référence
Caséinate de sodium	huile de poisson, phytostérol et limonène	Chen *et al.* 2013
Caséinate de sodium	Bixin® (colorant)	Zhang *et al*. 2013
Caséinate de sodium + carboxymethylcellulose	b-pinène (arôme de pin)	Koupantsis *et al.* 2014
Caséinate de sodium + chitosan	tymol (huile essentielle de thym)	Zhang *et al.* 2014

Caséinate de sodium + alginate de sodium	*Lactococcus Lactis* (probiotique)	Léonard *et al.* 2015
Caséinate de sodium + gomme arabique	EPA et DHA (oméga 3 et oméga 6)	Ilyasoglu *et al.* 2014
Caséinate de sodium + pectine	lipides polyinsaturés	Zhang *et al.* 2014
Caséinate de sodium + lécithine	coenzyme Q10	Stratulat *et al.* 2013
Caséinate de sodium et caséine hydrolysé	huile de poisson	Drusch *et al*. 2012

III.3 Les gélatines

La gélatine est une molécule complexe issue de l'hydrolyse du collagène contenu dans les différentes parties de la peau ou des os d'animaux. La conversion du collagène en gélatine a été longuement étudiée (Harding 1964 ; Vei 1964 ; Ward & Courts 1977). Elle se réalise en 2 étapes : la solubilisation du collagène (soit en milieu acide, soit en milieu basique) et sa conversion en gélatine. Cette dernière résulte de la dénaturation de la structure tertiaire de la triple hélice de tropocollagène. Les chaînes se dissocient et adoptent alors une configuration en pelote statique (Jones 1987). La fabrication industrielle de gélatine consiste à contrôler l'hydrolyse du collagène pour obtenir un produit final ayant des propriétés physico-chimiques voulues, (force du gel exprimé en bloom, viscosité, point isoélectrique etc….)

Deux procédés sont possibles pour la fabrication de la gélatine (GME 2008) :

- ***Le procédé acide : gélatine de type A***

Le procédé acide s'applique surtout à des matériaux peu réticulés comme le collagène de la peau de porc. C'est un procédé peu coûteux et rapide, utilisé principalement dans l'industrie alimentaire. Il consiste en un traitement dans des solutions d'acides minérales diluées, dont la concentration ne doit pas excéder 5 % et dont le pH doit se situer autour de

3.5 et 4.5. Les acides minéraux utilisés peuvent être l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique. Ce traitement à l'acide continu jusqu'à ce que la matière première soit entièrement acidifiée et atteigne un maximum de gonflement. La température du traitement est habituellement la température ambiante de l'usine, environs 20 °C. La durée du traitement dépend de la nature de la matière première, de la température et de la concentration en acide, et varie entre 10 et 48h.

- ***Le procédé alcalin : gélatine de type B***

Le procédé alcalin, méthode plus longue, est utilisée pour des collagènes plus complexes comme ceux provenant des os et de la peau de bovins. Cette gélatine est principalement utilisée dans l'industrie pharmaceutique, photographique et quelque fois en alimentaire. Pour cette technique, la peau et l'os sont traités par du lait de chaux (pH 12) pendant 6 à 12 semaines, afin d'épurer le collagène et de casser les liaisons covalentes pour le rendre soluble à 60°C. Cette étape est contrôlée en température entre 18 et 20°C. Le lavage consiste à éliminer le lait de chaux et à ramener le mélange à un pH 7.

- ***La gélatine de poisson et les sources alternatives***

La gélatine d'origine marine (poisson d'eau chaud ou poisson d'eau froide) est une alternative possible à la gélatine de mammifère (Kim & Mendis 2006, Karim & Rajeev 2009). La production de gélatine de poisson n'est pas nouvelle et date des années 1960 à partir d'une extraction acide des peaux de poisson, coproduits polluant de l'industrie de la pêche (Norland 1990). Cette gélatine peut être extraite par un procédé acide ou alcalin, suivant l'espèce de poisson traitée (saumon, hareng, maquereau, poisson chat, tilapia, requin bleu, carpe, sole etc…). La gélatine de poisson a en générale un taux de proline et d'hydroxyproline inférieur à celui de la gélatine de mammifère, ce qui se traduit par une dureté de gel moindre et un point de fusion plus bas (Karim & Rajeev 2009). Néanmoins, la gélatine issue de poisson d'eau chaude (tilapia, requin…) montre des caractéristiques plus proches de celles de la gélatine bovine que celles de poisson d'eau froide. Le taux de proline et d'hydroxyproline est d'environ 30 % dans la gélatine de mammifère, entre 22 et 25 % pour la gélatine de poisson d'eau chaude (tilapia et perche du Nil) et 17 % pour la gélatine de poisson d'eau froide (Muyonga *et al.* 2004).

La demande globale en gélatine a fortement augmenté ces dernières années (demande annuelle est 326 000 tonnes). La gélatine issue de la peau de porc constitue la majorité du marché avec 46 %, suivis de celle d'origine bovine (29.4%), des os (23.1%) et des autres sources (1.5 %) (GME, 2008). Cependant, l'utilisation de la gélatine reste auprès du grand public, problématique de part plusieurs facteurs. D'abord l'interdit religieux (l'Islam et le Judaïsme interdit la consommation de produits issus du porc, et l'Hindouisme interdit la consommation de produits issus des bovins). De plus, la tendance au végétarisme stricte augmente sensiblement dans le monde, interdisant toute consommation de produit d'origine animale. Et pour finir, des travaux ont prouvé que la gélatine est capable de transmettre des vecteurs pathogéniques comme le prion, même si la procédure d'extraction/purification est une barrière sûre au risque de transmission d'après Schreiber & Gareis (2007).

La gélatine de peau de volaille pourra être une voie économiquement viable dans le futur, mais sa commercialisation est actuellement très limitée par les petits volumes disponibles. De plus, la peau de volaille est aujourd'hui utilisée pour d'autre application en agro-alimentaire (Schrieber & Gareis 2007). De ce point de vue, la gélatine de poisson apparait comme la meilleure alternative à la gélatine de mammifère, particulièrement par ses caractéristiques uniques. Mais à l'heure actuelle, elle ne représente qu'environ 1 % de la production annuelle de gélatine (Arnesen & Gildberg 2006). D'autres sources exploitables sont encore au stade de la recherche en laboratoire, comme le collagène d'alligator, provenant des élevages de Louisiane. La peau étant utilisée pour la maroquinerie et la chair pour la consommation. Les os constituent un co-produit intéressant pour la production d'une gélatine ayant des propriétés inédite, car n'étant pas d'origine marine ni mammifère (Wood *et al.* 2008).

III.3.1 Composition et structure de la gélatine

La gélatine est une protéine poly-ampholyte composée à part égale de zones cationiques, anioniques et de résidus hydrophobes. Les zones cationiques sont représentées par les résidus lysine et arginine, les zones anioniques par les résidus d'acide glutamique et d'acide aspartique et les zones hydrophobes par les résidus leucine, isoleucine, méthionine et valine. Les résidus glycine, proline et hydroxyproline constituent le reste de la chaîne d'acide aminé (figure 26). Le schéma GLY-X-PRO est responsable de la structure en triple hélice de

la gélatine, ou le X peut être le plus souvent un résidu glycine (33% des cas), ou un résidu proline ou hydroxyproline (33% des cas également). Dans les autres cas, tous les autres acides aminés sont possibles. Le tableau 8 reprend la composition moyenne en acide aminé des différentes gélatines.

La gélatine de type A possède une zone isoélectrique comprise entre pH 8-9, et la distribution en masse moléculaire est plus hétérogène que celle de la gélatine de type B. La gélatine de type B possède une zone isoélectrique comprise entre pH 4-5. La majeure partie des fractions de poids moléculaire est située dans la zone des 100 000 $g.mol^{-1}$.

Tableau 8 : composition en acide aminé des différentes gélatine : gélatine de type A, gélatine de type B et gélatine de poisson d'eau froide

Classe d'acide aminé	Acide aminé	Gélatine de type A	Gélatine de type B	Gélatine poisson eau froide
Hydrophobe	Alanine	112	117	96
	Hydroxyproline	91	93	50
	Isoleucine	10	11	11
	Leucine	24	24.3	22
	Méthionine	3.6	3.9	17
	Phénylalanine	14	14	16
	Proline	132	124	106
	Tryptophane	-	-	-
	Valine	26	22	18
Polaire non chargé	Glycine	330	335	344
	Asparagine	16	0	52
	Glutamine	25	0	78
	Sérine	35	33	64
	Thréonine	18	18	25
	Cystéine	-	-	-
	Tyrosine	2.6	1.2	3
Chargé positivement	Arginine	49	48	56
	Histidine	4	4.2	8
	Hydroxylysine	6.4	4.3	6

	Lysine	27	28	29
Chargé	Acide aspartique	29	46	
négativement	Acide glutamique	48	72	78

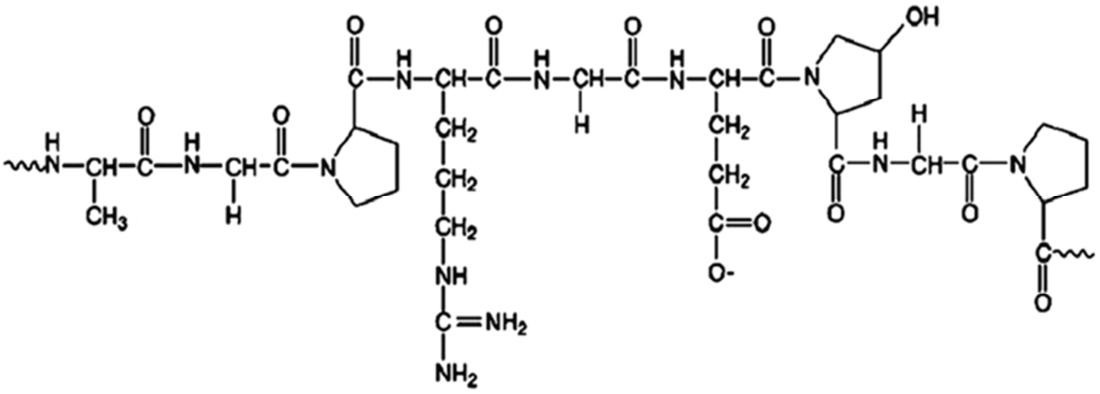


Figure 26 : structure chimique d'une chaîne de collagène

III.3.2 Caractéristiques et application de la gélatine

L'utilisation de la gélatine est multiple dans l'industrie agro-alimentaire, en tant qu'agent texturant, stabilisant et moussant. Elle permet aussi de réduire la quantité de matière grasse dans la confection de produit à base de viande ou de produire des formulations sous forme de gel. Dans le domaine médical, la gélatine peut servir de matrice pour implants, et est le principal constituant des gélules dures ou molles, vecteurs d'actif pharmaceutiques.

La gélatine est considérée comme un ingrédient en termes d'étiquetage et non pas comme un additif, c'est pourquoi elle n'a pas de numéro E. On peut néanmoins encore la trouver avec l'attribut E441, puisqu'elle reste considérée par certaines firmes agro-alimentaires comme un additif gélifiant.

La gélatine a été l'une des premières biomolécules utilisées pour l'encapsulation d'actif. Bien qu'accepter en agro-alimentaire, son utilisation pour l'encapsulation est prédominante dans les domaines de la pharmaceutiques et du textile, de par sa possibilité d'être réticulée avec des agents chimiques, qui eux ne sont pas acceptés en alimentaire (le formaldéhyde par exemple) (Jeyanthi *et al.* 1987 ; Couvreur *et al.* 1990).

Malheureusement, la présence résiduelle d'agent de réticulation dans la formulation et le risque de formation de produit toxique entre la gélatine et l'agent de réticulation, qui peuvent être relargués pendant une digestion in vivo, limite l'utilisation de ce type de produit. Dans cette optique, des dérivés naturels comme des dextranes oxydés (Jameela *et al.* 1995), des agents de réticulation non toxiques comme le glutaraldehyde ou l'activation des groupes d'acides carboxylique peuvent être utilisés comme agent de réticulation. La gélatine est souvent utilisée en association avec d'autre biopolymère dans la technique de coacervation complexes. Quelque travaux citent également des réticulant d'origine naturel, comme les flavonoïdes ou polyphosphates (Duconseille *et al.* 2014). La gélatine a été utilisée pour encapsuler un nombre très important d'actif différents, le tableau 9 ci-dessous montre quelque exemple d'utilisation dans le domaine de l'encapsulation d'actif :

Tableau 9 : exemple d'utilisation de la gélatine pour l'encapsulation d'actif

Molécule encapsulante	**Actif encapsulé**	**Référence**
Gélatine	Cycloheximide®	Saxema *et al.* 2005
Gélatine, hexametaphosphate	Huile de poisson	Wang *et al.* 2014
Gélatine, cyclodextrine	BSA	Haroun & Halawan 2010
Gélatine, gomme arabique	Limonène (arôme)	Kaushik & Roosy 2007
Gélatine, gomme arabique	Huile végétale	Nakagawa & Nugao 2012
Gélatine, gomme arabique et glutaraldehyde	Huile végétale	Piacentin *et al*. 2013
Gélatine, epigallocatechine gallate	/	Shutava *et al*. 2009
Gélatine, alginate de sodium	*Bifidobactérium adolescentis* 157035 (probiotique)	Annan *et al.* 2008

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

4eme PARTIE : La Fonctionnalisation des protéines

Partie B : Réactions de la fonctionnalisation

I. Fonctionnalisation des protéines par les sucres : la réaction de Maillard

I.1 La réaction de Maillard : généralité et principe

La réaction de Maillard tire son nom du chimiste français Louis-Camille Maillard qui l'a décrite le premier (Maillard 1913). Ce n'est que 40 ans plus tard que le premier schéma réactionnel fut publié par Hodge (1953). Cette interaction de sucres réducteurs et d'acides aminés et l'ensemble de leurs réactions successives est aussi appelée brunissement non-enzymatique. Cette réaction ou plutôt cet ensemble de réactions est considérée comme la plus importante dans la chimie des aliments (Shenoy 1993).

Elle a lieu lors du stockage des aliments ou plus fréquemment lors de leur traitement par des processus thermiques. En plus de son rôle prépondérant dans le développement des flaveurs, il a aussi été démontré qu'elle est responsable de la formation de couleurs et d'antioxydants (Griffith & Johnson 1957 ; Manzocco *et al.* 2001). Elle peut aussi réduire de manière drastique la valeur nutritionnelle des aliments en diminuant la concentration et donc la disponibilité des acides aminés essentiels (Kaanane & Labuza 1989).

L'apparition d'une couleur brune distincte et d'arômes associés à des aliments rôtis, grillés ou cuits au four est caractéristique de cette réaction avec pour conséquence le fait que des aliments présentant des goûts ou des arômes peu appétissants lorsqu'ils sont crus peuvent être transformés en produits désirables après avoir subi des traitements thermiques. C'est notamment le cas du pain, des graines de café et des fèves de cacao. La réaction de Maillard intervient également, dans les processus de dégradation du collagène et contribue à la transformation des matières végétales en humus.

La réaction de Maillard se décompose en trois étapes principales. Une première étape conduit à la glycation, qui est une réaction d'amination réductive durant laquelle la fonction amine α ou radicalaire d'un acide aminé libre ou protéique attaque la fonction carbonyle de la forme ouverte d'un ose réducteur (aldose ou cétose) et forme un produit d'addition, qui en perdant une molécule d'eau conduit à une imine appelée base de Schiff. Celle-ci, très instable, s'isomèrise très rapidement pour donner un produit de condensation qui est une glycosamine N-substituée (figure 27).

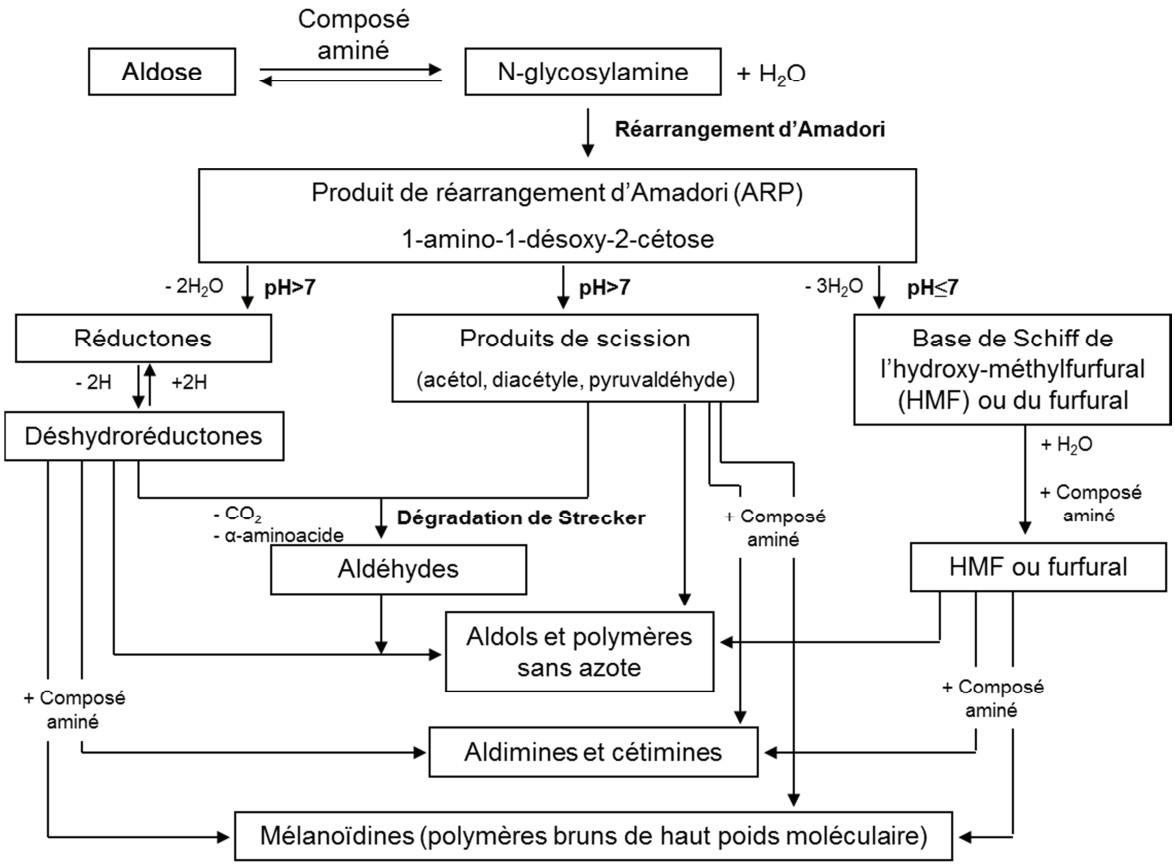


Figure 27 : étapes de la réaction de Maillard (Bridiau 2011)

Cette dernière se réarrange pour former un isomère C-glycosylé : le produit de réarrangement d'Amadori. Ce produit de réarrangement va par la suite subir toute une série de réaction de dégradation dépendant des conditions du milieu réactionnel et particulièrement du pH.

- A pH 7 ou inférieur, le produit d'Amadori subit principalement une réaction de 1.2-énolisation menant à la formation de furfural dans le cas des hexoses, ou d'hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le cas des pentoses

- A pH supérieur à 7, le composé d'Amadori subit des dégradations conduisant à différents composés, parmi lesquels des réductones, des hydroxyacétones et des diacétyles. Tous ces composés hautement réactifs prennent par ensuite à d'autres réactions. Les groupements carbonyles peuvent alors se condenser avec des fonctions amines libres, ce qui aboutit à l'incorporation d'azote dans les produits ultérieurs. Les composés dicarbonylés réagissent par exemple avec des acides aminés pour former

des aldéhydes et des α-amino-cétones. Cette réaction est appelée la dégradation de Strecker.

Enfin la dernière et troisième étape de la réaction de Maillard correspond à la formation, par cyclisation, déshydratation, rétro-aldolisation et isomérisation, des produits finaux de la réaction. Ces composés sont des polymères ou copolymères bruns de hauts poids moléculaires appelés mélanoïdes. Ces mélanoïdes sont la plupart du temps indésirables dans l'industrie agro-alimentaire, car considérés comme des produits de dégradation, ou des colorants pouvant impacter l'aspect visuel d'un produit. Au contraire, ils peuvent être également recherchés pour apporter un certain impact visuel, celui de la cuisson.

L'aspect fonctionnel de ces composés en dehors de leurs aspect visuel a commencé à être étudié que relativement récemment.

I.2 Les aspects fonctionnels des mélanoïdes issus de la réaction de Maillard

Depuis les années 90, des équipes de recherche ont cherché à produire de façon contrôlée les mélanoïdes issus de la réaction de Maillard, pour en tester les applications. Les applications qui nous intéressent plus particulièrement dans cette thèse sont la stabilisation d'émulsion. Le principe est de contrôler la réaction de Maillard, en mettant en présence un sucre et une protéine. Deux grandes méthodes sont décrites dans la littérature pour formuler ces conjugués.

I.2.1 La méthode en voie sèche : mélange de poudre

Cette première méthode consiste à mélanger la poudre de protéine avec la poudre de sucre et à laisser le mélange ainsi formé à incuber pendant un laps de temps donné à une humidité relative bloquée (entre 60 et 70% généralement). Le tableau 10 décrit les principales études portant sur la formation des conjugués par cette méthode.

Cette méthode d'obtention des conjugués de Maillard par voie sèche a plusieurs inconvénient quand on aborde leur industrialisation et leur production en grand volume. Tout

d'abord, la plupart des auteurs passent par une étape de mélange en voie liquide de la protéine et du sucre, afin d'obtenir un mélange tout à fait homogène, avant de quelque fois ajuster le pH et de lyophiliser l'ensemble. Cette étape de lyophilisation est le premier obstacle à la production en grand volume de ces conjugués, de par le prix et le temps que ce processus demande.

Ensuite le lyophilisat est mis dans un milieu thermostaté et à l'hygrométrie ajustée. C'est un deuxième obstacle au changement d'échelle, car il est compliqué et onéreux d'adapter le principe d'une chambre thermostatée et d'humidité contrôlée à plusieurs kilos de poudre, et ce de façon tout à fait homogène. Cette méthode implique aussi une longue durée d'incubation, pouvant aller de plusieurs heures à plusieurs semaines, ce qui n'est pas viable pour des applications industrielles.

Et un dernier point vient s'ajouter à la difficulté de formulation : celui d'utilisation. En effet, la poudre obtenu après la période d'incubation doit être remise en solution pour servir d'émulsifiant, ce qui ajoute une étape supplémentaire au process.

Tableau 10: récapitulatifs des études portant sur la formation des conjugués de Maillard par mélange de poudre à température et humidité contrôlée

Protéine	Polysaccharide	m/m	pH	T°C	H.R	Durée	Application	Référence
Ovalbumine	Glucose Acide glucuronique	1 :1	7.5	50°C	65%	0.5-3 jours	Amélioration du pouvoir émulsifiant de l'ovalbumine	Aoki *et al.* 1999
Caséinate de sodium Lactoglobuline	Pectine	1 :1 1 :3 1 :5	5.8	50, 60, 65 °C	65 et 80%	15 jours	Amélioration du pouvoir émulsifiant	Einhorn-Stoll *et al.* 2005
Caséinate de sodium	Dextran	1:3	/	60°C	79%	8h	Amélioration du pouvoir émulsifiant	Fechner *et al.* 2007
β-lactoglobuline α-lactoglobuline BSA	Dextran	1:2 1:6	7	60°C	0.44 aw	14 jours	Amélioration de la solubilité à des pH acides	Jiménez-Castaño *et al.* 2007

β-lactoglobuline	Chitosan	1 :4	6	40°C	79%	15 jours	Amélioration du pouvoir émulsifiant et de l'activité antibactérienne contre *E. Coli*	Miralles *et al.* 2007
Caséinate de sodium	Maltodextrine (DE40 et DE100)		/	60°C	79%	96 h	Amélioration du pouvoir émulsifiant	O'Regan *et al.* 2009
Protéine de Tofu	Galactomannan, polysaccharide d'okara, xyloglucan, chitine et chitosan	1 :1	7	60°C	65%	7 jours	Amélioration du pouvoir émulsifiant	Matemu *et al.* 2009
Caséinate de sodium	Maltodextrine (DE100 et DE40)	1 :1	/	60°C	79%	96 h	Amélioration du pouvoir émulsifiant en double émulsion	O'Regan *et al.* 2010
Caséinate de sodium et protéine de petit lait	Glucose, lactose, dextran et pectine	1 :2	/	70°C	65%	240 h	Amélioration du pouvoir émulsifiant et de la digestibilité pancréatique	Hiller *et al.* 2010
Caséinate de sodium	Maltodextrine (DE 40 et DE 100)	Les conjugués sont hydrolysés par voie enzymatique					Amélioration du pouvoir émulsifiant	O'Regan *et al.* 2010
Blanc d'œuf	Pectine	/		60°C	79%	Entre 6 h et 48h	Amélioration du pouvoir émulsifiant et du pouvoir moussant	Al-Hakkar *et al.* 2010
Protéine de petit lait et β-lactoglobuline	Fibre de maïs	1 :3		75°C	79%	4 jours	Amélioration du pouvoir émulsifiant et de la turbidité de l'émulsion	Yadav *et al.* 2010
Protéine de petit lait	Maltodextrine (DE 40, 100	1 :2 1 :1		90°C	/	2h	Encapsulation d'eugénol et étude du	Shah *et al.* 2012

	et180)	2 :1				relargage	
Protéine de soja	Gomme de fénugrec	1 :3 1 :1 1 :5	60°C	75%	3 jours	Amélioration du pouvoir émulsifiant	Kasran *et al.* 2013a,b

I.2.2 La méthode en voie liquide : réaction en solution

L'autre méthode, passant par la voie « liquide », est moins utilisée dans la littérature Mais paradoxalement, c'est celle ou apparait le moins d'obstacle à la production en grande échelle. En effet, les ingrédients sont simplement mélangés à une concentration donnée dans l'eau, sous agitation. Le tout est chauffé pendant un laps de temps très cours (généralement moins de 1 jour) à des températures standards (entre 50°C et 100°C). Cette étape peut être effectuée au sein de cuve double enveloppe thermostatée grâce à un chauffe-eau industriel. Une fois le composé de Maillard obtenu, il est alors possible de procéder à la formulation du produit directement dans le contenant et ainsi limiter le nombre d'étape.

Le tableau 11 reprend plusieurs exemples de la littérature décrivant la formation de conjugué de Maillard par voie liquide. Les applications visées sont souvent l'obtention de molécules ayant des propriétés émulsifiantes améliorée (Li *et al.* 2009) ou des propriétés antioxydant nouvelles (Gu *et al.* 2010).

Tableau 11 : exemples d'études portant sur la formation des conjugués de Maillard par la voie liquide

Protéine	Polysaccharide	T°C	Temps	Application	Références
Protéine du lactosérum	Xylose, glucose, fructose, lactose, maltose et saccharose	50°C	7 jours	Amélioration de l'activité antioxydante	Wen-qiong *et al.* 2013
B-lactoglobuline	Glucose	90°C	18h	Amélioration de l'activité antioxydante	Dong *et al.* 2012
Protéine de riz	Dextran	100°C	20 min	/	Li *et al.* 2013

Protéine de riz	Glucose, lactose, maltodextrine et dextrine	100°C	10, 15, 20 et 30 min	Amélioration du pouvoir émulsifiant	Li *et al.* 2009
B-lactoglobuline	Arabinose, galactose, glucose, lactose, rhamnose, ribose	60°C	3 jours	Amélioration de la solubilité et du pouvoir émulsifiant	Chevalier *et al*. 2001
Caséinate de sodium	Glucose, sirop de glucose et dextran	/	/	Microencapsulation	Drusch *et al.* 2009
Gélatine	Glucose	50°C	30 min		Lin *et al.* 2012
Caséine	Glucose	102°C	130 min	Amélioration de l'activité antioxydante	Gu *et al.* 2010

II. Fonctionnalisation des protéines par les polyphénols

Les interactions entre les protéines et les polyphénols ne sont pas un sujet d'étude récent. Les premières observations empiriques sur l'action d'extraits végétaux pour le tannage du cuir amenèrent Sir Humphry Davy, en 1803, à utiliser le mot 'tanin' pour désigner la matière astringente des végétaux utilisée dans le procédé (Dupas 2005). Issu du radical gaulois '*tann*' (chêne), le mot *'tan'* désigne en réalité l'écorce de chêne moulue utilisée pour le tannage végétal. Cette technique est apparue en Asie du Sud entre -7000 et -3000 ans avant J.C et est toujours utilisée dans certaines parties du monde pour faire précipiter le collagène des peaux et les rendre ainsi imputrescibles.

Historiquement d'autres utilisations empiriques peuvent être expliquées par ce phénomène, notamment la clarification du vin, le trouble de la bière, le phénomène d'astringence etc…

Les études portant sur les interactions naturelles se déroulant dans divers milieux réactionnels (boissons etc…) ont permis de comprendre les types d'interactions mis en jeu

dans ces phénomènes longtemps considérés comme empiriques. Ces études ont permis par la suite d'utiliser ces connaissances pour provoquer dans des milieux contrôlés ces interactions afin d'obtenir des conjugués ayant des propriétés originales.

Dans une première partie seront présentées les molécules présentes dans la matière première choisie pour ce projet de recherche, c'est-à-dire un extrait polyphénolique issus du raisin (Grape Total®, de chez Grape Sud). Ensuite, dans une seconde partie seront détaillées les principales explications avancées par la littérature afin de comprendre le phénomène d'interaction covalente protéine/polyphénols. Et dans une dernière partie, les études ayant pour but de provoquer ces interactions pour produire des conjugués fonctionnalisés seront décrites ainsi que celles permettant de comprendre les propriétés fonctionnelles de ces conjugués.

II.1 Les polyphénols de raisin : généralité et identification

II.1.1 Généralité sur les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (Garrido & Borges 2013).

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles.

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, ou d'un tissu particulier.

Une classification de ces substances a été proposée par Harborne en 1980. On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Plusieurs milliers des molécules ont été identifiées à ce jour. Ainsi nous en absorbons chaque fois que nous consommons un aliment d'origine végétale. Les polyphénols ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent le plus souvent un même squelette de base à quinze atomes de carbones « 2-phényl-1-benzopyrane», constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par un cycle pyranique central (figure 28).

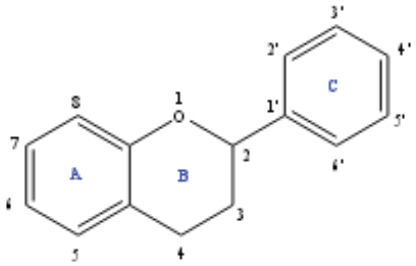


Figure 28 : structure de base des flavonoïdes : 2-phényl-1-benzopyrane

Dans la nature, les polyphénols peuvent se trouver sous forme libre ou conjuguée, souvent liée à un ou plusieurs groupes sucre, branchés sur l'un de leur groupement hydroxyle (O-Glycosides). Cette O-Glycosylation peut prendre place sur n'importe laquelle des fonctions hydroxydes présente sur le squelette carboné des polyphénols, mais certaines positions sont plus souvent rencontrées que d'autres.

II.1.2 les polyphénols de raisin

Les polyphénols présents dans le raisin peuvent être classés en deux grandes familles :

- les flavonoïdes (flavones, flavonols, flavononols, flavanols et anthocyane). Ils diffèrent entre eux par les positions des doubles liaisons et le nombre et la position des groupements hydroxyles. Ce sont des molécules unitaires, qui peuvent être greffées par un ou plusieurs résidus de type sucre (figure 29 par exemple).

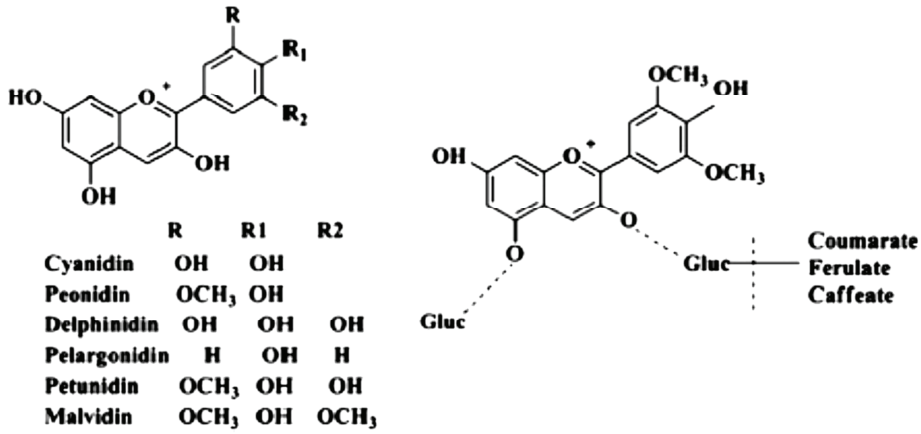


Figure 29 : structures chimiques des principaux anthocyanes rencontrés chez le raisin

- les tanins (hydrolysables ou condensés). Les tanins hydrolysables sont des molécules polymériques complexes ayant pour base une molécule d'acide ellagique ou une molécule d'acide gallique. Les tanins condensés sont des polymères d'anthocyanes, on parle d'ailleurs de protoanthocyanidine pour des molécules constituées de résidus anthocyanidine (figure 30).

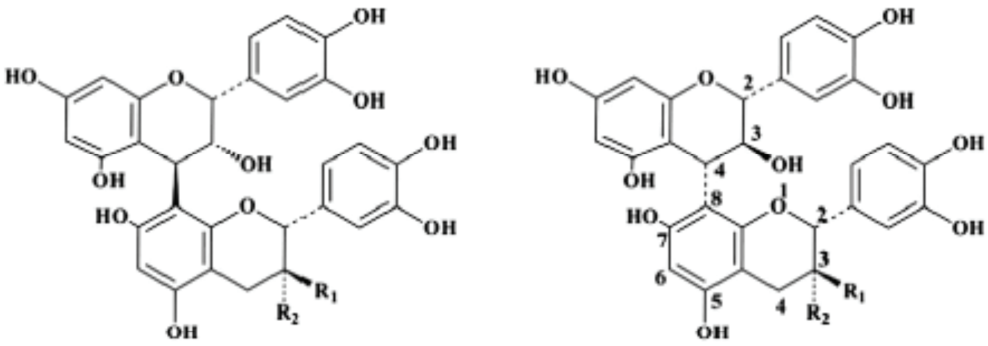


Figure 30 : Structure chimique des principaux tanins condensés rencontrés chez le raisin

Le tableau 12 ci-dessous résume les molécules majoritairement retrouvées dans le raisin, selon leurs familles :

Tableau 12 : synthèse des différents polyphénols retrouvé dans le raisin

Famille	Molécule	Références
Flavone	Génistéine, eriodicitol, naringenine, hespérétine, luéoline	Zoescklein *et al.* 1995 Cieslik *et al.* 2006 Macheix *et al*. 1994 Jandera *et al*. 2009 Fang *et al*. 2008
Flavonols	Quercetine, kaemferol, isorhamnetine, myricetine, laricitine, syringetine	Hsu *et al.* 2009 Jeffery *et al.* 2008
Flavononols	Taxifoline, astilbine, dihydromyricetine	Zoecklein *et al.* 1995
Flavanols	Catéchine, épicatéchine, épicatéchine gallate, gallocatéchine, épigallocatéhchine, épigallocatéchine gallate	Decendit *et al.* 2002
Anthocyanes	Cyanidine, peonidine, delphinidine, pelargonidine, petunidine, malvidine	He *et al.* 2010 Koponen *et al.* 2007 Castillo-Munoz *et al.* 2010
Tanins hydrolysables	Acide ellagique, acide gallique	Koponen *et al.* 2007
Tanin condensés	Procyanidine, prodelphinidine	He *et al*. (2008) Zhao *et al.* (2010)

II. 2 Les interactions covalentes protéine/polyphénol

II.2.1 les réactions par oxydation

La formation de structures moléculaires par la réaction des ortho quinones sur les protéines est connue dans la littérature. Le résidu diphénol d'un acide phénolique ou d'un polyphénol est oxydé en ortho quinone, par réaction enzymatique ou par réaction avec l'oxygène. La quinone forme un dimère avec un autre résidu quinone, ou réagit avec les résidus NH_2 ou SH d'une protéine pour former des liaisons covalentes de type C-N ou C-S avec le noyau aromatique, avec régénération de l'hydroquinone. Ce dernier peu de nouveau être oxydé et de nouveau se lier avec une autre protéine ou un autre polyphénol (Strauss & Gibson 2004) (voir figure 31).

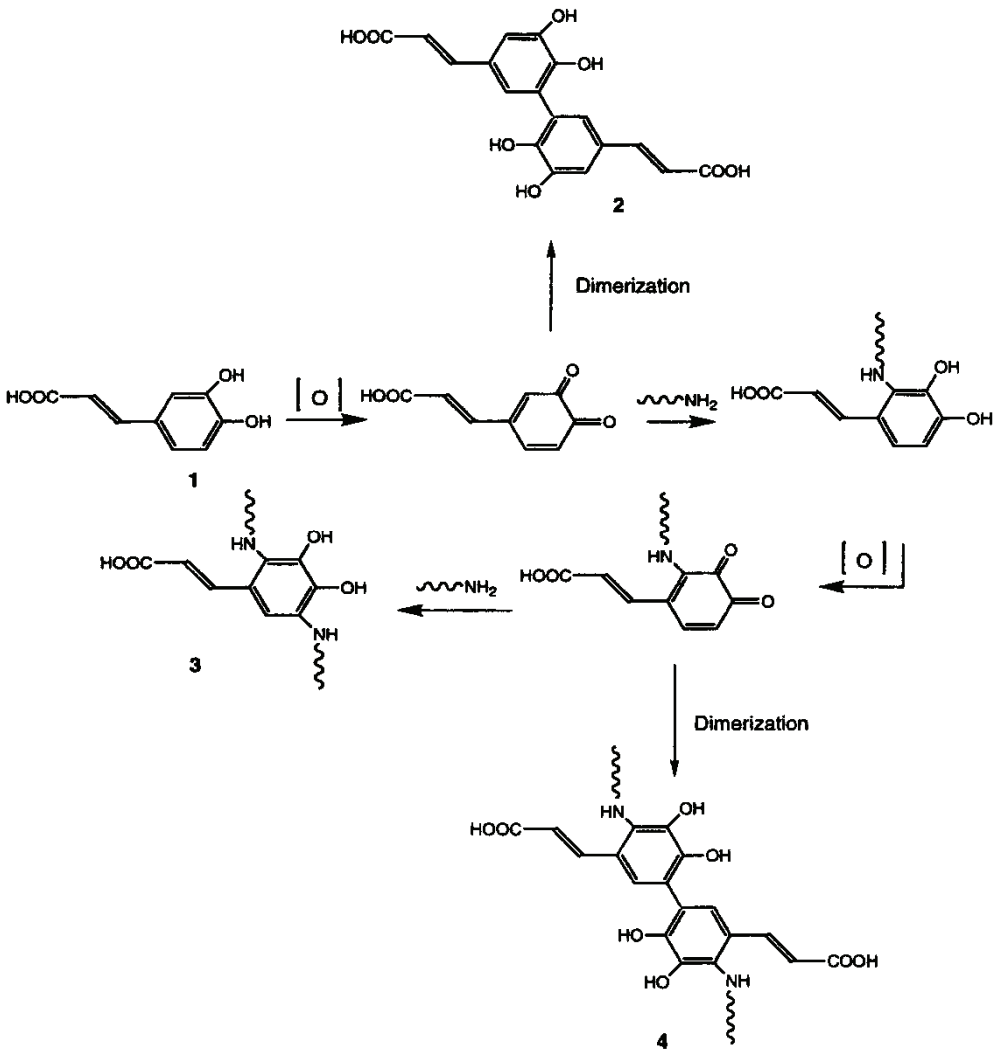


Figure 31 : greffage d'un acide phénolique avec un groupement aminé d'une chaîne peptidique en présence d'oxydant (Strauss & Gibson 2004)

II.2.2 Réaction avec changement de pH : la rupture des liaisons inter-flavonol

En présence d'un pH inférieur à 4 ou supérieur à 9, il y a rupture des liaisons interflavonone et formation de carbocations très électrophiles. Ces carbocations vont très vite réagir sur le groupement nucléophile le plus proche, dans notre cas, les fonctions SH ou NH_2 des protéines. En l'absence de protéines, un phénomène de polymérisation peut se produire sur les molécules en présence, entraînant la formation de composés de très hauts poids moléculaire qui peuvent précipiter (Haslam & Lilley 1988). C'est ce phénomène qui apparait notamment dans le trouble de la bière et dans la perte de l'astringence du vin vieillissant.

II.2.3 Les techniques historiques : utilisation empirique de ces réactions

Le tannage du cuir

La production du cuir est décrite comme le premier procédé manufacturé de l'humanité. Il permet la transformation de peau animale putrescible en un matériau utilisable, moins perméable à l'eau et à la vapeur, plus résistant à l'abrasion et plus résistant aux attaques bactériennes et à la chaleur. Ceci est dû à la capacité de plusieurs molécules organiques et inorganiques à interagir avec la protéine principale de la peau : le collagène. Les tanins ont été employés depuis le Néolithique pour convertir la peau en cuir. Ce procédé est connu sous le nom de tannage végétale et a été utilisé jusqu'à la fin du 19eme siècle, puis remplacé par le tannage minéral à base de chromium (Falcao *et al.* 2011). Deux critères semblent importants pour l'efficacité de ce phénomène. La taille du tanin devant se situer d'une part entre 500 et 3000 Da pour pouvoir atteindre les sites actifs de la protéine, et d'autre part avoir suffisamment de groupement hydroxyle permettant la réaction avec les groupements protéiques (Falcao *et al.* 2011).

Le trouble des boissons

Karl J. Siebert dans ses nombreux travaux sur le sujet (Siebert 2006 ; 1999 ; Siebert *et al.* 1996a ; Siebert *et al.* 1996b, Siebert & Lynn 2001) explique que le trouble de la boisson résulte de la diffusion de la lumière par des colloïdes ou des particules en suspension dans une solution. Il indique que ce phénomène présent dans différentes boissons comme la bière, les jus de fruit ou le vin, peut-être dû soit aux oxalates et aux tartrates, soit à une croissance de

micro-organisme ou la présence de certains polysaccharides. Cependant l'explication principale semble être l'interaction entre les polyphénols et les protéines. En effet, les polyphénols et les protéines peuvent former des complexes insolubles diffractant la lumière.

Ces formations de complexes dépendent des protéines misent en jeu, et plus exactement de leur taux de prolines. Cet acide aminé semble favoriser l'interaction protéine/polyphénols en prévenant la formation d'hélice alpha dans la structure secondaire de la protéine, permettant ainsi une structure plus ouverte. Les protéines principales de la bière (Asano *et al.* 1982) du jus de pomme (Wu & Siebert 2002) et du jus de raisin (Wu & Lu 2004) sont toutes relativement riches en proline et sont toutes les trois connues pour être les principales actrices de la formation du trouble dans leurs boissons respectives (voir figure 32).

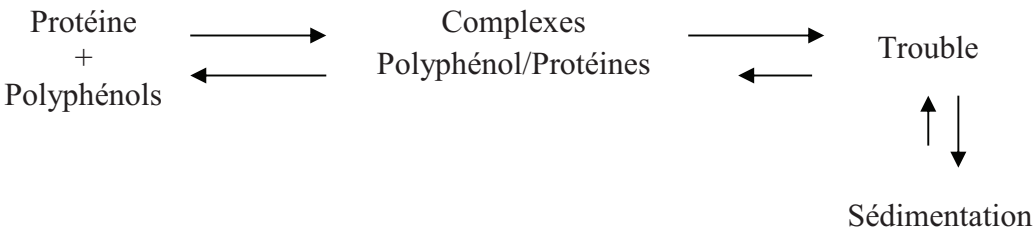


Figure 32 : interaction protéine/polyphénols entrainant la formation du trouble et de la sédimentation. (Selon : Siebert 2006)

La formation du trouble est influencée par quatre facteurs, selon le modèle de Siebert (1996a) : la concentration en protéine, la concentration en polyphénol, le pH et la concentration en éthanol. Les différentes concentrations en polyphénol et en protéine peuvent induire le mécanisme présenté en figure 33 : Ce modèle présente des configurations de liaisons particulières suivant la concentration de chaque protagoniste, selon que l'un ou l'autre soit en excès. Il semblerait que l'éthanol n'a qu'une action modeste sur la formation du trouble, alors que le pH a une action beaucoup plus importante : plus le pH est élevé et moins le trouble se forme (Siebert & Lynn, 2001). Gardner & McGuinness ont proposé en 1977 un modèle de développement du trouble passant par une phase préalable de polymérisation puis par une phase d'activation (figure 34).

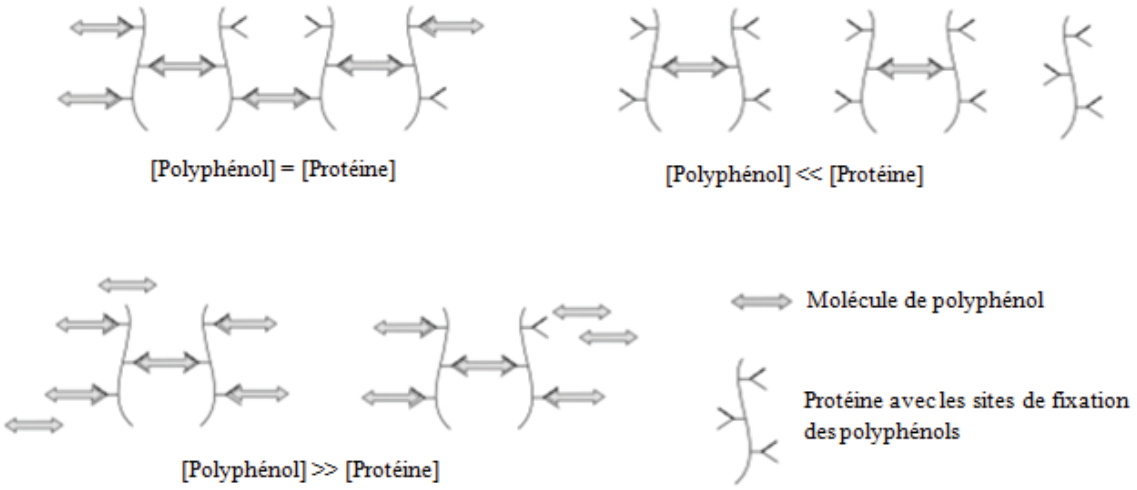


Figure 33 : mécanisme conceptuel de l'interaction protéine/polyphénols (selon : Siebert et al. 1996a)

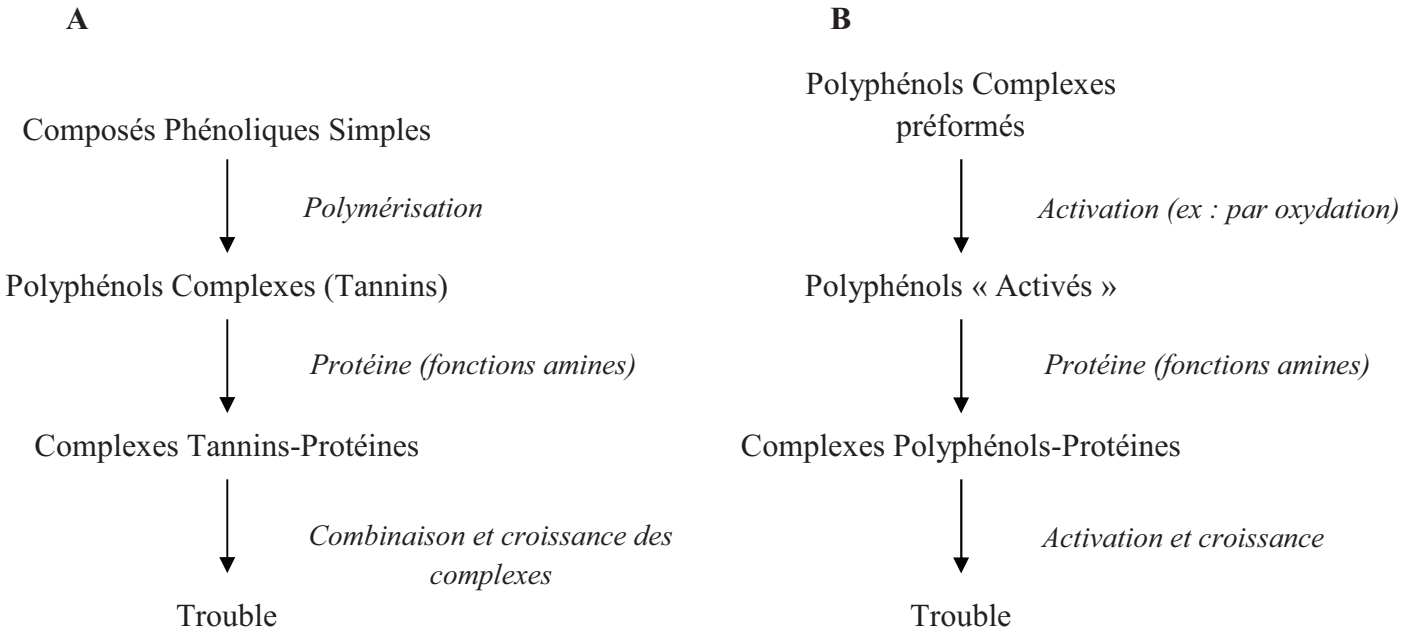


Figure 34 : mécanisme possible de la formation du trouble en 2 phases : (A) polymérisation (B) activation (selon : Gardner & Mc Guinness 1977)

La clarification des vins

D'après le Code International des Pratiques Œnologiques (CIPO, 2012) la clarification du vin (aussi appelée collage ou débourbage) est « *une technique utilisée en œnologie, par addition de substances précipitant les particules en suspension. Soit en favorisant la chute libre de ces dernières, soit en se coagulant autour des particules à éliminer et les entraînant dans les sédiments* ». L'objectif de cette technique est de compléter la clarification spontanée,

d'assouplir les vins rouges en enlevant une partie des tanins et des polyphénols et clarifier les vins troublés.

Il existe deux types de « colle » : les bentonites qui favorisent simplement la chute des particules, et les colles se coagulant. Dans cette dernière catégorie, plusieurs mélanges protéiques ou des protéines pures sont citées : la gélatine, l'albumine, le blanc d'œuf, la colle de poisson, le lait écrémé, la caséine, les matières protéiques d'origines végétales et les extraits protéiques lévuriens.

Ici selon le pH du vin, sa concentration en polyphénol et son degré d'alcool, les mêmes interactions que citées plus haut sont mis en jeu, permettant la précipitation des complexes protéine/polyphénols. Il est à noter que la « boue de collage » obtenue est éliminée par incinération ou épandage et n'est absolument pas valorisée à l'heure actuelle.

II.3 Les interactions provoquées : propriétés des conjugués

Les interactions provoquées en laboratoire sont le plus souvent formulées à partir de protéines et de polyphénols purs ou commerciaux et clairement identifiés. Ces études nous permettent de comprendre quels avantages il y a de faire interagir des polyphénols sur les protéines, et de connaître l'impact de ce greffage sur les propriétés fonctionnelles de l'un ou l'autre des protagonistes. Seront cités dans cette partie les études ayant pour but de produire des molécules originales, mais aussi celles permettant d'appréhender les impacts du greffage sur les propriétés fonctionnelles. Etonnamment, dans la littérature, les différentes propriétés des conjugués sont chacune étudiées sur un type de protéine différente, permettant un classement par protéine.

II.3.1 Gélatine et polyphénols

Le traitement du collagène par des extraits végétaux est une technique de tannage utilisé depuis l'antiquité pour conserver les peaux d'animaux. Le tannage du cuir est la première utilisation de la réticulation gélatine/polyphénol répertoriée. Les études récentes se

concentrent sur l'utilisation de la gélatine réticulée à partir de polyphénols purs et/ ou issus de mélanges alimentaires (type jus de fruit etc...) pour des applications rhéologiques.

Une étude de Gibson *et al.* (2004) utilise de la gélatine (bloom 175) et la réticule avec des polyphénols d'origines différentes. Ils utilisent principalement des molécules commerciales pures, comme l'acide caféique, l'acide chlorogénique et l'acide férulique, mais aussi un polyphénol plus complexe : la rutine. Deux réticulations sont également testées avec des mélanges alimentaires : du jus de raisin et du café. Les réactions de greffage se font en mélangeant les polyphénols avec la gélatine fondue, à un pH stabilisé à 8 et à une température réglée à 40°C. Le mélange est exposé à l'oxygène par deux méthodes : soit par bullage pendant 1h, soit dans un ballon fermé avec agitation occasionnelle pendant 4 h.

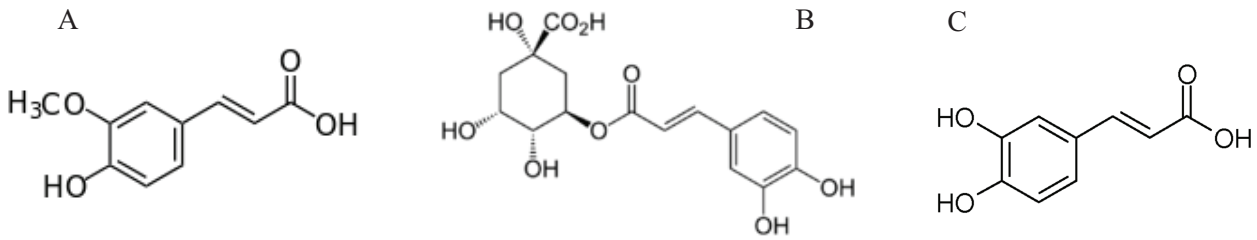


Figure 35 : structure chimique de l'acide férulique (A), de l'acide chlorogénique (B) et de l'acide caféique (C)

Dans cette étude, des billes de gélatine sont réalisées par coacervation acide et sont réticulées par les différents réticulants cités plus haut. Cette réticulation permet d'améliorer les propriétés mécaniques du gel de gélatine et améliore sa stabilité à la chaleur. Un article de Zhang *et al.* (2011) décrit également la formation de microsphères par coacervation, en utilisant de l'acide tannique, de la gélatine et de la gomme arabique. Les conditions de greffages ne sont pas décrites. .

Le travail de Cao *et al.* (2007) montre une utilisation similaire de deux polyphénols sur la gélatine : l'acide férulique et l'acide tannique. La gélatine est réticulée par le même phénomène oxydatif sur les polyphénols, mais par ajustement du pH de 6 à 10 et ajustement de la température à 50°C. Ici le but est de former un film de gélatine et de tester ses propriétés mécaniques d'élongation, de résistance et d'élasticité ainsi que sa perméabilité à la vapeur d'eau. Toutes ces caractéristiques sont améliorées par le greffage de polyphénol. Une

autre équipe (Yan *et al.* 2011) a mené une étude similaire avec de l'acide gallique et de la rutine sur de la gélatine issue de poisson (mais sans de traitement oxydatif mentionné) avec des résultats similaires.

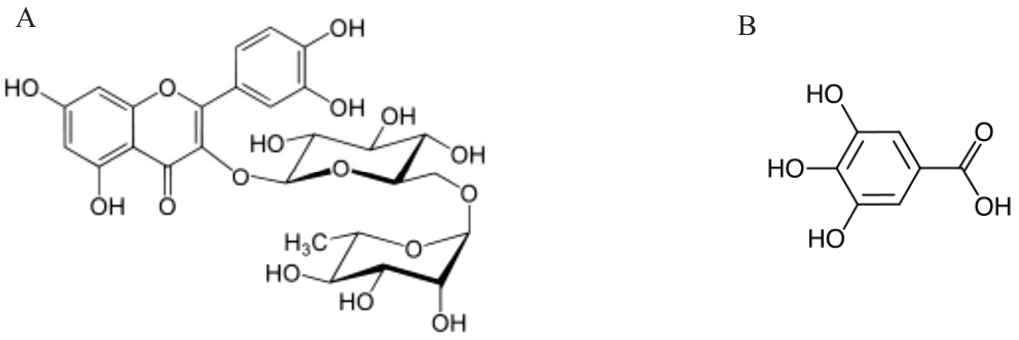


Figure 36 : structure chimique de la rutine (A) et de l'acide gallique (B)

L'étude s'approchant le plus de notre problématique date de 2009 et a été conduite par Aewsiri *et al.* La gélatine de sèche est réticulée avec de l'acide caféique, de l'acide férulique et de l'acide tannique, par ajustement du pH à 9 et bullage d'oxygène pendant 1h. Le complexe protéine/polyphénol est analysé pour ses pouvoirs émulsifiant et antioxydant, mais sans aller jusqu'à à la formulation de microsphères. La protection anti-oxydante sur des lipides sensibles est également testée. Ces travaux prouvent que le greffage de 5% de composés phénoliques sur de la gélatine de sèche améliore considérablement la capacité anti-oxydante de la gélatine, sans diminuer son pouvoir émulsifiant. Ce greffage inhibe aussi l'oxydation des lipides stabilisé en émulsion directe.

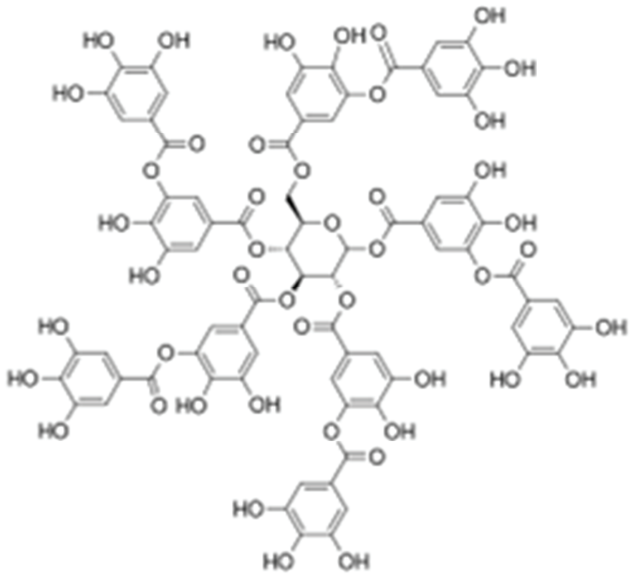


Figure 37 : structure chimique de l'acide tannique

Beaucoup d'articles et de brevet dans la littérature portent sur l'utilisation de la génipine comme réticulant pouvant remplacer les réticulants chimiques de la gélatine. Deux études notamment, celle de Bigi *et al.* (2002) et celle de Yao *et al.* (2004) utilisent la génipine pour réticuler des films de gélatine.

Les résultats obtenus sont proches de ceux trouvés avec des films réticulés grâce au glutaraldehyde en termes de propriétés mécaniques, thermiques et de gonflements. Ils suggèrent que la génipine pourrait être une bonne alternative à la réticulation chimique. Deux brevets des mêmes inventeurs, Sung *et al.* 2004 et 2007 (WO 2004/012676 A2 et US 7.282.220 B1) utilisent cette molécule pour réticuler de la gélatine servant de matrice à des microcapsules. Cette réticulation permet de limiter la dégradation des capsules notamment par la collagénase.

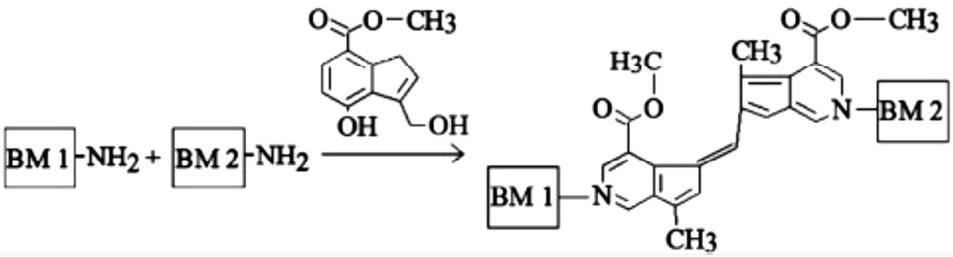


Figure 38 : réaction de réticulation entre deux biomolécule (BM) par la génépine

II.3.2 Protéine de lait et polyphénols

Le deuxième champ d'investigation au sujet des interactions polyphénol/protéine est le phénomène d'agrégation entre les protéines issues du lait et les polyphénols issus du thé. La problématique de ce genre d'interaction se situe au niveau de la biodisponibilité des complexes formés, notamment quand le lait est mélangé au thé. Des études contradictoires montrent d'un côté que ces complexes n'influencent en rien la biodisponibilité des polyphénols et leurs actions bénéfiques pour la santé, alors que d'autres démontrent que les complexes protéines/polyphénols empêchent une bonne absorption de ces derniers par le système digestif, et inhibent leurs pouvoirs antioxydants

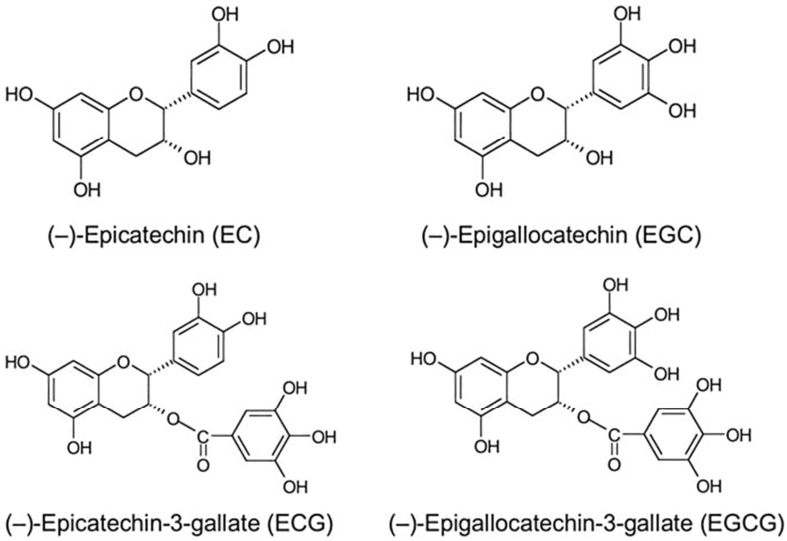


Figure 39 : principaux polyphénols du thé

La plupart des publications de la littérature étudie ce type d'interaction dans des milieux réactionnels proche de la réalité, sans provoquer la réticulation par oxydation. Les études de Hasni *et al.* (2011) et de Kanakis *et al.* (2011) sur les interactions entre respectivement les caséines α et β et la β-lactoglobuline avec les polyphénols du thé (catéchine, epicatéchine, epicatéchine gallate et apigallocatéchine gallate) se concentrent sur la structure des complexes en 3D, et montrent une inhibition de l'activité anti-oxydante des polyphénols.

Ces mêmes flavonoïdes sont étudiés par Arts *et al.* (2002) en présence de protéine de lait (caséine) et de BSA. Ils démontrent dans cette étude que le pouvoir masquant des protéines sur l'activité anti-oxydante des polyphénols est variable selon la protéine et selon le polyphénol. Le phénomène d'auto-oxydation par la formation d'une quinone à partir de l'épigallocatechine-3-gallate est étudié dans la contribution d'Ishii *et al.* (2008) et montre que le greffage du polyphénol sur la glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase inhibe son activité. Ceci montre que le greffage des polyphénols sur les enzymes entraîne une modification de l'activité du polyphénol et de la protéine.

II.3.3 Protéine végétale et polyphénols

Les interactions entre les protéines végétales et les polyphénols sont peu étudiées dans la littérature. Rawel *et al.* (2002) mettent en évidence que les interactions covalentes entre les protéines de sojas (la glycinine et l'inhibiteur de trypsine du soja) et divers polyphénols (acide caféique, acide chlorogénique, acide gallique, quercétine, apigénine, kaemférol et myricétine) peuvent être provoquées par ajustement du pH à 9 pendant 24h, à 4°C.

Cette étude montre que les polyphénols se greffent sur les résidus tryptophane, lysine et en général sur les groupements amino et thiol des protéines. Ce greffage augmente avec le nombre de groupement hydroxyle sur le polyphénol. Avec un haut degré de dérivation, ils observent que les protéines deviennent plus acides, avec une diminution nette des charges négatives. Ce changement de paramètre physico-chimique a un effet sur la solubilité des protéines dérivées : les protéines natives ont un pHi à 5 alors que les conjugués ont un pHi à 3.5, avec une diminution générale de la solubilité à tous les autres pH. Au niveau de la digestion de ces conjugués, il y a peu voir pas d'effet sur la digestion stomacal, alors que la digestion entérique est stimulées, jusqu'à être pratiquement doublée pour les conjugués glycinine/acide chlorogénique et glycinine/myricétine.

Il n'y a pas d'étude dans la littérature décrivant l'utilisation de polyphénol sur les protéines de pois, modèle protéique utilisé dans ce projet de recherche.

Synthèse du chapitre : 4eme partie : la fonctionnalisation des protéines

- Les trois biopolymères choisis pour ce projet de recherche sont d'origine protéique : les protéines de pois, le caséinate de sodium de lait de vache, et la gélatine de type A porcine

- Les molécules fonctionnalisantes sont également d'origine naturelle : les sucres et les polyphénols de raisin

- La fonctionnalisation des protéines de départ permet de modifier les propriétés fonctionnelles

- La réaction de Maillard consiste à greffer des sucres réducteurs sur les fonctions amines des protéines par traitement thermique. Les propriétés fonctionnelles des composés obtenus ont été explorés dans la littérature, mais peu sous forme de microsphères et jamais pour des formulations de vitamine A

- La complexation des protéines et des polyphénols permet de greffer des composés polyphénoliques sur les fonctions nucléophiles de protéines. Ces complexes ont été décrits dans la littérature pour leur indigestibilité, leurs propriétés émulsifiantes et antioxydantes. Mais il n'est nulle part fait état de leur utilisation sous forme de microsphère

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

I.1 Les biopolymères

Les biopolymères choisis pour cette étude sont tous de grade FOOD ou FEED, et proviennent de fournisseurs européens d'ingrédients agro-alimentaires. Le tableau 13 suivant liste les différentes matières premières utilisées.

Tableau 13: rréférences des biopolymères

	Nom usuel de la matière première	Référence fournisseur	Fournisseur	Pureté
Protéines	Isolat de protéine de pois (*Pisum Sativum*)	Nutralys® pea protein F85M	Roquette	>85%
	Caséinate de Sodium	Caséinate de sodium	Armor Protéines	100%
	Gélatine type A porcine	Gélatine bloom 140	PB Gelatins	100%
Oses et polysaccharides	Maltodextrine DE 6	Glucidex IT 6	Roquette	100%
	Maltodextrine DE 12	Glucidex IT 12	Roquette	100%
	Maltodextrine DE 38	Glucidex IT 38	Roquette	100%

	Lactose	Lactose	Sigma-Aldrich	99%
	Glucose	Glucose	Sigma-Aldrich	99%
	Acide glucuronique	Acide glucuronique	Sigma-Aldrich	99%
Polyphénols	Polyphénols de raisin	Exgrape Grape Total® PPR	Groupe Grape Sud®	>92% (équivalent catéchine)

I.2 Les actifs liposolubles encapsulés

Les actifs liposolubles utilisés dans ce projet de recherche sont : la vitamine A, sous forme d'acétate de rétinol, qui constitue l'actif encapsulé principal, et le géraniol, coencapsulé dans les microsphères. Cette coencapsulation du géraniol avec la vitamine A va permettre l'étude sur la perméabilité de la matrice des microsphères à cette molécule volatile. L'huile de tournesol a servis à la formulation des émulsions pour le test des capacités émulsifiantes des protéines fonctionnalisées ou non. Le tableau 14 reprend la description de chaque actif utilisé.

Tableau 14 : références des actifs liposolubles

	Nom usuel de l'actif	Référence fournisseur	Fournisseur	Pureté
Actif liposoluble	Vitamine A	Vitamine A oil acetate FG	Adisseo France	95%
	Huile de tournesol	Huile de tournesol	Marque distributeur Carrefour	100%
Traceur volatil	Géraniol	Géraniol	Sigma-Aldrich	>97%

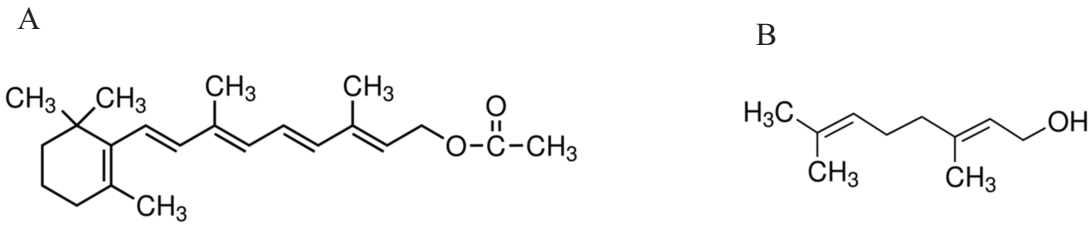


Figure 40 : en (A) : formule de l'acétate de rétinol (vitamine A). En (B) : formule du géraniol

I.3 Les produits chimiques

La plupart des produits chimiques utilisés dans ce travail provienne de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'acide 2-2-2 trifluoroacétique (TFA), l'acide acétique, l'acide trinitrobenzenesulfonique (TNBS), le bicarbonate de sodium, l'acide chlorhydrique, l'hydroxyde de sodium (soude) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) proviennent de chez ce fournisseur. L'acétonitrile et le méthanol sont de puretés compatibles avec la chromatographie en phase liquide et provienne de Carlo Erba. Le tableau 15 ci-dessous reprend les différents produits chimiques utilisés, ainsi que leurs principales caractéristiques et leurs fournisseurs.

Tableau 15: références des produits chimiques

Molécule	N° CAS	Fournisseur	Pureté	Formule brute
Acide 2-2-2 Trifluoroacétique (TFA)	76-05-1	Sigma-Aldrich	95%	$C_2HF_3O_2$
Acide Acétique	64-19-7	Sigma-Aldrich	100%	$C_2H_4O_2$
Acide Chlorhydrique	7647-01-0	Sigma-Aldrich	37%	HCl
Acide trinitrobenzenesulfonique (TNBS)	25-08-19-2	Sigma-Aldrich	100%	$C_6H_3N_3O_9S$
Hydroxyde de sodium (soude)	1310-73-2	Sigma-Aldrich	100%	NaOH
Bicarbonate de sodium	144-55-8	Sigma-Aldrich	100%	$NaHCO_3$

Diméthylsulfoxyde (DMSO)	67-68-5	Sigma-Aldrich	>95%	C_2H_6OS
Acétonitrile	75-05-8	Carlo Erba	>99%	C_2H_3N
Méthanol	67-56-1	Carlo Erba	>99%	CH_4O
Chloroforme	67-66-3	Sigma-Aldrich	>99%	$CHCl_3$

I.4 Le matériel biologique

Pour reproduire au plus près le système digestif d'un monogastrique, différents milieux de digestions simulés ont été recomposés in-vitro. Leurs compositions enzymatiques et biochimiques ont été reproduites au plus près en respectant le type enzymatique et leur concentration dans un fluide in-vivo. Ainsi, la pepsine, la pancréatine, l'extrait de bile proviennent de Sigma-Aldrich. La protéine du mucus, la mucine, a servi pour le test de mucoadhésion. Elle provient également de Sigma-Aldrich. Le tableau 16 présente les références de ces produits et leurs origines.

Tableau 16: références du matériel biologique

Molécule	N° CAS	Fournisseur	Origine
Pepsine	9001-75-6	Sigma-Aldrich	Muqueuse d'estomac de porc
Pancréatine	8049-47-6	Sigma-Aldrich	Pancréas de porc
Extrait de bile	8008-63-7	Sigma-Aldrich	Extrait de bile de porc
Mucine de type II	84082-64-4	Sigma-Aldrich	Mucine de mucus stomacal de porc

II. Méthode analytique

II.1 Méthode d'analyses par HPLC

II.1.1 Méthode d'analyse HPLC pour les biopolymères fonctionnalisés

Les analyses structurales des protéines et des produits de réaction des voies de fonctionnalisation ont été réalisées en utilisant un système de chromatographie liquide haute performance d'Agilent technologies (1200 LC). Les protéines et les protéines fonctionnalisées par la réaction de Maillard ont été analysées avec une colonne Biosuite 250 5µm HR SEC. Les produits ont été élués avec une phase mobile constituée d'eau distillée avec 0.1% de TFA à un débit de 1 ml/min. Les produits ont été détectés par détection UV (254 nm) à l'aide du logiciel HP Chemstation.

Les protéines et les protéines greffées avec les polyphénols de raisin ont été analysées avec une colonne TSK-GEL G3000SW. Les produits ont été élués à l'aide d'une solution de tampon phosphate (0.1M, pH 7) à un débit de 0.5 ml/min. Les produits ont été détectés par détection UV (210, 254 et 280 nm) à l'aide du logiciel HP Chemstation.

Le tableau 17 récapitule les différentes phases mobiles et les différentes colonnes utilisées pour la séparation, ainsi que la détection selon le type de biopolymère.

Tableau 17 : condition d'analyse HPLC des protéines fonctionnalisées

Biopolymère	Colonnes utilisées	Elution	Phase mobile	Débit	Détection UV
Protéine native et protéine greffée par réaction de Maillard	Colonne gel perméation Biosuite 250 5 µm HR SEC columns	Isocratique	Eau + 0.1 % TFA	1 ml/min	254 nm
Complexes protéine/polyphénols	Gel perméation TSK GW3000	Isocratique	Tampon phosphate 0.1M pH 7	0.5 ml/min	210 nm 254 nm 280 nm

II.1.2 Méthode d'analyse HPLC pour le dosage de la vitamine A

La vitamine A sous forme d'acétate de rétinol est diluée dans la phase mobile avant d'être transvasée dans un vial scellé. Le dosage se fait en comparaison avec une gamme étalon établie avec des concentrations connues du même produit. La mesure se fait en calculant l'aire sous le pic de détection UV, après séparation HPLC.

La vitamine A a été analysée avec une colonne Interchim C18 WOD. La molécule a été éluée à l'aide d'une solution d'Acétonitrile (65%), de méthanol (20%) et d'eau distillée (15%) en mode isocratique à un débit de 0.7 ml/min. Les produits ont été détectés par détection UV (340 nm) à l'aide du logiciel HP Chemstation (tableau 18).

Tableau 18 : Condition d'analyse HPLC de la vitamine A

Molécule	Colonne utilisée	Elution	Phase mobile	Débit	Détection UV
Vitamine A	Interchim C18 WOD	Isocratique	Acétonitrile 65%, Méthanol 20%, Eau 15%	0.7 ml/min	340 nm

II.2 Analyse par électrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse SDS-PAGE est une technique permettant de séparer des protéines selon leur poids moléculaire par migration électrique au sein d'un gel de polyacrylamide de maillage connu.

Ici le gel de concentration a été formulé à 4% de polyacrylamide et 0,1 % SDS et le gel de séparation à 12% de polyacrylamide et 0.1% SDS. Ce sont des gels précoulés de la marque Bio-Rad (Mini-PROTEAN® TGX™ Precasts Gels). Le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), le bleu de Coomassie et le glycérol sont également de chez Bio-Rad.

Les échantillons ont été dilués dans l'eau distillée à une concentration de 1g/L et dilué une nouvelle fois par 2 avec une solution de glycérol et de bleu de Coomassie. 5 µl de

mélange ont été injecté dans les puits du gel de concentration, et la migration a été faite à 170 V, dans un tampon de migration TRIS-Glycine (Bio-Rad) à pH 8.3 contenant 0.1% SDS.

Après la migration, le gel est rincé 3 fois à l'eau distillée, puis coloré avec une solution de bleu de Coomassie (45 % méthanol, 10% acide acétique), et décoloré dans un bain d'eau ultrapure pendant 12h. Les bandes sont lues grâce à un lecteur de gel (Bio-Rad gel doc EZ Imager)

II.3 Détermination du degré de substitution des protéines

Le taux d'amines libres d'une protéine peut être déterminé grâce à la méthode TNBS. L'échantillon est dispersé dans l'eau distillée (0.5 g/l), et 500 µl de cette solution est mélangé avec 2 ml de tampon bicarbonate (4% m/m, pH 8.5). 2 ml de TNBS (0.1 % m/m) sont ajoutés, et l'échantillon est placé au bain-marie à 50°C pendant 1h, à l'abri de la lumière. Ensuite 1 ml d'eau distillée est rajouté, et la réaction est stoppée par l'addition de 4 ml d'acide chlorhydrique (37% m/m). Le tube est laissé à refroidir à température ambiante et dans l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est ensuite mesuré à 344 nm.

Ce même protocole est utilisé avec les protéines fonctionnalisées, avec un échantillon préparé avec le même taux de protéine (c'est-à-dire 0.5 g/l de protéine en solution, soit 1 g/l de conjugué si le conjugué est à 50% protéique)

Le degré de substitution est calculé selon l'équation suivante :

$DS\ (\%) = [(Abs_{344nm}\text{ de la protéine})-(Abs_{344nm}\text{du conjugué})/ (Abs_{344nm}\text{de la protéine})] \times 100$

II.4 Quantification du brunissement des conjugués issus de la réaction de Maillard sur les protéines

Les conjugué de Maillard ont la spécificité de former des produits bruns. Pour quantifier ce brunissement, les conjugué ont été dilués dans l'eau distillée à 1 g/l, puis la mesure est faite à 420 nm grâce à un spectrophotomètre (UV-Vis Spectrophotometer UV mini 1240, Shimadzu)

III. Fonctionnalisation des protéines

III.1 Fonctionnalisation des protéines de pois par les sucres

Dans un ballon tricol de 500 ml, équipé d'un montage à reflux, 0.5 g de protéines de pois sont dispersés dans 100 ml d'eau distillée, sous agitation magnétique. Le pH est ajusté à 12 avec de la soude. Le tout est chauffé jusqu'à une température de 100°C pendant 15 min. Ensuite 0.5 g du sucre choisi sont rajoutés dans le mélange sans arrêter la chauffe ni l'agitation. Le tout est laissé 15 min à la même température. La réaction est arrêtée en refroidissant le ballon d'abord sous un filet d'eau froide puis dans un bain de glace.

III.2 Fonctionnalisation du caséinate de sodium de lait de vache et de la gélatine de type A porcine par les sucres

Cette fonctionnalisation fait appel au même protocole que celui des protéines de pois, mais le caséinate de sodium ou la gélatine de type A est directement mélangée avec le composé polysaccharidique, sans étape de dénaturation thermique préalable.

Dans un ballon tricol de 500 ml, équipé d'un montage à reflux, 0.5 g de protéines sont dispersés dans 100 ml d'eau distillée, sous agitation magnétique. Ensuite 0.5 g du sucre choisi sont rajoutés dans le mélange sans l'agitation. Le pH est ajusté à 12 avec de la soude. Le tout est laissé 15 min à 100°C. La réaction est arrêtée en refroidissant le ballon d'abord sous un filet d'eau froide puis dans un bain de glace.

III.3 Fonctionnalisation des protéines par les polyphénols de raisin

Le greffage des polyphénols de raisin sur les protéines est un phénomène naturel qui peut être provoqué et amplifier dans des conditions particulières. Une solution protéique est préparée à 10 g/l dans 100 ml d'eau distillée. Pour trouver les meilleures conditions de greffages, différentes masse de polyphénols (90 mg, 180 mg, 360 mg, 540 mg) sont rajouté à la solution protéique sous agitation magnétique. 100 µl de soude sont rajoutées dans chaque cas pour ajuster le pH 12. Le mélange change alors de couleur (passe du bordeaux au bleu-

vert) et il est laissé sous agitation pendant 24h, contenant ouvert (pour favoriser les phénomènes oxydatifs)

IV. Formulation des émulsions et analyses de la stabilité dans le temps par granulométrie laser

Un Granulomètre Laser Mastersizer 2000 (Malvern Instrument Ltd., UK) a été utilisé pour déterminer le diamètre des gouttelettes d'huile de tournesol dans les émulsions en test de stabilité. Cet appareil utilise la technique de la diffraction laser, pour déterminer la distribution de tailles des particules sphériques.

Les émulsions sont donc formulées avec une concentration en émulsifiant de 5 g/l pour 200 ml d'eau distillée. 20 mg d'huile de tournesol sont ensuite rajoutés sous agitation Turax (Ultraturax, T90) pendant 5 min. Le mélange est ensuite passé à l'homogénéisateur haute pression à 150 bars, pour un passage. 60 ml d'émulsions sont stockés à température ambiante.

Le suivi de la stabilité se fait par granulométrie laser en voie liquide. Une mesure à T0 est effectuée dans l'heure qui suit la formulation de l'émulsion, et les autres s'échelonnent tous les 7 jours.

Cette technique a également permis d'analyser le diamètre moyen ($D_{4.3}$) des émulsions ayant été séchées par la suite sous forme de microsphères de vitamine A.

V. Formulation des microsphères

La formulation des microsphères de vitamine A s'est effectuée en suivant le procédé d'émulsification/atomisation. Dans une première étape, les matières premières (protéines, sucres ou polyphénols) ont été délayées en milieux aqueux. S'en est suivis une étape de fonctionnalisation suivant les protocoles décris précédemment.

Une fois la matrice prête, la vitamine A en fusion (chauffée préalablement à 60°C) a été rajoutée sous agitation Turax pendant 10 min. Une fois la préparation homogène, cette dernière est passée à l'homogénéisateur en serrant la première tête de serrage à 50 bars et la deuxième à 150 bars. L'émulsion récupérée est ensuite séchée par atomisation. Le tableau 19 ci-dessous reprend les formulations des microsphères de vitamine A étudiées pendant ce projet de recherche.

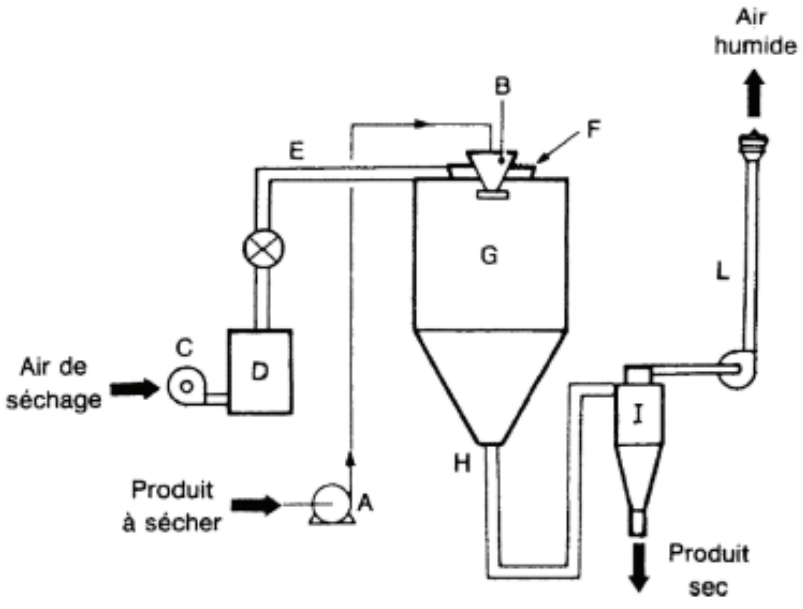
Tableau 19 : formulation des microsphères de vitamine A séché par atomisation

Formulations	E.S de l'émulsion pilote	% de vitamine A (m/m)	% de géraniol (m/m)	% de matrice protéique (m/m)
PP	14.4	43.3	10.5	46.2 % de protéine de pois
PP-MD38	14.4	43.3	10.5	46.2 % (23.1 % de protéine de pois et 23.1 % de maltodextrine DE38)
PP-TAN	14.4	43.3	10.2	46.2 % (34% de protéine de pois et 12 % de polyphénol de raisin)
CA	14.5	43.2	10	46.8 % de caséinate de sodium
CA-MD38	14.4	43.3	10.2	46.5 ¨% (23. 2% de caséinate de sodium et 23.2 % de maltodextrine DE38)
CA-TAN	14.5	43.3	10.2	46.2 % (34% de caséinate de sodium et 12.2 % de polyphénol de raisin)

GEL	14.2	43.3	10.2	46.5 % de gélatine de type A
GEL-MD38	21.2	43.3	10.1	46.5 % (23. 2% de gélatine de type A et 23.2 % de maltodextrine DE38)
GEL-TAN	14.3	43.3	10.3	46.2 % (34% de gélatine de type A et 12.2 % de polyphénol de raisin)

VI. Séchage des émulsions par atomisation : production des microsphères de vitamine A

Le séchage des émulsions a été effectué sur une tour d'atomisation Minor, (Niro Atomizer ; Danemark) équipée d'une turbine (modèle F11). La température d'entrée est réglée à 140 °C, le débit d'air de séchage est d'environ 400 kg/h. La température de sortie est contrôlée entre 75°C et 85°C. Le débit de la pompe d'alimentation est réglé selon la température de sortie. La turbine est réglée à une fréquence de 50Hz. L'air humide est séparé de la poudre de microsphère grâce à un cyclone (Niro Atomizer). La figure 41 rappelle le principe du procédé de séchage par atomisation.



A : pompe d'alimentation de la solution
B : atomiseur (turbine ou buse)
C : ventilateur d'entrée d'air
D : réchauffeur d'air
E : entrée d'air
F : diffuseur d'air
G : chambre de séchage
H : prise de l'extraction de l'air humide
I : cyclone
J : cheminé d'évacuation

Figure 41 schéma du principe d'un sécheur – atomiseur (Charreau & Cavaillé 2012)

VII.1 Etude morphologique de surface par microscopie électronique à balayage (MEB)

L'étude MEB a été réalisée avec un microscope Quanta 200 FEG (FEI, France) en mode environnemental. Les échantillons ont été collés sur un scotch de carbone conducteur. La pression de vapeur d'eau de la chambre a été réglée à 1.30 mbar, pour une taille de spot de 3 et une tension d'accélération de 20 kV. Les échantillons ont été observés par les deux détecteurs S.E et B.S.E à des grossissements de x 400, x 1600 et x 3000.

VII.2 Etude de la stabilité de la vitamine A au sein des microsphères

Pour déterminer la capacité des microsphères formulées à protéger la vitamine A de la dégradation dans le temps, trois conditions de stockage des microsphères ont été utilisées :

- A température ambiante, dans l'obscurité, à une humidité relative (H.R) non contrôlée
- A 40°C dans une étuve à renouvellement d'air, dans l'obscurité, H.R non contrôlée
- A 40°C, dans l'obscurité, à 75% d'H.R (solution saturée de NaCl dans dessiccateur fermé)

25 mg de chaque poudre de microsphères ont été placé dans une coupelle en aluminium, puis disposés dans les conditions ci-dessus, en triplicat pour chaque condition. Au bout de 28 jours, la poudre a été récupérée, mise en suspension dans 10 ml de DMSO à 50°C pendant 5 min pour extraire la vitamine A encapsulée. Le mélange a été ensuite centrifugé pendant 15 min à 14000 rpm, et le surnageant analysé par HPLC.

VII.3 Etude du relargage gastrique et entérique de la vitamine A

Pour pouvoir analyser le relargage de la vitamine A, il faut au préalable simuler des milieux de digestion *in-vitro*, permettant de recréer artificiellement les conditions de pH, les conditions enzymatiques et les conditions de températures rencontrées durant le transit digestif. Cela permet de mettre en situation les microsphères, dans un environnement susceptible de les dégrader et ainsi de provoquer une libération de la vitamine A.

- Milieu simulé de digestion gastrique :

Les microsphères (20 g/l final) sont mises en suspension dans 5 ml d'une solution d'eau distillée et HCl à pH 2. Le mélange est alors homogénéisé pendant quelques secondes. Une solution de pepsine à 40 g/l est rajoutée (312 µl). Le mélange est de nouveau homogénéisé pendant quelques secondes. L'homogénat est incubé à 37.5°C dans un Aquatron (Aquatron HT Infors AG Ch-4103 Bottmingen) avec une agitation orbitale de 180 rpm pendant un temps donné. Idéalement, l'Aquatron est mis à l'abri de la lumière pour éviter la photo-dégradation de la vitamine A. Ce processus est répété pour chaque temps d'analyse : à t= 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 180, 240 min. Chaque mesure à un temps donné est doublée.

- Milieu simulé de digestion entérique :

Les microsphères (20 g/l final) sont mises en suspension dans 5 ml d'une solution d'eau distillée et HCl à pH 5.5. Le mélange est alors homogénéisé pendant quelques secondes. 2.5 ml d'une solution mélange de pancréatine et d'extrait de bile (3 g/l de pancréatine et 12 g/l d'extrait de bile dans eau + HCl pH 5.5) (Concentration finale en microsphère 20 g/l) est ajoutée. Le mélange est de nouveau homogénéisé pendant quelques secondes. L'homogénat est incubé à 37.5°C dans l'aquatron avec une agitation orbitale de 180 rpm pendant un temps donné. Idéalement, l'Aquatron est mis à l'abri de la lumière pour éviter la photo-dégradation possible de la vitamine A. Ce processus est répété pour chaque temps d'analyse : à t= 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 180, 240 min. Chaque mesure à un temps donné est doublée.

Après chaque étape de digestion, la vitamine A relarguée se trouve dans le milieu de digestion, qui est un milieu aqueux. Une procédé d'extraction liquide/liquide a été utilisé afin d'extraire la vitamine A et la doser. Ce procédé utilise le protocole suivant :

Dans le milieu de digestion, 10 ml de chloroforme est ajouté. Le tout est agité manuellement pendant 10s et est laissé à déphaser (déphasage rapide inférieur à 1 min). 1ml de la phase chloroformique (en bas) est prélevé et centrifugé 15 min à 14000 rpm. Le surnageant est dilué par deux dans l'acétonitrile et stocké dans un vial scellé pour analyse HPLC.

Une étude complète a été effectuée pour étudier l'impact sur les microsphères de l'utilisation du chloroforme dans ce protocole sur une possible libération parasite de la

vitamine A lors de la phase d'extraction liquide/liquide. Le protocole de cette étude et ses résultats ne sont pas montrés dans ce manuscrit, mais leurs conclusions sont prises en compte dans le calcul du relargage de vitamine A.

VI.4 Etude de la perméabilité de la matrice des microsphères au géraniol

Les microsphères sont formulées avec du géraniol à hauteur de 10% m/m. Cette molécule volatile va servir de traceur de relargage. Elle a été choisie de par son analogie structurelle avec la vitamine A. La méthode utilisée ici pour suivre la libération du géraniol est proche des techniques des espaces de tête dynamiques (Siefarthet *al.* 2011). Elle consiste en un montage permettant de faire passer un flux d'azote sec et thermostaté sur un lit de microsphère placé dans une enceinte également thermostatée (figure 42). Le flux d'azote est réglé à 60 ml/min (figure 42, A), et passe par une première étuve qui le chauffe à 60 °C (figure 42, B). Le gaz arrive ensuite dans la seconde étuve elle aussi réglée à 60°C (figure 42, C) et passe sur un lit de microsphère stocké dans une cartouche par deux bouchons de laine de verre (figure 42, E). L'azote va entraîner les molécules de géraniol libérées vers le système d'injection de la chromatographie gazeuse (figure 42, D).

Le système d'injection de la chromatographie gazeuse va détourner le flux d'azote vers la colonne de séparation tous les 30 min, pendant 30 s. Cette partition du flux d'azote permet de séparer et de doser les composés volatils issus des microsphères à un instant donné de l'étude de relargage. Les conditions de séparation du géraniol en chromatographie gazeuse sont décrites dans le tableau 20. Le dosage du géraniol se fait en mesurant l'aire sous le pic du spectre FID, après identification du pic par passage d'un standard.

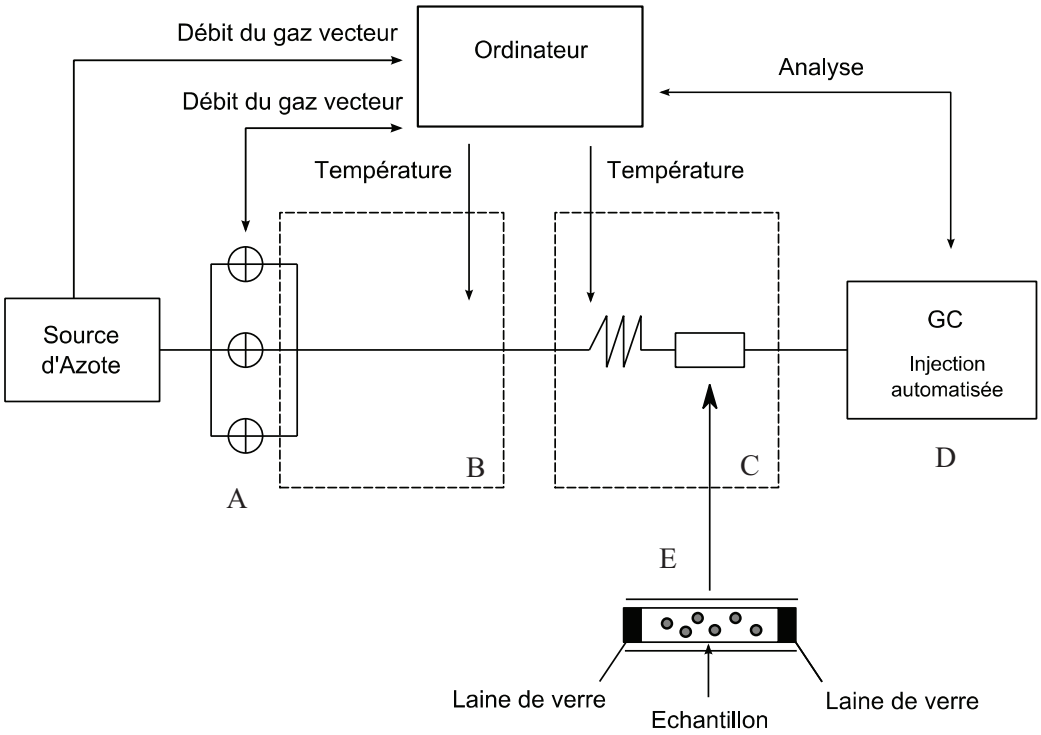


Figure 42 : Schéma du montage pour l'étude du relargage du géraniol libéré des microsphères

Tableau 20: condition d'analyse en chromatographie gazeuse du géraniol libéré des microsphères

Paramètre de la méthode GC	Consignes
Température du détecteur	250°C
Température de l'injecteur	250°C
Oven equib. time	10 min
Oven max.	450°C
Température initiale du four à colonne	100°C
Int Time	5 min
Gradient de température pour la séparation	Level 1 : 5°C min pendant 2 min, level 2 : 20°C min pendant 1 min
Colonne de séparation GC	J&W scientific catalog 1233232 DBFFAP 30mx0.320mm 40°C to 250°C 0.25 µm SNUS 6650953H

VI.5 Analyse du potentiel mucoadhésif des microsphères

L'analyse du potentiel muco-adhésif des microsphères a été effectuée selon une analyse originale non décrite dans la littérature pour ce type d'étude. Ce protocole a été développé en collaboration avec un partenaire extérieur.

Le principe de l'étude est d'utiliser des gammes de lectines préalablement couplées au fond des puits d'une plaque de microtitration (96 puits).

La première étape est de rendre fluorescente les microsphères. Les différentes microsphères ont été remises en solution à hauteur de $1x10^8$ particules pour 1ml, en présence de 100µg d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), dans un tampon carbonate 0.1M NaCl 0.5 M à pH 8.3, pendant 30 min, à température ambiante, sous agitation dans l'obscurité.

La seconde étape est d'incuber les microsphères marquées dans les puits fonctionnalisés avec les lectines. Après incubation (2h à température ambiante), l'élimination des microsphères non fixées et de la fluorescéine libre se fait avec une solution mélange de TRIS/HCl 50 mM, CaCl2 (1mM), MgCl2 (0.5 mM) et Bovine Sérum Albumine (BSA) 0.1% m/v à pH 7.4. La fluorescence est mesurée avec un lecteur de microplaque à 495 nm en excitation et 521 nm d'émission.

Cette étape permet d'avoir une valeur de fluorescence pour chaque lectine, qui correspond au taux de microsphères s'étant fixées aux lectines.

Dans un troisième temps, un nouvel échantillon de chaque microsphère a été remis en solution à hauteur de $1x10^8$ particules pour 1ml, en présence de 100 µg de FITC (tampon carbonate 0.1M, NaCl 0.5 M à pH 8.3, pendant 30 min température ambiante, agitation l'obscurité). Ces microsphères rendues fluorescentes sont ensuite mises en contact avec 50 µg de mucine, protéine principale du mucus intestinal. Les microsphères marquées sont ensuite mises à incuber dans les puits fonctionnalisés avec les lectines. Après incubation, le lavage et la lecture de la fluorescence se fait de la même façon que décrite plus haut.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre A : Etude de la fonctionnalisation des protéines

Chapitre B : Conception et observation morphologique des microsphères

Chapitre C : Etude de la fonctionnalisation sur le comportement des microsphères

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre A : Etude de la fonctionnalisation des protéines

A.1 : Fonctionnalisation des protéines de pois par les sucres

A.2 : Fonctionnalisation des protéines de pois par les polyphénols de raisin

A.3 : Fonctionnalisation du caséinate de sodium de lait de vache et de la gélatine de type A porcine par les sucres et les polyphénols de raisin

A.4 : Analyse des propriétés émulsifiantes des protéines fonctionnalisées

A.1 : Fonctionnalisation des protéines de pois par les sucres

La première voie de fonctionnalisation choisie pour les protéines de pois (F85M de la gamme Nutralys® de chez Roquette) est celle qui consiste à greffer des sucres sur les fonctions amines libres par chauffage. Les sucres choisis sont : le glucose, l'acide glucuronique, le lactose, la maltodextrine DE 6, la maltodextrine DE 12 et la maltodextrine DE 38.

La réaction de Maillard est connue dans la littérature pour donner des composés bruns, visibles lors de la cuisson des aliments (brunissement non enzymatique). Les sucres viennent se greffer sur les fonctions amines accessibles de la protéine. Dans le cas de protéine complexes, comme les protéines de pois, il a été réalisée une étape de dénaturation thermique afin de déplier les chaînes d'acides aminés et rendre accessible un maximum de fonctions réactives.

Suite à ce dépliement, le sucre rajouté dans la solution va être greffé par chauffage (100°C, pendant 15 min), afin d'obtenir les composés mélanoïdiques caractéristiques de la réaction de Maillard.

Dans une première partie, nous présenterons les résultats de l'étape de dénaturation thermique des protéines de pois. Dans une seconde partie, les résultats de greffages des différents sucres sur ces protéines seront présentés.

A1.1 Dénaturation thermique des protéines de pois

La dénaturation thermique des protéines de pois consiste à chauffer les protéines en solution à pH 12, à 100 °C pendant 15 min, avant l'ajout du sucre pour la réaction de Maillard. C'est une étape courante dans l'utilisation des protéines végétale, souvent décrite dans la littérature (par exemple pour les protéines de soja : Nishinari *et al.* 2014). Une analyse quantitative des fonctions amines libres a donc été menée pour comparer le nombre d'amine libre disponible sur les protéines de pois natives, et le nombre d'amine libre disponible après le traitement thermique. Ce dosage est effectué par le test colorimétrique TNBS, permettant de doser les amines libres par spectrométrie. Ces résultats sont décrits dans la figure 43.

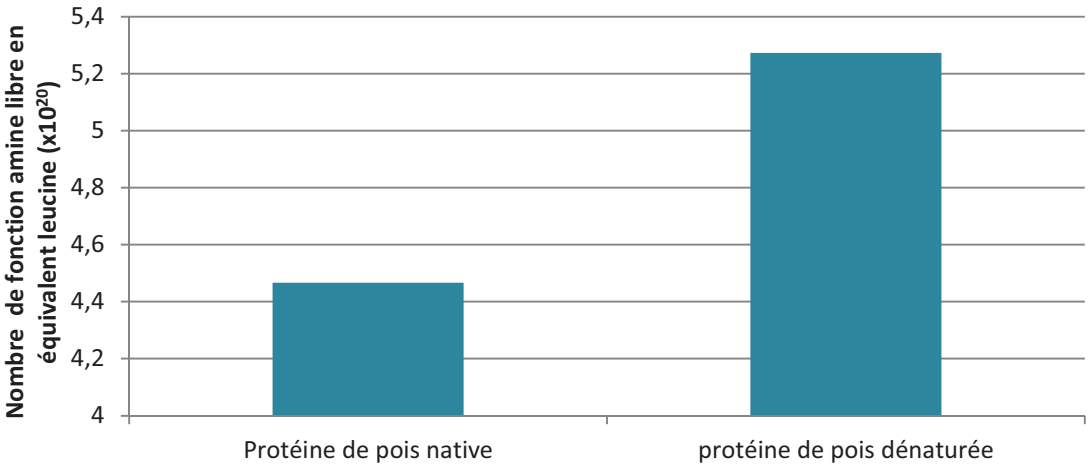


Figure 43 : quantification des fonctions amines libres sur les protéines de pois avant et après l'étape de dénaturation thermique (15min à 100°C)

Ces résultats montrent que les fonctions amines libres disponibles sur les protéines de pois natives sont au nombre d'environs $4.5x10^{20}$ fonctions en équivalent leucine. Le fait de dénaturer thermiquement ces protéines fait augmenter ce nombre jusqu'à environs $5.3x10^{20}$ fonctions équivalent leucine. Soit une augmentation d'environ $8x10^{19}$ fonctions amines capables de réagir avec les sucres pour la réaction de Maillard.

Afin de déterminer l'impact que pouvait avoir cette étape de dénaturation thermique sur les protéines de pois, une analyse des profils chromatographiques avant et après dénaturation a été effectuée par HPLC gel-perméation. Cette technique d'analyse permet d'obtenir des chromatogrammes qui présentent la séparation des protéines des tailles différentes en solution, en comparant leurs temps de rétention. Les protéines ayant un plus grand volume hydrodynamique sortant les premières. Les résultats de cette analyse sont présentés figure 44.

Cette étude montre que les protéines de pois présentent une gamme importante de tailles moléculaires différentes, visibles sur le chromatogramme A, avec plusieurs familles de hautes tailles moléculaires ayant un temps de rétention compris entre 5 min et 10 min qui semblent majoritaires. Une autre population de taille moins importante est également visible à des temps de rétentions compris entre 11 min et 16 min. Ces résultats sont cohérents avec la composition indiquée dans la littérature pour les protéines de pois, qui sont constituées de nombreuses fractions ayant des tailles moléculaires très différentes (Crevieu-Gabriel 1999).

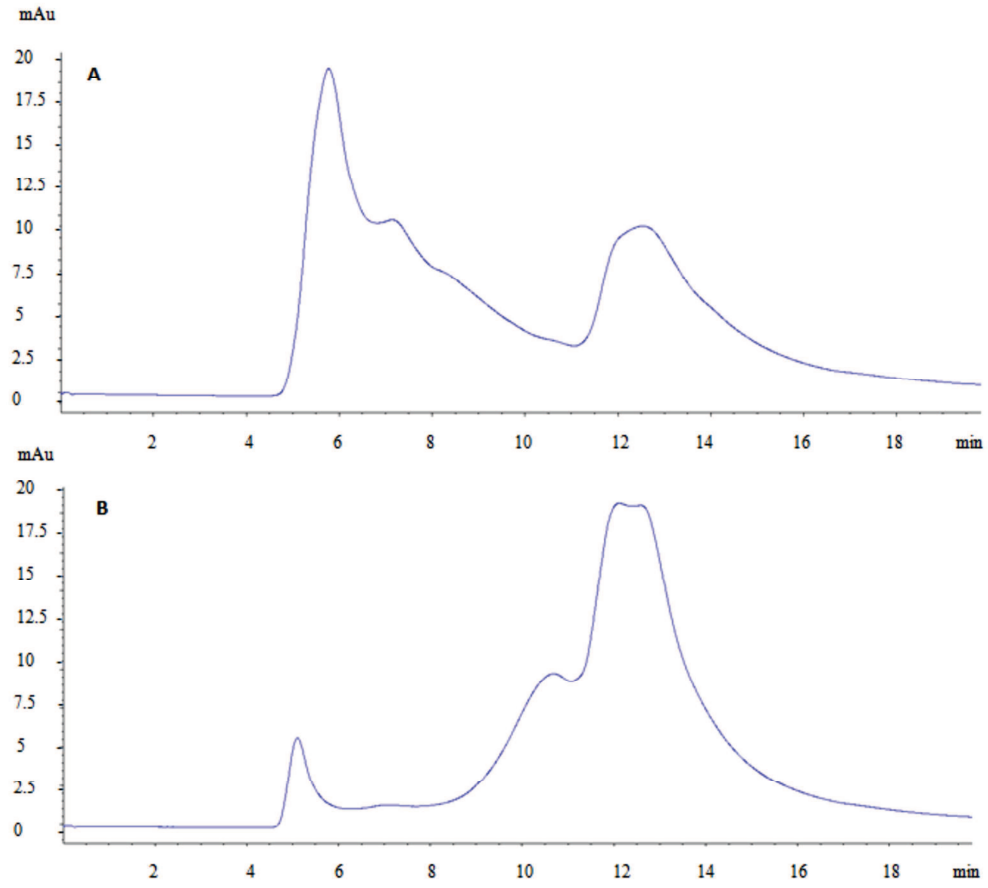


Figure 44 : profil chromatographique UV obtenu par gel perméation (colonne Biosuite 250, eau + TFA 0.1 %, 1 ml/min) des protéines de pois avant traitement thermique (A) et après traitement thermique (B)

Le chromatogramme B de cette même figure montre le profil chromatographique HPLC gel perméation des protéines de pois après l'étape de dénaturation thermique. La population de taille majoritaire n'est plus située à un temps de rétention de 6 min environs, comme pour les protéines de pois, mais à un temps de rétention de 12 min, attestant d'une modification structurale intervenue sur ces protéines.

Cette modification structurale peut être de plusieurs natures. La dénaturation thermique des protéines végétale est décrite dans la littérature pour engendrer différents phénomènes : la séparation des sous-unités, le dépliement des chaînes d'acides aminés, la création de liaisons covalentes intra-protéiques et l'hydrolyse en peptides de poids moléculaires plus petits dans les cas de température extrêmes.

Dans le cas présenté ici, nous avons une modification visible du profil de taille des protéines de pois passant d'une majorité de hautes tailles moléculaires à une majorité de tailles moléculaires moins importantes. Les pistes de la séparation des sous unités (très nombreuses chez les protéines de pois, d'après Crevieu-Gabriel (1999), et du dépliement de la

structure secondaire des protéines sont privilégiées. En effet, l'hydrolyse acide pouvant s'effectuer qu'en présence importante d'acide (par exemple, d'acide chlorhydrique 1M) et par chauffage à durer plus importante (1h par exemple).

La conformation d'une protéine est liée à la structure secondaire et tertiaire, elle est réalisée par l'intermédiaire de liaisons de faible énergie donc fragiles. La dénaturation résulte d'une modification des structures quaternaires, tertiaires et secondaires sans fragmentation de la chaîne peptidique. La dénaturation des protéines passe par des structures éphémères qui peuvent aboutir à un déploiement total de la molécule (comme montré figure 45).

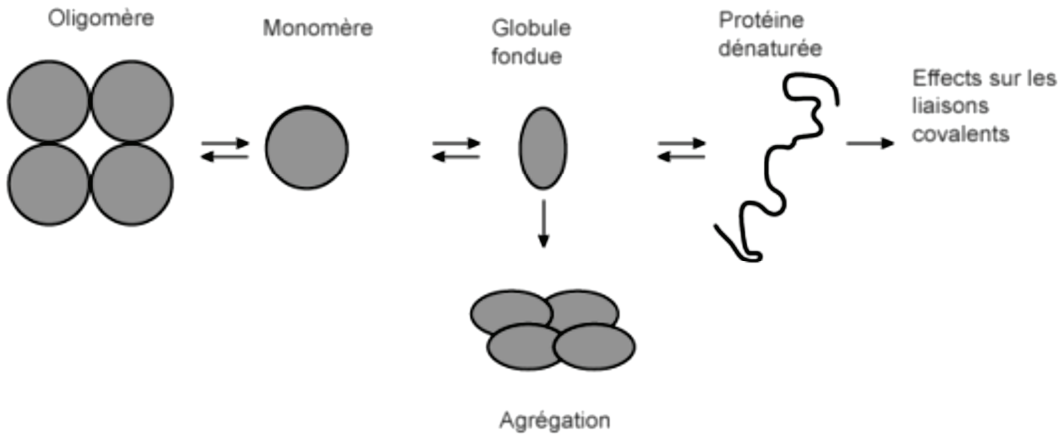


Figure 45 : les étapes de la dénaturation thermique des protéines (adapté de Nishinari *et al*. 2014)

L'augmentation du nombre de fonction amine libre observée figure 43 tend à confirmer le déploiement de la structure des protéines.

A1.2 Greffage des sucres sur les protéines de pois

Les différents sucres testés (glucose, lactose, acide glucuronique, maltodextrine DE 6, 12 et 38) ont été choisis pour être greffés sur les fonctions amines libres de protéines de pois, de par leurs disponibilités sur le marché et leurs utilisations dans le domaine de l'agro-alimentaire. Le greffage de ces sucres sur les protéines se fait par chauffage (100°C pendant 15min), en solution ajustée à pH 12.

Plusieurs études peuvent être menées pour déterminer l'efficacité du greffage : la production de composés mélanoïdiques par spectrométrie à 420 nm, l'évolution du pH de la

solution, et le dosage des amines libres par le test TNBS, donnant une indication du taux de greffage en pourcentage.

Le tableau 21 présente les différents résultats de ces études suivant le sucre utilisé sur les protéines de pois.

Tableau 21 : résultat de la fonctionnalisation des protéines de pois par les sucres : taux de greffage, absorbance à 420 nm et évolution du pH

Ajouts aux protéines de pois	Taux de greffage (%)	Absorbance à 420 nm	pH
Sans sucre (protéine traitée thermiquement)	0	0.172	13.2
Glucose	48	0.348	8.1
Lactose	52	0.554	8.1
Acide glucuronique	38	0.348	8.4
Maltodextrine DE 6	29	0.345	12.6
Maltodextrine DE 12	44	0.421	11.2
Maltodextrine DE 38	48	0.581	9.3

Les résultats présentés dans le tableau 21 montrent qu'un brunissement modéré est observé pour tous les tests (sauf protéine seule) ce qui indique la formation de produits de la réaction de Maillard. Les valeurs d'absorbance ne sont pas équivalentes entre les échantillons : le brunissement le plus faible est observé pour la maltodextrine DE 6 (0.345) et le brunissement le plus élevé pour la maltodextrine DE 38 (0.581).

L'évolution du pH de la solution est également un indice de l'efficacité de la réaction, car la disparition des fonctions amines libres influence ce dernier, en diminuant le caractère alcalin de la protéine. En partant d'un pH de 13.2 sans ajout de sucre, on arrive alors à une baisse d'environ 5 unités de pH pour le glucose, le lactose et l'acide glucuronique, et une baisse progressive du pH suivant le dextrose équivalent pour les maltodextrines (environs 1 unité de pH pour la maltodextrine DE 6, 2 unités de pH pour la maltodextrine DE 12 et environs 4 unités de pH pour la maltodextrine DE 38).

Enfin, les résultats du taux de greffage (calculés en rapport avec le nombre d'amine libre sur la protéine dénaturée avant l'ajout des sucres) montrent que l'efficacité de la réaction est dépendante du sucre utilisé. Ainsi, pour le glucose, nous obtenons un taux de greffage de 48% des amines libres, pour le lactose un taux de 52%, pour l'acide glucuronique un taux de 38%, et pour les maltodextrines DE 6, 12 et 38, des taux de respectivement 29, 44 et 48 % des amines libres greffées par les sucres.

Il existe un lien logique entre ces résultats : l'efficacité du greffage est dépendante du taux d'amine libre greffée, qui induit une baisse de pH et la formation de composés bruns détectables à 420 nm. Ici, le sucre ayant donné les meilleurs résultats est la maltodextrine DE 38, avec un taux de greffage de 48%, une baisse de pH de 4 points et une absorbance à 420 nm de 0.581.

L'efficacité des sucres à réagir avec les protéines pendant la réaction de Maillard est due à leurs pouvoirs réducteurs, lui-même directement corrélé au nombre d'unité glucose terminale, et donc la longueur des chaînes de monomères. Ainsi un glucose sera plus réducteur qu'un lactose, qui sera plus réducteur qu'une maltodextrine DE 12. Cette hiérarchie entre les sucres existe également entre les maltodextrines, qui voient leurs pouvoirs réducteurs être proportionnels à leurs DE. Nous retrouvons cette logique de réactivité des sucres dans les résultats du tableau 21, surtout pour les résultats concernant les maltodextrines. La maltodextrine DE 6, la moins réductrice, affiche un taux de greffage, une baisse de pH et une production de composés bruns inférieure à la maltodextrine DE 38, plus réductrice. La maltodextrine DE 12, de pouvoir réducteur intermédiaire, affichent des résultats intermédiaires.

Le greffage des sucres sur les protéines de pois n'étant pas été décrit dans la littérature, ces valeurs peuvent être cependant corrélées avec des études similaires faites sur les protéines de riz, dont les résultats de greffages sont moins élevés que ceux trouvés ici. Li et son équipe ont en effet greffé du glucose et du lactose sur des protéines de riz, avec pour taux de greffage 28 % et 26.8 % respectivement (Li *et al.* 2009). Il est à noter que dans leur étude, il n'y a pas mention d'une étape de dénaturation thermique des protéines de riz, ce qui peut expliquer les taux de greffage plus bas (nombre de fonction amine libre moins important).

Afin de confirmer l'augmentation du poids moléculaire que doit logiquement induire le greffage des sucres sur les fonctions amines libres, deux techniques d'analyses ont été utilisées : l'HPLC gel perméation, selon le même principe que pour le suivi de la dénaturation thermique, et l'électrophorèse SDS-PAGE, qui permet de séparer les protéines selon leurs poids moléculaires sur un gel d'acrylamide.

La figure 46 compare le profil chromatographique d'analyse par HPLC gel-perméation obtenu pour les protéines de pois après dénaturation avec les chromatogrammes obtenus pour les conjugués mettant en jeu les protéines de pois et les différentes maltodextrines. Le profil chromatographique de protéines dénaturées montre un pic important aux environs de 12 min. Les profils chromatographiques des conjugués avec les maltodextrines montrent tous une

augmentation du signal dans la zone comprise entre 5 min et 12 min, et une diminution visible du pic compris après 12 min (voir flèches, figure 46).

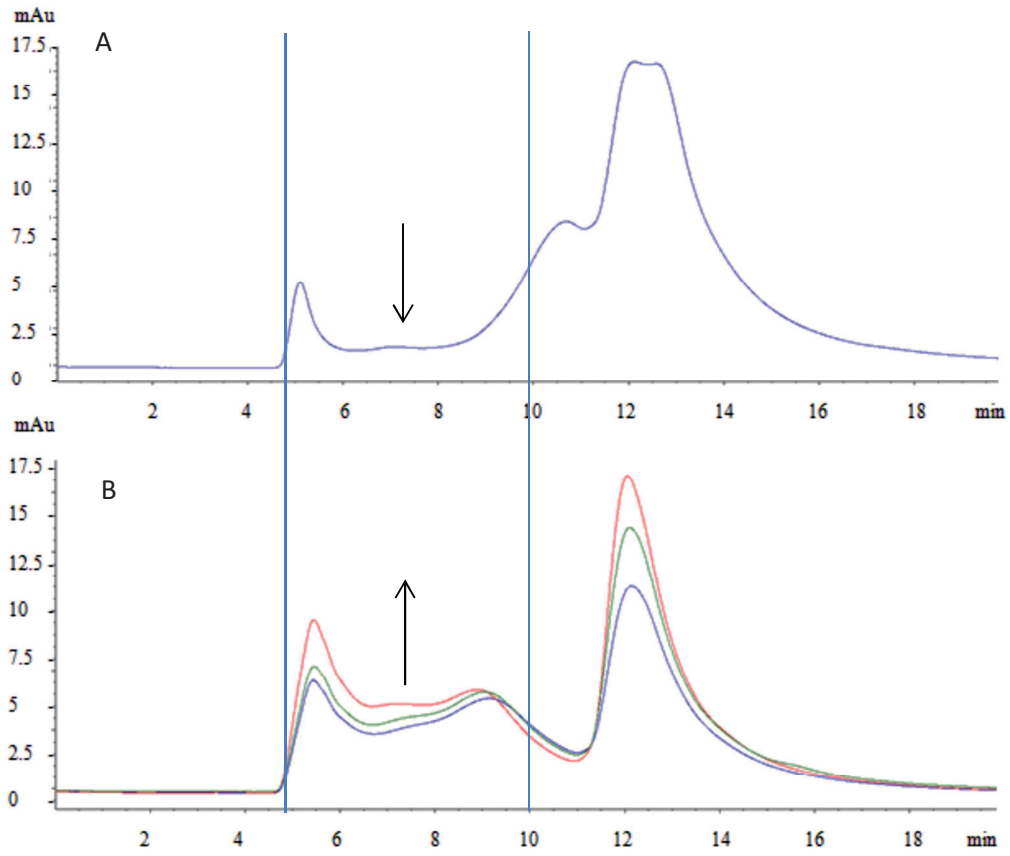


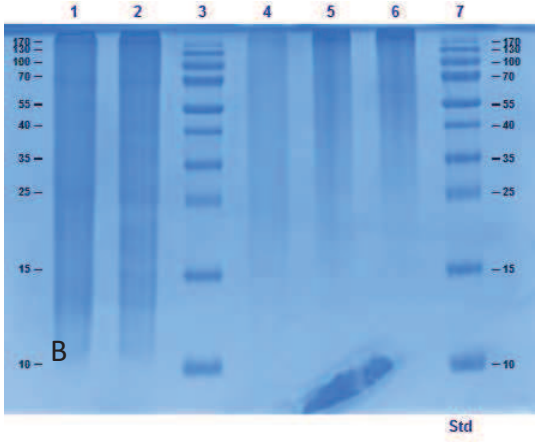
Figure 46 : profil chromatographique UV obtenu par gel perméation (colonne Biosuite 250, eau + TFA 0.1 %, 1 ml/min) représentant les protéines de pois dénaturées thermiquement (en A) et les conjugué obtenus par greffage des différentes maltodextrines (B) : en bleu MD6 ; en vert MD12 ; en rouge MD38

Ce profil chromatographique différent de celui des protéines dénaturées de départ indique qu'une portion non négligeable de ces protéines a réagi avec les sucres pendant le chauffage, produisant des molécules de plus hautes tailles moléculaires. Il est à noter également que l'on retrouve ici la même logique de hiérarchie entre les trois maltodextrines : le conjugué protéine de pois/maltodextrine DE38 (en rouge sur la figure 46) affiche un signal plus important au niveau des temps d'élution court (entre 5 et 10 min) que les autres conjugués, ce qui est en corrélation avec les taux de greffage obtenus précédemment (voir tableau 21).

Ces profils chromatographiques d'HPLC gel-perméation sont similaires à ceux trouvés dans la littérature pour des études du même ordre (Aoki *et al.* 1999) (Jiménez-Castano *et al.*

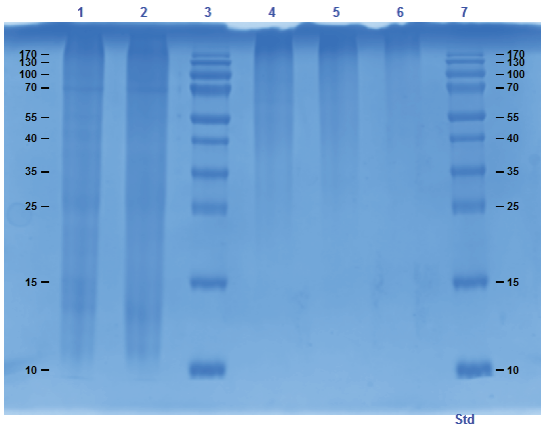
2007) (O'Regan *et al.* 2009) où l'on retrouve également cette évolution des tailles moléculaires vers des composés de plus grandes tailles que la protéine de départ.

La deuxième technique d'analyse utilisée pour analyser les poids moléculaires est l'électrophorèse SDS-PAGE. Cette analyse consiste à faire migrer les protéines dans un gel de poly-acrylamide (avec un gel de concentration à 4% d'acrylamide, et un gel de séparation à 12% d'acrylamide) grâce à un courant électrique. Les protéines se déplacent donc du haut du gel vers le bas, à une vitesse dépendante de leurs poids moléculaire. La figure 47 présente les deux gels obtenus (colorés au bleu de Comassie) pour les protéines de pois natives (gel A et B, puits n°1), les protéines de pois après l'étape de dénaturation thermique (gel A et B, puits n°2), pour le conjugué avec le glucose (gel g, puit n° 4), pour le conjugué avec le lactose (gel A, puits n°5), pour le conjugué avec l'acide glucuronique (gel A, puits n°6) et pour les conjugués obtenus avec les maltodextrines (gel B, puits n° 4, 5 et 6, respectivement pour les maltodextrines DE 6, 12 et 38). Les puits 3 et 7 des deux gels correspondent à des marqueurs de taille de standards protéiques connus.



A

N° de puits	Echantillons	Intensité de la bande 1
1	Protéines de pois	330817
2	Protéine de pois dénaturées	262219
4	Protéine de pois greffée avec le glucose	4 429 900
5	Protéine de pois greffée avec le lactose	2 777 664
6	Protéine de pois greffée avec l'acide glucuronique	1 477 188



B

N° de puits	Echantillons	Intensité de la bande 1
1	Protéines de pois	184 260
2	Protéines de pois dénaturées	99 493
4	Protéine de pois greffée avec la maltodextrine DE6	305 028
5	Protéine de pois greffée avec la maltodextrine DE12	696 562
6	Protéine de pois greffée avec la maltodextrine DE38	1 139 230

Figure 47 : gel d'électrophorèse SDS-PAGE des protéines de pois et des greffages des différents sucres

D'après la figure 47, les protéines de pois natives affichent une famille de poids moléculaire allant de 170 kDa à 10 kDa (gel A et gel B puits n° 1), ce qui est en accord avec la littérature, qui décrit les protéines de pois comme étant un mélange hétérogène de différents poids moléculaire (Crevieu-Gabriel 1999). Les protéines après l'étape de dénaturation thermique affichent exactement le même profil (gel A et B, puits n° 2). Si l'on fait le lien entre ce résultat et ceux décrits dans la première partie sur la dénaturation thermique des protéines de pois, l'hypothèse d'un déploiement des protéines par traitement thermique est confortée. En effet, si le traitement thermique avait entraîné une hydrolyse des protéines en peptide de tailles plus petites, alors une population importante de bande en bas du gel, serait visible sur les gels, ce qui n'est pas le cas ici.

En revanche, pour les puits des conjugués issus du greffage des sucres sur les protéines, nous observons une disparition des bandes caractéristiques des protéines de pois dénaturées, plus ou moins prononcée selon le sucre considéré.

Cette disparition des bandes de poids moléculaires intermédiaires pour une concentration quasi exclusive de bandes de hauts poids moléculaires, associé au *smear* de coloration qui apparait prouve qu'il y a augmentation du poids moléculaire global des protéines de pois, par greffage de sucre.

Une portion des conjugués est restée immobile dans le gel de concentration, ce qui suggère la présence de composés de haut poids moléculaire (supérieur à 170 kDa), de taille trop importante pour pouvoir pénétrer dans le gel de séparation à 12% d'acrylamide. En mesurant grâce au logiciel de lecture de gel l'intensité de cette bande (nommé bande 1 dans les tableaux, figure 47), il est possible de faire le parallèle entre ces résultats et les résultats du taux de greffage décrits précédemment.

En effet, la bande d'intensité la plus importante sur le gel B est celle résultant de l'utilisation de la maltodextrine DE 38. C'est cette maltodextrine qui a également donné le plus haut taux de greffage. Nous retrouvons cette logique de classification des sucres selon leurs pouvoirs réducteurs avec les autres conjugués (voir tableau 21).

Ce type de résultat sur gel d'électrophorèse est retrouvé dans les études suivantes : (Xu *et al.* 2010) (O'Regan *et al.* 2009), ou la présence du *smear* et des bandes de hauts poids moléculaires retenues dans le gel de concentration sont indiquées comme étant caractéristiques des conjugués de Maillard.

En conclusion de ce chapitre nous pouvons retenir que :

- L'étape de traitement thermique appliquée aux protéines de pois permet un changement structural des protéines et une meilleure accessibilité des fonctions amines

- Le greffage des sucres par la réaction de Maillard obéit à une logique de réactivité de ces derniers proportionnels à leurs pouvoirs réducteurs

- Le greffage des sucres sur les protéines de pois entraînent un changement du profil chromatographique qui tend vers des tailles moléculaires plus hautes

- Ce greffage est visible par électrophorèse SDS-PAGE par la présence de composés de grandes tailles retenus dans le gel de concentration

- Le greffage de la maltodextrine DE38 apparait être le plus intéressant avec un taux de greffage de 48 %

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre A : Etude de la fonctionnalisation des protéines

A.2 : Fonctionnalisation des protéines de pois par les polyphénols de raisin

A.2 : Fonctionnalisation des protéines de pois par les polyphénols

Une deuxième voie de fonctionnalisation a été imaginée pour les protéines de pois, qui consiste à greffer de façon covalente des polyphénols de raisin (Grape Total®, de chez Grape Sud) sur les fonctions nucléophiles des protéines. La matière première choisie ici est un extrait de polyphénol total du raisin (*Vitis vinefera*) riche en flavonoïdes et en tanins condensés, utilisé comme colorant ou mélange antioxydant en alimentaire ou en œnologie.

Pour greffer les résidus polyphénoliques, le pH du mélange des deux composés est ajusté à 12 par ajout d'une quantité définie de soude, afin de former des carbocations réactifs qui viendront attaquer les fonctions nucléophiles de la protéine. Afin de déterminer quel ratio était le plus efficace pour ce greffage, plusieurs concentrations de polyphénols ont tout d'abord été testées. Ensuite la préservation de l'activité antioxydante des complexes protéine/polyphénol a été étudiée.

A2.1 Greffage des polyphénols de raisin sur les protéines de pois

L'objectif de greffer des polyphénols sur les protéines est d'obtenir des complexes riches en fonctions antioxydantes (résidus polyphénoliques) tout en gardant l'activité émulsifiante des protéines. Le greffage des polyphénols sur les fonctions amines des protéines peut être quantifié comme pour les conjugué de Maillard, par l'analyse TNBS. La disparition des amines libres induit une baisse du pH de la solution également, comme expliqué précédemment. L'étude de ces deux paramètres est présentée dans la figure 48.

Comme indiqué figure 48, avec 8 % de polyphénol ayant été mis en contact avec les protéines de pois, nous obtenons une baisse de 20 % des fonctions amines libres et une baisse de 1 unité de pH. Avec 15% de polyphénol utilisé, nous observons une baisse d'environ 45% des amines libres et une perte de 2 unités de pH par rapport à la solution de protéine sans polyphénol. Enfin, avec 26% de polyphénols utilisé, nous obtenons les mêmes valeurs que pour 15% de polyphénols, avec une légère baisse de pH.

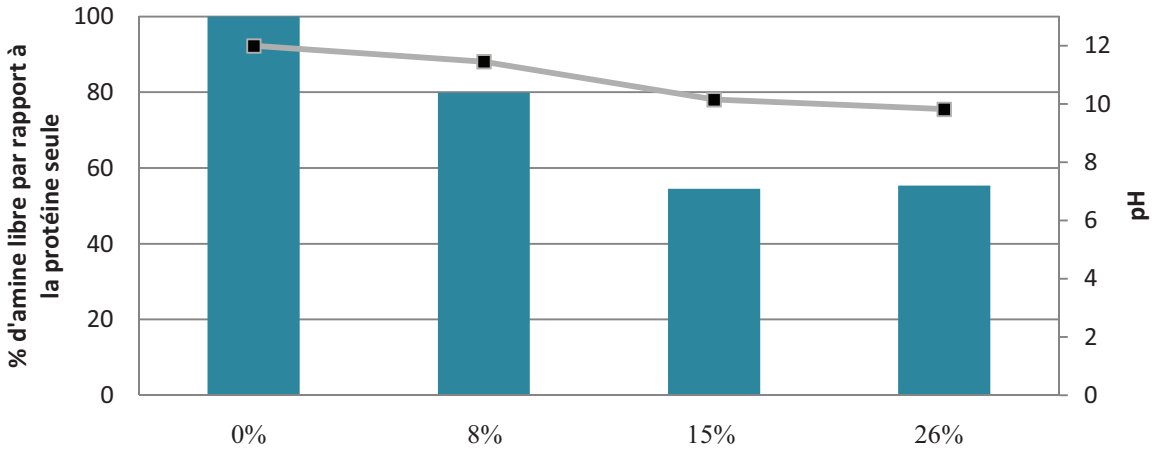


Figure 48 : histogramme : évolution du pourcentage d''amine libre sur les protéines de pois selon le taux de polyphénol rajouté. Courbe : évolution du pH de la solution selon le taux de polyphénol ajouté

Ces résultats indiquent qu'il y a un lien direct entre la quantité de polyphénol ajoutée aux protéines de pois en solution et le taux de greffage de ces protéines par les polyphénols. Au-delà de 26% de polyphénol, nous observons une précipitation quasi-totale des protéines en solution, ce qui n'est pas souhaitée pour une utilisation ultérieure.

L'étude de Rawel *et al. (*2002) utilise une farine de protéine de soja pour la faire réagir avec différents acides phénoliques (acide chlorogénique, caféique, gallique) et polyphénols (apigenine, kaempferol, quercetine, myricetine) purs. Afin de déterminer l'efficacité du greffage des polyphénols sur les protéines, l'équipe de Rawel mesure par analyse TNBS la disparition des fonctions amines libres, et la disparition des fonctions thiol, grâce à un dosage de la fluorescence des protéines marqués au monobrombimane et séparées par chromatographie liquide. Ils déterminent grâce au test TNBS des taux de greffage allant de 8% pour l'apigenine à 37 % pour l'acide caféique. Dans notre étude, utilisant un mélange complexe de polyphénols et de tanins condensés, nous obtenons un taux de greffage plus important de 45% des fonctions amines.

Cette différence peut être expliquée par les différences de protocole existant entre les deux techniques de greffage, mais Rawel avance que la réactivité des polyphénols augmente avec le nombre de groupe hydroxyle et dépend également de la position de ces groupements. L'utilisation de notre mélange contenant des tanins condensés, riches en groupement hydroxyle, ainsi que leurs disponibilités après l'étape de fonctionnalisation (pH ajusté à 12) peut permettre une meilleure réactivité vis-à-vis des protéines que l'utilisation de polyphénols purs.

Afin de vérifier que la disparition des amines libres et la diminution du pH de la solution est corrélée avec un greffage covalent des polyphénols sur les protéines de pois, deux techniques d'analyses du poids moléculaires des protéines ont été utilisées : l'HPLC gel perméation et l'électrophorèse SDS-PAGE, comme pour les composés de Maillard.

La figure 49 présente le profil chromatographiques obtenu par HPLC gel perméation des protéines de pois seules (en A) et du complexe à 26% de polyphénol (en B). Nous observons une modification visible du profil chromatographique des protéines. En effet, les protéines de pois montrent une répartition complexe de tailles moléculaires, avec une population majoritaire aux environs de 17 min d'élution. Ce mélange de protéines de tailles diverses est caractéristique des protéines végétales, et des protéines de pois en particulier (Crevieu-Gabriel 1999).

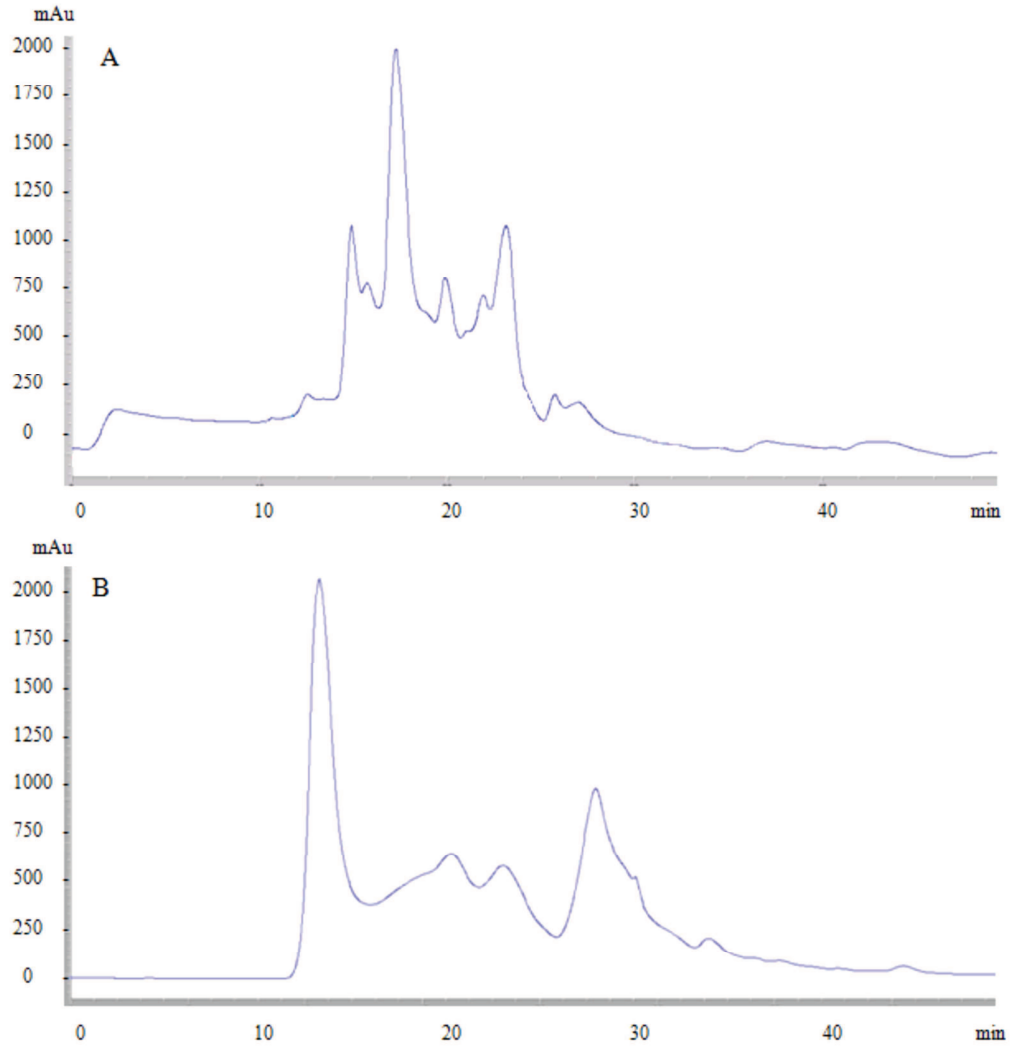
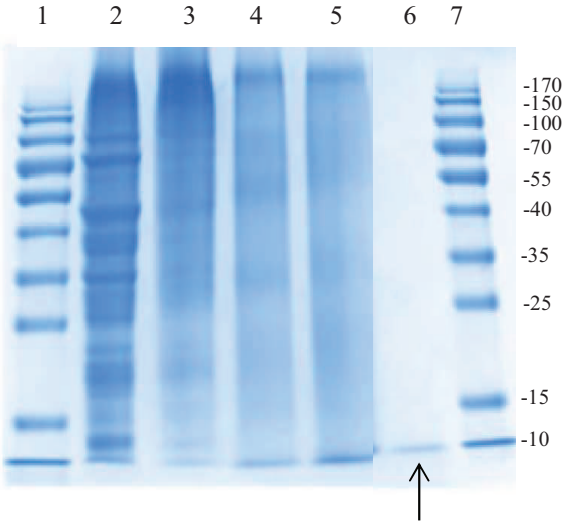


Figure 49 : profil chromatographique UV obtenu par gel perméation (colonne TSKGEL GW3000, tampon phosphate 0.1 M, 0.5 ml/min). En A : profil chromatographique des protéines de pois. En B : profil chromatographique du complexe protéine/polyphénol à 26% de polyphénol

Le fait de greffer des polyphénols sur les fonctions nucléophiles de ces protéines modifie le profil chromatographique (B). En effet, la population majoritaire a un temps d'élution beaucoup plus court, aux environs des 12 min, et il est visible également une diminution des autres populations de protéines de tailles moins importantes (notamment celles situé entre 15 et 25 min de temps d'élution).

L'analyse en électrophorèse SDS-PAGE (figure 50) confirme cette évolution des poids moléculaires vers des valeurs plus importantes. L'analyse montre la disparition progressive des bandes (visibles puits n°3, 4 et 5) caractéristiques des protéines de pois (comprises entre 170 et 10 kDa, visibles puits n°2). Cette disparition progressive peut être due à la formation de complexes de tailles trop importantes pour pouvoir migrer dans le gel de séparation. Egalement, la formation des complexes peut entraîner une sédimentation des protéines (car devenues insolubles dans l'eau). La disparition des bandes protéiques peut donc s'expliquer par la diminution des protéines en solution dans le surnageant après centrifugation des échantillons. Le puits n°1 et le puits n°7 montrent la séparation de standards de poids moléculaires connus, et le puits n°6 correspond à une solution de polyphénol de raisin sans protéine, servant à démontrer que ces molécules ne sont pas séparées par la technique d'analyse électrophorétique.



N° de puits	Echantillons
Puits n°1	standard
Puits n°2	Protéine de pois
Puits n°3	Protéine de pois + 8 % de polyphénol
Puits n°4	Protéine de pois + 15 % de polyphénol
Puis n°5	Protéine de pois + 26% de polyphénol
Puits n°6	Polyphénol seul
Puits n°7	standard

Figure 50 : gel d'électrophorèse des protéines de pois et des complexes protéines de pois/polyphénol

-

La bande en bas de gel, située en dessous de la bande de standard à 10 kDa (flèche puits n°6), correspond aux polyphénols en solution qui ne sont pas retenus par le gel d'acrylamide à cause de leurs petites tailles. Cette bande devient logiquement plus intense quand la quantité de polyphénol augmente dans le mélange. Cette disparition des bandes caractéristiques des protéines non fonctionnalisées se retrouve dans l'étude de Rawel (Rawel *et al*. 2002) sur les protéines de soja.

L'étude de l'évolution des profils chromatographiques par HPLC gel-perméation et par électrophorèse SDS- PAGE a démontré l'augmentation du poids moléculaire des protéines de pois pour produire des complexes de hautes tailles moléculaires, ce qui n'est pas reporté dans la littérature.

A2.2 Analyse du pouvoir antioxydant des complexes protéines/polyphénols

Le greffage des polyphénols sur les protéines de pois a pour objectif de modifier de façon covalente les protéines. Ce greffage, d'après la littérature, permet de conserver totalement ou en partie les capacités antioxydantes naturelles des polyphénols.

Pour déterminer si l'on conserve la capacité antioxydante des polyphénols de raisin utilisés après le greffage avec les protéines de pois, une analyse DPPH a été menée sur les complexes en comparaison avec la même quantité de polyphénols non greffée (figure 51).

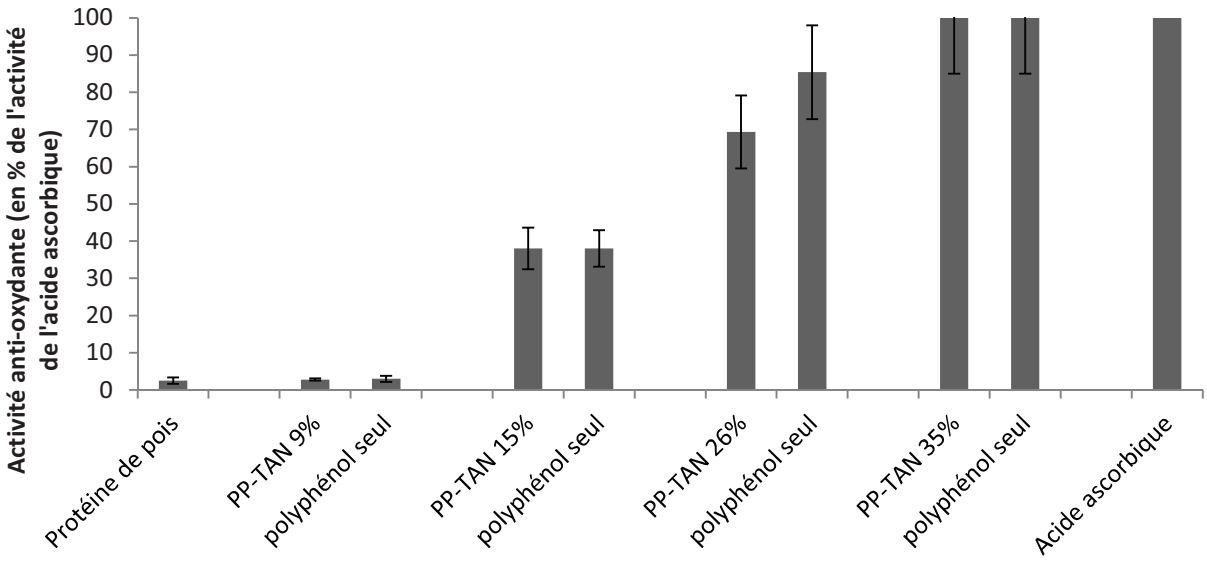


Figure 51 : mesure de l'activité antioxydante par DPPH, des protéines de pois, des complexes protéines de pois et polyphénols et des polyphénols seuls

Cette analyse permet d'étudier la capacité d'une molécule à piéger des radicaux libres qui sont des molécules à fort pouvoir oxydant sur les molécules sensibles à l'oxydation. Cette activité est mesurée en comparaison de l'activité d'un standard, l'acide ascorbique, antioxydant utilisé de façon importante en alimentaire pour la conservation des aliments.

Les résultats de la figure 51 montrent que les protéines de pois seules n'affichent pas de pouvoir antioxydant significatif (< 10% de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique). L'ajout de 8% de polyphénol n'améliore par ce pouvoir antioxydant (<10%). L'activité antioxydante commence à augmenter à partir de 15% de polyphénol (environs 40% de l'activité de l'acide ascorbique). L'activité de la quantité équivalente de polyphénol non greffé est d'également environs 40%, ce qui indique que le complexe protéine/polyphénol conserve son activité antioxydante, malgré le greffage covalent des polyphénols sur les fonctions nucléophiles des protéines de pois. Le complexe à 26% de polyphénol affiche une activité antioxydante d'environ 70%, alors que l'équivalent de polyphénols non greffés affiche une activité supérieure à 80 % de l'activité de l'acide ascorbique.

Il n'y a pas dans la littérature de travaux décrivant l'activité antioxydante des complexes protéines végétales/polyphénols. Mais plusieurs articles (Hasni *et al.* 2011) (Kanakis *et al.* 2011) montrent que la complexation du caséinate de sodium avec des polyphénols entraîne l'inhibition plus ou moins marquée de l'activité antioxydante de ces derniers. Les travaux d'Arts *et al.* en 2002 démontrent quant à eux la variabilité qu'il existe dans ce masquage de l'activité selon la protéine étudiée et selon les polyphénols utilisés. Mais tous les articles s'accordent à dire que cette fonctionnalisation, même si elle masque une partie de l'activité antioxydante des polyphénols, permet d'augmenter l'activité antioxydante de la protéine de départ, comme démontré dans l'étude de Aewsiri *et al.* (2009) avec la gélatine de poisson fonctionnalisée par trois acides phénoliques (acide caféique, férulique et tannique)

Ces résultats permettent de conclure que :

- Le greffage des polyphénols de raisin sur les protéines de pois entraîne la formation de composés protéine/polyphénol de hautes tailles moléculaires, visibles sur le profil chromatographique gel-perméation et sur les gels d'électrophorèses SDS-PAGE
- Ces complexes gardent une partie ou la totalité de l'activité antioxydante des polyphénols de départ

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre A : Etude de la fonctionnalisation des protéines

A.3 : Fonctionnalisation du caséinate de sodium de lait de vache et de la gélatine de type A porcine par les sucres et les polyphénols de raisin

A.3 : Fonctionnalisation des caséinate de sodium de lait de vache et de la gélatine de type A porcine par les sucres et les polyphénols de raisin

Après avoir effectué l'étude approfondie de la fonctionnalisation des protéines de pois par différents sucres et par des polyphénols de raisin, les mêmes voies de fonctionnalisation ont été appliquées à deux autres protéines : le caséinate de sodium et la gélatine de type A. Dans cette partie, nous verrons les principaux résultats obtenus pour la fonctionnalisation du caséinate de sodium, ainsi que les problèmes rencontrés pendant la fonctionnalisation de la gélatine de type A.

A3.1 Fonctionnalisation du caséinate de sodium de lait de vache par les sucre

Le caséinate de sodium de lait de vache a été greffé par différents sucres (glucose, lactose, maltodextrine DE 6, DE 12 et DE 38) selon le même protocole qu'utilisé pour les protéines de pois, mais sans étape de dénaturation thermique. En effet, la dénaturation thermique n'est pas utilisée dans la littérature pour les protéines laitières, et peut même impacter leurs fonctionnalités. Les trois paramètres analysés pour étudier l'efficacité du greffage des sucres sur les amines libres de la protéine sont de nouveau : la disparition des fonctions amines par le test TNBS, la mesure du brunissement à 420 nm par spectrométrie, et la mesure de l'évolution du pH de la solution. Ces résultats sont montrés dans le tableau 22 ci-dessous.

Tableau 22 : résultats du greffage des différents sucres obtenus pour le caséinate de sodium de lait de vache

Caséinate de sodium	Taux de greffage (%)	Absorbance à 420 nm	pH
Sans sucre	0	0.070	12.1
Glucose	37	0.125	8.6
Lactose	27	0.635	8.4
Maltodextrine DE 6	17	0.365	10.4

Maltodextrine DE 12	19	0.430	10.1
Maltodextrine DE 38	43	0.568	8.7

Comme pour les protéines de pois, ces résultats nous montrent que le greffage des sucres sur le caséinate de sodium est corrélé avec une disparition des amines libres de la protéine, une augmentation du brunissement de la solution et une baisse du pH de la solution. Pour le glucose par exemple, le taux de greffage est de 37%, l'absorbance est passée de 0.07 à 0.125 et le pH a baissé d'environ 3 unités.

Les résultats obtenus avec les maltodextrines de différentes tailles (et donc de pouvoirs réducteurs différents) nous montrent que la maltodextrine DE 38, qui a le pouvoir réducteur le plus élevé, est celle qui affiche le meilleur taux de greffage (43%), la plus forte absorbance à 420 nm (0.568) et la plus forte baisse de pH (environs 3 unités). La maltodextrine DE 12, moins réductrice, n'affiche qu'un taux de greffage de 19%, un brunissement à 0.430 et une baisse de pH d'environs 2 unités. Enfin, la maltodextrine DE 6, la moins réductrice des trois, obtient un taux de greffage de 17%, un brunissement de 0.365 et une baisse de pH d'environ 1.5 unités.

Cette logique de réactivité des maltodextrines suivant leur taille et leur pouvoir réducteur se retrouve également avec les résultats obtenus avec les protéines de pois du chapitre précédent. Les travaux de O'Regan & Mulvihill (2009 ; 2010) sur les conjugués de caséinate de sodium et de maltodextrine démontrent la faisabilité et l'intérêt de greffer des sucres sur cette protéine par la réaction de Maillard. Dans leur étude de 2009, en utilisant une maltodextrine de DE 40, ils obtiennent un taux de greffage de 35.6%, et un taux de greffage de 36.2 % avec une maltodextrine DE 100 (glucose). Les valeurs affichées dans le tableau 22 sont très proches de celles d'O'Regan, et l'amélioration du greffage obtenue grâce à la maltodextrine DE 38 dans notre cas peut s'expliquer par l'utilisation d'un milieu aqueux pour la réaction de Maillard, alors qu'ils ont privilégié la méthode par mélange de poudre, température et humidité relative contrôlée dans leurs travaux.

Afin de déterminer si le greffage de sucre sur le caséinate de sodium est accompagné d'une augmentation du poids moléculaire, une analyse par HPLC gel-perméation a été effectuée, ainsi qu'une analyse sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE (figure 52).

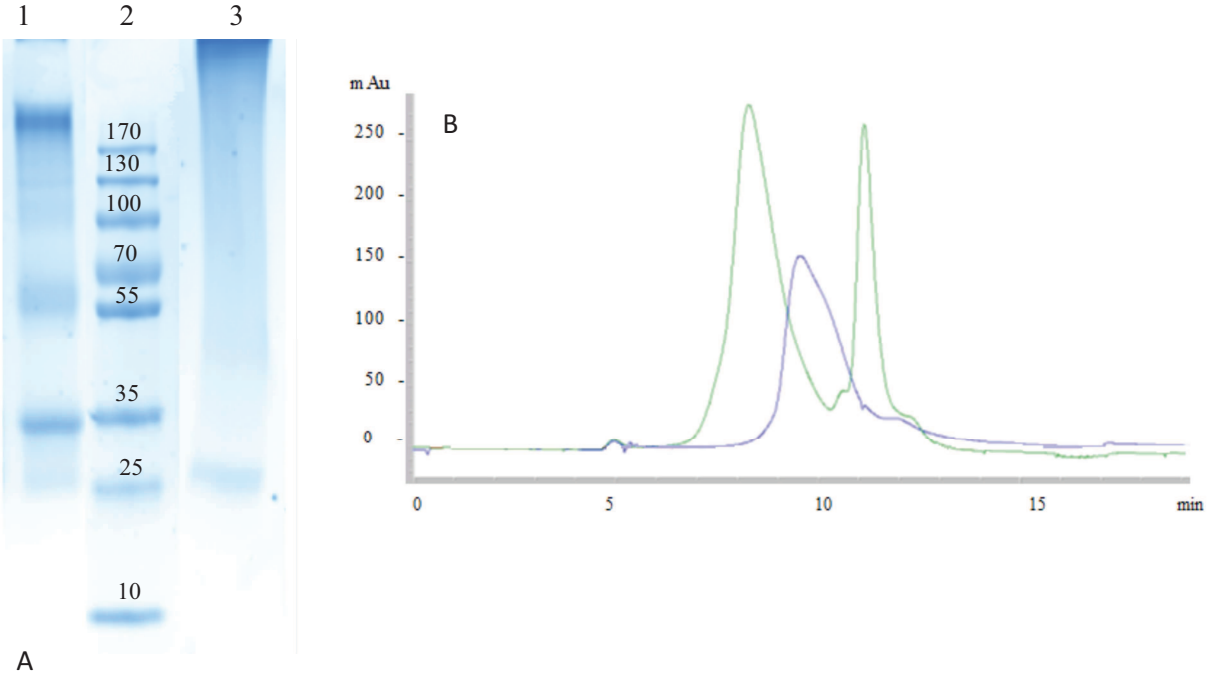


Figure 52 : en A : gel d'électrophorèse du caséinate de sodium (puits n°1) et du caséinate de sodium greffé avec la maltodextrine DE38 (puits n°3). Le puits n°2 correspond au standard. En B : Profil chromatographique UV obtenu en gel perméation (colonne Biosuite 250, eau + 0.1 % TFA, 1 ml/min) du caséinate de sodium (en bleu) et du caséinate de sodium greffé avec la maltodextrine DE38 (en vert)

La figure 52 (B) présente le profil chromatographique obtenu par HPLC gel-perméation du caséinate de sodium et du conjugué obtenu avec la maltodextrine DE 38. Nous pouvons constater que le caséinate de sodium a un temps d'élution principal aux environs de 9 min. Le caséinate de sodium greffé avec la maltodextrine montre deux pics visibles : le premier a un temps d'élution d'environs 7.5 min et le deuxième à un temps d'élution à 12 min. Le premier de ces pics démontre l'existence de protéines d'une taille moléculaire plus élevée que la protéine de départ. Le deuxième pic peut correspondre à des sous-unités de faibles poids moléculaires issues d'un dépliement du caséinate de sodium pendant la réaction de Maillard.

La partie (A) de la figure 52 montre le gel d'électrophorèse correspondant à la séparation du caséinate de sodium et du caséinate ayant réagi avec la maltodextrine DE38. Le caséinate de sodium affiche plusieurs bandes, dont la principale aux environs de 30-35 kDa

qui correspond aux formes principales de la caséine présente dans le caséinate (forme α et β) (Ginger & Grigor 1999). Le conjugué avec la maltodextrine DE 38 ne montre plus cette bande caractéristique de la caséine, mais un bande d'intensité très importante au niveau du gel de concentration, avec un *smear* coloré qui descend le long du gel. Cette bande retenue au niveau du gel de concentration correspond à des molécules de très hautes tailles moléculaires ayant atteint une taille trop importante pour pouvoir pénétrer dans le maillage plus serré du gel de séparation. Elle démontre donc la production de composés de hauts poids moléculaires par greffage de sucre sur le caséinate de sodium.

Cette évolution des profils chromatographiques par HPLC gel perméation vers des tailles plus importantes se retrouvent dans les travaux d'O'Regan (O'Regan & Mulvihill 2009) ou il constate l'apparition de toute une famille de composés complexes à des temps de rétention plus faibles que sa protéine de départ, prouvant ainsi l'augmentation du poids moléculaire du caséinate de départ. De même que l'apparition du *smear* et des molécules bloquées dans le gel de concentration que l'on retrouve de façon identique dans son article et qui confirme cette augmentation importante du poids moléculaire de la protéine de départ.

Ce type de résultats est également retrouvé dans les travaux d'Einhorn-Stoll *et al.* (2005) sur l'ensemble des protéines de lait, et dans les travaux de Gu *et al.* (2010) sur la caséine de lait de vache.

A3.2 Fonctionnalisation du caséinate de sodium de lait de vache par les polyphénols de raisin

La fonctionnalisation des protéines de pois par les polyphénols de raisin nous a permis de définir une quantité de matière première à utiliser pour un greffage optimal. Pour le caséinate de sodium, nous avons donc utilisé 26% de polyphénol pour l'étape de fonctionnalisation.

Afin de déterminer si le greffage a eu pour conséquence l'augmentation du poids moléculaire de la protéine, une analyse du profil chromatographique par HPLC gel perméation et une analyse par gel d'électrophorèse SDS-PAGE ont été menées. Ces résultats sont décrits dans la figure 53.

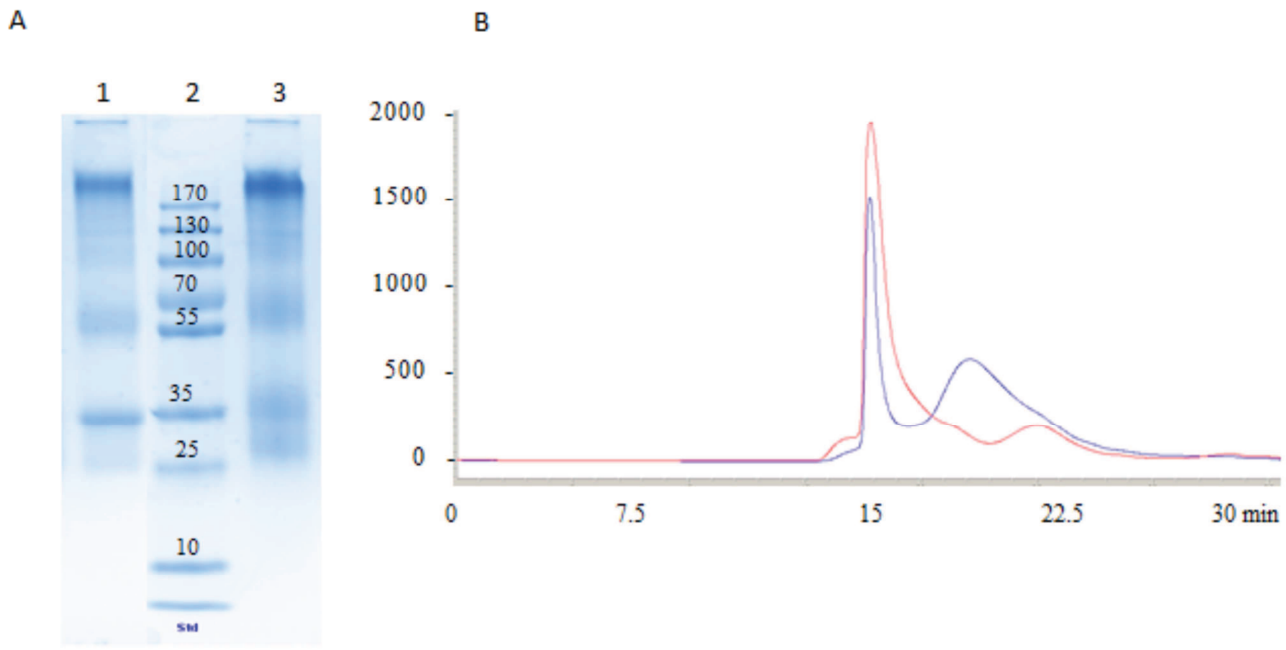


Figure 53 : en A : gel d'électrophorèse du caséinate de sodium (puits n°1) et du caséinate de sodium greffé avec 26% de polyphénol de raisin (puits n°3). Le puits n°2 correspond au standard. En B : Profil chromatographique UV obtenu en gel perméation (colonne TSKGEL GW3000, tampon phosphate 0.1 M, 0.5 ml/min) du caséinate de sodium (en bleu) et du caséinate de sodium greffé avec 26% de polyphénol de raisin(en rouge)

Les résultats du gel d'électrophorèse SDS-PAGE (en A) indiquent que le caséinate de sodium montre un ensemble de bande avec une bande majoritaire aux environs de 30kDa (puits n°1) correspondant à la caséine. L'intensité de cette bande dans le puits n°3 (aux environs de 30 kDa) semble s'atténuer, et se positionner légèrement plus haut dans le gel. La bande supérieure à 170 kDa est plus intense également, pouvant indiquer la formation de molécules de hauts poids moléculaires issues du greffage des polyphénols sur les protéines.

Les résultats de l'analyse du profil chromatographique par HPLC gel perméation (en B) montrent que le caséinate de sodium exhibe deux familles de tailles moléculaires distinctes : la première aux environs de 15 min, correspondant à des composés de hauts poids moléculaires, possiblement des agrégats protéiques, et la seconde aux environs de 20 min de temps de rétention. Le profil chromatographique du complexe caséinate de sodium/polyphénols de raisin n'exhibe qu'un seul pic, correspondant aux hautes tailles moléculaires et une diminution visible des autres populations de taille.

Ces résultats démontrent qu'il y a un greffage des polyphénols sur le caséinate de sodium, mais ce greffage ne semble pas être important. En effet la disparition de la bande de

caséine sur le gel d'électrophorèse n'est que partielle et l'analyse HPLC ne montre pas clairement une utilisation complète du caséinate en solution.

A3.3 Fonctionnalisation de la gélatine de type A porcine par la maltodextrine DE 38 et les polyphénols de raisin

Suivant la logique de l'étude, les deux voies de fonctionnalisation que sont la réaction de Maillard et le greffage de polyphénols de raisin ont été appliquées sur la gélatine de type A.

Concernant la réaction de Maillard, il a été choisi d'utiliser uniquement le sucre qui a donné les meilleurs résultats de greffage sur les autres protéines, c'est-à-dire la maltodextrine DE38. Afin de déterminer si le greffage a eu lieu, les trois paramètres que sont la disparition des amines libres, l'absorbance à 420 nm et l'évolution du pH ont été étudiés. Ces résultats sont présentés tableau 23.

Tableau 23 : résultat de la fonctionnalisation de la gélatine de type A par la maltodextrine DE38

Gélatine de type A	Taux de greffage	Absorbance à 420 nm	pH
Sans sucre	0	0.086	12.3
Maltodextrine DE 38	46	0.216	9.1

Comme indiqué dans le tableau ci-dessus, l'utilisation de la maltodextrine sur la gélatine permet un taux de greffage de 46%, un brunissement visible à 420 nm (0.216 d'absorbance) et une diminution du pH d'environs 3 unités. Ces valeurs sont à rapprocher de celles obtenues pour les protéines de pois et le caséinate de sodium précédemment. Les difficultés qu'entraîne l'utilisation de la gélatine, notamment sa faculté à produire des gels thermoréversibles n'ont pas permis d'effectuer des analyses HPLC et électrophorétiques satisfaisantes.

La fonctionnalisation de la gélatine par les polyphénols a montré un comportement très différent de celui observé pour les protéines de pois ou le caséinate de sodium. En effet la

mise en présence de la gélatine de type A et des polyphénols de raisin en solution pendant le procédé de fonctionnalisation a rapidement aboutit à la formation d'un gel rigide et insoluble. Dans ces conditions, il n'était pas possible d'effectuer des analyses en HPLC gel perméation ou de séparer les différentes populations de protéines par électrophorèse SDS-PAGE.

Il a donc été choisi d'utiliser ces conjugués dans les formulations de microsphères (GEL-MD38 et GEL-TAN), sans avoir d'informations précises sur le greffage. Mais l'observation visuelle sur le comportement du produit gélatine/polyphénol obtenu laisse à penser qu'il y a bien eu réaction entre les deux réactifs. En effet, la formation de ce gel résistant et aux capacités rhéologiques différentes de celle de la gélatine peut être rapprochée des changements rhéologiques observés dans l'étude de Gibson *et al.* (2004).

La différence de réactivité entre les protéines de pois, le caséinate de sodium et la gélatine peut être due au taux de proline et d'hydroxyproline très important que l'on retrouve dans la gélatine. Ces acides aminés favorisent l'interaction protéine/polyphénols en prévenant la formation d'hélice alpha dans la structure secondaire de la protéine, permettant ainsi une structure plus ouverte. Les protéines principales de la bière (Asano *et al.* 1982) du jus de pomme (Wu & Siebert 2002) et du jus de raisin (Wu & Lu 2004) sont toutes relativement riches en proline et sont toutes les trois connus pour être les principales actrices de la formation du trouble dans leurs boissons respectives.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que :

- Le greffage de polyphénol de raisin et de maltodextrine DE 38 sur le caséinate de sodium de lait de vache permet d'obtenir des complexes de tailles moléculaires élevées, visibles en HPLC et électrophorèses SDS-PAGE

- Le greffage de maltodextrine DE38 sur la gélatine de type A d'origine porcine permet d'augmenter la taille moléculaire de cette dernière

- Le greffage de polyphénol de raisin sur la gélatine de type A d'origine porcine aboutit à la formation d'un gel rigide pouvant avoir des propriétés intéressantes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre A : Etude de la fonctionnalisation des protéines

A.4 : Analyse des propriétés émulsifiantes des protéines fonctionnalisées

A.4 : Analyse des propriétés émulsifiantes des protéines fonctionnalisées

L'analyse des protéines fonctionnalisées à partir des protéines de pois, du caséinate de sodium de lait de vache et de la gélatine de type A porcine en utilisant des sucres et des polyphénols de raisin a permis de mettre au point différents conjugués pouvant servir dans le processus d'encapsulation de la vitamine A.

Ce processus passe par une étape d'émulsification de la phase lipidique par les protéines en phase aqueuse. Il est donc important d'étudier la capacité des différentes protéines (fonctionnalisées ou non) à former une émulsion de taille micrométrique et de la stabiliser au cours du temps. Pour ce faire, des émulsions faiblement concentrées en émulsifiant protéique (1% m/m) mais fortement concentrées en huile de tournesol (10% m/m) ont été formulées à partir des trois protéines de départ et de leurs fonctionnalisations ayant donné les meilleurs résultats dans les chapitres précédents. Pour cette analyse, l'huile de tournesol a été préférée à la vitamine A pour des raisons de coût et de facilité d'utilisation.

La taille des gouttelettes d'huile stabilisées est mesurée par granulométrie laser en voie liquide aussitôt après la formulation de l'émulsion (t=0 jours) et après une période de stockage à température ambiante de 21 jours (t= 21 jours). La taille des gouttelettes d'huile est un indice de l'état d'avancement de leurs coalescences, indicateur de la stabilité de l'émulsion dans le temps. Plus une gouttelette d'huile sera de taille importante, moins elle sera stable et plus elle aura tendance à fusionner avec une autre gouttelette, induisant ainsi un déphasage de la phase lipidique.

L'intérêt d'étudier la taille des émulsion et leurs stabilités au cours du temps permet d'avoir des informations sur la capacité des émulsions à garder une interface intacte eau/huile durant le séchage par atomisation et ainsi obtenir une efficacité d'encapsulation importante (Rusli *et al*. 2006) .

Dans une première partie seront présentés les résultats de granulométrie obtenus avec les protéines de pois (avant et après étape de dénaturation thermique) et les protéines de pois fonctionnalisées avec les différents sucres (glucose, lactose, maltodextrines DE 6, 12 et 38). Dans une seconde partie seront présentés les résultats obtenus avec le caséinate de sodium, la gélatine de type A et leurs conjugués avec la maltodextrine DE 38. Enfin dans une dernière partie seront décrits les résultats obtenus avec les différentes protéines et leurs conjugués issus du greffage des polyphénols de raisin.

A4.1 Analyse des propriétés émulsifiantes des protéines de pois fonctionnalisées par les sucres

Les protéines de pois utilisées dans ce projet de recherche (F85M, de la gamme Nutralys® de chez Roquette) sont vendues comme étant un émulsifiant efficace pouvant stabiliser une quantité conséquente d'huile dans des préparations alimentaires (fiche produit). L'étude des granulométries en voie liquide a été effectuée en utilisant un granulomètre laser. Les résultats sont exprimés par la répartition des tailles des gouttelettes lipidiques stabilisées par les protéines de pois. L'ordonnée est définie par le nombre de gouttelettes d'émulsion d'une taille donnée sur le nombre total de gouttelettes analysées par le granulomètre.

Les résultats de la figure 54 montrent l'évolution de la taille des gouttelettes des émulsions formulées avec les protéines de pois, les protéines de pois dénaturées thermiquement (100°C, 15 min) et les protéines de pois greffées soit avec du glucose soit avec du lactose. Les résultats obtenus à t=0 jours indiquent que les protéines de pois sont capables de stabiliser une émulsion quasi-micrométrique. Ce même constat peut être fait pour les protéines de pois après l'étape de dénaturation thermique, le conjugué avec le glucose et le conjugué avec le lactose.

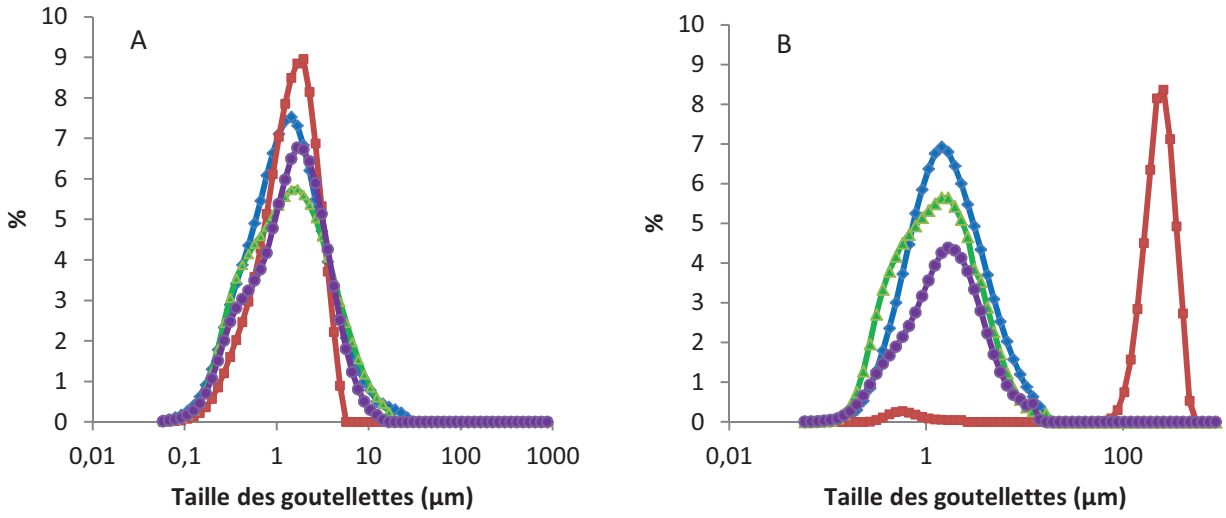


Figure 54 : analyse granulométrique des émulsions formulées à partir des protéines de poids (♦), des protéines de pois après l'étape de dénaturation thermique (■), des protéines de pois greffées avec le glucose (▲) et les protéines de pois greffées avec le lactose (●), a t= 0jours (A) et à t= 7 jours (B)

Les courbes de granulométrie montrées sur la partie B de la figure 54 nous indiquent qu'au bout de 7 jours de stockage à température ambiante, les émulsions formulées avec les protéines de pois, les protéines de pois greffées de glucose et les protéines de pois greffées de lactose sont toujours stables, avec une granulométrie moyenne proche du micron. Cependant, l'émulsion stabilisée par les protéines de pois dénaturées thermiquement affiche une population de taille moyenne aux environs de 500 µm. L'aspect visuelle de l'émulsion ainsi que cette population de taille de gouttelette indique qu'il y a déstructuration complète de l'émulsion et un déphasage de la phase lipidique.

Ainsi, ces résultats démontrent que les protéines de pois perdent leurs capacités émulsifiantes après une étape de dénaturation thermique à 100°C pendant 15 min.

La figure 55 montre les courbes de granulométrie obtenues après 21 jours de stockage à température ambiante pour les émulsions formulées avec les protéines de pois, les protéines de pois greffées avec du glucose et les protéines de pois greffées avec du lactose. L'émulsion de protéine de pois exhibe une large gamme de granulométries différentes, allant de 0.1 µm à 100 µm. Le conjugué issus du greffage du glucose garde toujours une population de taille inférieure au micron, mais une deuxième population aux environs de 100 µm est apparue. Le conjugué avec le lactose montre également ces deux populations mais celle aux environs de 100 µm est beaucoup plus importante que celle inférieure au micron.

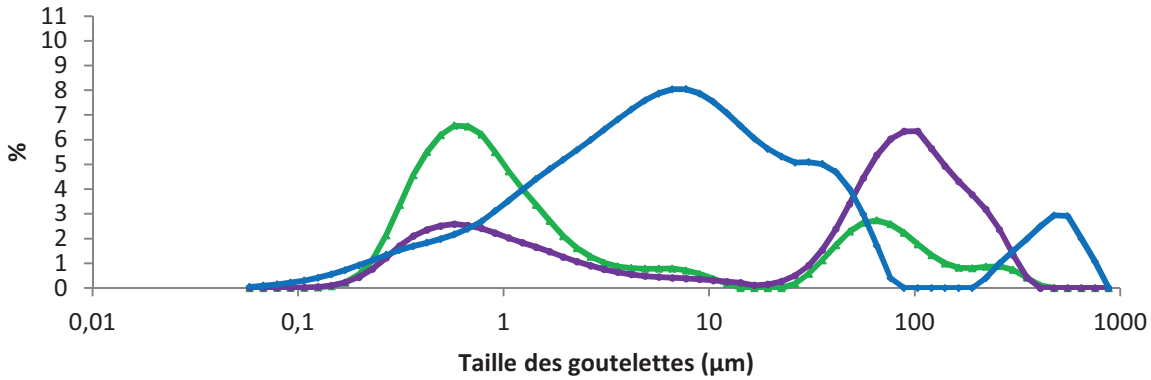


Figure 55 : analyse granulométrique des émulsions formulées à partir des protéines de pois (♦), des protéines de pois greffées avec le glucose (▲) et les protéines de pois greffées avec le lactose (●), a t=21 jours

L'observation visuelle des émulsions associée à la mesure de la coalescence des gouttelettes d'huile en solution permet de conclure que ces émulsions ne sont pas stables après 21 jours de stockage.

La même étude a été menée avec les conjugués de Maillard issus de la réaction entre les protéines de pois et les maltodextrines DE 6, 12 et 38. Les résultats des mesures granulométriques à t = 0 jours (A) et à t = 21 jours (B) sont indiqués figure 56.

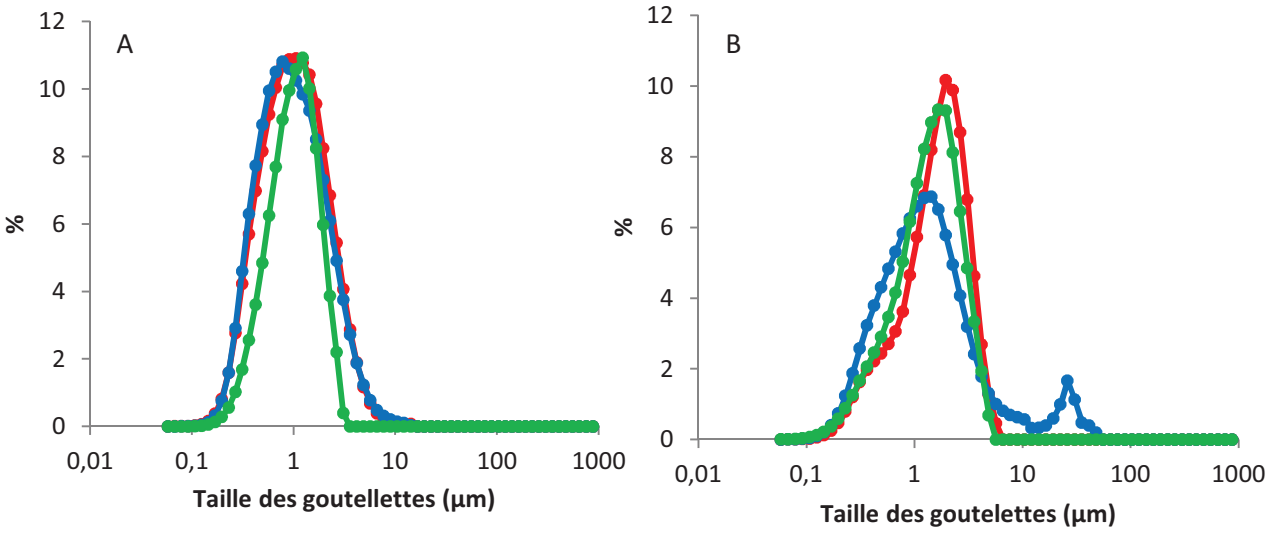


Figure 56 : analyse granulométrique des émulsions formulées à partir des protéines de pois greffées avec les maltodextrines DE 6 (●), DE12 (●) et DE38 (●). A t= 0 jours (A) et t= 21 jours (B)

Les résultats à t=0 jour montrent que les émulsions ont toutes une granulométrie proche du micron. Au bout de 21 jours de stockage à température ambiante, la qualité de ces émulsions est quasiment la même, avec un léger glissement de la taille moyenne des trois échantillons au-dessus du micromètre. Il n'y a pas de déphasage visible de la phase lipidique.

Nous pouvons dire que sur la période de stabilité étudiée (21 jours) et dans les conditions de stockage utilisées (température ambiante, obscurité), les conjugués de Maillard obtenus à partir des maltodextrines et des protéines de pois ont permis une meilleure stabilité des émulsions. Le greffage de sucres plus simples (glucose ou lactose) n'a pas permis d'améliorer la stabilité des émulsions par rapport aux protéines de pois utilisées seules. Et il a été montré également que l'étape de dénaturation thermique (100°C, 15 min) inhibe les capacités émulsifiantes des protéines de pois.

L'inhibition de la capacité émulsifiante des protéines de pois par dénaturation thermique n'est pas décrite dans la littérature, mais elle peut être rapprochée de celle observée avec les protéines de soja par Wan *et al.* (2014) et Liu *et al.* (2013). Ces travaux avancent l'hypothèse que le traitement thermique à 90°C sur les protéines de soja induit la formation d'agrégats, qui diminue l'adsorption des protéines sur la gouttelette d'huile pendant la phase d'émulsification. Il se peut que ce soit le même phénomène pour les protéines de pois, ces dernières faisant partie de la même famille : les protéines végétales.

Plusieurs travaux de la littérature ont utilisé des protéines végétales greffées par des sucres via la réaction de Maillard pour améliorer la stabilité d'une émulsion. Ainsi, Li *et al.* (2009 ; 2013) ont utilisé des protéines de riz hydrolysées en association avec du glucose, du lactose, des maltodextrines et du dextran. Leurs résultats montrent que l'association avec les différents sucres permet une meilleure stabilité de l'émulsion par rapport à l'hydrolysat protéique de départ. La meilleure stabilité est obtenue néanmoins avec le dextran, et la plus faible avec la maltodextrine. L'utilisation du glucose et du lactose donne des stabilités d'émulsion intermédiaires, ce qui est en désaccords avec nos résultats.

Les études de Kasran et son équipe (2013a ; 2013b) sur les produits de la réaction de Maillard entre les protéines de lait de soja et la gomme de fenugrec hydrolysée concluent également sur une amélioration de la stabilité des émulsions par le greffage de sucre sur les protéines. Les greffages du dextran sur une β-conglycinine issue du soja (Zhang *et al.* 2012), sur des protéines de blé (Wong & Augustin 2011) et sur des protéines de cacahuète (Yan *et al.* 2012) confirment également cette tendance des sucres à stabiliser des émulsions de protéines végétales. L'amélioration de la stabilité d'une émulsion par les protéines de pois greffées de maltodextrine n'a pas été décrite dans la littérature, mais les résultats obtenus sont en accord avec cette tendance générale d'amélioration.

A4.2 Analyse des propriétés émulsifiantes du caséinate de sodium de lait de vache fonctionnalisé par la maltodextrine DE38

Les résultats de greffage et d'amélioration des émulsions obtenues avec la maltodextrine DE 38 nous ont permis de choisir ce sucre pour la formulation des conjugués de Maillard avec le caséinate de sodium et la gélatine de type A porcine. Une étude similaire de stabilité d'émulsion d'huile de tournesol a été menée avec mesure au granulomètre laser.

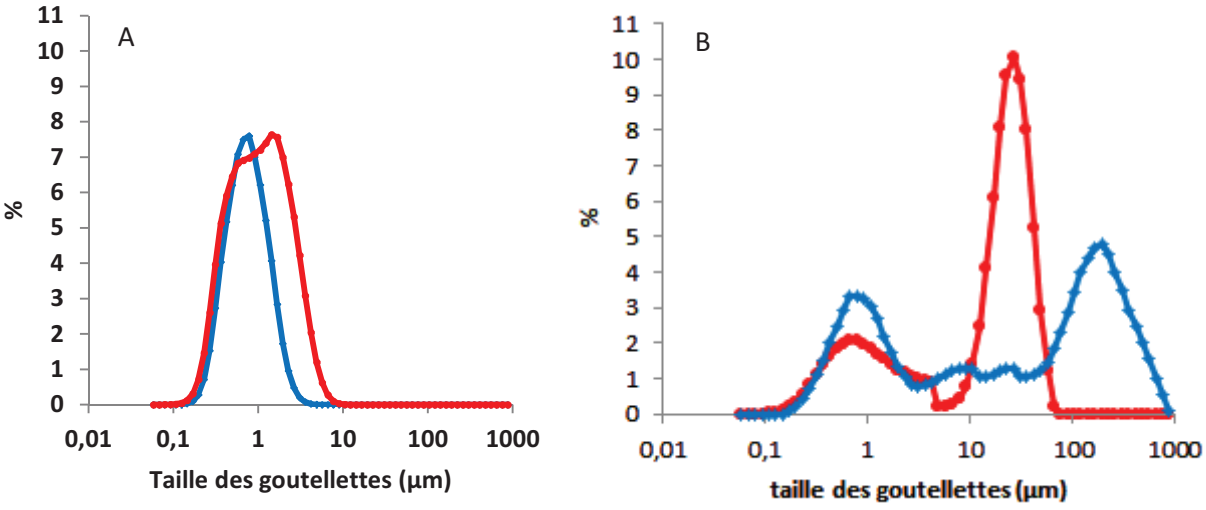


Figure 57 : analyse granulométrique des émulsions formulées à partir de caséinate de sodium (♦) et de caséinate de sodium greffé avec la maltodextrine DE38 (●). (A) à t = 0 jours, (B) à t = 7 jours

La figure 57 montre les résultats obtenus pour les émulsions stabilisées avec le caséinate de sodium (en bleu) et son conjugué de Maillard issus du greffage avec la maltodextrine DE38 (en rouge).

Pour l'émulsion stabilisée par le caséinate de sodium, nous pouvons observer une seule population micrométrique (figure 57, A) L'utilisation du conjugué de Maillard permet également de formuler une émulsion micrométrique, mais elle est constituée de deux familles de taille très proche, de par le léger épaulement.

Après une période de stockage de 7 jours, les deux émulsions montrent plusieurs populations de tailles : entre 100 et 1000 µm pour le caséinate de sodium, et entre 10 et 100 µm pour le conjugué issus du greffage de la maltodextrine DE 38 (figure 57, B). Ces résultats indiquent que la fonctionnalisation du caséinate de sodium par la maltodextrine DE38 ne permet pas d'améliorer la stabilité de l'émulsion au cours du temps.

Les travaux de O'Regan et son collaborateur Mulvihill (2009 ; 2010) ont présenté l'influence du greffage d'une maltodextrine DE 40 et d'une maltodextrine DE 100 sur les fonctionnalités du caséinate de sodium, notamment de son pouvoir émulsifiant (2009), et son utilisation dans un système de double émulsion (2010). Ces deux travaux concluent sur une amélioration visible de la stabilité de l'émulsion stabilisée par le conjugué de Maillard qui

permet d'obtenir une émulsion stable pendant 90 jours à 45°C (O'Regan & Mulvihill 2009) et une double émulsion stable sur 7 jours à 45°C (O'Regan & Mulvihill 2010).

Le conjugué de Maillard a été obtenu dans ces travaux par voie sèche, c'est-à-dire incubation du caséinate de sodium avec les maltodextrines à 60°C et à 79% d'humidité relative, et ce pendant 4 jours. Cette différence de préparation avec nos travaux (en solution 100°C, pH 12, 15 min) peut expliquer une différence de structure en solution ne permettant pas de stabiliser une émulsion de façon efficace.

Une amélioration de la stabilité de l'émulsion est aussi observée dans les travaux de Corzo-Martinez *et al.* (2012) par greffage du galactose sur le caséinate et dans les travaux de Fechner *et al.* en 2007. Mais dans ces deux publications également, les conjugués sont préparés par voie sèche (respectivement à 50-60°C, 4h à 72h, a_w de 0.67 et 60°C pendant 8h à 79% d'humidité relative).

Cependant, dans l'étude de Drusch *et al.* (2009), les deux voies (sèches et liquides) sont utilisées pour créer des conjugués caséinate de sodium/sirop de glucose par réaction de Maillard. Il n'y a pas de différences notables entre les stabilités des émulsions formulées à partir des conjugués issus de la voie sèche et les stabilités des émulsions formulées à partir des conjugués issus de la voie liquide. Dans tous les cas, la capacité émulsifiante du caséinate de sodium est améliorée. Cependant l'émulsion formulée est beaucoup plus concentrée (27% m/m d'émulsifiant pour 18 % de phase lipidique) que dans notre étude (1% d'émulsifiant pour 10% de phase lipidique), ce qui peut expliquer la stabilité observée.

A4.3 Analyse des propriétés émulsifiantes de la gélatine de type A porcine fonctionnalisée par la maltodextrine DE 38

La gélatine doit en partie ses propriétés émulsifiantes à sa capacité à former un gel rigide thermosensible. Dans cette étude, les émulsions utilisant la gélatine sont réalisées au-dessus du point de fusion du gel, afin de pouvoir obtenir une émulsion liquide. Mais pendant la période de stockage à température ambiante, l'émulsion liquide se transforme en un gel rigide, empêchant tout phénomène de coalescence des gouttelettes d'huile et de déphasage de la phase lipidique.

Une solution aurait été de chauffer ce gel pour le déstructurer, et analyser l'émulsion redevenue liquide par granulométrie laser. Mais le chauffage des émulsions peut entrainer leurs vieillissements accélérés qui n'aurait plus rien à voir avec le vieillissement naturel à température ambiante. Il a donc été décidé d'analyser uniquement l'émulsion à t=0 jours. Les résultats sont décrit figure 58.

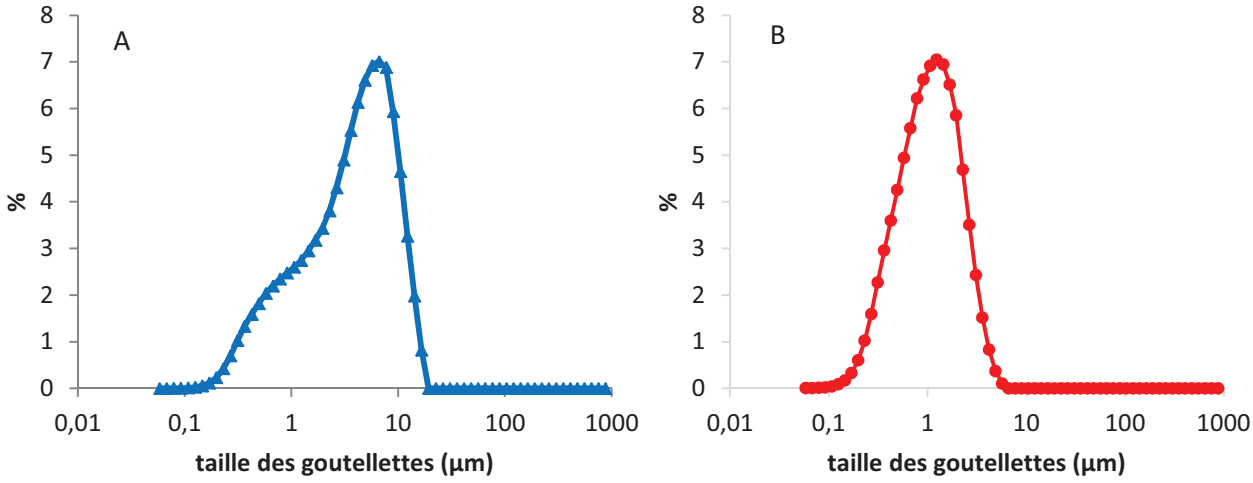


Figure 58 : analyse granulométrique des émulsions formulées à partir de gélatine de type A (♦) et de gélatine greffée avec la maltodextrine DE 38 (●) à t= 0 jours

Les résultats en (A) représentent l'émulsion obtenue avec la gélatine seule. Il est visible que le pic majoritaire est constitué de plusieurs populations de taille, l'une micrométrique et l'une ayant un diamètre moyen proche de 10 µm.

Les résultats en (B) sont ceux obtenus avec le conjugué de Maillard issus du greffage de la maltodextrine DE38 sur la gélatine. Dans ce cas-là, l'émulsion est micrométrique et n'affiche qu'une seule population de taille. Il y a donc une amélioration de la qualité de l'émulsion par le greffage de la maltodextrine DE 38 sur la gélatine.

Les travaux de Lin *et al.* (2012) sur la conjugaison de la gélatine de type B avec du glucose par la réaction de Maillard démontrent que ce greffage améliore la stabilité et la qualité de l'émulsion. Néanmoins, la différence de la qualité de gélatine (type A dans notre étude) et l'impossibilité d'effectuer une cinétique au cours du temps empêche une comparaison et une interprétation rigoureuse de ces résultats.

A4.4 Analyse des propriétés émulsifiantes des protéines fonctionnalisées par les polyphénols de raisin

La capacité des polyphénols à réagir avec les protéines est souvent perçue comme un inconvénient, car elle peut diminuer la digestibilité, la solubilité et les propriétés fonctionnelles de ces dernières. Par exemple, la diminution de la solubilité d'une protéine et l'augmentation de son hydrophobicité peuvent entraîner une perte de sa capacité émulsifiante.

Il a donc été nécessaire dans le cadre de ce projet de recherche de vérifier si le greffage des polyphénols sur les protéines n'influençait pas les propriétés émulsifiantes de ces dernières. Des émulsions ont donc été formulées avec ou sans la fonctionnalisation avec des polyphénols de raisin, et ce pour les protéines de pois, le caséinate de sodium et la gélatine de type A.

La figure 59 présente les résultats obtenus pour des émulsions formulées avec les protéines de pois, un mélange de protéine de pois et de polyphénols de raisin (26%, pH non ajusté), et un mélange fonctionnalisé (26 %, pH ajusté à 12) de protéine de pois avec des polyphénols de raisin.

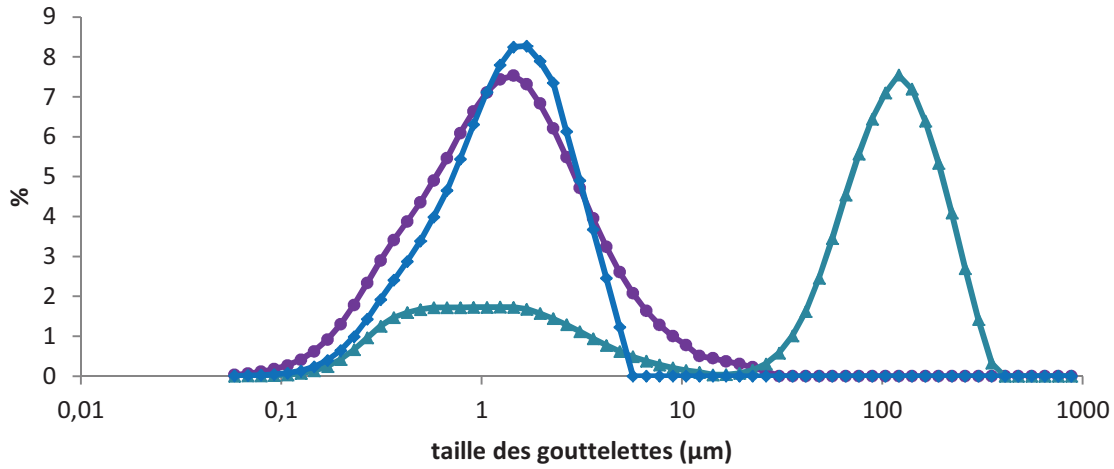


Figure 59 : analyse granulométrique des émulsions formulées avec les protéines de pois (♦), les protéines de pois mélangées avec les polyphénols de raisin sans fonctionnalisation (▲) et le complexe protéine de pois / polyphénol de raisin (●)

Ces résultats montrent que l'émulsion stabilisée par les complexes protéines de pois/polyphénol de raisin est micrométrique : l'émulsion montre une seule population de taille homogène. Au contraire, le mélange non fonctionnalisé de protéine de pois et de polyphénol de raisin présente une émulsion avec deux populations de tailles, l'une minoritaire aux environs du micromètre, et l'autre ayant une taille moyenne de 100 µm. Ces résultats associés à l'observation visuel de l'échantillon a permis de conclure qu'un simple mélange sans fonctionnalisation n'avait pas la capacité de stabiliser une émulsion. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le caséinate de sodium et la gélatine de type A (résultats non montrés).

L'étape de fonctionnalisation du mélange protéine/polyphénol de raisin est donc nécessaire pour formuler une émulsion fine et stable. Une étude de la stabilité au cours du temps dans des conditions de stockage à température ambiante a donc été menée sur 21 jours avec les complexes fonctionnalisés issus des protéines de pois, du caséinate de sodium et de la gélatine de type A. Ces résultats sont présentés figure 60.

Comme montré dans les parties précédentes, l'émulsion à t=21 jours formulés avec les protéines de pois seules ne présente pas la même qualité de répartition de taille qu'a t=0jours. (Figure 60, A1). Il y a coalescence des gouttelettes d'huile et déstabilisation du système. Le caséinate de sodium ne stabilise pas l'émulsion au-delà de 7 jours (figure 60, B1) et la capacité à formuler des gels rigides empêche d'étudier l'évolution dans le temps de l'émulsion formulée avec la gélatine (Figure 60, C1).

Les résultats obtenus avec l'émulsion stabilisée par le complexe protéine de pois/polyphénol montre une émulsion micrométrique à t=0 jours et à t=21 jours. Il en est de même pour les résultats obtenus avec les complexes caséinate de sodium/polyphénol et gélatine/polyphénol. Ces résultats indiquent que le greffage de polyphénol de raisin sur ces trois protéines permet l'amélioration de leurs capacités à stabiliser des émulsions dans le temps. De plus, concernant la gélatine de type A, ce greffage inhibe le phénomène de formation d'un gel rigide à température ambiante (figure 60, A2, B2 et C2).

Ces résultats démontrent qu'une étape de fonctionnalisation est nécessaire pour pouvoir associer les trois protéines choisies avec les polyphénols de raisin. Le fait d'améliorer la stabilité d'une émulsion en utilisant des complexes protéines/polyphénols est peu décrit dans la littérature.

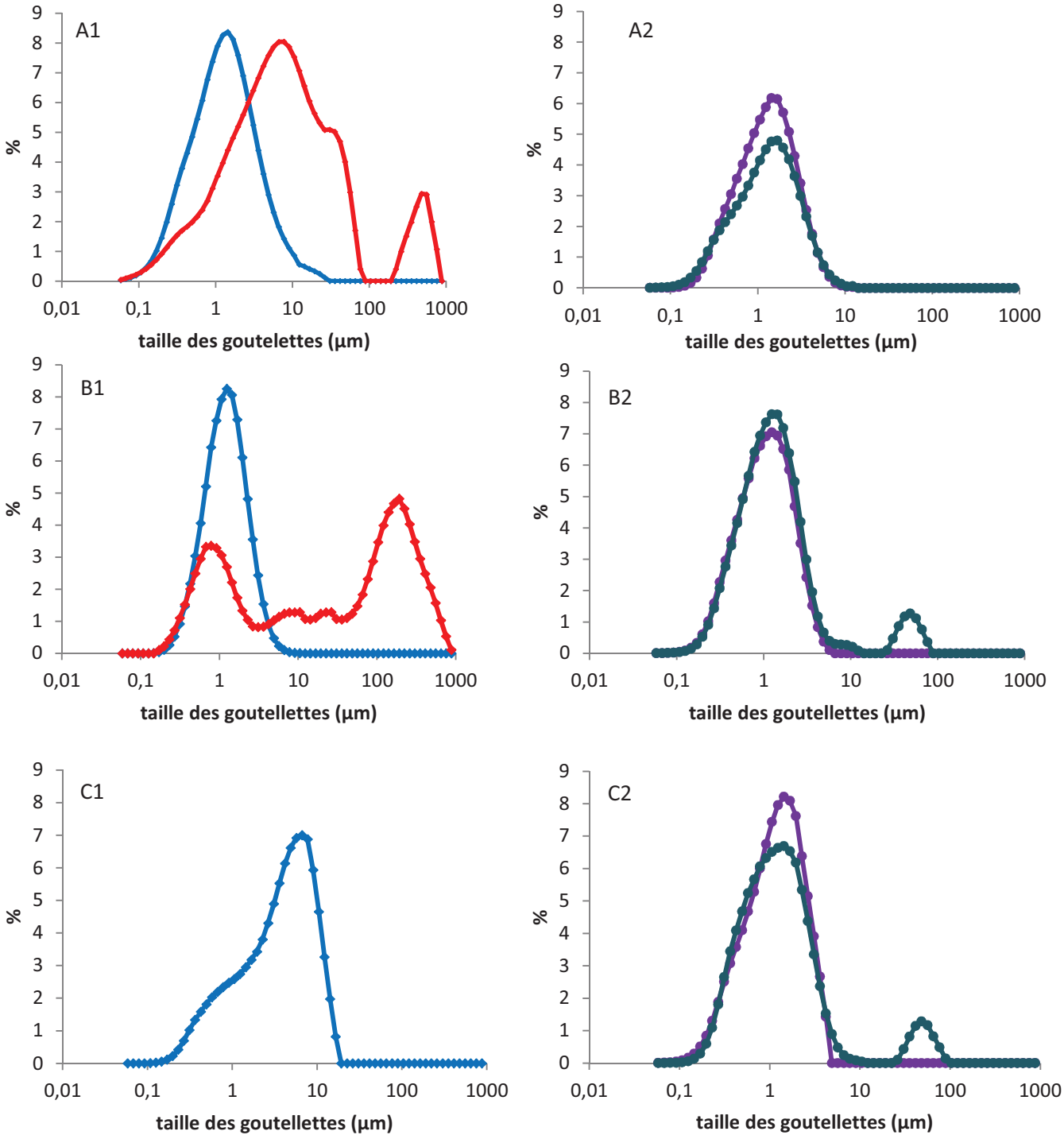


Figure 60 : analyse granulométrique des émulsions formulées avec : en A1 : (♦) PP à t= 0 jours, (♦) PP t= 21 jours ; en B1 : (♦) CA t=0 jours, (♦) CA t=7 jours ; en C1 : (♦) GEL t= 0 jours. En A2 : (●) PP-TAN t= 0 jours ; (●) PP-TAN t=21 jours ; en B2 : (●) CA-TAN t= 0jours ; (●) CA-TAN t=21jours ; En C2 : (●) GEL-TAN t=0 jours ; (●) GEL-TAN t=21 jours

Les travaux de Wan *et al.* (2014) et Cui *et al.* (2014) étudient l'influence du resveratrol et de la rutine (respectivement) sur la stabilité d'une émulsion formulée par des protéines de soja. Ces deux travaux indiquent que l'ajout de ces polyphénols n'influencent pas de façon importante les capacités émulsifiantes des protéines de départ. L'étude de Cui montre quand même une amélioration de la taille des gouttelettes vis-à-vis du témoin sans polyphénol. Ces résultats de la littérature peuvent être rapprochés de ceux trouvés ici pour les protéines de pois.

L'influence des polyphénols sur l'activité émulsifiante de la gélatine a été explorée par Aewsiri et ses collaborateurs dans deux études (2009 ; 2010). La gélatine étudiée est issus de la seiche. Dans l'étude de 2009, l'ajout d'acide caféique, d'acide férulique et d'acide tannique à pH 9 avec la gélatine permet d'obtenir des émulsions semblables à celle obtenue avec la gélatine de départ, et permet d'obtenir une stabilité comparable au bout de 12 jours de stockage. L'étude de 2010 utilise l'acide tannique oxydé et permet d'obtenir une émulsion plus stable et de meilleure qualité au bout de 12 jours de stockage. Il semblerait donc que greffer des polyphénols sur la gélatine permette d'obtenir une émulsion de meilleure qualité et stable dans le temps, comme nous l'avons observé ici avec la gélatine de type A.

L'étude présentée dans cette partie a permis de conclure que :

- Le traitement thermique sur les protéines de pois leur fait perdre leurs capacités émulsifiantes
- Le greffage de maltodextrine DE 6, 12 et 38 permet d'améliorer la stabilité de l'émulsion
- Le greffage de maltodextrine DE 38 sur le caséinate de sodium de lait de vache ne permet pas d'améliorer la stabilité de l'émulsion
- Les émulsions à base de gélatine de type A porcine forment un gel rigide
- Le mélange protéine/polyphénol sans fonctionnalisation ne permet pas de formuler une émulsion viable
- Par contre le greffage de polyphénol de raisin sur les trois protéines permet de formuler des émulsions micrométriques et stables dans le temps

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre B : Conception et observation morphologique des microsphères

B.1 : Conception des microsphères

B.2 Observation au microscope électronique à balayage des microsphères de vitamine A

B.1 Conception des microsphères

Les deux voies de fonctionnalisation ont permis de produire des microsphères de formulations originales. Leurs productions à l'échelle pilote a été effectuée pour avoir une quantité appréciable de microsphère de vitamine A sous forme pulvérulente par atomisation.

Pour comprendre l'apport des voies de fonctionnalisation aux comportements du produit final, une production de microsphères formulée à partir de protéines non fonctionnalisées a donc également été faite pour comparaison.

Les conditions de formulations sont différentes selon que la fonctionnalisation a été faite à une échelle laboratoire pour un objectif analytique et à une échelle pilote pour un objectif de production. Une analyses des conjugués obtenus à l'échelle pilote a été effectuée et les résultats obtenus ont été assez proches de ceux de l'échelle laboratoire pour valider la cohérence du processus de formulation. Le tableau 24 présente les formulations et les principales caractéristiques des microsphères formulées en échelle pilote au sein de la société IDCAPS. Le taux de greffage de la maltodextrine DE38 ou des polyphénols de raisin est rappelé quand il était connu, ainsi que l'extrait sec (E.S) de l'émulsion formulée pour le séchage en atomisation. Il est aussi présenté le D4.3 de l'émulsion, qui correspond à la taille moyenne des gouttelettes de vitamine A stabilisée au sein du système par les émulsifiants. Enfin le taux d'humidité (obtenu par la méthode des balances infrarouges à 105°C) est également présenté afin d'indiquer la qualité du séchage.

Les extraits secs choisis pour formuler les émulsions sont compris entre 14% et 22%. Cela correspond à une viscosité du produit liquide compatible avec le process d'atomisation. Les émulsions obtenues sont en majorités submicroniques (avec des D4.3 compris entre 0.53 µm pour CA-MD38 et 0.9 µm pour GEL-MD38). Les seules émulsions au-dessus du micron sont PP-TAN, GEL-TAN et CA-TAN (respectivement 1.6 µm, 1.9 µm et 1.02 µm). Les complexes protéines/polyphénols semblent donc moins efficaces pour formuler des émulsions sub-microniques à l'échelle pilote. Néanmoins la taille de ces émulsions étaient suffisamment basses pour prouver une bonne encapsulation de la vitamine A et une bonne atomisation du produit.

Tableau 24 : composition et caractéristiques des microsphères de vitamine A formulées pour ce projet de recherche

Formulations	Taux de greffage	E.S de l'émulsion pilote	D4.3 de l'émulsion pilote (µm)	% de vitamine A (m/m)	% de géraniol (m/m)	Humidité de la poudre (% H.R)
PP	/	14.4	0.86	43.3	10.5	4.6
PP-MD38	48	14.4	0.78	43.3	10.5	5.2
PP-TAN	55	14.4	1.6	43.3	10.2	3.8
CA	/	14.5	0.57	43.2	10	3.6
CA-MD38	43	14.4	0.53	43.3	10.2	3.4
CA-TAN	/	14.5	1.9	43.3	10.2	4.5
GEL	0	14.2	0.85	43.3	10.2	4.2
GEL-MD38	46	21.2	0.9	43.3	10.1	5.6
GEL-TAN	/	14.3	1.02	43.3	10.3	3.8

B.2 Observation au microscope électronique à balayage des microsphères de vitamine A

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie permettant d'observer des échantillons de natures organique ou inorganique jusqu'à une échelle nanométrique. Cette technique est très souvent utilisée dans le domaine des matériaux et dans l'observation des particules.

L'étude des neuf microsphères formulées précédemment (voir tableau 24) a pour objectif de visualiser la forme générale des microsphères, ainsi que leurs particularités de surface et leurs qualités de séchage. Ces résultats d'observation seront présentés et discutés dans une première partie de ce chapitre.

Le nombre important d'observations effectuées sur les différentes microsphères et sur d'autres échantillons nous ont conduits à synthétiser nos réflexions avec la littérature sur le sujet pour proposer une méthodologie simple qui explique la forme des microsphères observées et quelles informations il est possible d'en tirer. Cette réflexion sera présentée dans une seconde partie.

B2.1 Observation des microsphères formulées dans ce projet

Chaque lot de microsphère a été observé par MEB en mode environnemental, avec les paramètres les plus adaptés à l'observation de microsphères formulées avec des molécules organiques. Ces clichés sont présentés figure 61 (formulations issues des protéines de pois), figure 62 (formulations issues du caséinate de sodium) et figure 63 (formulations issues de la gélatine de type A).

La figure 61 montre les clichés obtenus pour les microsphères issus des formulations PP (en A), PP-MD38 (en B) et PP-TAN (en C). Chaque lot a été observé à deux grossissements : d'abord à un grossissement de x400, afin d'observer la forme générale des microsphères, leurs répartitions de taille et leurs cohésivités. On peut également observer à ce grossissement si la vitamine A se trouve à l'extérieur de la microsphère. Cette observation permet de se faire une idée sur la qualité du séchage et de l'encapsulation. Le deuxième

grossissement, x6000, permet d'étudier plus en détail l'état de surface d'une microsphère individuelle. Ce grossissement permet d'observer les tâches sombres, donnant des informations sur la qualité de la matrice.

Concernant la figure 61, nous pouvons observer sur les clichés A1, B1 et C1 (grossissement x400) que les particules de microsphère sont assez bien individualisées, ce qui indique un séchage de bonne qualité par atomisation. Les microsphères sont de forme générale sphérique, avec une forme de ballon dégonflé caractéristique de ce procédé de séchage.

Cette forme de ballon dégonflé est retrouvée sur les clichés A2, B2 et C2 (grossissement x6000) pour toutes les formulations, indiquant que le film de surface créé pendant le séchage n'est pas imperméable à la vapeur. Les tâches sombres visibles sur le cliché A2 (microsphère PP) et le cliché C2 (microsphère PP-TAN) signalent une composition hétérogène de la matrice, surement constituée de petites cavités d'air, de protéine et de vitamine A. Il s'agit donc d'une matrice poreuse. Le cliché B2 (microsphère PP-MD38) ne montre pas ces tâches sombres. Il se peut que cette matrice soit plus compacte et moins hétérogène. Il est visible également une granulométrie de surface sur le cliché B2. Cette granulométrie est celle de la microsphère, et ne peut pas venir d'un artefact de métallisation car nous utilisons ici le mode environnemental, qui ne nécessite pas d'étape de préparation de l'échantillon à observer.

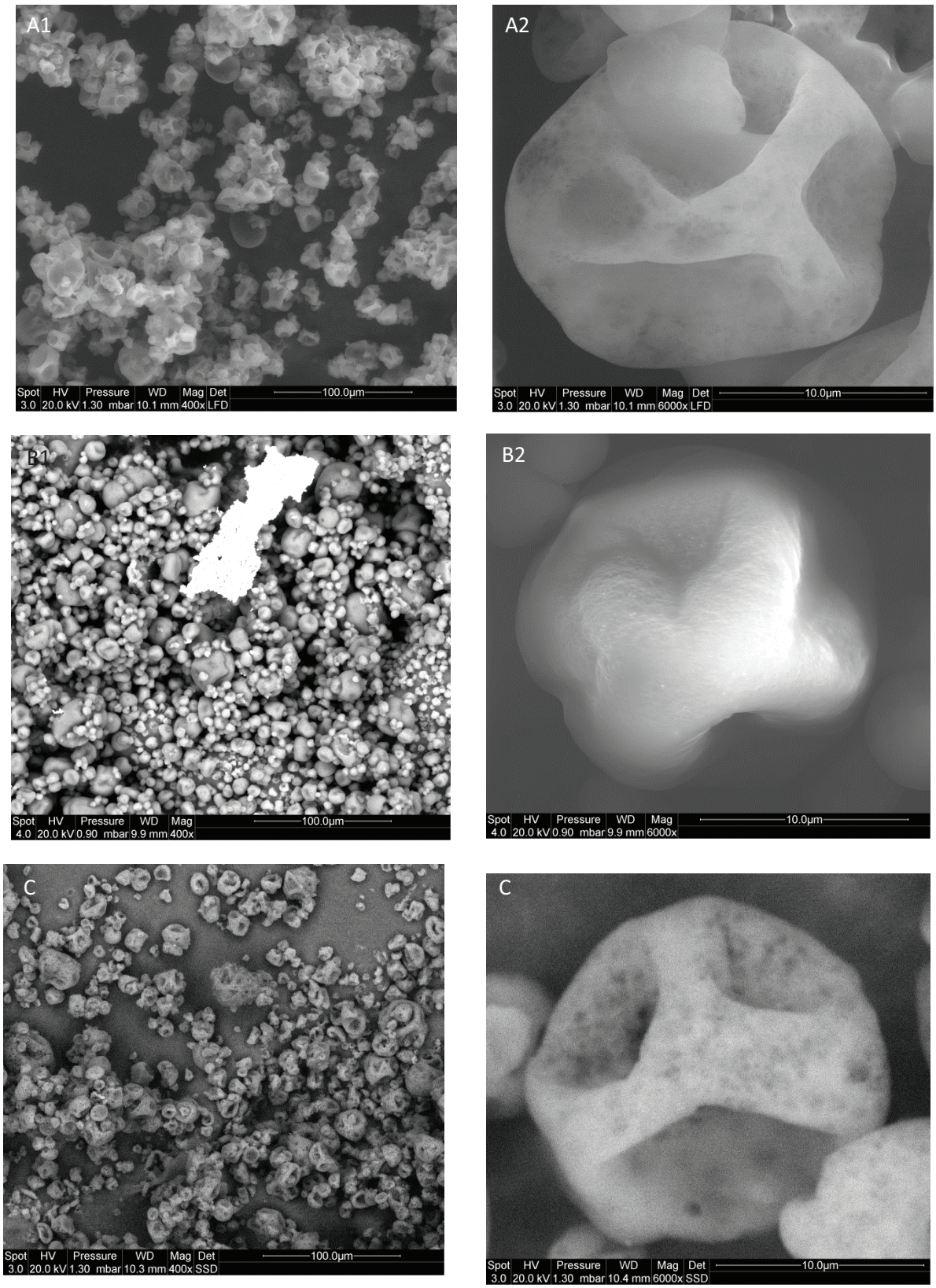


Figure 61 : observation MEB. A1 : microsphère PP x 400, A2 : microsphère PP x 6000 B1 : microsphère PP-MD38 x 400, B2 : microsphère PP-MD38 x 6000. C1 : microsphère PP-TAN x 400. C2 : microsphère PP-TAN x 6000

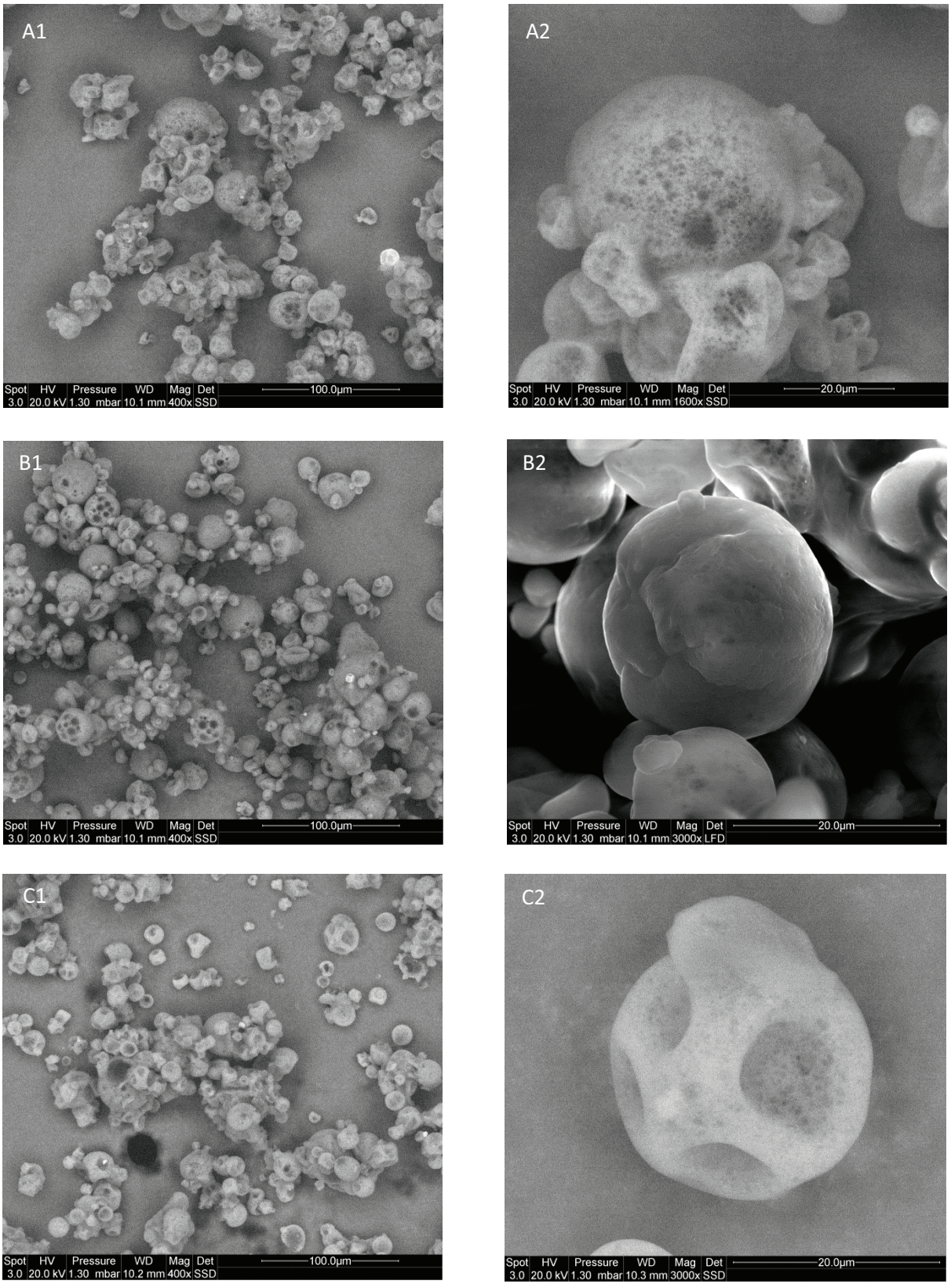


Figure 62 : observation MEB. A1 : microsphère Ca x 400. A2 : microsphère CA x 6000. B1 : microsphère CA-MD38 x 400, B2 : microsphère CA-MD38 x 6000. C1 : microsphère CA-TAN x 400. C2 : microsphère CA-TAN x 6000

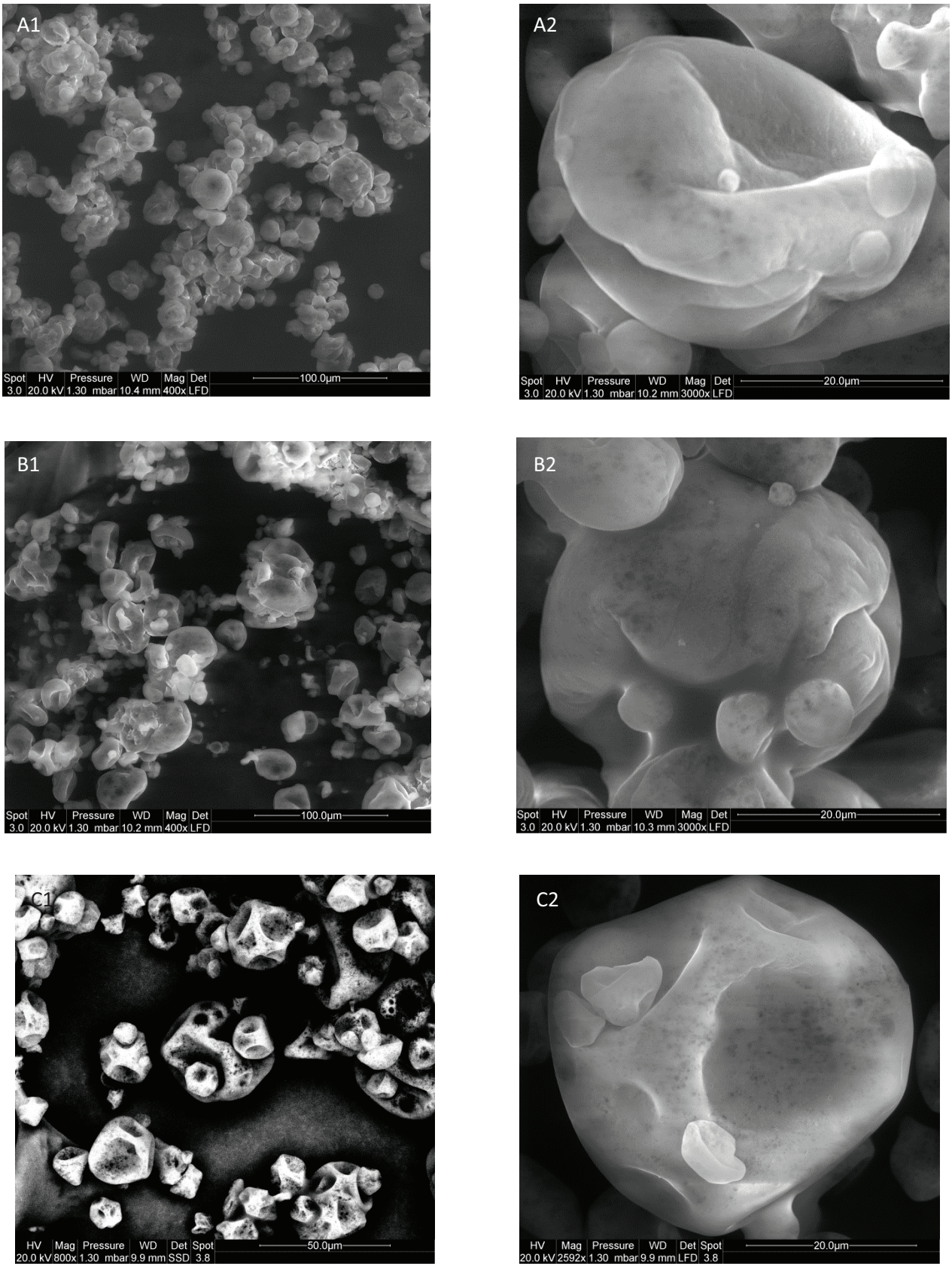


Figure 63 : observation MEB. A1 : microsphère GEL x 400. A2 : microsphère GEL x 6000. B1 : microsphère GEL-MD38 x 400, B2 : microsphère GEL-MD38 x 6000. C1 : microsphère GEL-TAN x 400. C2 : microsphère GEL-TAN x 6000

La figure 62 présente les clichées obtenus avec les microsphères CA (en A), CA-MD38 (en B) et CA-TAN (en C). Le grossissement x400 permet d'identifier des microsphères bien individualisées. La forme de ballon dégonflé est retrouvée pour les microsphères CA (en A1) et CA-TAN (en C1), mais ne semble pas être la règle pour la formulation CA-MD38 (en B1). En effets ces microsphères semblent plus sphériques.

Cette observation peut donc indiquer que les microsphères CA-MD38 sont moins perméables à la vapeur d'eau que les microsphères CA et CA-TAN. De plus, comme pour les observations précédentes, le grossissement x6000 permet d'observer des tâches sombres à la surface des particules. Ces tâches sombres sont visibles pour les microsphères CA et CA-TAN (cliché A2 et C2) mais sont beaucoup moins visibles pour les microsphères CA-MD38. Comme pour les microsphères PP-MD38, il est possible que la matrice soit plus dense et moins poreuse, ce qui expliquerait en partie qu'elle soit moins perméable à la vapeur d'eau.

Les photos de la figure 63 présentent les observations de microsphères de gélatine de type A GEL (en A), les microsphères GEL-MD38 (en B) et les microsphères GEL-TAN (en C). Les mêmes observations peuvent être faites que pour les autres microsphères avec une forme généralement sphérique. Par contre, la forme de ballon dégonflé est beaucoup plus visible pour GEL-TAN (C1 et C2) que pour les microsphères GEL et GEL-MD38. Les tâches sombres sont également plus présentent pour GEL-TAN que pour toutes les autres microsphères de cette série. Cela pourrait indiquer que les formulations GEL et GEL-MD38 sont moins perméables à la vapeur d'eau et que leurs matrices sont plus denses et homogènes que celles des microsphères GEL-TAN.

B2.2 Observation des microsphères par MEB : méthodologie d'exploitation des résultats

L'observation des microsphères obtenues par atomisation est une chose assez courante dans la littérature. Il est rare qu'une étude portant sur l'encapsulation d'actif et ayant aboutie à la formation de microsphère (ou de tout autres formes de vecteurs particulaires) ne présente pas des clichés MEB pour illustrer leurs recherches. Bien souvent, l'exploitation de ces résultats n'est principalement qu'esthétique, avec une observation très sommaire sur l'aspect de surface ou sur la forme générale. Afin d'aller plus loin dans l'exploitation des résultats, dans cette partie sera décrit le processus qui est mis en jeux pendant le séchage par

atomisation d'une émulsion, et son influence sur la forme générale de la microsphère, ainsi que les informations que l'on peut exploiter à l'issus de l'observation MEB.

Le séchage des émulsions par atomisation est à l'origine de la structure sphérique des microsphères obtenues. En effet les techniques de nébulisation (buse ou turbine) produisent des gouttelettes de forme sphérique (Li & Deng 2007). L'évaporation d'eau pendant le processus d'atomisation a lieu à partir de gouttelettes dispersées. Comme le décrit Charlesworth & Marshall (1960) et Faldt (1995), lors de la phase d'atomisation, les protéines grâce à leurs propriétés tensio-actives se placent à l'interface air/eau. Après évaporation de l'eau de l'émulsion, elles forment une enveloppe poreuse, où sont dispersées les gouttelettes d'actifs liposolubles (figure 64). Cet état de fait est confirmé par les travaux de Kelly *et al.* (2014) qui montrent la réparation des protéines et des globules lipidiques par imagerie confocale après coloration des molécules d'intérêts au sein d'une microsphère remise en solution dans l'eau.

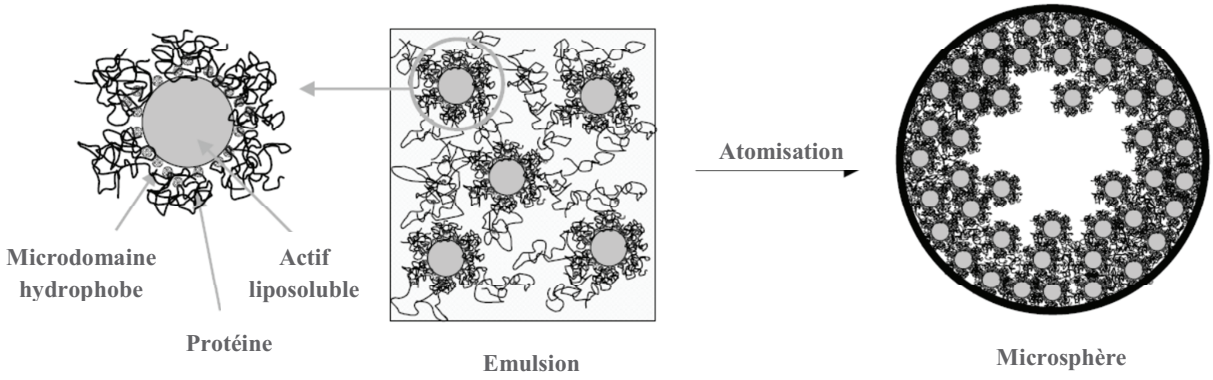


Figure 64 : représentation schématique de la microencapsulation d'un actif liposoluble par des protéines (adapté de Nesterenko (2012)

La surface flétrie de la microsphère, que l'on peut considérer comme une forme de « ballon dégonflé » (ou de balle de golf, terme utilisé par Murrieta-Pazos *et al*. 2012) n'est pas dû ici aux conditions d'analyse MEB comme l'affirme Nesterenko dans son manuscrit de thèse (2012). Ici le mode environnemental étant utilisé, nous ne sommes pas en condition de haut vide qui pourrait entraîner la diminution de volume (contraction) de la microsphère. Ce phénomène a pour origine le mode de séchage en lui-même, comme expliqué dans le Spray Drying Handbook (Masters 1985) (figure 65) et repris par Kim *et al.* (2009) concernant le séchage du lait par atomisation.

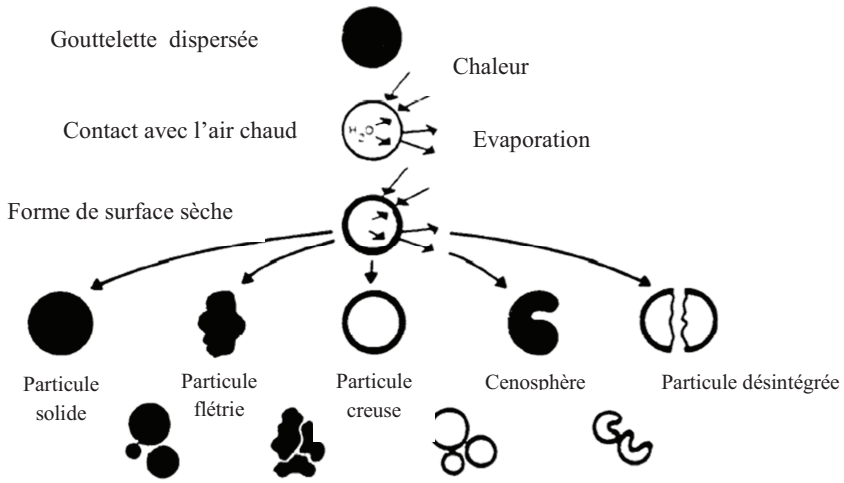


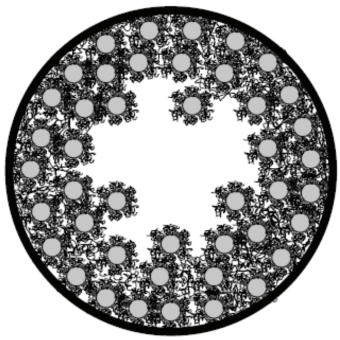
Figure 65 : Exemples de formes de particules obtenues par atomisation (adapté de Masters, 1985)

La forme d'une particule atomisée est directement reliée au process de séchage, ainsi qu'à sa formulation : lors du séchage par atomisation (ou nébulisation séchage), la goutte formée par le système de nébulisation subit une première étape de perte d'eau conditionnée par le transfert de masse induit par la différence de pression relative entre le flux d'air et la surface de la goutte. Ce transfert de masse rapide se produit en haut de tour, dès la sortie du système de nébulisation. La surface de la goutte est donc séchée en premier lieu par ce phénomène physique qui ne dépend pas uniquement de la température de l'air de séchage, mais principalement du débit d'air, de la fréquence de la turbine et de la tension superficielle à la surface de la goutte d'émulsion (Masters 1985).

Cette première étape provoque la formation d'un film de surface sec (ou croûte), qui selon ces propriétés, va influencer la forme la particule. Dans notre cas d'émulsion protéique, ce film reste perméable à la vapeur d'eau.

La deuxième étape est celle où la température de séchage est déterminante, et se déroule plus bas dans la tour d'atomisation. La goutte se réchauffe de l'extérieur vers l'intérieur de par le gradient de température. Si la température de l'air d'entrée est supérieure à la température d'ébullition du solvant de l'émulsion (ici, de l'eau), alors il y a formation de vapeur à l'intérieur de la goutte et vaporisation de celle-ci vers l'extérieur à travers le film de surface. Ce qui provoque la formation d'une cavité interne (visible figure 66) principale ainsi que les petites cavités périphériques.

A



B

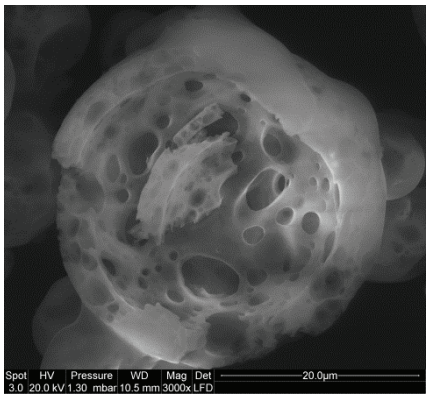


Figure 66 : en A : microcapsule schématique selon Nesterenko (2012). En B : Cliché MEB de l'intérieur d'une microsphère atomisée (PP) x 3000

Ces petites cavités périphériques présentes au sein de la microsphère (forme en « mie de pain ») peuvent être également dues à la phase d'homogénéisation par le Turax. En effet, ce procédé d'agitation est connu pour ajouter une grande quantité d'air dans les formulations de par le principe de circulation des liquides dans ce type d'appareil (Roustel 2010).

La déperdition de vapeur d'eau à l'issu de la deuxième étape de séchage entraîne une contraction de la microsphère qui déforme le film de surface et donne cette forme de « ballon dégonflé » (ou éponge, ou balle de golf) caractéristique.

Le schéma de Nesterenko peut être donc corrigé par la forme que prennent les émulsions atomisées dans la plupart des cas, celle de « ballon dégonflé » qui n'est pas dépendante de l'observation MEB mais bien du mode de séchage.

Les « tâches » sombres visibles notamment à la surfaces des microsphères PP (photos A, figure 61) ne sont pas à proprement parler des pores qui se seraient formés à la surface la microsphère. Une observation plus précise montre qu'il n'y a pas réellement de « trou » dans le film de surface. Cette différence de contraste est due à l'observation MEB, et plus exactement à la façon dont les électrons du faisceau interagissent avec la matière. En effet, en observation SE (électrons secondaire), le faisceau peut « interagir» jusqu'à 1 µm dans la couche extérieure de la microsphère, et ainsi venir chercher l'information (électron arraché à la matière) à l'intérieur de la microsphère. Pour une observation en rétro-diffusé (BSE), cela peut aller jusqu'à 3 µm. Ce qui peut laisser entendre que l'information visuelle que l'on obtient sur ces photos n'est pas uniquement l'aspect de surface de la microsphère, mais aussi

des informations sur sa composition et sur la structure interne (jusqu'à une épaisseur « atteignable » par les différents électrons).

La différence de contraste visible au BSE est due à la présence d'un contraste chimique. Ce phénomène est très visible quand il existe une différence de type organique/inorganique entre deux parties d'une particule. Ainsi une zone riche en éléments inorganiques (sels, silice…) apparait beaucoup plus claire qu'une zone purement organique (matière grasse, protéine…). Mais ce contraste chimique peut entrer en jeux en cas de présence de cavités vides dans la structure interne (dans la zone atteignable comme expliqué plus haut). Ainsi les zones de cavités vides peuvent apparaitre plus sombres que les zones plus denses, comme l'explique la figure 67.

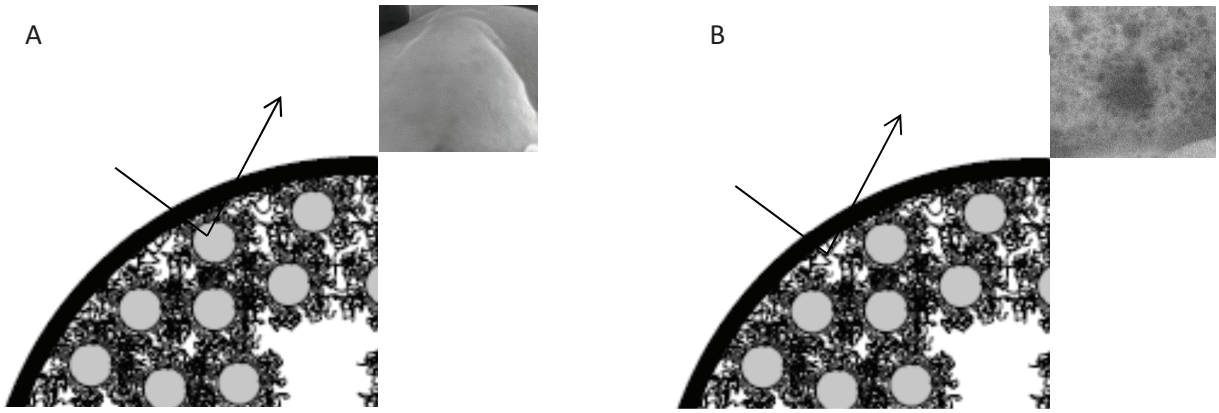


Figure 67 : schéma du principe de pénétration des électrons lors de l'observation SE ou BSE : en A, si l'électron entre en contact avec une zone de matière dense. En B : si l'électron rentre en contact avec une zone moins dense ou de composition chimique différente : création d'un contraste chimique

L'incorporation des bulles d'air et leur conservation au sein de la formulation de l'émulsion de départ est en théorie dépendante de la viscosité de la préparation. Ainsi une émulsion ayant une grande viscosité ne permettra qu'un faible dégazage après l'étape d'émulsification au Turax. Il n'est donc pas illogique de penser que la présence de tâches sombres en surface des microsphères observées au MEB soit directement proportionnelle à la viscosité de la solution initiale.

Le nombre d'observations effectuées lors de ce projet de recherche a permis de dégager plusieurs axes intéressants et une méthodologie d'observation spécifique de ces produits. Le mode environnemental utilisé ici nous a permis de nous affranchir des possibles

artefacts pouvant être apportés par l'étape de métallisation. Le lien effectué entre le procédé de séchage et l'observation des poudres peut à l'avenir amener à observer différemment les microparticules sous un angle plus rigoureux que le simple aspect esthétique.

L'hypothèse avancée sur les tâches sombres en surface observées sur nos photos peut donner une idée sur la structure immédiate des premiers micromètres de la microsphère, ainsi que sur la qualité du film. Ces résultats obtenus ainsi qu'une étude de l'état de l'art à ce sujet permet de proposer un schéma récapitulatif (figure 68) de la formation des microsphères séchées par atomisation. Ces observations ainsi que de nombreuses autres (concernant ce projet de recherche ou non) ont permis également de dégager des conclusions intéressantes sur l'intérêt de l'utilisation du mode environnemental pour l'observation des microsphères.

Ces conclusions ont fait l'objet d'un article de méthodologie, synthétisant les avantages du mode environnemtal et les différents artefacts que l'étape de préparation des échantillons (métallisation) engendre sur l'observation et l'exploitation des résultats.

Ces observations peuvent être complétées par celles effectuées par Murrieta-Pazos *et al.* dans leurs travaux de revues sur la surface et les formes caractéristiques des poudres alimentaires (Murrieta-Pazos *et al.* 2012). Le MEB y est présenté comme une technique possible de caractérisation de surface des produits atomisés.

Les résultats et leurs exploitations développées dans les études de Kim *et al* (2002 ; 2009a, 2009b) sur le lait atomisé indiquent bien que le séchage par atomisation et les différents facteurs de séchage (flux d'air, température etc…) jouent un rôle primordial dans la forme de la particule finale. Ses observations sur le lait sont en accord avec les observations faites ici sur le séchage de microsphère (forme de ballon dégonflé dépendante du séchage notamment). Mais les échantillons de poudres de lait sont systématiquement métallisés (recouvert d'une fine pellicule de métal conducteur, or ou platine) afin d'améliorer la conductimétrie et donc l'analyse MEB. Ce film peut induire des artefacts d'observations (Jones *et al*. 2013).

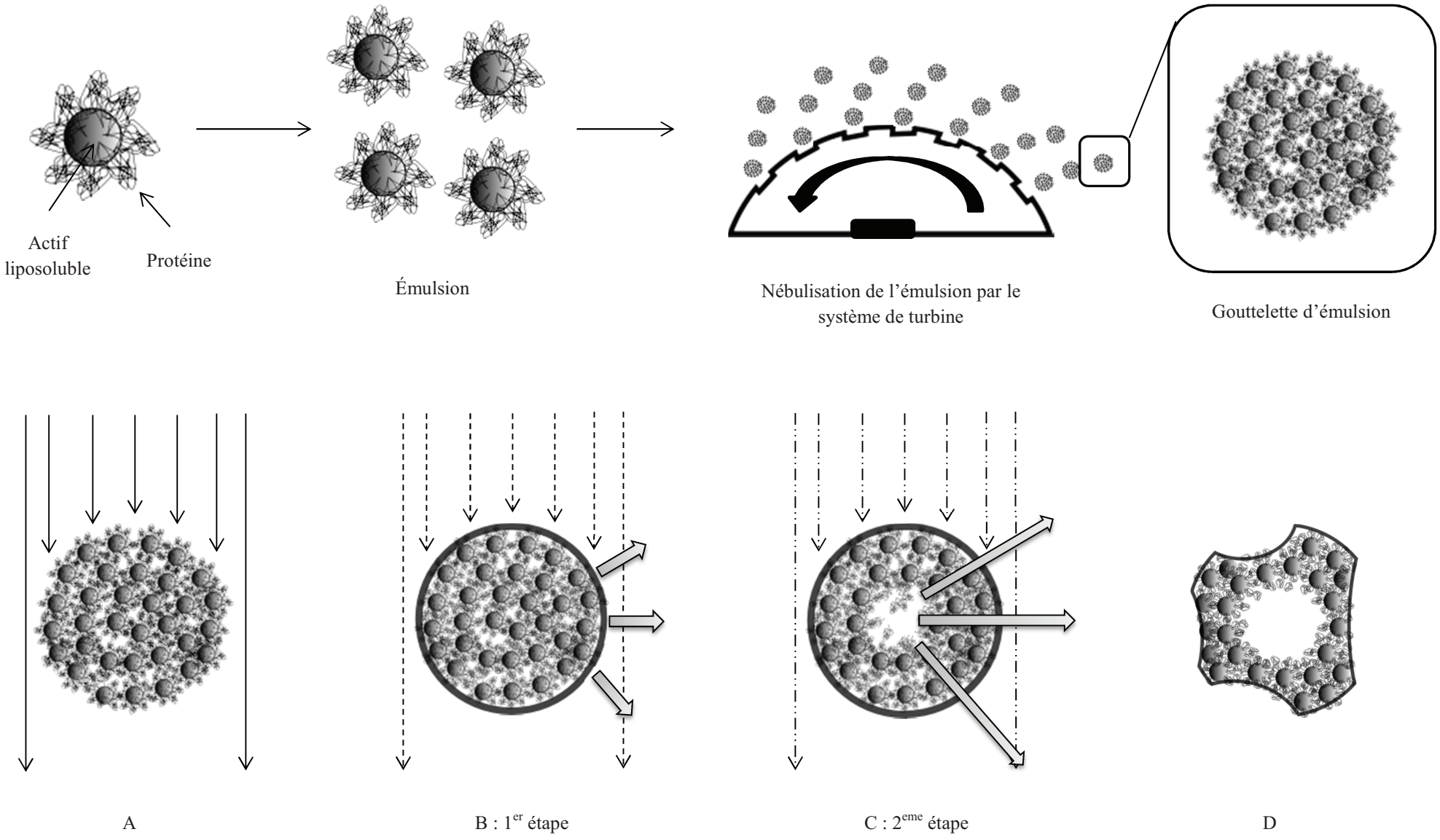


Figure 68 : schéma du principe général de séchage des émulsions, et l'influences des différents paramètres sur la forme de la particule finale. En A : la goutte d'émulsion est soumis à 2 types de facteurs : les facteurs physiques (vitesse d'air) et les facteurs thermiques (T°C de l'air d'entré). En B : 1er étape de séchage les facteurs physiques induise un transfert d'eau par modification de la tension superficielle à la surface de la goutte, ce qui a pour conséquence le séchage d'un film à la surface. En C : 2eme étape de séchage, la goutte se réchauffe de l'extérieur vers l'intérieur par transfert thermique et l'eau se vaporise, créant ainsi une cavité centrale. En D : la particule finale voit son film de surface se contracter de par la perte d'eau.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre C : Etude de l'influence de la fonctionnalisation sur le comportement des microsphères

C.1 : Etude de la stabilité de la vitamine A en condition de stockage

C.2 : Etude de la stabilité des microsphères et du relargage de la vitamine A dans des milieux de digestion gastriques et entériques simulés

C.3 : Etude de la perméabilité des microsphères aux molécules volatiles : étude sur le géraniol

C.4 : Etude du potentiel muco-adhésif des microsphères

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre C : Etude de l'influence de la fonctionnalisation sur le comportement des microsphères

C1 : Etude de la stabilité de la vitamine A en condition de stockage

C.1 Etude de la stabilité de la vitamine A en condition de stockage

Les actifs liposolubles, et plus particulièrement les vitamines liposolubles, sont très sensibles à différents facteurs, qui peuvent amorcer des réactions de dégradation ou une perte totale ou partielle de l'activité. Ces facteurs de dégradation peuvent être de natures diverses, mais les plus fréquemment rencontrés en agro-alimentaire sont la température, l'humidité relative et les UV (photons).

Un des rôles de l'encapsulation est de protéger l'actif de ces facteurs. Pour notre étude, la vitamine A a été protégée dans neufs formulations de microsphères différentes (PP, PP-MD38, PP-TAN, CA, CA-MD38, CA-TAN, GEL, GEL-MD38, GEL-TAN). L'objectif de cette étude est de déterminer si ces microsphères sont capables de protéger la vitamine après une période de stockage de 28 jours. Trois conditions de stockage ont été mise en place :

- La première est à température ambiante, dans l'obscurité, sans régulation de l'humidité relative. Ce sont des conditions de stockage standard, non particulièrement oxydantes pour la vitamine A
- La deuxième est à 40°C dans l'obscurité, sans régulation de l'humidité relative. Ici le facteur température est le seul à être étudié
- Le troisième est à 40°C, 75% d'humidité relative et dans l'obscurité. Deux des trois facteurs principaux de dégradation des vitamines liposolubles sont donc réunis.

La vitamine A encapsulée est d'abord dosée par HPLC à t=0 jours après déstructuration complète de la matrice de chaque microsphère par le DMSO. Ce taux de référence est mis en relation avec le taux retrouvé selon le même protocole pour des microsphères ayant été stockées dans les trois conditions de stockage décrites ci-dessus, à t= 28 jours. Chaque échantillon a été étudié en triplicata.

Les résultats présentés dans cette partie décriront en premier lieu les microsphères issus des protéines de pois fonctionnalisées ou non, puis celles du caséinate de sodium et de la gélatine de type A, associés à leurs conjugués issus du greffage de maltodextrine DE 38 ou de polyphénol de raisin.

C1.1 Microsphères de protéine de pois et leurs fonctionnalisations

L'utilisation des protéines de pois (PP), de son conjugué de Maillard (PP-MD38) et de son complexe avec les polyphénols de raisin (PP-TAN) pour la formulation de microsphère de vitamine A a permis de tester l'influence de la fonctionnalisation sur la stabilité de la vitamine dans des conditions de stockage différentes. Ces résultats sont présentés figure 69.

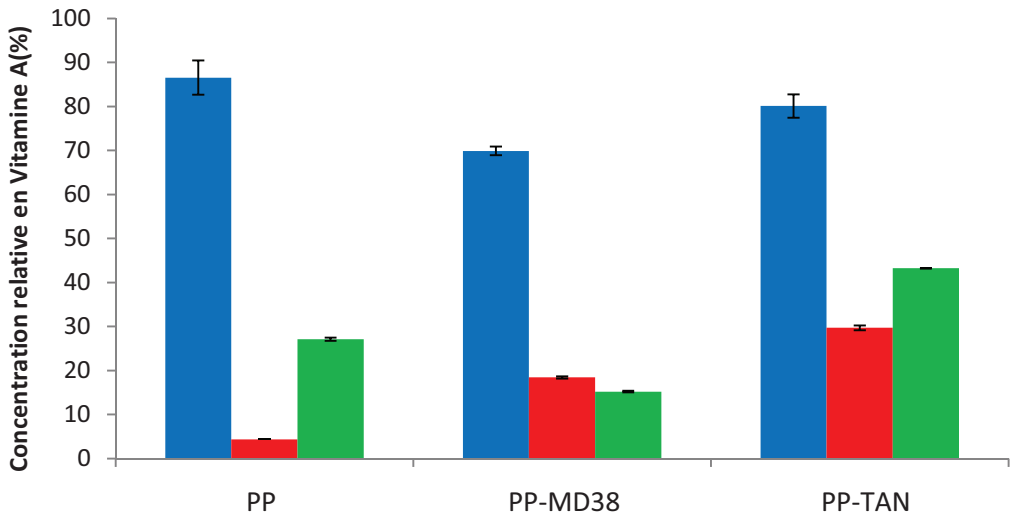


Figure 69 : pourcentage de vitamine A retrouvé dans les microsphères de protéines de pois et de leur conjugué, après un stockage de 28 jours à température ambiante (en bleu), à 40°C (en rouge) et à 40°C et 75% d'humidité relative (en vert)

Ces résultats montrent que l'utilisation des protéines de pois (microsphères PP) permet de récupérer 86.5% de la vitamine A encapsulée après 28 jours à température ambiante. Les protéines de pois seules permettent donc de stabiliser la vitamine A de façon satisfaisante sous forme de microsphère à température ambiante. Quand ces microsphères sont stockées à 40°C, le taux de vitamine A récupérée chute à 4.3 % et à 27.1 % dans le cas 40°C/75% H.R. Ces résultats indiquent que l'utilisation de ces protéines ne permet pas de protéger la vitamine A des deux facteurs de dégradation que sont la chaleur et l'humidité.

La formulation utilisant le conjugué de protéine de pois greffée avec la maltodextrine DE 38 (PP-MD38) permet de stabiliser 69.8% de la vitamine à température ambiante au bout de 28 jours. A 40°C, on retrouve 18.4 % de la vitamine A au bout de ce laps de temps, et à 40°C et 75% d'humidité relative, on retrouve 15.1 % de la vitamine de départ. Ces résultats montrent que la formulation PP-MD38 n'est pas adaptée à la stabilisation de la vitamine A

sous forme de microsphère dans des conditions de stockage dégradantes. Il y a néanmoins une amélioration notable de la stabilité à 40°C. Le pourcentage retrouvé à température ambiante montre une baisse de la stabilité par rapport aux protéines de pois seules, indiquant que PP-MD38 est moins efficace pour protéger l'actif de la dégradation que PP.

La formulation PP-TAN, utilisant le complexe protéine de pois/polyphénol de raisin, permet de stabiliser 80.1 % de la vitamine à température ambiante pendant 28 jours. Dans des conditions de stockage plus dégradantes, il est retrouvé 29.7 % de la vitamine après 28 jours à 40°C et 43.2 % de la vitamine après 28 jours à 40°C/75% d'H.R. Ces résultats montrent tout d'abord que cette formulation est capable de stabiliser de façon très satisfaisante la vitamine A à température ambiante et qu'elle apporte une meilleure stabilité par rapport aux protéines de pois seules (PP) dans des conditions de stockages dégradantes.

C1.2 Microsphères de caséinate de sodium de lait de vache et leurs fonctionnalisations

Les formulations issues de la fonctionnalisation du caséinate de sodium (CA-MD38 et CA-TAN) ainsi que les microsphères formulées à partir du caséinate de sodium seul (CA) ont été testées dans les trois conditions de stockage selon le même protocole que précédemment. Le taux de vitamine A retrouvé au bout de 28 jours dans les microsphères est mis en relation avec le taux de vitamine à t = 0 jours. Les résultats sont présentés figure 70.

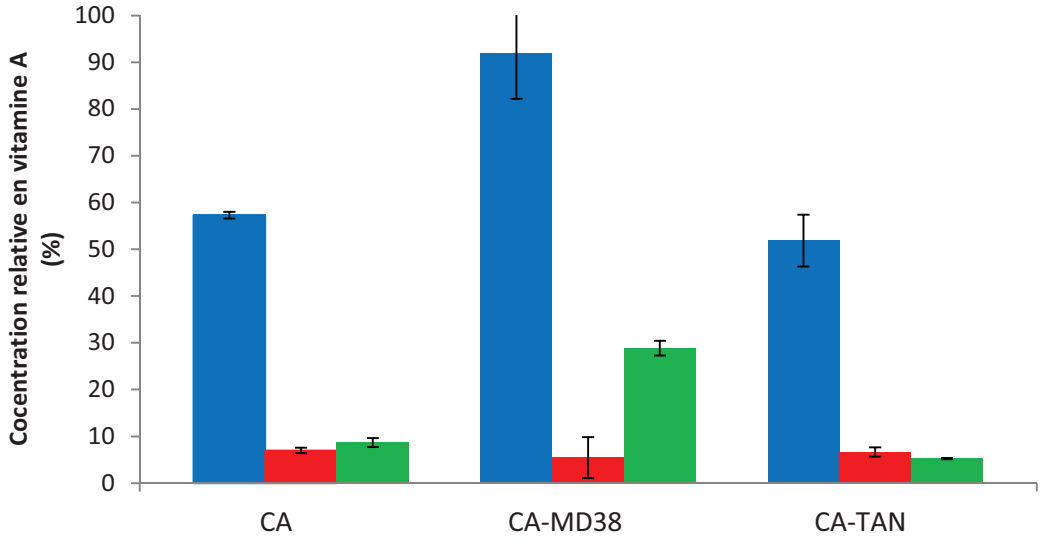


Figure 70 : pourcentage de vitamine A retrouvé dans les microsphères de caséinate de sodium et de leur conjugué, après un stockage de 28 jours à température ambiante (en bleu), à 40°C (en rouge) et à 40°C et 75% d'humidité relative (en vert)

Les résultats de la figure 70 nous indiquent que l'utilisation du caséinate de sodium dans la formulation de microsphère (CA) permet de stabiliser 57.3% de vitamine A au bout de 28 jours à température ambiante. Cette valeur montre que cette protéine n'est pas le meilleur choix pour stabiliser cette vitamine sensible à température ambiante. Le taux de vitamine A retrouvé à 40°C est de 6.9 % et le taux retrouvé à 40°C et 75% d'humidité relative est de 8.7%. Le caséinate de sodium ne permet pas de protéger la vitamine A sous forme de microsphère pendant un stockage en condition dégradante.

La fonctionnalisation par la réaction de Maillard (CA-MD38) permet d'améliorer de façon importante le taux de vitamine A retrouvé à température ambiante au bout de 28 jours : on retrouve 91.8 % de vitamine dans les microsphères. Il y a amélioration de la stabilité dans les conditions les plus dégradantes (40°C et 75% d'H.R) avec un taux de 28.8 % de vitamine retrouvée. Par contre cette formulation ne permet pas d'améliorer la stabilité à 40°C avec un taux retrouvé de 6.3 %.

La formulation CA-TAN donne des résultats très similaires à ceux de la formulation CA (51.8 % à température ambiante, 6.67 % à 40°C et 5.24% à 40°C et 75% d'humidité relative). Ces résultats indiqueraient que la fonctionnalisation du caséinate de sodium par les polyphénols de raisin n'influence pas de façon significative la stabilité de la vitamine A.

C1.3 Microsphères de gélatine de type A porcine et leurs fonctionnalisations

La gélatine de type A a été utilisée pour formuler des microsphères de vitamine A (GEL), ainsi que les deux formulations issues des deux vois de fonctionnalisation (GEL-MD38 et GEL-TAN). Ces microsphères ont été testées pour étudier leurs capacités à stabiliser la vitamine A au cours du temps.

La formulation GEL-MD38 ne permet pas de fournir de résultats fiables, la poudre ayant repris en humidité très rapidement dans les trois conditions de stockage, entraînant l'agglomération de l'échantillon testé et ne permettant pas une étude correcte de sa capacité de protection de la vitamine A. Le fait même que la poudre ne soit pas stable à l'air libre montre que cette formulation n'est de toute façon pas adaptée à la formulation de microsphères sous forme pulvérulente.

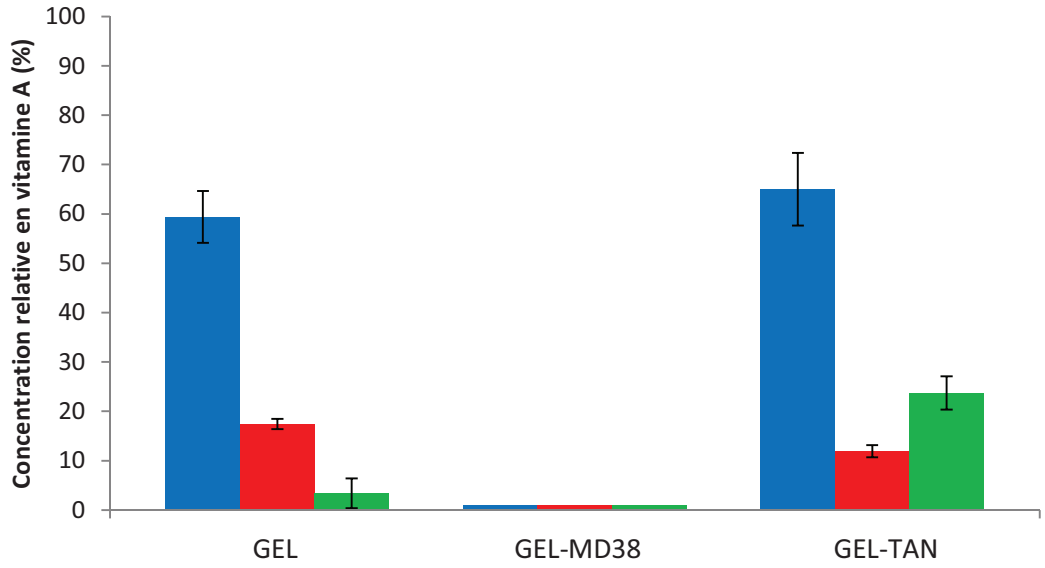


Figure 71 : pourcentage de vitamine A retrouvé dans les microsphères de gélatine de type A et de leur conjugué, après un stockage de 28 jours à température ambiante (en bleu), à 40°C (en rouge) et à 40°C et 75% d'humidité relative (en vert)

Les résultats (figure 71) obtenus pour la formulation GEL montrent qu'il est possible de stabiliser 59.3% de la vitamine A à température ambiante pendant 28 jours, mais ne permet pas de stabiliser de façon correcte la vitamine à 40°C et à 40°C et 75% d'H.R. (17.4 % et 3.3 % respectivement). Le greffage des polyphénols de raisin sur la gélatine de type A (GEL-TAN) permet d'améliorer légèrement la stabilité à température ambiante (64.9 % de vitamine A retrouvée). Une amélioration plus notable est observée à 40°C et 75% d'H.R. avec un taux de vitamine A retrouvé de 23.73%. Par contre ce greffage ne permet pas d'améliorer la stabilité à 40°C (11.9 %).

C1.4 Discussion des résultats : la stabilité de la vitamine A sous forme de microsphère

Les résultats présentés figure 69, 70 et 71 montrent que les voies de fonctionnalisations ont une influence notable sur la stabilité de la vitamine A encapsulée. Cette influence peut provenir de plusieurs phénomènes liés à la formulation de la microsphère.

Tout d'abord, la présence de composés de type antioxydant peut potentiellement améliorer la stabilité chimique de l'actif au cours du temps. Cette première théorie sera discutée dans une première partie.

La perméabilité de la matrice aux facteurs extérieurs oxydant que sont l'oxygène de l'air et l'humidité relative peut également jouer sur la stabilité de la vitamine A au cours du stockage. Ce phénomène sera discuté dans une deuxième partie.

C1.4.1 Premier phénomène de protection possible : la présence de molécules antioxydantes

Les protéines de pois, le caséinate de sodium ou la gélatine de type A ne sont pas connues pour avoir un pouvoir antioxydant particulier. Par contre, des travaux ont montré que les conjugués issus de la réaction de Maillard pouvaient avoir des capacités de protections antioxydantes intéressantes.

Dans le cas des formulations obtenus avec des composés de la réaction de Maillard, il y a une amélioration de la stabilité pertinente uniquement avec la formulation CA-MD38 en comparaison avec la formulation CA.

L'étude de Drusch *et al.* (2009) sur la glycation du caséinate de sodium par différent sucres et son influence sur la stabilité d'un actif lipophile fonctionnel, montre que la réaction de Maillard est capable de donner des composés ayant une bonne activité antioxydante, améliorant ainsi la stabilité de l'actif dans le temps. Il est notamment mention de composé caséinate-sirop de glucose à DE 38, qui correspondrait à notre formulation. Ce composé améliore la stabilité d'une huile de poisson encapsulée dans des conditions de stockage de 60% de H.R et 20°C sur 55 jours, en retardant l'oxydation des lipides. La même observation a été faite par O'Regan et son équipe en 2010, également sur un actif lipophile, sous forme de double émulsion avec du caséinate ayant réagi avec différents sucres.

L'activité antioxydante potentielle des composés de Maillard issus des protéines de lait est également décrite dans la littérature par Wen-qiong *et al.* (2013) et Dong *et al.* (2012)

Cette capacité de protection améliorée de la part des composés de Maillard est retrouvée de façon moins visible entre PP-MD38 et PP à 40°C, mais n'est pas décrite dans la littérature.

Les polyphénols de raisin sont connus pour avoir un excellent pouvoir antioxydant (Garrido & Borges 2013). Le fait de former des complexes entre les protéines et les polyphénols peut entraîner une perte plus ou moins importante de l'activité antioxydante des composés phénoliques. Dans cette étude, nous avons une amélioration de la stabilité de la vitamine A au cours du temps par la formulation PP-TAN dans des conditions de dégradation de la vitamine A (40°C et 40°C et 75% d'H.R) et pour la formulation GEL-TAN à 40°C et 75% d'H.R.

Le fait de rajouter des polyphénols dans des formulations de type encapsulation par émulsion est assez bien décrit dans la littérature. La quercetine (Di Maatia *et al.* 2010), le resveratrol (Coradini *et al.* 2014) (Wan *et al.* 2014), l'epigallocatechine-3-gallate (Zhou & Elias 2013), la rutine (Cui *et al.* 2014) et un concentré de polyphénol du thé vert (Von Staszewski *et al.* 2014) ont tous démontré leurs efficacités à réduire l'oxydation des lipides en émulsion et ainsi augmenter leurs stabilités au cours du temps.

Il est donc possible que l'activité antioxydante des polyphénols de raisin ait ici le même rôle d'amélioration de la stabilité de la vitamine A au cours du temps. Néanmoins, nous ne retrouvons pas ce rôle dans la formulation CA-TAN, ce qui peut laisser à penser que la composition chimique de la matrice n'est peut-être pas le seul facteur pouvant influencer la stabilité de l'actif encapsulé.

C1.4.2 Deuxième phénomène de protection possible : caractéristique physico-chimique de la matrice

Si l'on considère que la matrice de la microsphère comme un film protéique, alors les règles et phénomènes observés dans la littérature concernant les films de ce type s'appliquent. La dégradation d'une molécule peut être due en effet à un transfert d'humidité et d'oxygène, deux facteurs accélérant la dégradation des composés liposolubles. Le transfert des molécules d'eau notamment est directement corrélé avec la perméabilité à la vapeur d'eau du biopolymère utilisé (Wihodo & Moraru 2013).

Selon McHugh and Krochta, en 1994, les biopolymères très polaires comme les protéines ou l'amidon montrent généralement une perméabilité à la vapeur d'eau très élevée, mais une faible perméabilité au gaz. D'un autre côté, les polymères non polaires (comme les lipides), auraient un comportement inverse. Par exemple, pour un film à base de caséinate de sodium (Avena-Bustillos & Krochta 1993), le fait de rajouter différents pourcentages de cire d'abeille dans la formulation permet d'abaisser la perméabilité à la vapeur d'eau de 4.25 $x10^{-10}$ g m/m² sPa à 1.114.25 $x10^{-10}$ g m/m² sPa. Le même constat a été fait avec l'ajout de cire de Carnauba et la cire de Candellila (Chick & Hernandez 2002).

La composition en acide aminé d'une protéine peut également influencer la perméabilité à la vapeur d'eau d'un film protéique. Un haut taux d'acide aminé hydrophobe peut conduire à une perméabilité à la vapeur d'eau réduite. Ce phénomène est particulièrement visible entre les différents types de gélatine : la gélatine de poisson, ayant un taux d'acides aminés hydrophobes plus élevé que les autres types de gélatine, montre une perméabilité à la vapeur d'eau moindre (Karim & Bhat 2009).

L'action de l'hydrophobicité de la matrice peut être visible ici si l'on compare les résultats de stabilité obtenu pour les formulations PP, CA et GEL à température ambiante et à 40°C et 75% d'H.R. Les protéines de pois sont plus hydrophobes que le caséinate et la gélatine (Perrot 1994). Elles apportent donc logiquement plus de stabilité que les deux autres protéines, dans des conditions de stockage similaires.

Le fait de greffer des composés plutôt hydrophobes comme les polyphénols sur les protéines peut augmenter l'hydrophobicité générale de la matrice, ce qui est particulièrement visible pendant la formation de complexes insolubles lors de la précipitation des polyphénols du vin par les protéines (Siebert 1996b).

Diminuer ainsi la capacité de la matrice d'une microsphère à capter l'humidité ambiante permettrai de réduire l'influence de cette humidité sur le stress dégradant subit par la vitamine encapsulée.

L'étude de la stabilité de la vitamine A sous forme de microsphère permet de conclure que :

- La formulation PP est la plus adaptée parmi les formulations protéiques non fonctionnalisées au stockage des microsphères de vitamine A à température ambiante avec un taux de vitamine A retrouvée de 86.5%

- La formulation PP-MD38 permet d'améliorer la stabilité de la vitamine A à un stockage à 40°C par rapport à PP dans les mêmes conditions de stockage

- La formulation PP-TAN permet d'améliorer la stabilité de la vitamine A dans des conditions de stockage de 40°C et 40 °C/75% d'H.R. par rapport aux formulations PP et PP-MD38

- La formulation CA-MD38 permet d'améliorer la stabilité de la vitamine A de façon très intéressante à température ambiante avec un taux de 91.8% de vitamine retrouvée

- La formulation GEL-TAN permet d'améliorer de façon significative la stabilité de la vitamine A dans les conditions de stockage à 40°C/75% d'H.R par rapport à la formulation GEL

- Deux phénomènes peuvent expliquer la réduction de la dégradation de la vitamine A sous forme de microsphère : la présence de molécules antioxydantes au sein de la matrice, et les propriétés physico-chimiques du biopolymère, modifié ou non par la fonctionnalisation

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre C : Influence de la fonctionnalisation sur le comportement des microsphères

C.2 : Etude de la stabilité des microsphères et du relargage de la vitamine A dans des milieux de digestion gastriques et entériques simulés

C.2 Etude de la stabilité des microsphères et du relargage de la vitamine A dans des milieux de digestion gastriques et entériques simulés

L'encapsulation de la vitamine A a pour objectif d'améliorer la formulation de sa forme galénique, de la protéger des facteurs environnementaux dégradant (température, humidité, oxygène…) et de permettre une libération contrôlée. L'encapsulation permet également de protéger la vitamine pendant son parcours dans le tractus digestif, depuis la première étape jusqu'au lieu d'action ou d'absorption désiré. La vitamine A est liposoluble, elle doit donc être vectorisée et libérée au niveau de l'intestin grêle, qui est le site d'absorption privilégié des lipides.

Le vecteur protégeant la vitamine A doit donc résister aux différents facteurs physico-chimiques rencontrés au niveau des différentes étapes de la digestion : les contraintes mécaniques par exemple de la mastication, puis les facteurs chimiques de l'estomac et enfin libérer la vitamine A sous l'effet des facteurs chimiques de l'intestin grêle.

Dans cette étude, les différentes microsphères formulées à partir des protéines de pois, du caséinate de sodium et de la gélatine de type A, fonctionnalisées ou non avec la maltodextrine DE38 et les polyphénols de raisin ont été testées. Nous avons choisi de simuler deux étapes importantes de la digestion chez les monogastriques :

- L'étape de digestion gastrique, avec un environnement acide (pH 1-2 à jeun) et avec la présence d'une enzyme protéolytique : la pepsine.
- L'étape de digestion entérique, avec un environnement légèrement acide (pH 5), la présence de sels biliaires et d'un cocktail d'enzymes (glucosidase, protéase, lipase etc…) (mélange commercial connu sous le nom de pancréatine)

Ces deux étapes ont été reconstituées afin d'y faire incuber chaque lot de microsphère pendant 5h, à 37°C. Des prélèvements réguliers ont été effectués, suivis d'une extraction au chloroforme de la vitamine A relarguée dans le milieu. Son dosage par HPLC a été réalisé afin de calculer le pourcentage de relargage dans le milieu de digestion.

Une première partie décrira les résultats obtenus avec les microsphères issues de la formulation à base de protéine de pois (PP), de protéine de pois greffées avec la maltodextrine DE38 (PP-MD38) et les protéines de pois greffées avec les polyphénols de raisin (PP-TAN).

Une seconde partie décrira les résultats obtenus avec le caséinate de sodium de lait de vache (CA) et ses deux formulations fonctionnalisées (CA-MD38 et CA-TAN) et enfin une dernière partie traitera de la gélatine de type A porcine (GEL) et de ses microsphères fonctionnalisées (GEL-MD38 et GEL-TAN).

C2.1 Les formulations issues des protéines de pois

Les protéines de pois utilisées pour les microsphères PP sont un mélange hétérogène de protéines de différentes masses moléculaires et constituées par des assemblages complexes de sous unités reliées par des ponts disulfures ou des liaisons de faible énergie. Les différentes microsphères formulées à partir de ces protéines et de leurs fonctionnalisations par greffage soit de maltodextrine DE 38 soit de polyphénol de raisin ont été étudiées au sein de milieu de digestion gastrique et entérique simulés.

La figure 72 montre les trois profils de relargage de la vitamine A en milieu gastrique obtenu avec PP, PP-MD38 et PP-TAN. Le pourcentage de vitamine A relarguée est exprimé en relatif par rapport au taux de vitamine A théorique dans les formulations de microsphère (environs 43% m/m)

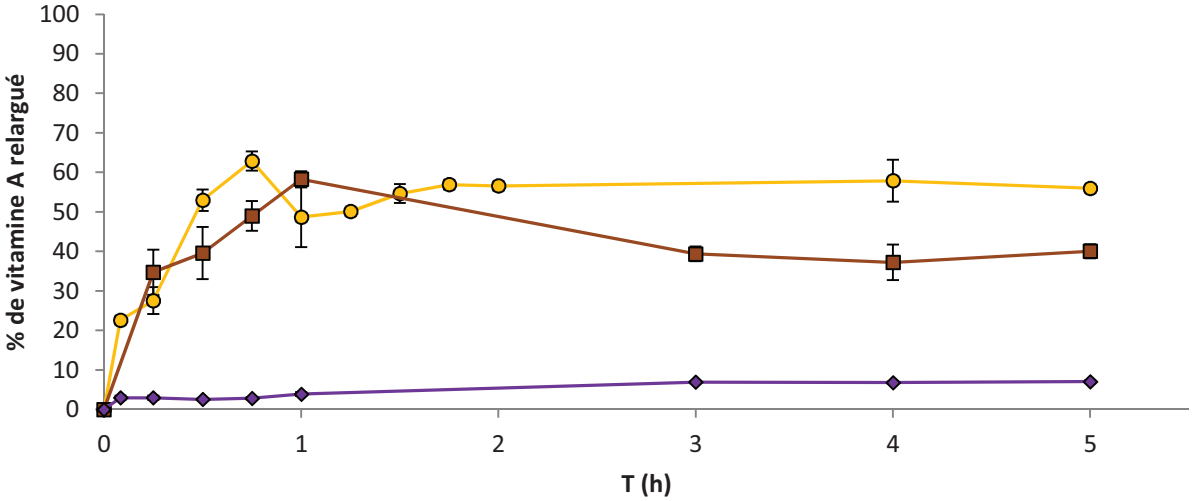


Figure 72 : cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères PP (jaune), PP-MD38 (marron) et PP-TAN (violet) dans un milieu de digestion gastrique simulé (pH 2, pepsine)

Pour les microsphères formulées avec les protéines de pois (PP), nous observons un relargage rapide, avec un taux de vitamine A relarguée d'environ 60 % en moins d'une heure. Ce premier résultat indiquerait que pendant la digestion gastrique, la microsphère de protéine de pois est majoritairement déstructurée, et libère la vitamine A dans le milieu. Le pH acide et la présence de pepsine dans ce milieu de digestion peut expliquer ce relargage, car la légumine de pois est sensible à l'hydrolyse par la pepsine, probablement en raison de la déstabilisation de sa structure à pH acide (Perrot 1994).

Le même phénomène de relargage important (environs 50%) est observé avec les microsphères formulées à partir du composé de Maillard (PP-MD38). La fonctionnalisation par la maltodextrine DE 38 n'apporte donc pas de protection gastrique à la microsphère. Par contre l'utilisation des conjugués protéine/polyphénol dans la formulation PP-TAN a pour effet un relargage insignifiant de la vitamine A (<10%) dans ce milieu de digestion. Les conjugués de ce type sont décrits dans la littérature pour être résistants à une digestion de type gastrique (pH 2 avec enzyme) (Rawel *et al.* 2002). **C'est la première fois que ce phénomène est utilisé de façon voulu et contrôlé pour apporter une protection gastrique à un vecteur particulaire.**

La figure 73 montre les trois profils de relargage des microsphères PP, PP-MD38 et PP-TAN obtenus en milieu entérique.

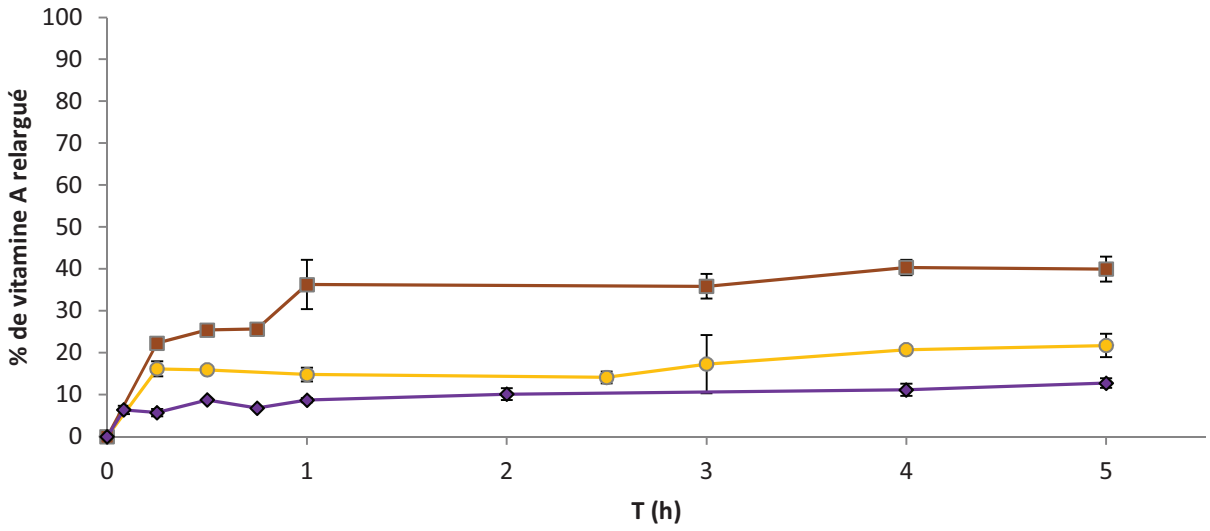


Figure 73 : cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères PP (jaune), PP-MD38 (marron) et PP-TAN (violet) dans un milieu de digestion entérique simulé (pH 5.5, enzyme, sel biliaire)

La digestion entérique simulée fait intervenir ici un mélange complexe de protéine digestive (lipase, protéase glucosidase) et de sels biliaires le tout à un pH de 5.5. Nous observons que les microsphères formulées à partir de protéines de pois (PP) n'ont qu'un relargage modeste dans ces conditions, inférieur à 20% (figure 73), contrairement aux résultats présentés figure 72.

L'absence d'un relargage important pour les microsphères de protéine de pois dans un milieu portant riche en enzyme de type protéase peut s'expliquer par différents facteurs : le pH, proche du pHi des protéines de pois (pHi=4.5), rendant les vecteurs particulaires peu solubles, ne permet pas une bonne accessibilité des protéines par les protéases. Il semblerait également que selon Perrot (1995), les protéines de pois soient résistantes à la dégradation enzymatique de la trypsine, présente dans ce milieu de digestion.

Concernant la digestion de vecteurs formulés à partir de protéine végétale en règle générale, un problème peut être soulevé en étudiant la littérature à ce sujet. En effet, ce type de biomasse est riche en facteurs antinutritionnels, qui agissent comme des mécanismes de défense chez les végétaux pour empêcher l'ingestion et la digestion. Les deux plus importants et mieux connus sont les inhibiteurs de la trypsine (Salunkhe & Kadam, 1989) et les lectines. D'autres moins importants comme les tanins, les fibres et les phytates sont également référencés dans les protéines de pois (Perrot 1995). Ces facteurs antinutritionnels, de par leurs actions soit directement sur les enzymes digestives, soit sur l'absorption des nutriments, peuvent diminuer significativement la dégradation des protéines, surtout au sein d'un milieu de digestion simulé (milieu fermé non renouvelé, petit volume)

La matière première utilisée ici, Nutralys® F85M de chez Roquette, contient un minimum de 85% de protéine (fiche produit), mais les 15 % restant peuvent constituer une source de facteurs antinutritionnels. De plus, sans avoir connaissance du traitement qu'on subit ces protéines pendant leurs productions, il est difficile d'évaluer si un traitement thermique suffisant a eu lieu qui aurait permis de dénaturer ces facteurs. Il est donc possible que pendant la formulation de la microsphère, ces facteurs antinutritionnels fassent partie intégrante de la matrice, et agissent ensuite dans le milieu de digestion simulé, empêchant la dégradation de la matrice, et donc le relargage de l'actif

Nous observons ensuite que l'utilisation de conjugué PP-MD38 (figure 73) dans la formulation améliore le relargage de la vitamine A qui passe à 40% après 1h. La légère amélioration du relargage (+ 20 %) par la formulation PP-MD38 peut être directement reliée à

la désactivation des facteurs antinutritionnels (Moughan *et al.* 2008) par le processus de réaction de Maillard (chauffage supérieur à 95°C). En effet, selon Tang *et al.* (2009), le traitement thermique au-delà de 95°C a une influence à la fois bénéfique et néfaste sur la digestibilité des protéines. Les effets bénéfiques comprennent l'inactivation des inhibiteurs d'enzymes digestives et le déroulement des protéines induit par la chaleur, permettant une meilleure accessibilité des enzymes de digestion. Les effets négatifs sont l'agrégation de protéines dénaturées avec la possible formation de nouvelles interactions moléculaires qui sont peu ou pas attaquables par les enzymes.

Les phénomènes de dépliements et d'inactivation des facteurs antinutritionnels peuvent êtres couplés à celui de la formation d'agrégat indigestes. Néanmoins l'amélioration constatée par la fonctionnalisation par la réaction de Maillard semble indiquer que ce sont les aspects bénéfiques du chauffage des protéines qui l'emportent.

Enfin, comme observé figure 73, et comme dans les conditions gastriques (figure 72), l'utilisation de conjugués PP-TAN entraîne un relargage de la vitamine A insignifiant (<10%). Selon Adsule et Kadam (1989) et Hahn *et al.* (1984), les complexes que forment les polyphénols aux protéines végétales sont responsables de la faible digestibilité des protéines. Beaucoup d'études ont été menées sur l'influence de la présence de composés phénoliques dans les rations animales, notamment pour les ruminants (Aufrere *et al.* 2012). Bien que l'impact des tanins et des polyphénols sur la digestibilité intestinale des protéines soit mal connu (Patra & Saxena, 2011), il semblerait bien que ces composés inhibent la capacité des enzymes endogènes à hydrolyser les protéines en peptides et acides aminés (Waghorn 2008). Les polyphénols de la formulation PP-TAN pourraient donc jouer ici un rôle de facteur antinutritionnel, en plus de celui de former des complexes avec les protéines de pois de la matrice.

Il est d'ailleurs intéressant de noter que le tannage de protéines végétales (tourteau de soja principalement) pour l'alimentation du bétail peut se faire de façon naturelle en utilisant des tanins naturels afin d'améliorer leurs résistances à certaines zones du tractus digestif des ruminants et améliorer leurs digestions dans celles visées (Aufrere *et al*. 2012).

C2.2 Les formulations issues du caséinate de sodium de lait de vache

Dans la littérature, le caséinate de sodium est présenté comme une protéine dont la digestion ne pose pas de problème particulier chez l'homme. Cette protéine est en effet digérée de façon partielle par la pepsine de l'estomac, et de façon quasi-totale par la trypsine de l'intestin grêle (Beaufrand *et al.* 1977). Les formulations à base de caséinate sont nombreux dans la littérature (Chen *et al*. 2013 ; Zhang *et al.* 2013 ; Drusch *et al.* 2012) et peuvent être issues de procédés d'encapsulation différents.

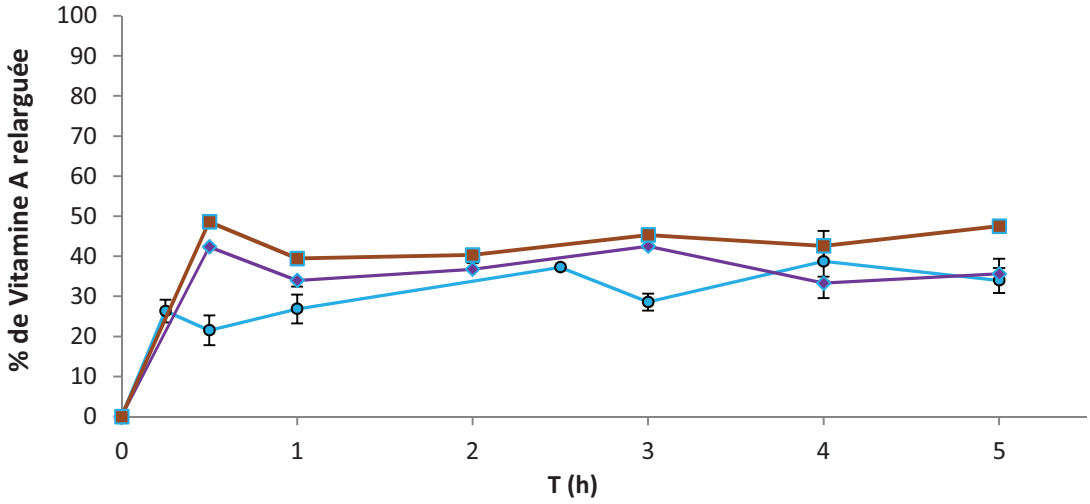


Figure 74 : cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères CA (bleu), CA-MD38 (marron) et CA-TAN (violet) dans un milieu de digestion gastrique simulé (pH 2, pepsine)

La figure 74 présente les résultats du relargage de la vitamine A obtenus pour les formulations CA, CA-MD38 et CA-TAN dans un milieu de digestion gastrique simulé. Nous observons que la formulation CA montre un relargage de vitamine A d'environ 30% en moins d'une heure. Les deux formulations issues des deux voies de fonctionnalisation on presque exactement le même comportement dans ce milieu de digestion. Que ce soit le greffage de maltodextrine DE 38 (CA-MD38, environs 40 % de relargage de vitamine A), ou le greffage de polyphénol de raisin (CA-TAN, environs 40% de relargage de vitamine A), il ne semble y avoir aucune influence des étapes de fonctionnalisation dans la capacité de la microsphère à être attaquée par la pepsine de l'estomac ou déstructurée par le pH acide.

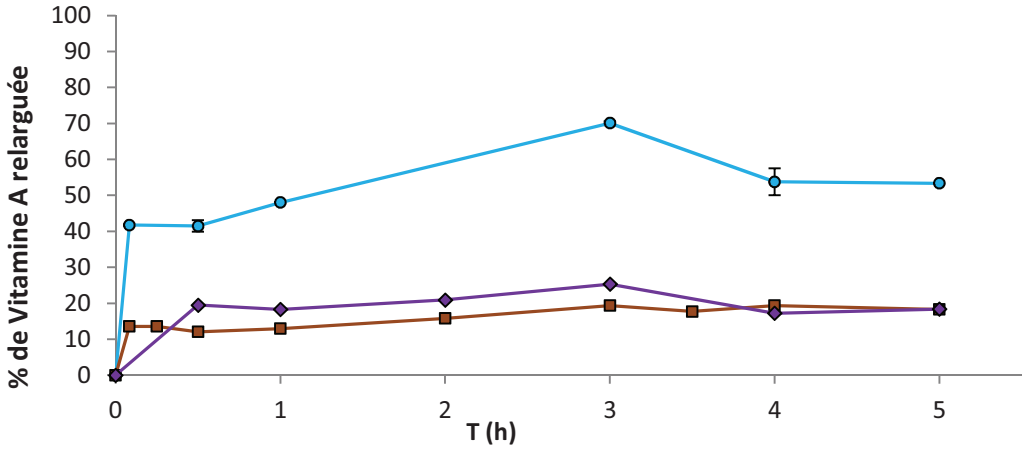


Figure 75 : cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères CA (bleu), CA-MD38 (marron) et CA-TAN (violet) dans un milieu de digestion entérique simulé (pH 5.5, enzyme, sels biliaire)

En revanche, en milieu de digestion entérique dont les résultats de relargage sont présentés figure 75, la microsphère CA montre une libération de la vitamine A proche de 50 % en moins d'une heure. La fonctionnalisation par les tanins et la fonctionnalisation par les sucres réduisent ce relargage aux environs de 20% dans le même laps de temps. Il y a donc inhibition de la digestion entérique, quel que soit la voie de fonctionnalisation choisie.

Dans son étude de 2010, Hiller *et al*. ont démontré que la digestion entérique de composés de Maillard formulés avec du caséinate de sodium était diminuée de 36-55% par rapport à du caséinate seul. Ils avancent l'hypothèse que la conformation des complexes protéine/polysaccharides peut protéger les liaisons protéiques contre la protéolyse. Ils se reportent aux études d'Oliver *et al.* (2006 a, b) qui confirme que les complexes à partir de caséinate de sodium sont compacts et forment un réseau fermement tissés. Ces observations pourraient expliquer pourquoi le greffage de la maltodextrine DE 38 sur le caséinate de sodium inhibe le relargage de la vitamine A encapsulée.

Cette même inhibition par la formulation CA-TAN peut être expliquée par le fait que les complexes protéines/polyphénol inhibent en générale la protéolyse, notamment par la trypsine (Lai *et al.* 2013). La littérature est assez divergente sur l'influence des polyphénols sur la digestion et la biodisponibilité des protéines de laits en général. Aucune contribution scientifique ne fait état de vecteur particulaire associant caséinate de sodium et polyphénol dans le but d'inhiber la protéolyse. Néanmoins, étant donné que les microsphères CA semblent reproduire assez fidèlement le profil de digestion du caséinate de sodium montré par

Beaufrand (1977), il semblerait parfaitement possible que le comportement de CA-TAN soit conforme à celui décrit dans la littérature pour les composés protéine laitière/polyphénol (Lai *et al.* 2013).

C2.3 Les formulations issues de la gélatine de type A porcine

La gélatine est un biopolymère utilisé de longue date dans les procédés d'encapsulation et de galénique pour son excellente biodégradabilité. Afin d'améliorer ses capacités de nombreux réticulants chimiques (formaldéhyde, gluthéraldéhyde…) sont utilisés dans l'industrie afin d'apporter un contrôle sur le relargage de l'actif encapsulé. Aujourd'hui de plus en plus d'études se détournent de cette voie chimique pour l'utilisation de réticulants plus propres et alimentaires (Wu *et al.* 2013) (Cao *et al.* 2007) (Strauss & Gibson 2004).

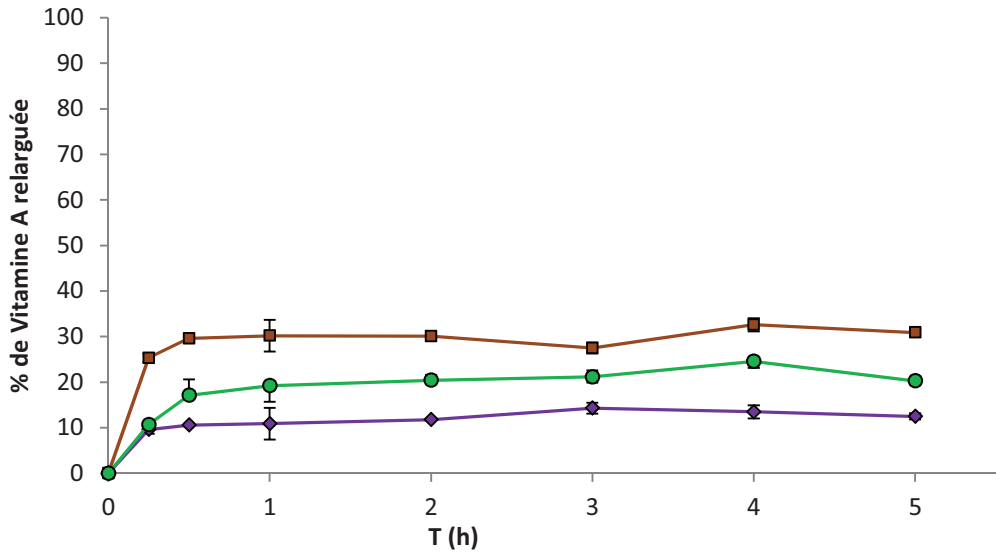


Figure 76 : Cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères GEL (vert), GEL-MD38 (marron) et GEL-TAN (violet) dans un milieu de digestion gastrique simulé (pH 2, pepsine)

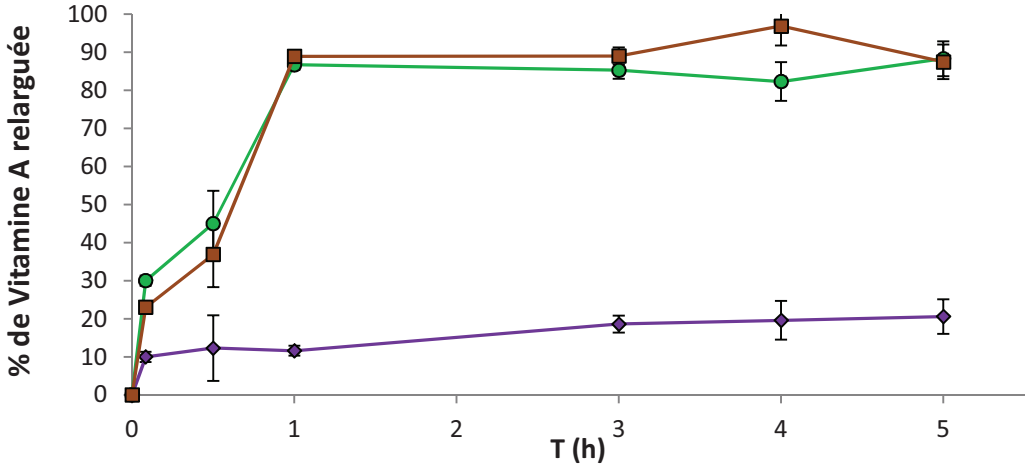


Figure 77 : cinétique de relargage de la vitamine A encapsulée dans les microsphères GEL (vert), GEL-MD38 (marron) et GEL-Tan (violet) dans un milieu de digestion entérique simulé (pH 5.5, enzyme, sel biliaires)

La figure 76 présente les profils de relargage de la vitamine A des microsphères GEL, GEL-MD38 et GEL-TAN dans un milieu gastrique simulé. La figure 77 présente les résultats de relargage obtenus avec les mêmes microsphères mais dans un milieu de digestion entérique.

La figure 76 indiquent qu'un actif encapsulé au sein de microsphère de gélatine de type A porcine (GEL) montre un faible relargage en milieu gastrique simulé (aux alentours de 20 % en 1h), alors qu'un relargage quasi complet est observé en milieu de digestion entérique (> 90% en 1h) (Figure 77). La digestion et le relargage des vecteurs de gélatine ont surtout été étudiés pour des formes de capsules molles ou de tablette, mais rarement dans le cas de microsphères. Ces études démontrent toutes néanmoins que le relargage entérique des vecteurs de gélatine est issus de la dégradation enzymatique qui a lieu au niveau tractus intestinal (Singh *et al.* 2002). Dans sa review sur le sujet Singh (2002) appelle même à l'intégration des enzymes de digestion dans le test standard de solubilité utilisé en pharmacologie.

La fonctionnalisation par la maltodextrine DE 38 améliore très peu la digestion gastrique du vecteur (d'environ 10% en 1h) (figure 76) alors qu'elle ne change en rien le comportement de la microsphère en milieu de digestion entérique, ou le relargage reste très important (environs 90% en 1h) (figure 77).

Par contre, la voie de fonctionnalisation par les polyphénols même si elle ne change pas le comportement en milieu gastrique, inhibe quasi totalement la digestion entérique. La réticulation de la gélatine par des molécules naturelles de type polyphénoliques a surtout été étudiée dans le cas de l'amélioration des capacités rhéologiques des films et des gels que l'on peut obtenir. Notamment les études de Cao (2007) et de Strauss (2004) qui montrent une amélioration de la force mécanique et de la résistance thermique des gels. La résistance à la digestion entérique peut s'expliquer ici encore par la résistance des complexes protéine/polyphénols à la protéolyse enzymatique, comme pour les protéines précédentes. La réticulation des gels de gélatine nous apprend que le maillage de ces gels par les molécules réticulantes peut entraîner une inaccessibilité des sites de coupures pour les enzymes de digestion (Singh *et al.* 2002). Il se peut également que l'insolubilité des vecteurs GEL-TAN diminue drastiquement le champ d'action des enzymes protéolytiques.

En conclusion de cette étude :

- La formulation PP a un potentiel dans la vectorisation gastrique, de par son relargage important en milieu gastrique (environs 60% en 1h), elle ne relargue pas en milieu entérique (environs 10%)

- La formulation CA montre un relargage intermédiaire dans les milieux de digestion gastrique et entérique (autour de 30- 40%)

- La formulation GEL a un potentiel dans la vectorisation entérique de par sa résistance à la digestion gastrique (relargage < 10%) et son relargage important en milieu entérique (environs 90% en 1h)

- La fonctionnalisation par les sucres améliore légèrement la digestion entérique des protéines de pois (PP-MD38) mais à l'effet inverse sur le caséinate de sodium (CA-MD38)

- La fonctionnalisation par les polyphénols de raisin inhibe la digestion gastrique et entérique des formulations à base de protéine de pois et de gélatine (PP-TAN et GEL-TAN)

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre C : Influence de la fonctionnalisation sur le comportement des microsphères

C.3 : Etude de la perméabilité des microsphères aux molécules volatiles : étude sur le géraniol coencapsulé avec la vitamine A

C.3 Etude de la perméabilité des microsphères aux molécules volatiles : étude sur le géraniol coencapsulé avec la vitamine A

L'analyse de molécules volatiles est couramment associée dans la littérature à la perception des odeurs ou des arômes. Les techniques d'analyses les plus anciennes font intervenir simplement la perception humaine, au moyen de l'odorat ou du goût. Mais devant la complexité des arômes naturels (souvent plusieurs centaines de molécules) et pour une meilleure compréhension des mécanismes en jeux dans les interactions avec les autres molécules, d'autres techniques d'analyses ont été mises au point.

Le développement des outils d'analyse, notamment la combinaison de la chromatographie gazeuse avec la spectrométrie de masse (GC/MS), dans les années 1950, a été un tournant important dans la recherche sur les arômes et le début de leurs identifications (Maarse & Visscher 1996). L'ajout d'un « nez électronique » (sniff-detector) a également permis d'améliorer l'analyse par chromatographie gazeuse (Dravniek & O'Donnell 1971).

Les technique de suivis de concentration d'arômes en phase gaz se fait habituellement par la technique dit de l'espace de tête (headspace technique). Cette technique a été mentionnée la première fois par Buttery & Teranishi, en 1963. Elle consiste à mesurer et analyser les molécules volatiles présentes dans un espace fermé ou est maintenu l'échantillon à analyser. Il y a donc des phénomènes de partition de l'arôme entre l'espace de tête et l'échantillon, conduisant à un équilibre thermodynamique, comme expliqué dans l'étude de Peppas & Brannon-Peppasen (1996). Le piquage de cette espace de tête peut se faire par l'intermédiaire d'une GC (chromatographie phase gaz). Ce principe permet d'analyser le « vrai espace de tête » d'un échantillon, notamment pour des applications ou l'arôme est enfermé dans un contenant et ou son rôle odorant est maximum à l'ouverture de ce contenant. Mais cette technique est insuffisante dans le cas où l'échantillon d'arôme n'est pas dans un système fermé, et où il n'y a pas la possibilité de former cette espace de tête avec partition à l'équilibre des molécules volatiles. Le fait de passer d'un système statique (l'espace de tête) à un système dynamique, avec purge de l'espace de tête avec un gaz vecteur, permet de s'affranchir des phénomènes d'équilibres thermodynamiques qui peuvent exister. Mais cela diminue la concentration en molécule analysée et rend ainsi le dosage moins fiable (Stephan 2000).

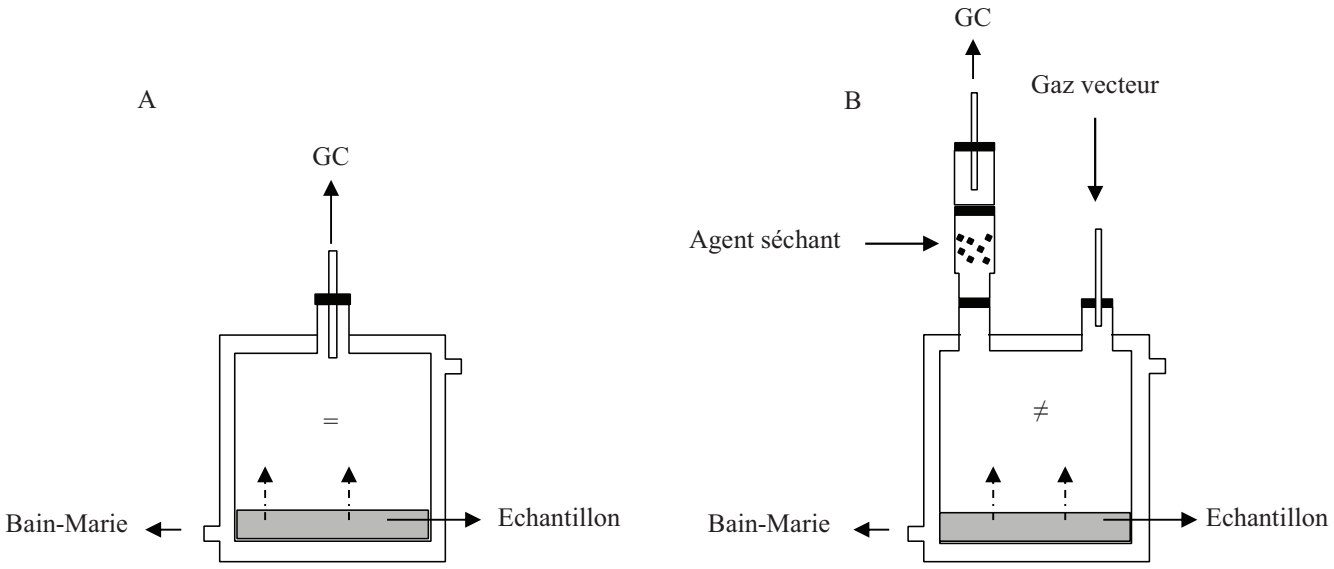


Figure 78 : En A : principe de la technique de l'espace de tête statique. En B : principe de la technique de l'espace de tête dynamique

Quand l'espace de tête statique est analysé par GC comme dans l'étude de Wulff *et al.* (2005), l'injection manuelle d'un échantillon permet une cinétique assez précise sur les 5 premières heures, mais oblige le manipulateur à espacer son point d'après à 24h de relargage. Les contraintes de ce genre d'injection ne permettent pas de suivre le relargage de façon précise jusqu'à épuisement du vecteur, qui peut prendre plusieurs jours.

Le principe de l'espace de tête dynamique (décrit figure 78) permet de se rapprocher des conditions réelles des systèmes ouverts. Par exemple, des arômes encapsulés dans un produit cosmétique à application cutanée : quand le composé odorant est libéré au contact de la peau par friction, le système ouvert peau/air ambiant ne permet pas la création d'un espace de tête statique.

La technique que nous avons utilisée pour ce projet de recherche permet de faire diffuser un gaz vecteur (l'azote, à un débit de 60 ml/min) à travers un lit de microsphère placé dans une cartouche, simulant ainsi un espace de tête dynamique (figure 79). Le fait que ce débit de gaz chargé en molécule volatile soit dérivé à des temps précis vers un système d'analyse en GC permet d'avoir une cinétique du relargage dans des temps très longs. L'automatisme avec lequel le flux de gaz est dérivé à des temps précis (toutes les 30 min) permet une continuité parfaite de l'analyse, sans surveillance, jusqu'à épuisement total de l'échantillon (ce qui est rarement le cas dans la littérature).

Ce système se rapproche de ceux retrouvés dans les études de Sansukchreanpon *et al.* (2010), de Siefarth *et al.* (2011) et de Boland *et al.* (2004).

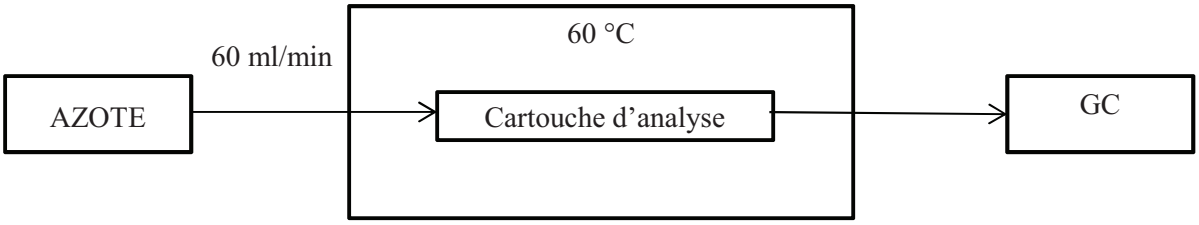


Figure 79 : principe du système d'analyse utilisé pour étudier la libération du géraniol coencapsulé dans les microsphères de vitamine A

L'objectif de cette étude est de comprendre les phénomènes de relargage d'arôme liposoluble encapsulé au sein d'un système matriciel que sont les microsphères. Les différentes formulations analysées ici vont permettre d'appréhender les mécanismes chimiques qui peuvent entrer en jeu entre la molécule volatile et le constituant des matrices.

Pour cette étude, l'arôme volatile modèle que nous avons choisi est le géraniol (3.7-dimethylocta-trans-2.6-dien-1-ol) de par son utilisation fréquente en industrie cosmétique, sa facilité d'analyse et sa solubilité dans les lipides, ainsi que pour son analogie de structure avec la vitamine A (Chen & Viljoen 2010). Cette molécule est dispersée au sein des différentes formulations de microsphère de vitamine A à hauteur de 10% m/m, lors de la phase d'émulsification, et servira de traceur pour cette analyse de la perméabilité de la matrice.

C3.1 Etude préliminaire du géraniol adsorbé sur laine de verre: détermination des conditions d'analyses

La détection du géraniol se fait en phase gaz, par une séparation sur colonne de chromatographie gazeuse, au cours d'un temps de contact plus ou moins long du géraniol avec un débit constant d'azote (gaz vecteur) thermostaté à une température donnée (60°C). L'analyse de ce courant d'azote chargé de molécule de géraniol se fait toutes les 30 min de façon automatisée, par dérivation automatique du flux de gaz vers le système d'injection de la GC. Un exemple de spectre de détection du géraniol en FID est montré figure 80.

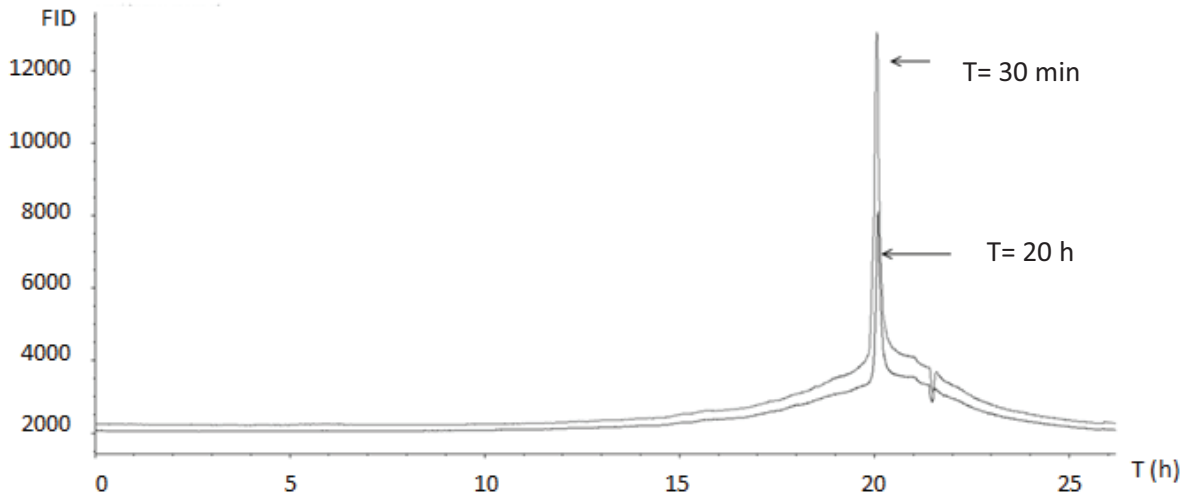


Figure 80 : spectre FID du pic de géraniol à t= 30min de relargage, et à t= 20h, pour 9.22 mg de géraniol sur laine de verre

Afin de déterminer la quantité de géraniol analysable par cette technique, le géraniol a préalablement été adsorbé sur une masse de laine de verre inerte. Cette laine de verre est ensuite insérée dans la cartouche d'analyse en acier et subit le courant d'azote thermostaté (60ml/min, à 60°C) afin d'entraîner les molécules de géraniol vers la chromatographie gazeuse. Différentes masses de géraniol ont été testées pour suivre le profil de relargage au cours du temps. Ces résultats sont présentés figure 81.

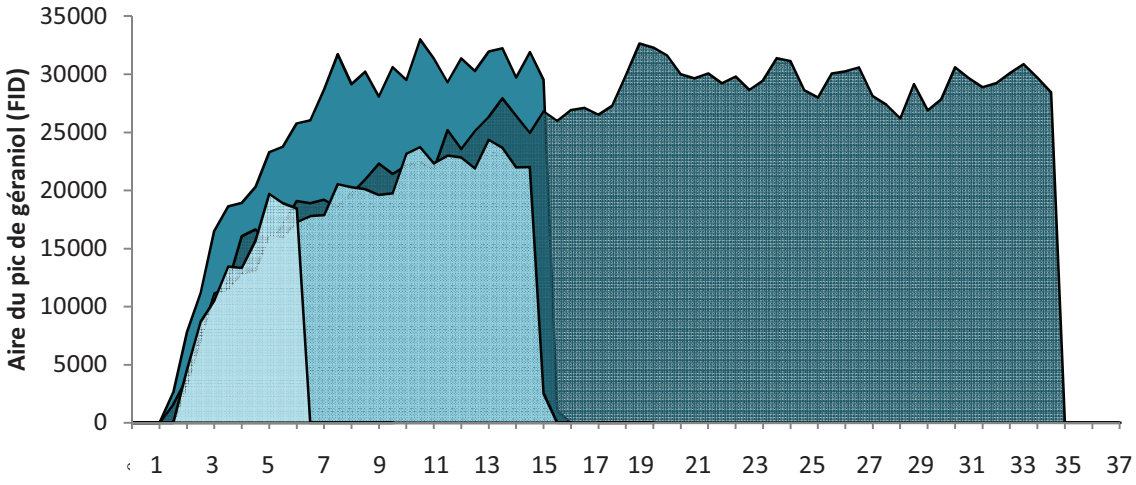


Figure 81 : cinétique de relargage du géraniol adsorbé sur laine de verre : 9.22 mg, 7.64 mg 6.16 mg 4.17 mg

La figure 81 montre que les relargages des différentes masses de géraniol adsorbé sur la laine de verre ont tous le même profil, à savoir une augmentation progressive du taux de géraniol relargué (aire du pic de plus en plus important) jusqu'à une stabilisation situé entre 20000 et 30000 unités d'aire. La masse de géraniol déposée semble avoir un effet sur la durée du relargage en lui-même et non sur son intensité. En effet, pour 9.22 mg de géraniol le relargage est stable à 30000 unités d'aire jusqu'à 33h d'analyses environs. Pour des masses plus faibles (7.64 mg et 6.16 mg), le relargage s'arrête aux environs de 15h d'analyse. Pour une masse très faible de 4.17 mg, le relargage se stoppe à 6h d'analyse environs. L'arrêt du relargage de géraniol se fait de manière très abrupte, avec des valeurs passant de 30000 unités d'aire à 0 dans le laps de temps entre deux piquages, c'est-à-dire 30 min.

Le masse de géraniol adsorbée sur laine de verre ne semble donc pas avoir d'incidence ni sur la forme du profil de relargage (monté progressive, stabilisation et arrêt brutal) ni sur le taux de relargage atteint. Il est intéressant de signaler que l'aire sous la courbe des relargages, qui correspond à la quantité de géraniol total détectée, est proportionnel à la masse de géraniol adsorbée (voir figure 82).

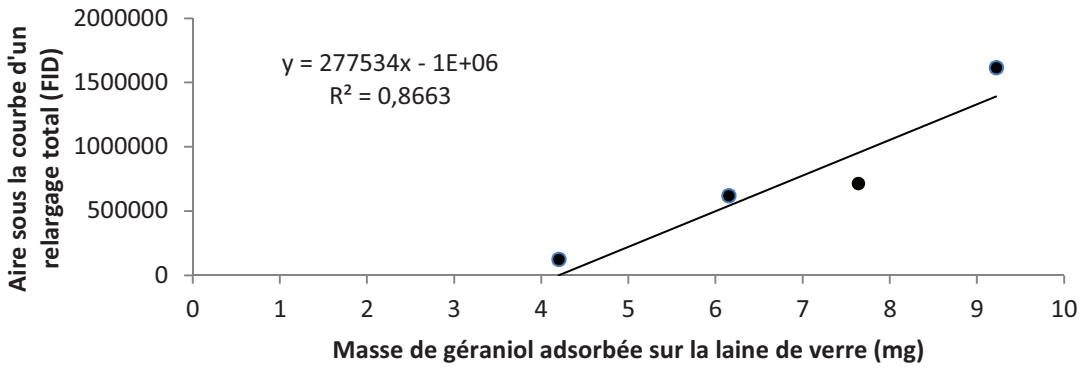


Figure 82 : sommes des aires du pic de géraniol sur un relargage total par rapport à la masse de géraniol adsorbé sur la laine de verre.

Le plateau atteint par la libération du géraniol n'est pas dû à une saturation de la cartouche d'analyse par un phénomène d'équilibre géraniol liquide/espace de tête. Ici le flux continu d'azote entraînant le géraniol empêche la création de cette équilibre, l'espace de tête est perpétuellement purgé de tous composés volatiles, forçant en quelque sorte l'échantillon analysé à une vitesse maximum de libération jusqu'à épuisement du vecteur (ici la laine de

verre imbibé de géraniol liquide). Le seul impact de la quantité de géraniol est la durée que prend l'épuisement de ce réservoir, ce qui est visible sur la figure 81.

Pour expliquer la montée progressive en début de courbe, nous pouvons émettre l'hypothèse que le système laine de verre/géraniol, qui a été préparé ex temporairement à température ambiante, doit se réchauffer à la température du flux d'azote (60°C). Le Δ de température peut expliquer à lui seul ce profil du relargage. L'absence d'interaction théorique entre le géraniol et la laine de verre est démontrée par l'absence « d'effet de rétention » visible : pas d'épuisement progressif du géraniol dans le temps, mais un arrêt brutal.

Cette étude sur le géraniol libre a permis de mettre au point la méthode de détection et d'avoir une idée assez précise sur la limite de détection du géraniol analysé par cette technique. Elle a également servis à montrer le profil de relargage de la molécule non encapsulée, permettant une comparaison avec un relargage de molécule coencapsulée dans les microsphères de vitamine A et donc une compréhension accrue des interactions matrice/molécule volatile. Afin d'avoir un profil de relargage le plus explicite possible, nous avons choisis, suite à cette étude, de travailler sur des quantités théoriques de géraniol de 10 mg ce qui correspond à 100 mg de microsphère dans la cartouche du système d'analyse.

C3.2 Etude de l'influence de la masse de microsphère dans la cartouche d'analyse

Afin de déterminer l'influence de la quantité de microsphère dans la cartouche, une étude a été faite en faisant varier la masse (100 mg, 75 mg, 50 mg et 25 mg) d'un lot de microsphère modèle, celui formulé avec les protéines de pois (PP). Ces microsphères ont été formulées avec 47% m/m de protéine de pois, 43% m/m de vitamine A et 10% m/m de géraniol. L'étude du relargage du géraniol suivant la quantité de microsphère est présentée dans la figure 83.

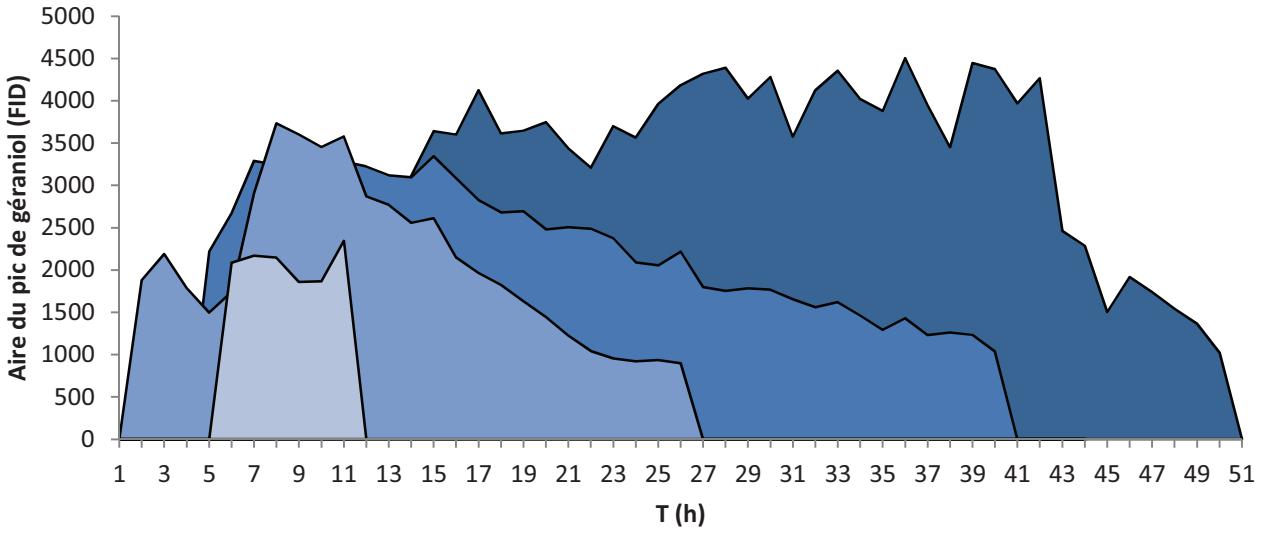


Figure 83 : Cinétique de relargage du géraniol selon la masse de microsphère analysée : : 100 mg : 75 mg : 50 mg : 25 mg

Ces résultats montrent que la quantité de géraniol relargué est proportionnelle à la masse de microsphère placée dans la cartouche d'analyse. Cette proportionnalité est renforcée quand on trace la droite mettant en relation l'aire sous la courbe d'un relargage total et la quantité de microsphère disposée dans la cartouche. Nous obtenons une droite de régression parfaitement linéaire (voir figure 84).

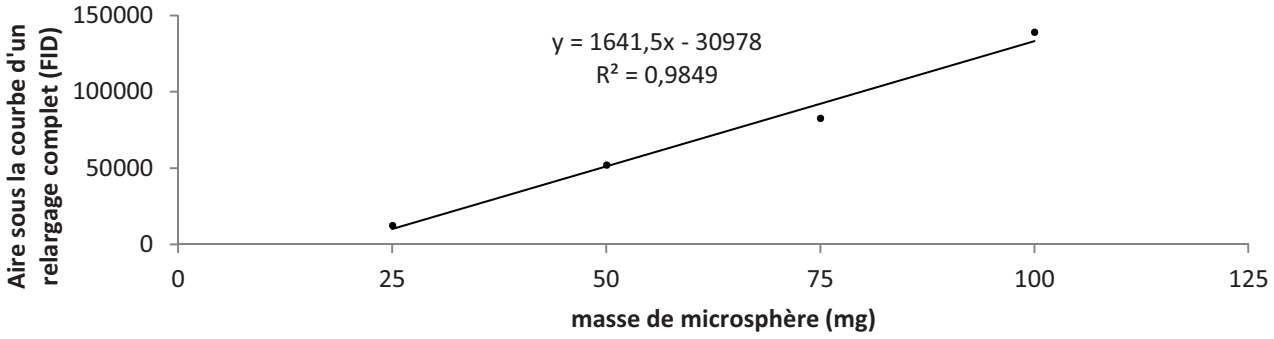


Figure 84 : Droite représentant la somme des aires du pic de géraniol sur un relargage total par rapport à la masse de microsphère inséré dans la cartouche d'analyse

Le profil de relargage du géraniol coencapsulé dans les microsphères est différent de celui observé pour du géraniol adsorbé sur laine de verre. Le profil est moins régulier et ne présente pas un épuisement brutal de la molécule. Il démontre donc la présence d'interactions entre le géraniol et la matrice de la microsphère. Ces interactions sont d'autant plus visibles qu'il n'y a pas d'épuisement brutal, signalant un effet de rétention de la molécule, non présent dans le cas du géraniol adsorbé sur la laine de verre.

Cette étude a permis de démontrer que la masse de 100 mg de microsphère introduite dans la cartouche d'analyse était suffisante pour obtenir un profil de relargage correcte et exploitable. Cette masse va donc être utilisée pour l'étude de la libération du géraniol avec les différentes formulations de microsphères de vitamine A.

Les phénomènes d'interactions qui peuvent exister entre un arôme et son environnement immédiat sont assez bien décrits dans la littérature. De nombreux facteurs peuvent influencer la libération d'un actif volatil (De Roos 2003). Ils seront discutés après présentation des résultats obtenus avec les différentes matrices de biopolymères.

C3.3 Influence des différentes voies de fonctionnalisation sur la perméabilité de la matrice au géraniol

Pour la suite de l'étude, les différentes microsphères (PP, PP-MD38, PP-TAN, GEL, et CA, CA-MD38, CA-TAN) ont été analysées selon les conditions décrites dans le paragraphe précédent (100 mg de microsphère, azote vecteur à 60 ml/min thermostaté à 60°C) afin de déterminer l'influence des différentes voies de fonctionnalisation sur la perméabilité de la matrice au géraniol.

Pour rappel, toutes les microsphères de vitamine A dont les résultats sont présentés ici sont formulées avec 10% m/m de géraniol avant le séchage en atomisation.

La figure 85 montre les différentes cinétiques de relargage du géraniol suivant les formulations testées. Les microsphères formulés à partir des protéines de pois non fonctionnalisées (PP) relarguent de façon régulière leur géraniol. Ce relargage est stable jusqu'à environs 20h d'analyse, puis tend à diminuer jusqu'à l'épuisement total du géraniol à la 25eme heure.

Pour les microsphères issues du greffage de maltodextrine sur les protéines de pois (PP-MD38) nous observons une cinétique de relargage du géraniol différente : dès la première heure d'analyse, un pic de relargage est détecté pour atteindre un maximum à 4h-5h d'analyse. Ensuite le géraniol est de moins en moins libéré jusqu'à l'épuisement total aux environs de la 17eme heure.

Par contre la formulation PP-TAN ne montre aucun relargage significatif du géraniol au cours du temps. La courbe présentée figure 85 étant le minimum de détection du FID de la chromatographie phase gaz, elle est indiquée à titre d'information.

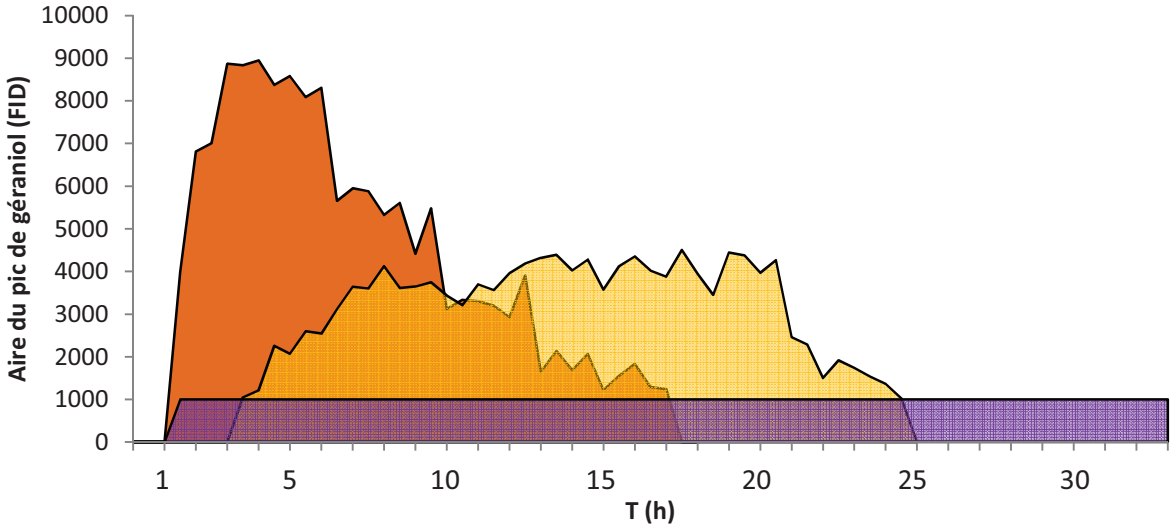


Figure 85 : Cinétique de relargage du géraniol dans le temps pour les microsphères PP : , PP-MD38 : et PP-TAN :

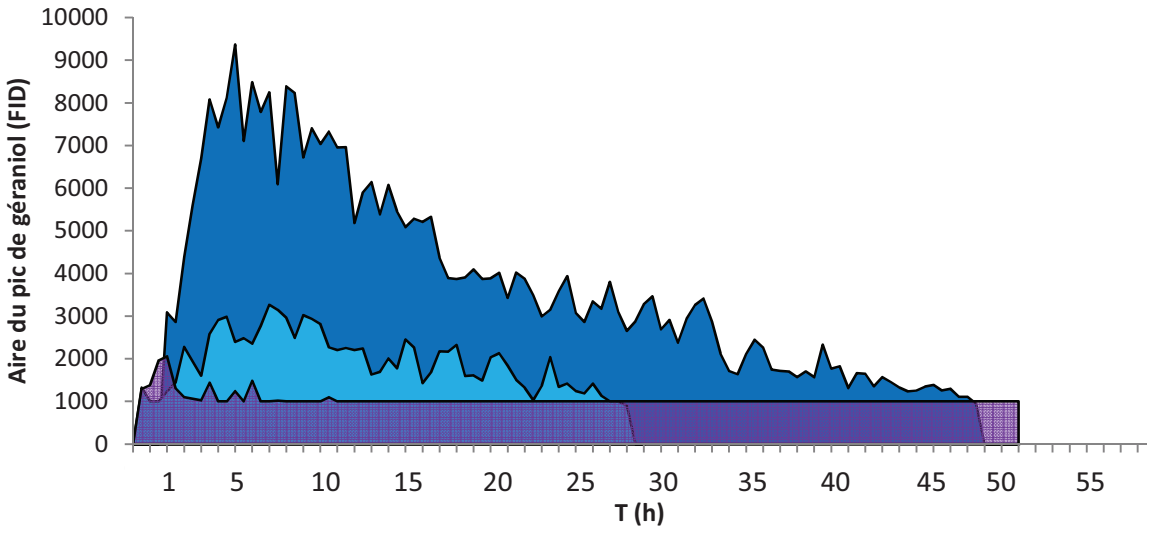


Figure 86 : Cinétique de relargage du géraniol dans le temps pour les microsphères CA : , CA-MD38 : et CA-TAN :

La figure 86 présente la même étude pour les formulations CA, CA-MD38 et CA-TAN. Comme pour les résultats obtenus pour les protéines de pois précédemment, les microsphères de caséinate de sodium relarguent le géraniol de façon régulière jusqu'à la 28eme heure. La fonctionnalisation par la maltodextrine DE 38 montre un relargage du géraniol très rapide et important entre 0 et 12 h et une diminution régulière jusqu'à la 50eme heure. La formulation CA-TAN ne montre pas de relargage significatif du géraniol au cours du temps, comme nous l'avons montré pour la formulation PP-TAN.

Ces deux études indiquent qu'une même fonctionnalisation entraîne un même profil de relargage du géraniol. Ces différences de cinétique de relargage sont intéressantes pour comprendre les phénomènes d'interactions qui peuvent exister au sein de la microsphère entre la molécule volatile et la matrice.

L'étude des interactions entre les matrices alimentaires et les arômes comme le géraniol mettent en exergue l'influence des principaux composants alimentaires: protéine, glucide et lipide, et les structures que l'on peut rencontrer de façon courante, comme les émulsions (Bakker & Mela 1994). L'effet d'un processus de microencapsulation sur la rétention d'un arôme est décrit par de Roos (2003) comme la création d'un microenvironnement autour de la molécule volatile encapsulée, avec une notion de transfert de masse entre la phase ou est dispersée la molécule et la matrice ou est piégée cette phase. Les résultats de l'étude de Bouwmeesters & De Roos (1998) suggèrent que dans une phase lipidique, une molécule volatile liposoluble est moins volatile que dans la matrice constituante du vecteur. Le transfert de masse entre les deux systèmes est donc augmenté et la rétention de l'arôme est logiquement accrue. Le modèle d'étude de cette contribution faisait intervenir une phase liposoluble dispersée dans une bille d'alginate réticulée. Il existait donc bel et bien une différence notable entre les deux phases, avec une quasi insolubilité de l'arôme dans la phase alginate.

Dans le modèle de microsphère que nous utilisons ici, le géraniol a été ajouté à la vitamine A avant l'incorporation de celle-ci dans la phase d'émulsification. Nous pouvons donc supposer que le géraniol est dispersé de la même façon que la vitamine A au sein de la matrice protéique. Mais il se peut également que le géraniol soit dispersé de façon indépendante dans la matrice qui compose la microsphère. Deux types d'interaction entrent alors en jeux : entre le géraniol et la vitamine A et entre le géraniol et les composés qui composent la matrice (protéine, conjugué de Maillard, complexes protéine/polyphénol).

Les différences observées selon les formulations renforcent l'idée que même si le géraniol est uniquement dispersé au sein de la vitamine A, son passage en phase gaz l'oblige à entrer en interaction avec les molécules de la matrice. C'est donc les interactions pouvant avoir lieux avec ces dernières que nous discuterons par la suite.

Le fait que le géraniol entre en interactions avec des composés peu conventionnels (conjugués de Maillard et conjugués protéine/polyphénol) rend l'interprétation des résultats complexe. Historiquement, les recherches portant sur les composés alimentaires et les arômes ont été effectuées sur les protéines, les sucres et les lipides.

C3.3.1 Influence de la fonctionnalisation par la maltodextrine DE38 sur le relargage du géraniol

Les protéines peuvent affecter la volatilité d'un arôme par une adsorption réversible mettant en jeu des interactions de van der Waals et/ou des liaisons électrostatiques (Fischer & Widder 1997). Les mono et disaccharides sont connus pour entraîner une augmentation de la libération de nombreux arômes, et spécialement les plus polaires (éthyle acétate, éthyle butanoate, méthyl anthranilate, acétone, éthanol, 1-heptanole, méthyl butanoate, etc…) (Nahon *et al.* 1998) (Perpète & Collin 2000) (Roberts *et al.* 1996). Les mono et disaccharides sont également connus pour diminuer la volatilité des arômes plus apolaires (2-heptanone, ethyl hexanoate, 2-heptanal, octanal) (Nahon *et al*. 1998). Les polysaccharides sont connus quant à eux pour diminuer la volatilité des arômes (Robert. *et al.* 1996) (Godshall 1997).

Le géraniol est une molécule volatile d'hydrophobicité intermédiaire ($\log(P_{ow}) = 2.97$) (Chen & Viljoen 2010) (Fischer *et al.* 2009) de par sa fonction alcool. Elle se rangerait donc plutôt dans la catégorie des arômes qui voient leurs volatilités augmentées en présence de mono et disaccharides.

Pour les formulations issues de la fonctionnalisation par la réaction de Maillard, le sucre utilisé est la maltodextrine DE 38. A ce niveau-là d'équivalence en dextrose, nous ne pouvons pas considérer cette maltodextrine comme étant un polysaccharide. De plus, nous ne savons pas quel sont exactement les DE des résidus greffés sur les protéines. Pour la suite de la discussion, nous établirons le fait que les formulations PP-MD38 et CA-MD38 ont un comportement se rapprochant d'un mélange protéine/mono-disaccharide.

La présence en grande quantité de ces mono et disaccharides dans ces formulations expliquerais la différence de relargage qu'il existe avec les formulations n'utilisant que les protéines seules. Le pic important de relargage dans les premières heures de l'étude montre une libération très accélérée par rapport aux protéines utilisée seules, ce qui est en accord avec la littérature citée ci-dessus.

De plus l'étude de Fares *et al.* (1998) montre que la glycosylation du caséinate de sodium diminue la rétention des arômes en solution car les sites d'adsorption des molécules aromatiques (fonction amine principalement) sont utilisés pour le greffage des sucres. Cette étude expliquerait pourquoi il y a un relargage plus rapide avec les composés de Maillard dans le cas des protéines de pois et du caséinate de sodium, confirmant ainsi la théorie de la diminution de rétention induit par les mono et disaccharides.

C3.3.2 Influence de la fonctionnalisation par les polyphénols sur le relargage du géraniol

L'influence des composés polyphénoliques sur la volatilité des molécules volatiles est documentée dans la littérature principalement dans le domaine de l'œnologie, ou ces molécules entrent en interactions avec les arômes du vin, rouge ou blanc.

Plusieurs études ont analysé ce phénomène, notamment les contributions de Dufour & Bayonove (1999a et 1999b) qui ont étudié l'influence de dérivé catéchine et des tanins condensés sur la volatilité de substances aromatiques : la fraction tannique a pour effet de diminuer la volatilité du benzaldehyde, mais n'a aucun effet sur la volatilité de l'isoamyl acetate et de l'éthyl hexanoate. Plus récemment, Aronson & Eberler (2004) ont investigué l'action des polyphénols sur l'espace de tête et la perception des arômes : leurs conclusions montrent que l'acide gallique diminue la volatilité du 2-méthylpyrazine. Une autre étude, celle de Lund *et al.* (2009) montre que la perception de l'isobutyl methoxypyrazine, du 3-mercaptohexanol et de l'éthyl decanoate est largement supprimée par l'addition des polyphénols.

Ces différentes études font toutes états d'une diminution voir une suppression totale de la volatilité de certains arômes par l'ajout des polyphénols. Le mécanisme chimique principal serait les interactions hydrophobes, d'après l'étude de Dufour & Sauvaitre (2000).

Aucune littérature n'est actuellement disponible sur l'influence de formulations incluant des composés polyphénoliques sous forme de microsphères encapsulant un arôme. Mais si l'on considère que les mécanismes en jeux décris plus haut sont les mêmes que pour les formulations PP-TAN et CA-TAN, alors cela expliquerait l'absence de libération de géraniol dans nos conditions d'analyse.

C3.4 Relargage des microsphères de gélatine de type A

Les formulations à base de gélatine n'ont pas été toutes étudiées par manque de temps. Seul la formulation GEL a été analysée (figure 87). Nous observons que son profil de libération du géraniol est similaire à ceux rencontrer pour les formulations à base des conjugués de Maillard, avec un pic de relargage important dès le début de l'analyse et une diminution progressive jusqu'à l'épuisement complet des vecteurs (30eme heure).

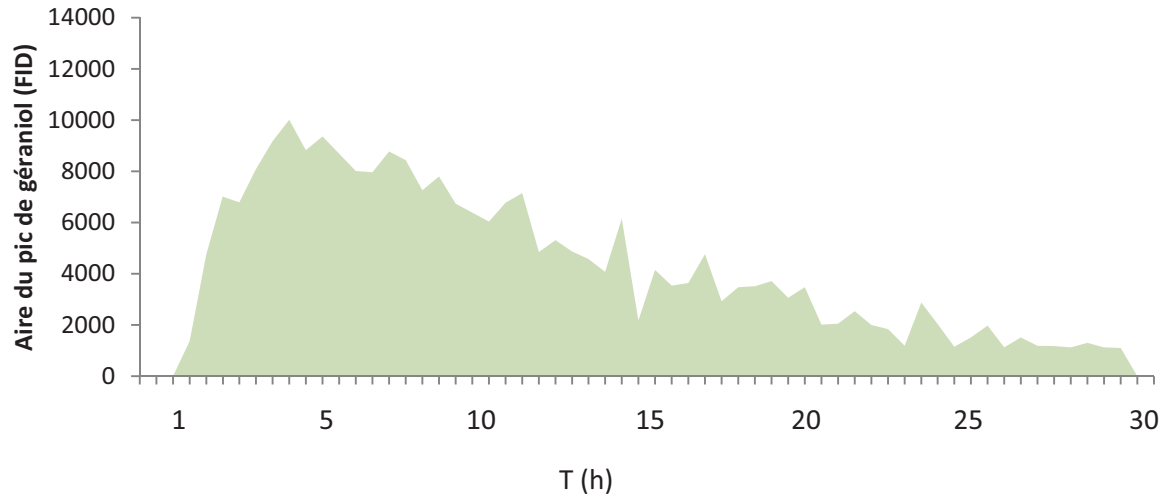


Figure 87 : Cinétique de relargage du géraniol dans le temps : microsphère GEL

La rétention du géraniol par la gélatine ne semble pas être similaire à celle trouvée pour les autres protéines. Cela peut s'expliquer par le fait que la gélatine est une protéine plus hydrophile que les protéines de pois et le caséinate de sodium. L'étude de Zafeiropoulou *et al.* (2012) montre qu'il y a une corrélation directe entre l'hydrophobicité des molécules volatiles et leur taux de relargage. La suite de cette étude consisterais à étudier le relargage du géraniol

dans les mêmes conditions pour les microsphères GEL-MD38 et GEL-TAN afin de confirmer les résultats obtenus pour les autres protéines.

En conclusion de ces résultats, nous pouvons dire que :

- Le profil de libération du géraniol adsorbé sur la laine de verre dépend de la quantité de molécule

- La somme des aires sous le pic d'un relargage est proportionnelle à la quantité de géraniol adsorbé sur laine de verre, et à la quantité de microsphère étudiée.

- Les microsphères formulées avec les protéines de pois (PP) et avec le caséinate de sodium de lait de vache (CA) montrent un relargage continu et régulier dans le temps jusqu'à l'épuisement du géraniol.

- La fonctionnalisation par la maltodextrine DE38 (PP-MD38 et CA-MD38) influence la cinétique de libération du géraniol en provoquant une libération plus rapide en début d'analyse.

- La fonctionnalisation par les polyphénols de raisin (PP-TAN et CA-TAN) semble inhiber la libération du géraniol

- La formulation GEL à base de gélatine de type A porcine montre un relargage plus rapide du géraniol que les formulations PP et CA

- Cette étude devra être compléter avec l'analyse des formulations GEL-MD38 et GEL-TAN

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre C : Influence de la fonctionnalisation sur le comportement des microsphères

C.4 : Etude du potentiel muco-adhésif des microsphères

C.4 Etude du potentiel muco-adhésif des microsphères

La vitamine A est une vitamine liposoluble, et doit, en tant que telle, être prise en charge au niveau de l'intestin grêle par les sels biliaires. Les sels biliaires permettent d'émulsionner les lipides du bol alimentaire afin qu'ils soient plus accessibles aux lipases pancréatiques. Cette transformation en émulsion permet également le passage des cellules épithéliales par un transfert passif. Le fait de formuler la vitamine A dans un vecteur de type microsphère permet une vectorisation jusqu'au site d'absorption spécifique (protection en milieu gastrique et libération en milieu entérique). La libération de la vitamine A au plus près des sites d'absorptions des composés liposolubles permet en théorie d'améliorer la biodisponibilité de cette dernière.

Une autre piste complémentaire à la vectorisation consiste à utiliser des microsphères mucoadhésives, c'est-à-dire pouvant entrer en interaction avec le mucus intestinal. Cette intéraction peut permettre d'allonger le temps de résidence des microsphères au sein de la zone d'absorption spécifique et ainsi améliorer le ciblage du relargage, et augmenter la biodisponibilité de l'actif. Le mucus intestinal peut être considéré comme un gel hydraté constitué principalement d'une glycoprotéine : la mucine. Cette glycoprotéine est formée d'une chaîne d'acides aminés et de nombreux résidus polysaccharidiques chargés. Le mucus tapisse entièrement les cellules épithéliales de l'intestin et constitue donc une interface importante pour les vecteurs particulaires.

Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature pour mesurer le potentiel mucoadhésif des vecteurs particulaires. Les forces d'intéraction entre la particule et la mucine peuvent être mesurées par D.S.C (Differential Scanning Calorimetery) comme dans l'étude de Yadav *et al.* (2014), ou par S.P.R (Surface Plasmon Resonance). Une autre voie utilisant des prélèvements d'intestins animaux permet également de mesurer le temps de rétention des particules sur la surface de mucus ex-vivo (Onoue *et al*. 2011). Le travail de Zheng *et al.* (2013) permet de tester le potentiel mucoadhésif d'un polymère par la mesure de la disparition de la mucine en solution après mise en contact avec des particules formulées avec ce polymère.

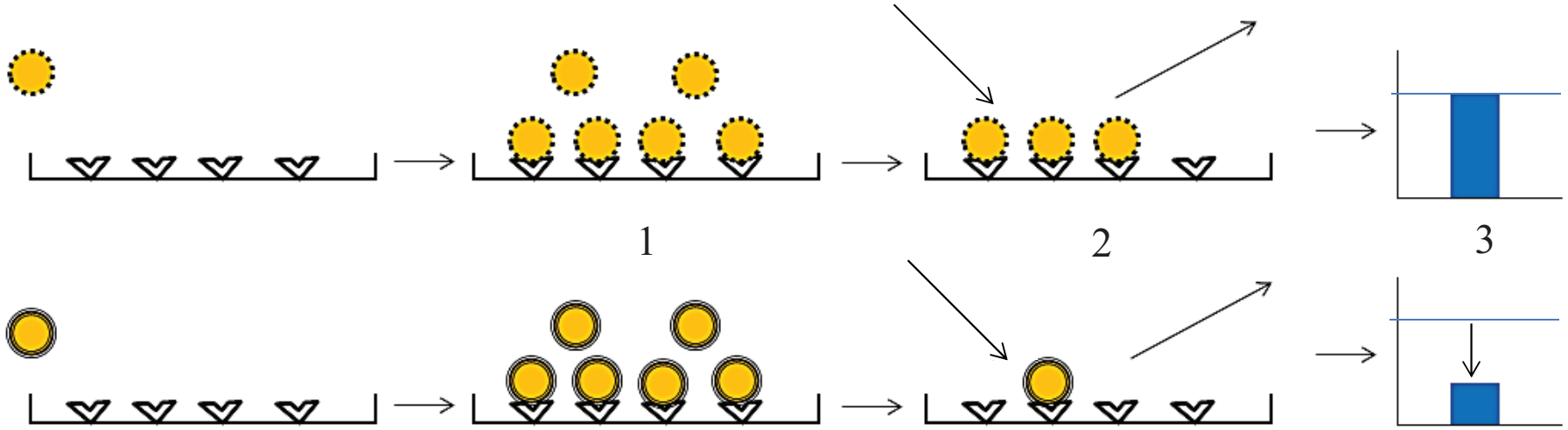
La technique utilisée pour notre étude est détaillée dans la figure 88. Elle consiste à mesurer la capacité des microsphères à se lier avec des lectines immobilisées au fond d'un puits de microplaque. Les lectines sont des molécules de type protéique ayant une affinité

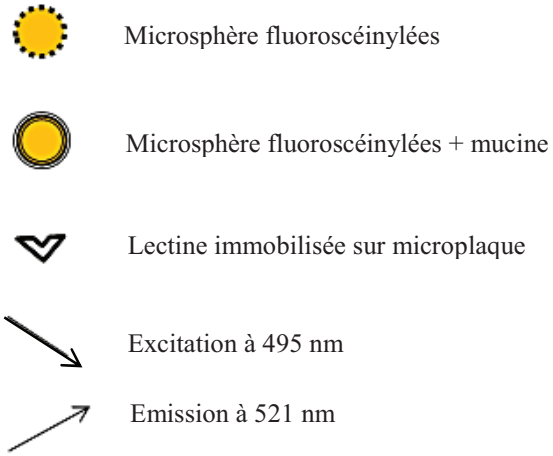
particulière pour certains motifs polysaccharidiques. Cette spécificité change selon l'origine de la lectine. Pour cette étude, cinq lectines ont été sélectionnées, nommées : RCA-I, DSA, UEA-II, LTA et UEA-I (voir tableau 25).

Tableau 25 : caractéristiques des lectines sélectionnées pour le test du potentiel mucoadhésif des microsphères

Lectine	Origine	Profils glycaniques reconnus
RCA-I	Ricin commun (*Ricinus communis*)	Lactose
DSA	Datura officinal *(Datura stramonium)*	Oligomère de N-acétylglucose lié en β-1-4, et galactose lié en β-1-4 N-acétylglucose.
UEA-I	Ajonc d'Europe (*Ulex europeus*)	Fucose
UEA-II	Ajonc d'Europe (*Ulex europeus*)	Oligomère de N-acétylglucose lié en β-1-4 et résidus fucose-α-1-2-galactose-β-1-4-N-acétylglucose
LTA	Lotier pourpre (*Lotus tetragonolobus*)	Fucose, résidus fucose-α-1-2-galactose-β-1-4-N-acétylglucose

Les microsphères sont préalablement greffées de fluorescéine afin de mesurer le taux de microsphère pouvant adhérer au fond des puits après un lavage. Ce taux est mis en relation avec la valeur retrouvée avec le même type de microsphère, mais après contact avec la mucine. Si la mucine adhère aux microsphères, alors ces dernières adhéreront moins aux lectines immobilisées. Après le lavage, s'en suit une mesure de la fluorescence logiquement moindre. Le pourcentage d'inhibition est donc mesuré en fonction de la valeur de fluorescence avant et après contact avec la mucine.





1 : Les microsphères sont mises en contact avec les lectines immobilisées sur microplaque pendant un temps donné.

2 : **un lavage permet de se débarrasser des microsphères qui n'ont pas adhéré** aux lectines. Les microsphères ayant adhéré sont ensuite excitées à une longueur d'onde de 495 nm et la fluorescence est mesurée à une longueur d'onde d'émission de 521 nm.

3 : la valeur de fluorescence obtenue correspond à l'affinité de la microsphère pour une lectine donnée.

Figure 88 : principe de l'analyse du potentiel mucoadhésif des microsphères

Cette technologie a été utilisée sur des virus et sur des protéines (Duverger *et al.* 1999), sur des cellules procaryotes (Hsu *et al.* 2006), et sur des cellules eucaryotes (Angeloni *et al.* 2006, Landemarre *et al.* 2013), le but étant initialement d'identifier les profils glycosidiques à la surface des éléments étudiés.

C4.1 Potentiel mucoadhésif des microsphères : méthode de calcul et résultats

La capacité des lectines à se lier de façon non covalente avec les microsphères formulées à base de gélatine de type A porcine (GEL) a été testée, et les résultats seront développés dans cette partie à titre d'exemple.

Les microsphères rendues fluorescentes par le greffage de fluorescéine permettent une mesure de la fluorescence uniquement si elles ont adhéré aux lectines immobilisées (après lavage). Ces valeurs permettent de calculer une moyenne de fluorescence pour ces cinq lectines, qui servira au calcul du pourcentage d'inhibition. Le même test a été réalisé mais avec des microsphères GEL ayant été mis préalablement en contact avec une solution de mucine. Les résultats de fluorescence obtenus pour GEL sont présentés figure 89.

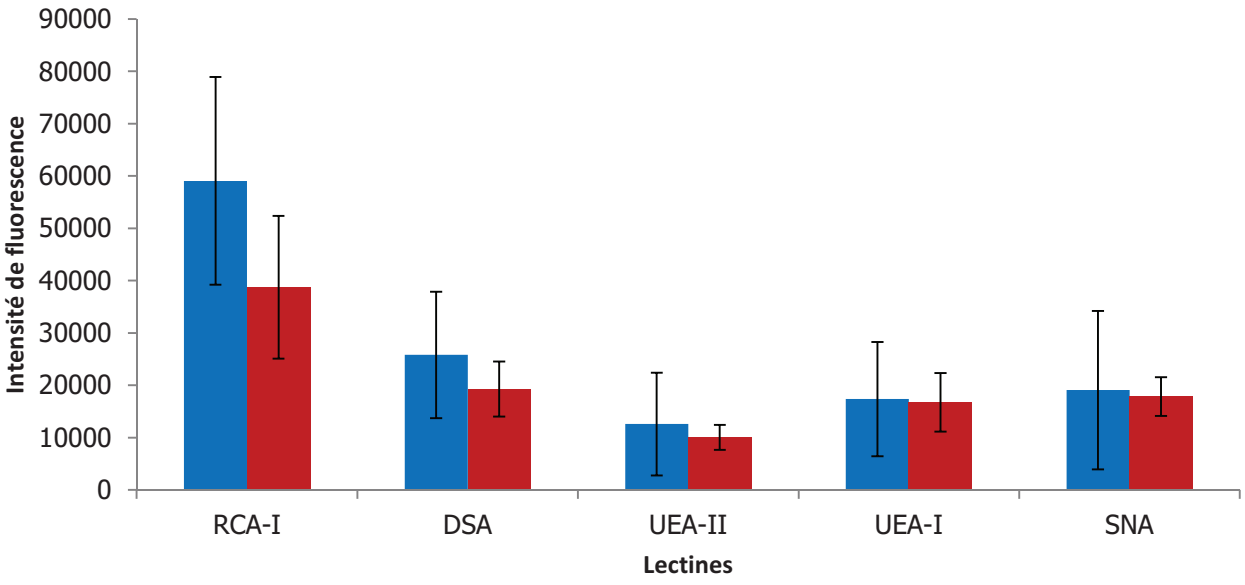


Figure 89 : intensités de fluorescence obtenues avec les microsphères GEL : en bleu : sans contact avec la mucine, en rouge : après contact avec la mucine

Les valeurs de fluorescence des microsphères GEL après mucine sont systématiquement plus basses que les fluorescences avant la mucine. Le rapport entre la moyenne des fluorescences avant mucine et la moyenne des fluorescences après la mucine donne le pourcentage d'inhibition, présenté figure 90.

La même méthode a été appliquée aux microsphères formulées à partir des protéines de pois et de gélatine de type A greffées de maltodextrine DE 38 (PP-MD38 et GEL-MD38) et aux microsphères issus des complexes protéines de pois et caséinate de sodium / polyphénol de raisin (PP-TAN et CA-TAN). Les résultats des pourcentages d'inhibitions sont présentés figure 90, ainsi que ceux trouvés pour les formulations non fonctionnalisées PP, CA et GEL. L'étude du potentiel mucoadhésif n'a pas pu être menée pour les microsphères CA-MD38 et GEL-TAN par manque de temps (ces études sont en cours).

Les résultats d'inhibition trouvés pour les formulations PP, CA et GEL permettent de classer les microsphères formulées avec les protéines non fonctionnalisées selon leurs potentiels mucoadhésifs. Avec seulement 0.5 % d'inhibition, les protéines de pois apparaissent les moins mucoadhésives, par rapport au caséinate de sodium avec un résultat de 6.7 % et de la gélatine de type A avec 15.2 %. La gélatine apparait comme étant la protéine non fonctionnalisée apportant le plus de mucoadhésivité aux microsphères de vitamine A par rapport aux autres protéines.

Après la fonctionnalisation des protéines de pois, nous observons que pour la formulation PP-MD38, l'inhibition de la fluorescence est de 17.8 %, et de 1.38% pour PP-TAN. Il est visible que la formulation du conjugué de Maillard avec les protéines de pois et la maltodextrine DE 38 améliore très nettement l'intéraction entre la mucine et les microsphères, inhibant l'intéraction microsphère/lectine. Par contre le greffage de polyphénol de raisin ne semble pas avoir d'influence marquante sur ce type d'interaction.

Pour les microsphères formulées à base de caséinate de sodium, nous observons que le greffage de polyphénols de raisin sur le caséinate de sodium ne semble pas avoir de réelle influence sur la mucoadhésivité de la microsphère (4.2 % d'inhibition). Enfin pour les microsphères formulées à base de gélatine de type A porcine, la fonctionnalisation par la maltodextrine DE 38 (GEL-MD38) fait chuter le potentiel mucoadhésif de la microsphère, passant de 15.2 % pour la gélatine seule à 2.8 % pour la gélatine fonctionnalisée.

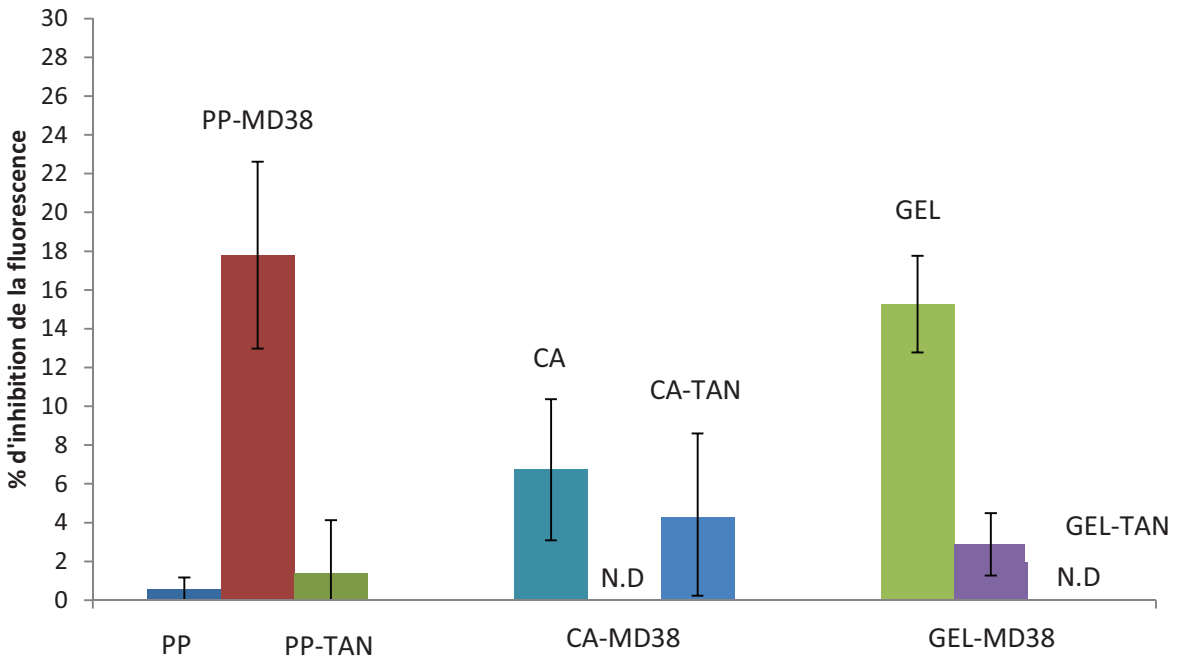


Figure 90 : pourcentage d'inhibition de la fluorescence calculé pour les microsphères PP, PP-MD38, PP-TAN, CA, CA-TAN, GEL et GEL-MD38. Le pourcentage d'inhibition de la fluorescence est proportionnel au potentiel mucoadhésif de la microsphère

C4.2 Interprétation des résultats du potentiel mucoadhésif

La capacité de certains polymères à interagir avec le mucus intestinal est directement reliée à leurs capacités à interagir avec le gel hydraté de mucine tapissant le tissus épithéliale de l'intestin. Les interactions électrostatiques peuvent faciliter un contact intime entre la particule et le mucus, de par la présence de groupement hydrophiles comme des fonctions hydroxyles, amines ou acides. La flexibilité des chaînes de polymères et une conformation favorable peuvent également être essentielles pour une bonne mucoadhésion (Peppas *et al.* 1985).

La littérature sur la mucoadhésivité des particules est bien documentée sur certain biopolymères : les polysaccharides à longues chaînes, comme l'alginate et le chitosan (George & Abraham 2006), la pectine (Hagesaether & Sande 2007), l'acide hyaluronique (Kyyronene *et al.* 1992), et la carboxymethylcellulose (Bogataj *et al.* 1999) par exemple. Mais aucune recherche ne fait état d'une étude portée exclusivement sur une matrice de type protéique, à part dans le cas de la gélatine qui sera exploré plus loin. Dans leur review de 2012, Ensign et son équipe ne font pas du tout mention de systèmes de vectorisation à base de protéine pouvant interagir avec le mucus intestinal. Cette lacune dans la littérature ne nous permet pas

de comparer nos résultats avec ceux déjà existant. Les conjugués de Maillard et les complexes protéine/polyphénol n'ont pas été non plus étudiés sous cette angle novateur.

L'augmentation du potentiel mucoadhésif des protéines de pois par greffage de maltodextrine DE 38 que nous avons observé peut s'expliquer par la diminution de l'hydrophobicité des protéines par le greffage de résidus saccharidiques (phénomène observé avec le caséinate de sodium dans l'étude d'O'Regan *et al.* 2009). Il se peut également que le déploiement des protéines, observé pendant la phase de dénaturation thermique de la réaction de Maillard ai amené à une conformation plus favorable à la mucoadhésion, avec en plus une meilleur accessibilité des fonctions hydrophiles et notamment des fonctions amines. La réaction de Maillard ayant lieu sur les fonctions amines des protéines, il est peu probable cependant que ces dernières entrent en jeux dans le phénomène de mucoadhésion.

Les résultats obtenus avec PP-TAN montrent que la fonctionnalisation des protéines de pois par les polyphénols de raisin n'a aucun effet sur la mucoadhésion. Peut-être est-ce dû à l'utilisation des groupements hydrophiles (fonctions amines et thiols) de la protéine par ce greffage, ou dû au caractère plutôt hydrophobe des polyphénols eux même.

Dans sa review de 2010 concernant la vectorisation d'actif par les protéines de laits, Yoav D. Livney ne fait à aucun moment mention d'un potentiel mucoadhésif du caséinate de sodium, ni d'aucune autres protéines issues du lait. Le caséinate de sodium voit déjà ses fonctions acides occupées par un atome de sodium, ce qui peut les rendre moins disponibles pour interagir avec la mucine. Le fait de greffer des polyphénols sur les fonctions amines n'a aucune influence sur le potentiel mucoadhésif, il semble donc que l'interaction de ces dernières ne rentre pas en compte de façon importante.

Contrairement aux protéines de pois et au caséinate de sodium, la gélatine de type A montre un potentiel mucoadhésif important. La mucoadhésivité de la gélatine sous forme de microsphère a été étudiée dans les deux études de Wang *et al.* en 2000 et en 2001 en comparaison avec une gélatine modifiée par addition de fonctions amines par voie chimique. Ces travaux démontrent une amélioration significative de la mucoadhésivité stomacale de la gélatine après l'ajout de fonctions amines, démontrant par le fait l'importance du nombre et de la disponibilité de ces fonctions dans le phénomène de mucoadhésion. Par ailleurs, la gélatine est décrite dans la littérature pour être riche en lysine, arginine, proline et hydroxyproline (Elzoghby 2013). Ces acides aminés ont tous une ou plusieurs fonctions aminées dans leurs chaînes latérales. Le collagène dont est issus la gélatine est également

considéré comme une glycoprotéine riche en résidu N-acetylglucosamine (Nimni 1983). Cette « richesse en fonction amine » est rendu accessible par la conformation « ouverte » en forme d'hélice de la structure tertiaire de la gélatine (Nimni 1983). Ces deux facteurs pourraient expliquer la mucoadhésivité de la gélatine sans fonctionnalisation et la perte de cette dernière par le greffage de la maltodextrine DE 38 sur les fonctions amines. Le pourcentage de méthionine légèrement plus important chez la gélatine que chez les autres protéines pourrait également expliquer son pouvoir mucoadhésif plus élevé. En effet, les fonctions thiols peuvent jouer un rôle dans le phénomène de mucoadhésion par création de ponts disulfures avec les résidus de même nature de la mucine (Leitner *et al.* 2003).

Pour conclure, nous pouvons dire que le phénomène de mucoadhésion des microsphères au mucus intestinal est complexe et multifactoriel. Le fait de greffer de la maltodextrine DE 38 joue négativement sur le facteur « amine libre » des protéines, mais améliore le facteur « polymère hydrophile ». Dans le cas de la formulation PP-MD38, il semblerait que ce soit le deuxième facteur qui ai prédominé (voir figure 91).

Par contre, dans le cas de GEL et GEL-MD38, le fait de greffer la maltodextrine DE 38 a drastiquement diminué le potentiel mucoadhésif de la microsphère. Le facteur « polymère hydrophile » ne semble donc pas avoir eu un rôle prédominant alors que la diminution du nombre d'amine libre par greffage de la maltodextrine DE 38 semble avoir joué son influence négative (figure 91).

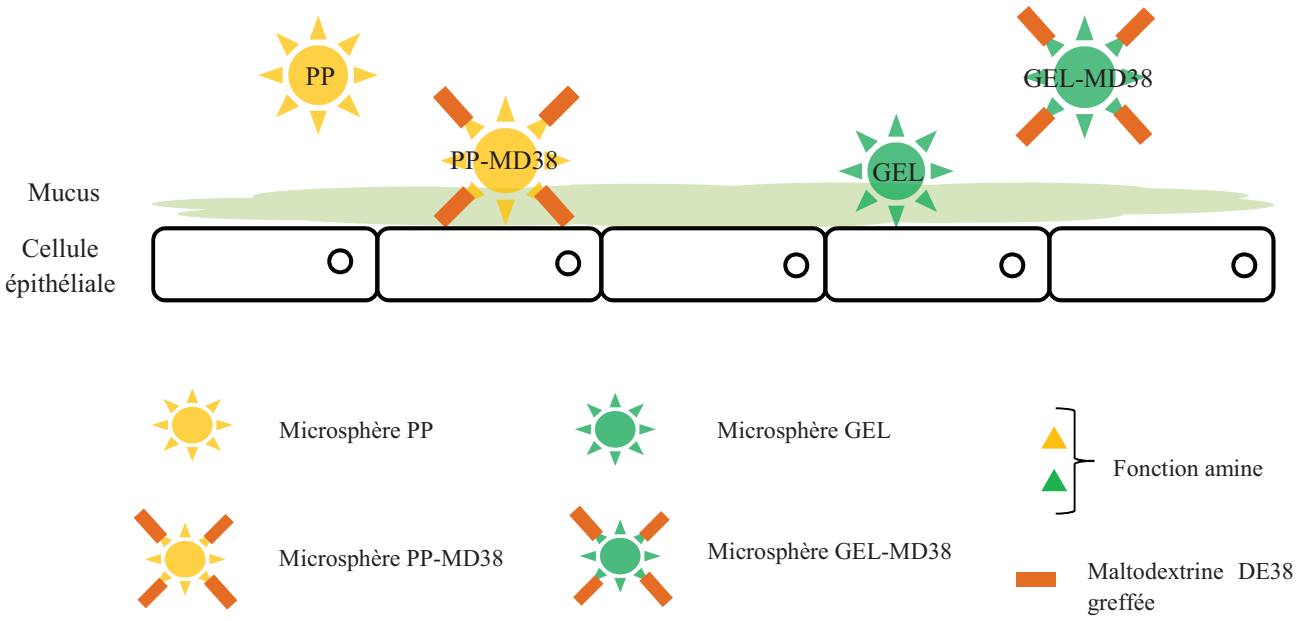


Figure 91 : schéma récapitulatif des interactions microsphères/mucine, pour les microsphères PP, PP-MD38, GEL et GEL-MD38

Le fait que les trois protéines étudiées aient des résultats nettement différents démontre bien que la conformation, l'hydrophobicité et la composition en acides aminés sont des facteurs prédominant dans le phénomène de mucoadhésion. Il serait important d'établir le taux d'amine libre en surface des microsphères afin de confirmer les résultats obtenus lors de cette étude.

En conclusion de cette étude, nous pouvons établir que :

- La méthode utilisée pour notre étude est originale et permet de mesurer un potentiel de mucoadhésivité des microsphères

- La gélatine de type A porcine apparait comme la protéine non fonctionnalisée ayant le meilleur potentiel mucoadhésif en comparaison avec les protéines de pois et le caséinate de sodium de lait de vache

- Le greffage de la maltodextrine DE 38 sur cette gélatine inhibe de façon importance ce potentiel mucoadhésif

- Par contre les résultats ont montré que le greffage de la maltodextrine DE 38 sur les protéines de pois a nettement amélioré le potentiel mucoadhésif des microsphères

- Le greffage des polyphénols de raisin sur les protéines de pois et sur le caséinate de sodium n'a pas d'effet significatif sur la mucoadhésivité

- Le phénomène de la mucoadhésion intestinal est un phénomène multifactoriel complexe, mais il semblerait que le taux d'amine libre en surface des microsphères joue un rôle prépondérant pour la formulation GEL, alors que la diminution de l'hydrophobicité de la formulation PP par greffage de maltodextrine DE 38 soit un facteur majeur

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Conclusions Générales et Perspectives

Les vitamines liposolubles sont des molécules dont l'intégration dans les procédés agro-alimentaires et de nutrition animale se confronte à plusieurs obstacles : la forme souvent fondue de la vitamine, et sa sensibilité aux facteurs extérieurs qui peut entraîner des phénomènes de dégradation ou de perte d'activité. Ces obstacles peuvent être levés par le choix d'une forme galénique adaptée.

Le principal objectif de ce travail était de mettre au point une forme galénique d'une vitamine liposoluble, la vitamine A, par la technique de microencapsulation par atomisation. Ces microsphères ont été formulées à partir de molécules naturelles (biopolymères) natives ou fonctionnalisées. Ces fonctionnalisations ont eu lieux par deux voies distinctes : le greffage de sucre et le greffage de polyphénol. L'étude générale de l'influence de ces voies de fonctionnalisation s'est faite à plusieurs niveaux :

Au niveau des biopolymères tout d'abord par :

- La mise au point et la caractérisation des conjugués
- La capacité de ces conjugués à stabiliser des émulsions dans le temps

Au niveau des microsphères sous forme pulvérulente ensuite, par l'étude de :

- La capacité à stabiliser la vitamine A encapsulée au sein des microsphères dans des conditions de stockages dégradantes
- La capacité des microsphères à relarguer la vitamine A ou non dans des milieux de digestion simulés
- La perméabilité de la matrice au géraniol coencapsulé avec la vitamine A
- Le potentiel mucoadhésif des microsphères

Pour mener à bien cette étude, plusieurs étapes ont été nécessaires :

Une première étape de choix des biopolymères et de fonctionnalisation, ainsi que d'analyse de leurs capacités émulsifiantes. Les principaux résultats de cette étape seront synthétisés dans une première partie.

Une seconde étape de caractérisation du comportement de microsphères issues du séchage par atomisation. Les principaux résultats de cette étape seront synthétisés dans une seconde partie.

Choix des biopolymères, fonctionnalisations et capacités émulsifiantes

Le screening des biopolymères pouvant encapsuler la vitamine A a abouti aux choix de trois protéines : les protéines de pois, le caséinate de sodium de lait de vache et la gélatine de type A porcine. Ces trois protéines ont permis de formuler trois types de microsphère, respectivement nommés PP, CA et GEL, qui ont servis de témoins négatifs pour l'étude de l'influence de la fonctionnalisation par la suite.

La réflexion sur les voies de fonctionnalisation a permis de choisir deux réactions naturelles, connues du monde de l'agro-alimentaire.

La réaction de Maillard d'abord, qui permet de greffer des composés glycosidiques sur les protéines, et qui est connue pour être responsable du brunissement non enzymatique des aliments cuits. Une étude avec les protéines de pois greffées de différents sucres a permis de choisir la maltodextrine DE 38 comme sucre privilégié pour cette réaction, avec un taux de greffage de 48% des fonctions amines libres et un brunissement important. Cette maltodextrine a donc été choisie pour appliquer cette voie de fonctionnalisation au caséinate de sodium de lait de vache et à la gélatine de type A porcine. Les profils chromatographiques gel-perméation et la séparation SDS-PAGE confirment le greffage par l'augmentation des talles moléculaires des protéines.

La complexation des polyphénols de raisin sur les protéines ensuite, réaction permettant de greffer des composés polyphénoliques sur les protéines, intervient naturellement dans le trouble des boissons, le collage du vin ou le tannage des peaux. Le greffage des polyphénols de raisin a été étudié de façon plus approfondie sur les protéines de pois et le ratio optimum de polyphénol par rapport aux protéines a été trouvé à 26% m/m. Le greffage des polyphénols sur les protéines de pois a été mis en évidence par la détection de conjugués de hautes tailles moléculaires par HPLC gel-perméation et électrophorèses SDS-PAGE. L'étude du pouvoir antioxydant des conjugués montre que la formulation garde une activité antioxydante intéressante. Le même protocole de fonctionnalisation a été appliqué sur

le caséinate de sodium et la gélatine de type A afin d'obtenir des complexes protéines/polyphénols.

L'étude de la capacité à stabiliser une émulsion directe dans le temps a été menée par la suite. Cette étude a été effectuée sur des émulsions peu concentrées en huile de tournesol, sur une période de 21 jours, avec mesure de la taille des gouttelettes d'huile dispersées par granulométrie laser. Les principaux résultats de cette étude montre d'abord que tous les biopolymères et conjugués étudiés ont permis de formuler des émulsions micrométriques. Ensuite, le greffage de la maltodextrine DE38 sur les protéines de pois a permis d'augmenter la stabilité dans le temps de l'émulsion. Par contre le greffage de cette maltodextrine n'a pas permis d'améliorer la stabilité de l'émulsion de caséinate de sodium et de gélatine de type A porcine. Le greffage des polyphénols de raisin sur les trois protéines a permis d'augmenter la stabilité des émulsions dans le temps par rapport aux protéines seules.

Caractérisation des microsphères de vitamine A

La deuxième partie de ce travail de thèse s'est concentrée sur la caractérisation des microsphères de vitamine A obtenues par séchage en atomisation. Des trois formulations originales, formulées à partir des protéines non fonctionnalisées (PP, CA et GEL), six autres ont été produites, correspondant chacune a une voie de fonctionnalisation des protéines :

- Réaction de Maillard : PP-MD38, CA-MD38 et GEL-MD38
- Complexes protéines/polyphénol : PP-TAN, CA-TAN et GEL-TAN.

Ces 9 formulations ont été formulées avec 43% de vitamine A, 10% de géraniol et 47% de protéine (fonctionnalisées ou non), par atomisation de l'émulsion.

La technique de microscopie électronique à balayage (MEB) a permis de mener une étude sur les caractéristiques de surface des microsphères de vitamine A. Ces observations en mode environnemental ont permis d'étudier de plus près la qualité du séchage et l'efficacité de l'encapsulation. Elles ont permis également de conduire une réflexion plus approfondie sur les observations et interprétations que l'on peut faire à partir des clichés, sur la structure interne et externe des microsphères, et des différentes étapes du séchage par atomisation. Il a été notamment avancé une hypothèse sur les tâches sombres de surface des

particules, ainsi que sur la forme de ballon dégonflé des microsphères. Ces réflexions ont permis la rédaction d'un article de méthodologie, actuellement en cours de soumission.

La stabilité de la vitamine A encapsulée dans les microsphères a été ensuite étudiée. Cette étude a été réalisée dans trois conditions de stockage (obscurité et température ambiante, obscurité et 40°C, obscurité, 40°C et 75% d'H.R) pendant une période de 28 jours. Cette étude a permis de hiérarchiser les protéines non fonctionnalisées entre elles, pour savoir quelle était la plus apte à stabiliser la vitamine A. Ces résultats indiquent que les protéines de pois ont le meilleur potentiel en comparaison avec les autres protéines pour stabiliser cette vitamine à température ambiante. La formulation CA-MD38 est la formulation fonctionnalisée la plus apte à stabiliser cette vitamine à température ambiante. Les conjugués PP-TAN et GEL-TAN permettent d'apporter une protection satisfaisante aux facteurs dégradant, en améliorant la stabilité de la vitamine A à 40°C et 75% d'H.R. Cette étude a permis de dégager des pistes de réflexions intéressantes sur la compréhension de l'influence de la matrice de microsphère sur la stabilité de la vitamine A et notamment sur le rôle que peuvent jouer l'hydrophobicité de la matrice et la présence de molécules antioxydantes.

Le relargage de la vitamine A dans des milieux de digestions simulés a également été étudié. Cette étude a pris place dans deux milieux reconstitués, un milieu gastrique à pH2 et en présence de pepsine, et un milieu entérique à pH 5.5 et présence d'enzyme de type lipase, protéase et glucosidase. Les résultats ont permis de dégager des comportements intéressant de relargage : une formulation comme PP montre un potentiel intéressant pour une vectorisation gastrique, et la formulation GEL montre un bon potentiel pour une vectorisation entérique.

L'influence du greffage de la maltodextrine DE38 par la réaction de Maillard est différente selon la protéine étudiée. PP-MD38 montre par exemple un relargage plus important en milieu entérique (aux environs de 40%). Le greffage de cette même maltodextrine sur le caséinate de sodium inhibe le relargage entérique de la vitamine A. Le greffage des polyphénols de raisin sur les protéines a par contre toujours le même effet, sauf pour la formulation CA-TAN en milieu gastrique : celui d'inhiber la libération de la vitamine A. Ces résultats prouvent que le greffage des polyphénols peut être une voie intéressante de modification des protéines afin de contrôler le relargage en remplacement des réticulants chimiques utilisés à l'heure actuelle.

L'étude suivante a consisté à suivre la libération du géraniol coencapsulé avec la vitamine A au sein des microsphères. Pour cela, une quantité de microsphère a été soumise à un débit d'azote constant et thermostaté à 60°C afin d'analyser la libération du géraniol dans le temps par chromatographie gazeuse. Les résultats montrent que les microsphères de protéines natives, CA et PP, libèrent leurs géraniol de façon constante et progressive, jusqu'à l'épuisement du vecteur. Le fait de greffer la maltodextrine DE 38 (PP-MD38 et CA-MD38) accélère cette libération de façon visible. Par contre le greffage de polyphénol (PP-TAN et CA-TAN) semble inhiber complétement la libération du géraniol.

Et enfin l'étude du potentiel mucoadhésif des microsphères a permis de dégager des propriétés intéressantes de la formulation GEL et PP-MD38, par rapport aux autres formulations testées. Cette étude originale mise en place en collaboration avec un partenaire extérieur permet d'étudier ce potentiel de façon rapide et peut être appliquée à d'autre type de microparticules.

Ces différents résultats ont permis de montrer la possibilité d'utiliser des conjugués originaux dans le domaine de l'encapsulation d'actif, et de comprendre leurs intérêts suivant les applications visées. D'autres études ont été menées dont les résultats ne sont pas présentés ici par soucis de cohérence. Notamment une étude comparative entre les trois types de gélatine disponibles sur le marché : la gélatine de type A (présentée dans ce mémoire), la gélatine de type B et la gélatine de poisson d'eau froide, qui a fourni des informations pertinentes pour la formulation des microsphères. Il a été également mené une étude sur l'utilisation de biomasse d'origine algale, sous un angle novateur d'encapsulation d'actif, ainsi qu'une exploration des biomasses d'origine entomologiques d'intérêt pour la microencapsulation de vitamine A.

Ces différents travaux ont été également l'occasion de développer des outils analytiques novateurs et spécifiques à l'étude du comportement des microsphères.

Plusieurs perspectives peuvent être dégagées de ce travail :

Concernant la production de microsphère, une des perspectives est de mettre au point les conditions de formulation et de séchage par atomisation dans une optique de production en scale up, avec toujours en vue l'aspect économique et industrialisable du produit visé. En effet les formulations de microsphère présentées dans ce rapport n'ont pas été rationnalisées pour un rendement de production optimal.

Ensuite il est possible à présent d'envisager l'utilisation d'autres actifs, liposolubles ou hydrosolubles, pour valider l'utilisation des voies de fonctionnalisation sur d'autres procédés d'encapsulation, comme l'enrobage sur lit d'air fluidisé ou le co-séchage. Cette piste de travail a déjà été envisagée sur la formulation GEL-TAN en tant qu'enrobage pulvérisé sur des cristaux de sels pour en retarder la solubilité dans l'eau.

Les techniques analytiques évoquées dans ce rapport devront être optimisées et peuvent faire l'objet d'étude complète afin de créer des outils analytiques puissant et fiables, permettant d'améliorer les capacités de formulation et d'adaptabilité de l'entreprise.

Enfin les connaissances accumulés sur le comportement des matières premières et sur les interactions entre l'actif encapsulé et la matrice des microsphères peuvent désormais intégrer les choix de formulations au sein du service R&D d'INNOV'IA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Adsule, R.N.S., Kadam, S., Leung, H.K. 1989. Lentil in : CRC handbook of World Food Legumes (eds. D.K. Salunkehe and S.S. Kadam). Boca Raton, Florida, USA. C.R.C. Press.

Aewsiri, T., Soottawat, B., Visessanguan, W., Eun, J.B., Wierenga, P.A., Gruppen, H. 2009. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin modified by oxidized phenolic compounds. Food Chemistry 117, 160-168.

Aewsiri, T., Benjakul, S., Visessanguan, W., Wierenga, P.A., Gruppen, H. 2010. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin-tannic acid complex as influenced by types of interaction. Innovative Food Science andEmerging Technologies 11, 712-720.

Al-Awwadi, N.A., Araiz, C., Bornet, A., Delbosc, S., Cristol, J.P., Linck, N., Azay, J., Teissedre, P.L., Cros, G. 2005. Extract enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertention, and cardiac hypertrophy in hight-fructose-fed rats. Journal of Agricultural Food Chemistry 53(1), 151-157.

Al-Hakkak, J., Al-Hakkak, F. 2010. Functional egg white-pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction. Journal of Food Engineering 100, 152-159.

Angeloni, S., Ridet, J.L., Kusy, N., Gao, h., Crevoisier, F., Guinchad, S., Kochhar, S., Sigrist, H., Sprenger, N. 2005. Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. Glycobiology 15, 31-41.

Annan, N.T., Borza, A.D., Truelstrup Hansen, L. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food Research International 41, 184-193.

Aoki, T., Uehara, T., Yonemasu, A. El-Din, M.Z. 1996. Response surface analyse of the effects of calcium and phosphate on the formation and properties of casein micelles in artificla micelles system. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44(5), 1230-1235.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Aoki, T., Hiidome, Y., Sugimoto, Y., Ibrahim H.R., Kato, Y. 1999. Improvement of heat stability and emulsifying activity of ovalbumin by conjugaison with glucuronic acid through the Maillard reaction. Food Research International 32, 129-133.

Arnesen, J.A., & Gildberg, A. 2006. Extraction of muscle proteins and gelatin from cod head. Process Biochemistry 41, 697-700.

Aronson, J., Ebeler, S.E. 2004. Effect of polyphenol compounds on the headspace volatillity of flavors. American Journal of Oenology and Viticulture 55 13-21

Arsicn I., Vuleta, G. 1999. Influence of liposomes on the stability of vitamin a incorporated in polyacrylate hydrogel. International Journal of Cosmetic Science 21(4), 219-225.

Arts, M.J.T.J., Haenen, G.R.M.M., Wilms, L.C., Beetsra, S.A.J.N., Heijnen, C.G.M., Voss, H.H.P., Bast, A. 2002. Interactions between flavonoids and proteins : effects on the total antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 1184-1187.

Asano, K., Shinagawa, K., Hashimoyo, N. 1982. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. Journal of the American Society of Brewing Chemists 40, 147-154

Aufrere, J., Theodoridou, K., Baumont, R. 2012. Valeur alimentaire pour les ruminants des légumineuses contenant des tannins condensés en milieux tempérés. INRA Production Animale 25, 29-44.

Avena-Bustillos, R.J., Krochta, J.M. 1993. Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. Journal of Food Science 58 (4), 904-907.

Bakker, J., & Mela, D.J. 1994. Effect of emulsion structure on flavor release and taste perception. In R.J. McGorrin, & J.V. Leland, Flavor-food interaction (pp.36-47). Washington DC : American Chemists Society.

Beaufrand, M.J., Poullain, B., Bau H.M., Debry, G. 1977. Absorption chez l'homme du caséinate de sodium et des protéines ultrafiltrées du lait. Le Lait 567.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., Rubini, K. 2002. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. Biomaterial 23, 4827-4832.

Bogataj, M., Mrhar, A., Korosec, L. 1999. Influence of physicochemisal and biological parameters on drug release from microspheres adhered on vesical and intestinal mucosa. International Journal of Pharmacogical 177, 211-220.

Boland, A.B., Buhr, K., Giannouli, P., van Ruth, S.M. 2004. Influence of gelatin, starch, pectin and artificial saliva on the release of 11 flavour compounds from model gel systems. Food Chemistry 86, 401-411.

Borel, P., Drai, J., Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Laromiguiere, M., le Moel, G. 2005. Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids. Annales de Biologie Clinique (Paris) 63(2), 165-177.

Bouwmeesters, J.F.G. & De Roos, K.B. 1998. Process for preparing beads as food additive, WO 98/15192

Bridiau N. (2009). Synthèse chimio-enzymatique de pseudo-glyco-aminoacides, analogues de l'antigène Lewis x sialylé. Thèse de doctorat, Université de la Rochelle

Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B., Mercier. J-C., Pelissier, J., Das, B.C. 1977. Complete amino acid sequences of bovine αs2 casein, Federation of European Biochemical Societies Letters, 76, 274-279.

Buttery, R.G. & Teranishi, R. 1963. Measurement of fat autoxidation and browning aldehydes by direct vapour injection gas liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry 11, 504-507.

Cao N., Fu Y., He J. 2007. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. Food Hydrocolloids 21, 575-584.

Carlotti, M.E., Rossatto, V., Gallarate, M. 2002. Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVa and UVb radiation. International Journal of Pharmaceutics 240(1-2), 85-94

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Casanova, H. & Dickinson, E. 1988. Influence of protein interfacial composition and salt stability of mixed casein emulsions. Journal Agricultural and Food Chemistry 46(1), 72-77

Castillo-Munoz, N., Winterhalter, P., Weber, F., Gomez, M.V., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E. 2010. Structure elucidation of peonidine 3.7-O-B-diglucoside isolated from Garnacha Tintorena (*Vitis vinifera L.*) grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 11105-11111.

Charlesworth, D.H., & Marshall JR., W.R. 1960. Evaporation from drops containing dissolved solids. American Institute of Chemical Engineers Journal 6(1), 9-23.

Charreau, A., & Cavaillé, R. Séchage II : appareillage et choix d'un procédé. Les Techniques de l'Ingénieur J2482.

Chen, Q., McGillivray, D., Wen, J., Zhong, F., Quek, S.Y. 2013. Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. Journal of Food Engineering 117, 505-512.

Chen, W., Viljoen, A.M. 2010. Geraniol – A review of a commercially important fragrance material. South African Journal of Botany 76, 643-651.

Chevalier F., Chobert J.M., Popineau, Y., Nicolas., M.G., Haertlé, T. 2001. Improvement of functional properties of β-lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. International Dairy Journal 11, 145-152.

Chick, J., Hernandez, R.J. 2002. Physical, thermal, and barrier characterization of casein-wax-based edible film. Journal of Food Science 67 (3), 1073-1079.

Cieslik, E., Greda, A., Adamus, W. 2006. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. Food Chemistry 94(1) 135-142.

Cirpanli, Y., Unlu, N., Calis, S., Hincal, A.A. 2005. Formulation and in-vitro characterization of retinoic acid loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. Journal of Microencapsulation 22(8), 877-889.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Coradini, K., Lima, F.O., Oliveira, C.M., Chaves, P.S., Athayde, M.L., Carvalho, L.M., Beck, R.C.R. 2014. Co-encapsulation of resveratrol and curcuminin lipid-core nanocapsules improves there in vitro antioxydant effects. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, in Press.

Costa, A.M.M., Nunes, J.C., Lima, B.N.B, Pedrosa, C., Calado, V., Torres, A.G., Pierucci, A.P.T.R. 2015. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. Food Chemistry 168, 157-166.

Couvreur, P., Roblot-Treupel, L. Poupon, M.F., Brasseur, F., Puisieux, F. 1990. Nanoparticles as microcarriers for anticancer drugs. Advanced Drug Delivery Reviews 5, 209-230.

Corzo-martinez, M., Carrera-Sanchez, C., Villamiel, M., Rodriguez-Patino, J.M., Moreno, F.J. 2012. Assessment of interfacial and foaming properties of bovine sodium caseinate glycated with galactose. Journal of Food Engineering 113, 461-470.

Crevieu-Gabriel, I. 1999. Digestion des protéines végétales chez les monogastriques. Exemple des protéines de pois. INRA Production Animale 12, 147-161.

Cui, Z., Kong, X., Chen, Y., Zhang, C., Hua, Y. 2014. Effects of rutin incorporation on the physical and oxidative stability of soy protein-stabilized emulsions. Food Hydrocolloids 41, 1-9.

De Roos, K.B. 2003. Effect of texture and microstructure on flavour retention and release. International Dairy Journal 13, 593-605.

De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. International Dairy Journal 20(4), 292-302.

Decendit A., Waffo-Teguo, P., Richard, T., Krisa, S., Vercauteren, J. Monti, J.P., Deffieux, G., Mérillon, J.M. 2002. Galloylated catechins and stilbene diglucoside in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Phytochemistry 60, 795-798.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Di Mattia, C.D., Giampiero, S., Mastrocola, D., Sarker, D.K., Pittia, P. 2010. Surface properties of phenolic compounds and their influence on the dispersion degree and oxidative stability of olive oil O/W emulsions. Food Hydrocolloids 24, 652-658.

Dickinson, E., Rolfe, S.E., Dalgleish, D.G. 1988. Competitive adsorption of αs1-casein and β-casein in oil-in-water emulsions. Food Hydrocolloids 2, 397-405.

Dong, S., Panya, A., Zeng, M., Chen, B., McClements, D.J., Decker, E.A. 2012. Characteristics and antioxidant activity of hydrolyzed β-lactoglobulin-glucose Maillard reaction products. Food Research International 46, 55-61.

Dravnieks, A. & O'Donell, A. 1971. Principles and some techniques of hight-resolution headspace analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 19, 1049-1056.

Drusch, S., Berg, S., Scampicchio, M., Serfert, Y., Somoza, V., Mannino, S., Scwarz, K. 2009. Role of glycated caseinate in stabilization of microencapsulated lipophilic functional ingredients. Food Hydrocolloids 23, 942-948.

Drusch, S., Serfert, Y., Berger, A., Shaikh, M.Q., Rätzke, K., Zaporojtchenko, V., Schwarz, K. 2012. New insight into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein. Food Hydrocolloids 27, 332-338.

Ducel, V., Richard, J., Popineau, Y., Boury, F. 2004a. Adsorption kinetics and rheological interfacial properties of plant proteins at the oil-water interface. Biomacromolecules 5, 2088-2093.

Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y., Boury. 2004b. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins : application to the microencapsulation of oil droplets. Colloid Surface 232, 239-247.

Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F., Sante-Lhoutellier, V. 2014. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution : a review. Food Hydrocolloids, in press.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Dufour, C.,& Bayonove, C.L. 1999a. Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 671-678.

Dufour, C., & Bayonove, C.L. 1999b. Interaction between wine polyphenol and aroma substances. An insight at the molecular level. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 678-684.

Dufour, C. & Sauvaitre, I. 2000. Interaction between anthocyanins and aroma substances in a model system. Effect on the flavor of grape-derived beverage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 1784-1788.

Dupas, C. Influence des protéines laitières sur le pouvoir antioxydant et la biodisponibilité des polyphénols du café. Thèse de doctorat de l'université de Paris. Paris : Agroparitech ENSIA, 2005, 258 p.

Duverger, E., Coppin, A., Strecker, G., Monsigny, M. 1999. Interaction between lectins and neoglycoproteins containing new sialylated glycosynthons. Journal of Glyconconjugates 16, 793-800.

Einhorn-Stoll, U., Ulbrich, M., Sever, S., Kunzek, H. 2005. Formation of milk protein-pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating. Food Hydrocolloids 19, 329-340.

Elzoghby A.O. 2013. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems : Reviewing three decades of research. Journal of Controlled Release 172, 1075-1091.

Ensign, L.M., Cone, R., Hanes, J. 2012. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles : the gastrointestinal mucus barriers. Advanced Drug Delivery Reviews 64, 557-570.

Ezpeleta, I., Irache, J.M., Stainmesse, S., Chabenat, C., Gueguen, J., Popineau, Y., Orecchioni, A.M. 1996. Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid. International Journal of Pharmaceutics 131(2), 191-200.

Falcao, L., Araujo, M.E.M. 2011. Tannins characterization in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot tests. Journal of Cultural Heritage 12, 149-156.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Faldt, P., Bergenstahl, B., Carlsson, G. 1993. The surface coverage of fat on food powders analysed by ESCA (Electron Spectrocopy for Chemical Analysis). Food Strucure 12, 225-234.

Fang, F., Li, J.M., Zhang, P., Tang, K ., Wang, W., Pan Q.H. 2008. Effect of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wine. Food Research International 41(1), 53-60.

FAO. 2009b. Biodiversity and nutrition, a common path. Rome.

Fares, K., Landy P., Guillard, R., Voilley A. 1998. Physicochemical interactions between aroma compounds and milk proteins : effect of water and protein modification. Journal of Diatery Science 812, 82-91.

Fechner, A., Knoth, A., Scherze I., Muschiolik, G. 2007. Stability and release properties of double-emulsions stabilized by caseinate-dextran conjugates. Food Hydrocolloids 21, 943-952.

Fischer E., Fieber, W., Navarro, C., Sommer, H., Benczédi, D., Velazco M.I., Schönhoff, M. 2009. Partitioning and localization of fragrance in surfactant mixed micelles. Journal of Surfacting Detergent 12, 73-84.

Fischer, N., & Widder, S. 1997. How proteins influence food flavor. Food Technology 51, 68-70.

Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 2003. Advanced Dairy Chemistry, Protein Part A, vol. 1, 3 edn, New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Garrido, J. & Borges, F. 2013. Wine and grape polyphenols- a chemical perspective. Food Research International 54, 1844-1858.

Gardner, R.J., McGuinness, J.D. 1977. Complex phenol in brewing- A critical survey. Technical Quarterly, Master Brewers Associations of America 14, 250-261.

George, M., Abraham, E. 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs : alginate and chitosan – a review. Journal of Controlled release 114, 1-14.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. 2007. Application of spray-drying in microencapsulation of food ingredients : an overview. Food Research International 40(9), 1107-1121.

Gharsallaoui, M., Saurel, R., Chambin, O., Cases, E., Voilley, A., Caayot, P. 2010. Utilization of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilized oil in water emulsions. Food Chemistry 122, 447-454.

Ginger, M.R. & Grigor, M.R. 1999. Comparative aspects of milk caseins. Comparative Biochemistry and Physiology B 124, 133-145.

GME. (2008). Gelatin Manufacturers of Europe.
http://www.gelatine.org/en/gelatine/overview/127.htm. Consulté le 15.03.08

Godshall, M. A. 1997. How carbohydrates influence food flavor. Food Technology 51, 63-67

Golding, M., Wooster, T.J. 2009. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. Current Opinion in Colloid & Interface Science 15, 90-101.

Goodman, D.S, Blomstrand, R., Werner, B., Huang, H.S., Shiratori, T. 1966. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and beta-carotene in man. Journal of Clinical Investigation 45(10), 1615-1623.

Gouin, S. 2004. Microencapsulation : industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends in Food Science & Technology 15, 330-347.

Gravlund, K., 1986. Homogenization. North European Dairy Journal, n° 9/84, 212-220.

Griffith, T., Johnson, J.A. 1957. Relation of the browning reaction to storage of sugar cookies. Cereal Chemistry 34, 159-169.

Grolier, P., Agoudavin S., Azaïs-Braesco, V. 1995. Comparative bioavailability of diet, oil, and emulsion based preparation of vitamin a and beta carotene in rat. Nutrition Research 15(10), 1507-1516.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Gu, F.L., Kim, J.M., Abbas, S., Zhang, X.M., Xia, S.Q., Chen., Z.X. Structure and antioxidant activity of hight molecular weight Maillard reaction products from casein-glucose. Food Chemistry 120, 505-511.

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, 209-224.

Guo, M., Fox, P.F., Flynn, A. Mahammad, K.S. 1989. Heat-induced changes in sodium caseinate. Journal of Dairy Research 56, 503-512.

Hagesaether, E. & Sande, S.A. 2007. In vitro measurement of mucoadhesive properties of six types of pectin. Drug Development and Industrial Pharmacy 33, 417-425.

Hahn, D.H., Rooney, L.W., Earp, C.F. 1984. Tannins and phenols of sorghum, Cereal Foods World, 29, 776-779.

Harding, J.J. 1965. The Unusual links and cross-links of collagen. Advances in Protein Chemistry 20, 109-190.

Haroun, A.A., & El-Halawany, N.R. 2010. Encapsulation of bovine serum albumin within β-cyclodextrine/gelatin based polymeric hydrogel for controlled protein drug release. IRBM 31, 234-241.

Harrison, E.H. 2005. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. Annual Review of Nutrition 25, 87-103.

Haslam, E., Lilley, T.H.1988. Natural astringency in foodstuffs- A molecular interpretation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 27 (1), 1-40.

Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R., Tajmir-Riahi, H.A. 2011. Interaction of milk α- and β-caseins with tea polyphenols. Food Chemistry 126, 630-639.

He, F., Mu, L., Yan, G.L., Liang, N.N., Pan, Q.H., Wang, J. 2010. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. Molecules 15(12), 9057-9091.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

He, F., Pan, Q.H., Shi, W., Duan, C.Q. 2008. Chemical synthesis of proanthocyanidins in vitro and their reactions in aging wine. Molecules 13(12), 3007-3032.

Hoogenkamp H. 2012. Pea protein and other vegetable-origin pulse protein sources. Roquette Nutralys pea protein.

Hiller, B., Lorenzen P.C. 2010. Functional properties of milk proteins as affected by Maillard reaction induced oligomerisation. Food Research International 43, 1155-1166.

Hodge J.E. 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1, 928-943.

Hsu, K.L., Pilobello, K.T., Mahal, L.K. 2006. Analysing the dynamic bacterial glycome with a lectin microarray approach. Natural Chemistry Biological 2, 153-157.

Hsu, Y.L., Liang, H.L., Hung C.H., Kuo, P.L. 2009. Syringetin, a flavonoid derivative in grape and wine, induces human osteoblast differentiation througt bone morphogenetic protein-2/extracellular signal-regulated kinase ½ pathways. Molecular Nutrition & Food Research 53(11), 1452-1461.

Humphrey, S.P., Williamson R.T. 2001. A review of saliva: normal composition, flow, and function. The Journal of Prosthetic Dentistry 85, 162-169.

IFIF. 2012. International Feed Industry Federation. Consulté le 25 Mai 2012

Ilyasoglu, H., Nehir El, S. 2014. Nanoencapsulation of EPA/DHA with sodium caseinate-gum Arabic complex and its usage in the enrichment of fruit juice. LWT – Food Science and Technology 56, 461-468.

Ishii T., Mori T., Tanaka T., Mizuno D., Yamaji R., Kumazawa S., Nakayama T., Akagawa M. Covalent modification of proteins by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through auto-oxydation. Free Radical Biology & Medecine 45, 1384-1384.

Isler, O., Huber, W., Ronco, A., Kofler, M. 1947. Synthese des vitamin A. Helvetica Chimica Acta 30, 1911-1927

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Jameela, S.R., Jayakrishnan, A. 1995. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle : studies on the in-vitro release of mixoantrone and in-vivo degradation of microspheres in rat muscle. Biomaterials 16, 769-775.

Jandera, P., Skerikova, V., Rehova, L., Hajek, T., Baldrianova, L., Skopova, G. 2005. RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a coularray detector. Journal of Separation Sciences 28, 1005-1022.

Jee, J.P., Lim, S.J., Park, J.S., Kim, C.K. 2006. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 63(2), 134-139.

Jeffery, D.W., Parker, M., Smith, P.A. 2008. Flavonol composition of Australian red and white wines determined by hight-performance liquid chromatography. Australian Journal of Grape and Wine Research 14(3), 153-161.

Jenning, V., & Gohla, S.H. 2001. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). Journal of Microencapsulation 18(2), 149-158.

Jeyanthi, R. & Panduranga Rao, K. 1987. Preparation of gelatin microspheres of bleomycin. International Journal of Pharmaceutics 35, 177-179.

Jiménez-Castaňo, L., Villamiel, M., López-Fandiňo, R. 2007. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. Food Hydrocolloids 21, 433-443.

Jones, B.E. 1987. In hard capsule development and technology; Ridgway, K., Ed; The Pharmaceutical: London, U.K., pp 39-48.

Jones, J.R., Prime, D., Leaper, M.C., Richardson, D.J., Rielly, C.D., Stapley, A.G.F. 2013. Effect of processing variables and bulk composition on the surface composition of spray dried powders of a model food system. Journal of Engineering 118, 19-30.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Kaanane A., Labuza T.P. The Maillard reaction in food. In : The Maillard reaction in aging, diabetes, and nutrition : proceedings of a NIH Conference on the Maillard reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition, held in Bethesda, Maryland, September 22-23, 1988. A.R. Liss : New York, 1989, 301-327

Kanakis C.D., Hasni I., Bourassa P., Tarantillis P.A., Polissiou M.G., Tajmir-Riahi H.A. 2011. Milk β-lactoglobulin complexes with tea polyphenols. Food Chemistry 127, 1046-1055.

Karrer, P., Morf, R., Schoepp, K. 1931. Zur kenntnis des vitamins A in fishtranen. Helvetica Chimica Acta 30, 1911-1927.

Karim, A.A. & Rajeev, B. 2009. Fish gelatin : properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids 23, 563-576.

Kasran, M., Cui, S.W., Goff, H.D. 2013a. Emulsifying properties of soy whey protein isolate-fenugreek gum conjugates in oil-in-water emulsion model system. Food Hydrocolloids 30, 691-697.

Kasran, M., Cui, S.W., Goff, H.D. 2013b. Covalent attachment of fenugreek gum to soy whey protein isolate through natural Maillard reaction for improved emulsion stability. Food Hydrocolloids 30, 552-558.

Kaushik, V., & Roos, Y.H. 2007. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum arabic-sucrose-gelatin systems. LWT Food Science and Technology 40, 1381-1391.

Keller, B.C. 2001. Liposomes in nutrition. Trends in Food Science & Technology 12(1), 25-31.

Kelly, G.M., O'Mahony, J.A., Kelly, A.L., O'Callaghan, D.J. 2014. Physical characteristics of spray-dried dairy powders containing different vegetable oils. Journal of Food Engineering 122, 122-129.

Khanvilkar, K., Donovan, M.D., Flanagan, D.R. 2001. Drug transfer through mucus. Advanced Drug Delivery Reviews 48, 173-193.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Kim, D.G., Jeong, Y.I., Choi, C., Roh, S.H., Kang, S.K., Jang, M.K., Nah, J.W. 2006. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics 319(1-2), 130-138.

Kim, E.H.J., Chen, X.D., Pearce, D. 2002. Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces 26(3), 197-212.

Kim, E.H.J., Chen, X.D., Pearce, D. 2009a. Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 1. Development of surface composition during manufacture. Journal of Food Engineering 94, 163-168.

Kim, E.H.J., Chen, X.D., Pearce, D. 2009b. Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 2. Effects of spray drying conditions on the surface composition. Journal of Food Engineering 94, 169-181.

Kim, S., & Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts- a review. Food Research International 39, 383-393.

Kinsella, J. E. 1984. Milk proteins: physicochemical and functional properties. Critical Review of Food Science Nutrition 21(3), 197-262.

Koponen, J.J., Happonen, A.M., Mattila, P.H. Torronen, A.R. 2007. Content of anthocyanins and elligitanins in selected foods consumed in Finland. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(4), 1612-1619.

Koupantsis, T., Pavlidou, E., Paraskevopoulou, A. 2014. Flavour encapsulation in milk proteins – CMC coacervate type complexes. Food Hydrocolloids 37, 134-142.

Kyyronen, K., Hume, L., Benedetti, L., Urtti, A., Topp, E., Stella, V. 1992. Methylprednisolone esters of hyaluronic acid in ophthalmic drug delivery : in vitro and in vivo release studies. International Journal of Pharmaceutical 80, 161-169.

Lai, P., Okazawa, A., Izumi, Y., Bamba, T., Fukusaki, E., Yoshikawa, M., Kobayashi, A. 2013. Effect of gallic acid on peptides released by trypsin digestion of bovine α-casein. Journal of Bioscience and Bioengineering 115, 259-267.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Landemarre, L., Canceillieri, P., Duverger, E. 2013. Cell surface lectin array: parameters affecting cell glycan signature. Journal of Glycoconjugate 30, 195-203.

Lecluse, W.J. 1979. Homogénéisateurs à hautes pressions. Information Chimie, n°191.

Lee, S.C., Yuk, H.G., Lee, D.H., LEE, K.E., Hwang, Y.I., Ludescher, R.D. 2002. Stabilization of retinol through incorporation into liposome. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 35(4), 358-363.

Leitner, V.M., Walker, G.F., Bernkop-Schnürch. 2003. Thiolated polymers : evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. European Journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics 56, 207-214.

Léonard, L., Beji, O., Arnould, C., Noirot, E., Bonnotte, A., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Lherminier, J., Saurel, R., Oulahal, N. 2013. Preservation of viability and anti-Listeria activity of lactic bacteria*, Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei*, entrapped in gelling matrice of alginate or alginate/caseinate. Food Control 47, 7-19.

Li, H. & Deng, X. 2007. Prediction of powder particle size during centrifugal atomization using a rotating disk. Science and Technology of Advanced Material 8, 264-270.

Li, Y., Lu, F., Luo, C., Chen, Z., Mao, J., Shoemaker, C., Zhong, F. 2009. Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar. Food Chemistry 117, 69-74.

Li, Y., Zhong, F., Ji, W., Yokoyama, W., Shoemaker, C.F., Zhu, S. 2013. Functional properties of Maillard reaction products of rice protein hydrolysate with mono-, oligo- and polysaccharides. Food Hydrocolloids 30, 53-60.

Lieske, B. & Konrad, G. 1994. Thermal modification of sodium-caseinate : influence temperature and pH on selected physic-chemical and functional properties. Milchwissenschaft 49(1), 16-20.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Lin, H.S., Chan, S.Y., Low, K.S., Shoon, M.L., Ho, P.C. 2000. Kinetic study of a 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-based formulation of all-trans-retinoic acid in Sprague-Dawley rats after oral or intravenous administration. Journal of Pharmaceutical Sciences 89, 260-267.

Lin, H.S., Leong, W.W., Yang, J.A., Lee, P., Chan, S.Y., Ho, P.C. 2007. Biopharmaceutics of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) formulated with modified beta-cyclodextrins. International Journal of Pharmaceutics 341(1-2), 238-245.

Lin, L.H., Chen, K.M., Liu, H.J., Chu, H.C., Kuo, T.C., Hwang M.C., Wang, C.F. 2012. Preparation and surface activities of modified gelatin-glucose conjugates. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects 408, 97-103.

Liu, Z.H., Chang, S.K.C., Li, L.T., Tasumi, E. 2004. Effect of selective thermal denaturation of soybean proteins on soymilk viszcosity and tofu's physical properties. Food Research International 37, 815-822.

Livney, Y.D. 2010. Milk proteins as vehicles for bioactive. Current Opinion in Colloid & Interface Science 15, 73-83.

Loveday, S.M., & Singh, H. 2008. Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. Trend in Food Science & Technology 19(12), 657-668.

Lund, C.M., Nicolau, L., Gardner, R.C., Kilmartin, P.A. 2009. Effect of polyphenols on the perception of key aroma compounds from Sauvignon Blanc wine. Australian Journal of Grape and Wine Research 15, 18-26

Maarse, H. & Visscher, C.A. 1996. Volatile compounds in food. Qualitative and quantitative date (7eme edition). Zeist : TNO Biotechnology and Chemistry Institute.

Macheix, J.J., Fleuriert, A. Billot, J. 1994. Fruit phenolic. Boca Raton : CRC Press Inc.

Maillard, L.C. 1912. Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoïdines par voie méthodique. Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences 154, 66-68.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M.C., Lerici, C.R. 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. Trends of Food Science and Technology 11, 340-346.

Marieb, E.N. 1999. Anatomie et Physiologie Humaine. De Boeck : Québec.

Markus, A., & Pelah, Z. 1989. Encapsulation of vitamin A. Journal of Microencapsulation 6(3), 389-394.

Masters K. Spray drying Handbook. 4eme edition. Essex : Longman Scientific & Technical, 1985, 696 p.

Matemu, A.O., Kayahara, H., Murasawa, H., Nakamura, S. 2009. Importance of size and charge of carbohydrate chains in the preparation of functional glycoproteins with excellent emulsifying properties from tofu whey. Food Chemistry 114, 1328-1334.

McClements, D., Li, J.Y. 2010. Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. Food Functionality 1, 32-59.

McCollum, E.V. & Davis, M. 1913. The necessity of certain lipids in the diet during growth. Journal of Biological Chemistry 15(1), 167-175.

McCollum, E.V. & Davis, M. 1915. The essential factor in the diet during growth. Journal of Biological Chemistry 23(1), 231-246.

McCormack, B., & Gregoriadis, G. 1998. Drug in cyclodextrin in liposome. An approach to controlling the fate of water insoluble drugs in vivo. International Journal of Pharmaceutics 162(1-2), 59-69.

McHugh, T.H., Krochta, J.M. 1994. Permeability properties of edible films. In : Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M. (eds), Edible film and Coating to improve Food Quality. Technomic Publishing Compagny, Inc., Lancaster, PA, pp. 139-187.

Miralles, B., Martinez-Rodriguez A., Santiago, A., van de Lagemaat, J., Heras, A. 2007. The occurrence of Maillard-type protein-polysaccharide reaction between β-lactoglobulin and chitosan. Food Chemistry 100, 1071-1075.

Moore T. 1930. Vitamin A and carotene : the absence of the liver oil vitamin A from carotene. VI. The convertion of carotene to vitamin A in vivo. Biochemistry Journal 24(3), 692-702.

Morris, G.A., Sims, I.M., Robertson, A.J., Furneaux R.H. 2004. Investigation into the physical and chemical properties of sodium caseinate-maltodextrin glycol-conjugates. Food Hydrocolloids 18, 1007-1014.

Moughan J.P, Rutherfurd M.S. 2008. Available lysine in foods : A brief historical overview. Journal of AOAC International 91 (4), 901-906.

Mulvhill, D.M. & Fox, P.F. 1989. Caseins : functional properties. In P.F. Fox, developments in dairy chemistry (4th ed. pp. 131-172). London, UK : Elsevier Applied Science Publishers.

Munoz-Botella, S., martin, M.A., del Castillo, B., Lerner, D.A., Menéndez, J.C. 2002. Differentiating geometrical isomers of retinoids and controlling their photo-isomerization by complexation with cyclodextrins. Analytica Chimica Acta 468(1), 161-170.

Murrietas-Pazos, I., Gaiani, C., Galet, L., Calvet, R., Cuq, B., Scher, J. 2012. Food powders : Surface and form characterization revisited. Journal of Food Engineering 112, 1-21.

Muyonga, J.H., Cole, C. G. B., Duodu, K.G. 2004. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. Food Hydrocolloid 18, 581-592.

Nahon, D.F., Navarro y Koren, P.A., Roozen, J.P., Posthymus, M.A. 1998. Flavour release from mixtures of sodium cyclamate, sucrose, and an orange aroma. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 4963-4968.

Nakagawa, K., & Nagao, H. 2012. Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced gelatin-acacia complex coacervation. Colloid and Surface A : Physicochemical Engineering Aspects 411, 129-139.

Nesternko Alla. Etude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation. Sciences es Agro-ressources. Toulouse : Université de Toulouse, Institut national polytechnique de Toulouse, 2012, p.233

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Nimni, M.E. 1983. Collagen : structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues. Seminars in Arthritis and Rheumatism, vol 13, n°1.

Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., Phillips, G.O. 2014. Soy proteins : A review on composition, aggregation and emulsification. Food Hydrocolloids 39, 301-318.

Norland, R.E. 1990. Fish gelatin. In M.N. Voight, & J.K. Botta (eds.), Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability (pp. 325-333). Lancaster : technomic Publishing Co.

Olivier, C.M., Melton, L.D., Stanley, R.A. 2006a. Functional properties of caséinate glycoconjugates prepared by controlled heating in dry state. Journal of the Science of Food & Agriculture 86, 732-740.

Olivier, C.M., Melton, L.D., Stanley, R.A. 2006b. Glycation of caséinate by fructose and fructo-oligosaccharides during controlled heat treatment in dry state. Journal of the Science of Food & Agriculture 86, 722-731.

Onoue S., Ochi, M., Yamada, S. 2011. Development of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-loaded enteric microparticles with intestinal mucoadhésive property. International Journal of Pharmaceutics 410, 111-113.

O'Regan J., Mulvihill D.M. 2009. Preparation, characterization and selected functional properties of sodium caseinate-maltodextrin conjugates. Food Chemistry 115, 1257-1267.

O'Regan, J., Mulvihill, D.M. 2010. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: encapsulation and stability. Food Research International 43, 224-231.

Panfili, G., Manzi, P., Pizzoferrato, L. 1998. Influence of the thermal and other manufacturing stresses on retinol isomerization in milk and dairy products. The Journal of Dairy Research 65(2), 253-260.

Patra, K., Saxena, J. 2011. Exploitation of dietary tannins to improves rumen metabolism and ruminal nutrition. Journal of Science Food Agricultural 91, 24-37.

Peppas, N.A., Buri, P.A. 1985. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. Journal of Control Release 2, 257-275.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Peppas, N.A. & Brannon-Peppas, L. 1996. Controlled release of fragrance from polymers I. Thermodynamic analysis. Journal of Controlled Release 40, 245-250.

Pereira, H.V.R., Saraiva, K.P., Carvalho, L.M.J., Andrade, L.R., Pedrosa, C., Pierucci, A.P.T.R. 2009. Legume seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. Food Research International 42, 115-121.

Perpète, P., & Collin, S. 2000. Influence of beer ethanol content on the wort flavour perception. Food Chemistry 71, 379-385.

Perrot, C. 1994. Susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique des protéines de pois (*Pisum Sativum L.*). Thèse de doctorat, options sciences alimentaires. Université Paris 7.

Perrot, C. 1995. Les protéines de pois : de leur fonction dans la graine à leur utilisation en alimentation animale. INRA Production Animale 8 (3), 151-164.

Piacentini, E., Giorno, L., Dragosavac, M.M., Vladisavljevic, G.T., Holdich, R.G. 2013. Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum Arabic complex coacervation by membrane emulsification. Food Research International 53, 362-372.

Pierucci, A.P.T.R., Andrade, L.R., Baptista, E.B., Volpato, N.M., Rocha-Leao, M.H.M. 2006. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. Journal of Microencapsulation 23, 654-662.

Pierucci, A.P.T.R, Andrade, L.R., Farina, M., Pedrosa, C., Rocha-Leao, M.H.M. 2007. Comparison of α-tocopherol microparticles produced with different wall material : pea protein a new interesting alternative. Journal of Microencapsulation 24, 201-213.

Ponchel, P., Montisci, M.J., Dembri, A., Durrer, C., Duchêne, D. 1997. Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 44, 23-31.

Puyol, P., Perez, M.D., Sanchez, I., Ena, J.M., Calvo, M. 1995. Uptake and passage of β-lactoglobulin, palmitic acid and retinol across the caco-2 monolayer. Biochimica et Biophysica Acta 1236(1), 149-154.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Qi, Z.H. & Shieh, W.J. 2002. Aqueous media for effective delivery of tritinoin. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 44(1), 133-136.

Rawel, H.M., Czajka, D., Rohn, S., Kroll, J. 2002. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy protein. International Journal of Biological Macromolecules 30, 137-150.

Reineccius, G.A. 1991. Carbohydrate for flavor encapsulation. Food Technology 3, 144.

Richard, J. & Benoit, J.P. 2000. Microencapsulation. Technique de l'ingénieur. Editeur T.I, ref : j2210

Roberts, D.D., Elmore, J.S., Langley, K.R., Bakker, J. 1996. Effects of sucrose, guar gum, and carboxymethylcellulose on the release of volatile flavor compounds under dynamic conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, 1321-1326.

Rollema, H.S. 1992. Casein association and micelle formation. Advanced Dairy Chemistry 1, 111-140.

Roustel, S. 2010. Homogénéisation à haute pression des dispersions alimentaires liquides. Technique de l'Ingénieur. Editeur T.I, ref : F2710

Rusli, J.K., Sanguansri, L., Augustin, M.A. 2006. Stabilization of oils by microencapsulation with heated protein-glucose syrup mixtures. Journal of the American Oil Chemists Society 83 (11), 965-972.

Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. 1989. Handbook of world food legumes, nutritional chemistry, processing technology and utilization, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 23-144.

Samuel, K.L., Wang, Y.Y., Wirtz, D., Hanes, J. 2009. Micro- and macro-rheology of mucus. Advanced Drug Delivery Reviews 61, 86-100.

Sansukcharearnpon A., Wanichwecharungruang, S., Leepipatpaiboon, N. Kerdcharoen, T., Arayachukeat, S. 2010. High loading fragrance encapsulation based on a polymer-blend : preparation and release behavior. International Journal of Pharmaceutics 391, 267-273.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Saravanan, M. & Rao, K.P. 2010. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. Carbohydrate Polymers 12, 453-469.

Sauvant, P., Cansell M., Sassi, A.H., Atgié, C. 2012. Vitamin A enrichment : caution with encapsulation strategies used for food application. Food Research International 46, 469-479.

Saxena, A., Sachin, K., Bohidar, H.B., Kamra Verma, A. 2005. Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nano-particles. Colloids and Surface B : Biointerfaces 45, 42-48.

Schrieber, R., & Gareis, H. 2007. Gelatin handbook. Weinhem : Wiley-VCH GmbH & Co.

Semenova, E.M., Cooper, A., Wilson, C.G., Converse, C.A. 2002. Stabilization of all trans retinol by cyclodextrins : a comparative study using HPLC and fluorescence spectroscopy. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 44(1-4), 155-158.

Shah, B., Davidson, P.M., Zhong, Q. 2012. Encapsulation of eugenol using Maillard-type conjugates to form transparent and heat stable nanoscale dispersions. LWT – Food Science and Technology 49, 139-148.

Shenoy, V.R. 1993. Maillard reaction and its applications. Journal of Science Industrial Research 52, 684-689.

Shutava, T.G., Balkundi, S.S., Lvov, Y.M. 2009. Epigallocatechin gallate/gelatin layer-by-layer assembled films and microcapsules. Journal of Colloid and Interface Science 330, 276-283.

Siebert, K.J., Carrasco A., Lynn P. Y. 1996a. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, 1997-2005.

Siebert, K.J., Lynn, P. Y. 2001. The effect of pH on protein-polyphenol particle size. European Brewery Convention, Congress 28 th, Budapest; EBC (pp791-800)

Siebert, K.J., Troukhanova N.V., Lynn P.Y. 1996b. Nature of polyphenols-protein interactions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, 80-85.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Siebert K.J. 1999. Haze formation in beverages. LWT Food Science and Technology. 39, 987-994.

Siebert, K.J. 2006. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 353-362.

Siefarth, C., Tyapkova, O., Beauchamp, J., Scweiggert, U., Buettner, A., Bader, S. 2011. Influence of polyols and bulking agent on flavor release from low viscosity solutions. Food Chemistry 129, 1462-1468.

Sigurdsson, H.H., Kirch, J., Lehr, C.M. 2013. Mucus as a barrier to lipophilic drugs. International Journal of Pharmaceutics 453, 56-64.

Singh, A.K., & Das, J. 1998. Liposome encapsulated vitamin A compounds exhibit greater stability and diminished toxicity. Biophysical Chemistry 73(1-2), 155-162.

Singh, H., Sarkar, A. 2011. Behaviour of protein-stabilised emulsion under various physiological conditions. Advances Colloid and Interface Science 165, 47-57.

Singh, S., Rao, K.V.R., Venugopal, K., Manikandan, R. 2002. Alteration in dissolution characteristics of gelatin-containing formulations. A reviews of the problem, test methods and solution. Pharmaceutical Technology.

Smart, J.D. 2005. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. Advanced Drug Delivery Reviews 57, 1556-1568

Snoeren, T. H. M. 1975. Electrostatic interaction between kappa carrageenan and k-casein, Milchwissenchaft 30, 393-395.

Soutward, C.R. 1989. Use of casein and caseinates. In P.F. Fox Developments in dairy chemistry, functional milk protein (pp. 173). New York : Elsevier Applied Science

Steenbock, H. 1919. White corns vs yellow corn and a probable relation between the fat soluble vitamin and yellow plant pigment. Science 50(1253), 352-353.

Stephan, A., Bücking, M., Steinhart, H. 2000. Novel analytical tools for food flavours. Food Research International 33, 199-209.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Stratulat, I., Britten, M., Salmieri, S., St-Gelais, D., Champagne, C.P., Fustier, P., Lacroix, M. 2013. Encapsulation of coenzyme Q10 in a simple emulsion based nutraceutical formulation and application in cheese manufacturing. Food Chemistry 141, 2707-2712.

Strauss, G., Gibson, S.M. 2004. Plant phenolic as cross-linkers of gelatin gels-based coacervates for use as food ingredients. Food Hydrocolloid 18, 81-89.

Sung H.W., Liang H.C., Chang W.H., Tu H. 2007. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as drug carrier. US 7.282.220 B1.

Sung H.W., Tu H. 2004. Drug loaded biological material treated with genipin. WO 2004/012676 A2.

Swaisgood, H.E. 1993. Review and update of casein chemistry. Journal of Dairy Science 76(10), 3054-3062.

Taha, E.I., Al-Saidan, S., Samy, A.M., Khan, M.A. 2004. Preparation and in vitro characterization of self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of all-trans-retinol acetate. International Journal of Pharmaceutics 285(1-2), 109-119.

Tanga, C.H., Chena, L., Mab C.Y. 2009. Thermal aggregation, amino acid composition and invitro digestibility of vicilin-rich protein isolates from there *Phaseolus* legumes: a comparative study. Food Chemistry 113(4), 957-963.

Tesoriere, L., D'Arpa, D., Re, R., Livrea, M.A. 1997. Antioxidant reactions of all-trans retinol in phospholipid bilayers : effect of oxygen partial pressure, radical fluxes, and retinol concentration. Archives of Biochemistry and Biophysics 343(1), 13-18.

Vasir, J.K., Tambwekar, K., Garg, S. 2003. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. International Journal of Pharmaceutics 255, 13-32.

Veis, A. 1964. The macromolecular chemistry of gelatin. Academic Press : London.

Von Staszewski, M., Pizones Ruiz-Henestrosa, V., Pilosof, A.M.R. 2014. Green tea polyphenol-β-lactoglobulin nanocomplexes: interfacial behavior, emulsification and oxidation stability of fish oil. Food Hydrocolloids 35, 505-511.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUV**W**XYZ

Waghorn, G.C. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production. Progress and Challenges. Animal Feed Science Technology 147, 116-139.

Wan, Z.L., Wang J.M., Wang L.Y., Yuan, Y., Yang, X.Q. 2014. Complexation of resveratrol with soy protein and its improvement on oxidative stability of corn oil/water emulsions. Food Chemistry 161, 324-331.

Wang, B., Adhikari, B., Barrow, C.J. 2014. optimization of the microencapsulation of tuna oil in gelatin-sodium hexametaphosphate using complex coacervation. Food Chemistry 158, 358-365.

Wang, J., Tauch, Y., Deguchi, Y., Morimoto, K., Tabata, Y., Ikada, Y. 2000. Positively charged gelatin microspheres as gastric mucoadhesive drug delivery system for clearance of *H. pylori*. Drug Delivery 7, 237-243.

Wang, J., Tabata, Y., Bi, D., Morimoto, K. 2001. Evaluation of gastric mucoadhesive properties of aminated gelatin microspheres. Journal of Controlled Release 73, 223-231.

Ward, A.G., & Courts, A. 1977. The science and technology of gelatin. London : Academic Press.

Wen-qiong, W., Yi-hong, B., Ying, C. 2013. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interaction in a whey protein isolate and sugar system. Food Chemistry 139, 355-361.

Wihodo, M., & Moraru, C.I. 2013. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: a review. Journal of Food Engineering 114, 292-302.

Wong, B.T., Day, L., Augustin, M.A. 2011. Deamidated wheat protein-dextran Maillard conjugates : effect of size and location of polysaccharide conjugated on steric stabilization of emulsion at acidic pH. Food Hydrocolloid 25, 1424-1432.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Wood, A., Ogawa, M., Portier, R.J., Schexnayder, M., Shirley, M., Losso, J.N. 2008. Biochemical properties of alligator (*Alligator mississippiensis*) bone collagen. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 151, 246-249.

Wu, J., Chen, S., Ge. S., Miao, J., Li, J., Zhang, Q. 2013. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. Food Hydrocolloids 32, 42-51.

Wu, L.C., Lu, Y.W. 2004. Electrophoretic method for the identification of haze-active protein in grape seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 3130-3135.

Wu, L.C., Siebert, K.J. 2002. Characterization of haze-active proteins in apple juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 3828-3834.

Wulff, G., Avgenaki, G., Guzmann, M.S.P. 2005. Molecular encapsulation of flavours as helical inclusion complexes of amylase. Journal of Cereal Science 41, 239-249.

Xu, C.H., Yang, X.Q., Yu, S.J., Qi, J.U., Guo, R., Sun, W.W., Yao, Y.J., Zhao, M. 2010. The effect of glycosylation with dextran chains of differing lengths on the thermal aggregation of β-conglycinin and glycinin. Food Research International 43, 2270-2276.

Yadhav, M.P., Parris, N., Johnston, D.B., Onwulata, C.I., Hicks, K.B. Corn fiber gum and milk protein conjugates with improved emulsion stability. Carbohydrate Polymers 81, 476-483.

Yan, L., Zhao, G., Zhao, M., Ren, J., Yang, B. 2012. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction. Food Chemistry 131, 901-906.

Yan, M., Li, B., Zhao, X., Yi, J. 2011. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin. Food Hydrocolloids 25, 907-914.

Yao, C.H., Liu, B.S., Chang, C.J, Hsu, S.H, Chen, Y.S. 2004. Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. Material Chemistry and Physics 83, 204-208.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Yoshida, K., Sekine, T., Matsuzaki, F., Yanaki, T., Yamaguchi, M. 1999. Stability of vitamine A in oil in water in oil type multiple emulsions. Journal of the American Oil Chemists'Society 76(2), 1-6.

Young, S.L., Sadra, X., Rosenberg, M. 1993. Microencapsulating properties of whey proteins. 2. Combination of whey proteins with carbohydrates. Journal of Dairy Sciences 76, 2878-2885.

Zafeiropoulou, T., Evageliou, V., Gardeli, C., Yanniotis, S., Komaitis, M. 2012. Retention of selected aroma compounds by gelatine matrice. Food Hydrocolloids 28, 105-109.

Zhang, J.B., Wu, N.N., Yang, X.Q., He, X.T., Wang, L.J. 2012. Improvement of emulsifying properties of Maillard reaction products from β-conglycinin and dextran using controlled enzymatic hydrolysis. Food Hydrocolloids 28, 301-312.

Zhang, Z.Q., Pan, C.H., Chung, D. 2011. Tannic acid cross-linked gelatin-gum Arabic coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate : characterization and in vitro release study. Food Research International 44, 100-1007.

Zhang, Y, & Zhong, Q. 2013. Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions. Food Hydrocolloids 33, 1-9.

Zhang, Y., Niu, Y., Luo, Y., Ge, M., Yang, T., Yu, L., Wang, Q. 2014. Fabrication, characterization and anti-microbial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. Food Chemistry 142, 269-275.

Zhang, Z., Decker E.A., McClements, D.J. 2014. Encapsulation, protection, and release of polyunsaturated lipids using biopolymer-based hydrogel particles. Food Research International 64, 520-526.

Zheng, C., Zhang, X.G., Sun, L., Zhang, Z.P., Li, C.X. 2013. Biodegradable and redox-responsive chitosan/poly(L-aspartic acid) submicron capsules for transmucosal delivery of proteins and peptides. Journal of Material Science : Material Medical 24, 931-939.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

Zhao, Q., Duan, C.Q., Wang, J. 2010. Anthocyanins profiles of grape berries of *Vitis amurensis*, its hybrids ad their wines. International Journal of Molecular Sciences 11(5), 2212-2228.

Zhou, L. & Elias, R.J. 2013. Antioxydant and pro-oxidant activity of (-) epigallocatechin-3-gallate in food emulsions : influence of phenolic concentration. Food Chemistry 138, 1503-1509.

Zoecklein, B., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., Nury, F.S. 1995. Wine analysis and production. New York : Chapman & Hall.

Zuidam, N.J., Nedovic. 2010. Encapsulation technologies for Active Food Ingredient and Food Processing

Utilisation et fonctionnalisation de protéines pour la conception de nouvelles microsphères permettant la protection et le relargage contrôlé de vitamine A

Résumé :

Le principal objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'influence de la fonctionnalisation des protéines par des sucres ou des polyphénols de raisin dans la formulation et le comportement de microsphères de vitamine A. La formulation de différents conjugués issus soit de la réaction de Maillard soit de la complexation des polyphénols sur les protéines a été effectué sur trois matières premières protéiques : les protéines de pois, le caséinate de sodium de lait de vache et la gélatine de type A porcine. Dans une première partie, les caractéristiques et le pouvoir émulsifiant des conjugués ont été étudiés, et ont confirmé le potentiel de stabilisation d'une huile dans le temps. Une seconde partie s'est concentrée sur les observations au microscope électronique à balayage des microsphères et sur une méthodologie d'observation spécifique à ce genre d'échantillon. Une troisième partie a étudié l'influence des fonctionnalisations sur la stabilité de la vitamine A dans le temps, sur sa libération dans des milieux de digestion gastriques et entériques simulés, et sur la libération de géraniol coencapsulé. La dernière étude a portée sur le potentiel mucoadhésif des microsphères en utilisant une technique d'analyse originale.

Mots-Clés : Protéine, Polyphénol, Réaction de Maillard, Fonctionnalisation, Microencapsulation, Vitamine A, Emulsion, Atomisation, MEB, Relargage, Géraniol, Mucoadhésion,