



HAL
open science

Etude in vitro et in silico de l'extraction, modification chimique et assemblage de phospholipides pour la construction de nouvelles vésicules végétales : exemple de la caméline

Jean-François Fabre

► To cite this version:

Jean-François Fabre. Etude in vitro et in silico de l'extraction, modification chimique et assemblage de phospholipides pour la construction de nouvelles vésicules végétales : exemple de la caméline. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2019. Français. NNT : 2019INPT0066 . tel-04167838

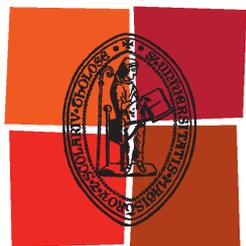
HAL Id: tel-04167838

<https://theses.hal.science/tel-04167838v1>

Submitted on 21 Jul 2023

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 Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

M. JEAN-FRANCOIS FABRE

le jeudi 4 juillet 2019

Titre :

Etude in vitro et in silico de l'extraction, modification chimique et assemblage de phospholipides pour la construction de nouvelles vésicules végétales : exemple de la caméline.

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)

Directeur(s) de Thèse :

M. ZEPHIRIN MOULOUNGUI

Rapporteurs :

M. BERNARD KUREK, INRA REIMS

M. THIERRY DURAND, CNRS

Membre(s) du jury :

M. THIERRY BENVENU, ECOLE NATIONALE SUP DE CHIMIE DE RENNES, Président

M. FREDERIC FINE, TERRES INOVIA, Membre

M. FREDERIC POUJAUD, PANAM FRANCE SARL, Invité

Mme CHRISTINE RAYNAUD, TOULOUSE INP, Membre

Mme CORINNE DUFAURE, TOULOUSE INP, Membre

M. ZEPHIRIN MOULOUNGUI, INRA TOULOUSE, Membre

« Le secret du bonheur consiste à regarder toutes les merveilles du monde et ne jamais oublier les deux gouttes d'huile dans la cuiller » - Paulo Coelho (l'Alchimiste)

Remerciements

Les travaux exposés ici n'ont pu être réalisés qu'avec le concours scientifique de collègues et partenaires académiques ou industriels. De même, la réalisation de cette thèse n'a été possible que grâce à un cadre de travail rendu favorable par les différents membres du LCA. Enfin, la persévérance, la motivation, l'énergie et les ressources engagées pendant ces années n'ont pu être mobilisées que par l'aide de mes amis et des membres de ma famille. Je tiens à exprimer ici ma reconnaissance envers toutes ces personnes. J'en oublierai certainement et excusez par avance mes oublis ou le choix des mots qui ne seront peut-être pas toujours au niveau de la gratitude que je leur dois. Ne cherchez pas non plus une hiérarchie dans la place des remerciements quand il s'agit surtout d'un souci d'organisation.

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury pour avoir examiné ce manuscrit et apporté leurs commentaires.

Je remercie en particulier M. Bernard Kurek et M. Thierry Durand d'avoir accepté d'être rapporteur et pris le temps de me faire profiter de toute leur expertise. Je remercie M. Benvegnu d'avoir accepté la présidence de ce jury, Mme Dufaure-Lacaze pour sa disponibilité, M. Fine pour l'intérêt exprimé pour ces travaux, M. Poujaud pour avoir partagé sa passion des graines de chia. Je remercie Mme Raynaud pour ses encouragements et sa gentillesse. Je la remercie aussi pour m'avoir permis de profiter de méthodes et équipements mis au point par le CRT-CATAR qu'elle dirige.

Je tiens à profondément remercier mon directeur de thèse, M. Mouloungui, qui m'a conduit sur la piste de l'oxygène singulet, des vésicules et du mucilage et m'a fait confiance pour aller au bout de ce chemin. Je tiens à le remercier également pour son accompagnement constant depuis 2004, année où il m'a accueilli et apporté sa confiance au sein du LCA. Les nombreux projets sur lesquels il m'a permis de collaborer ont contribué à la pluridisciplinarité de ce travail.

Je tiens ensuite à remercier mes collègues et relations académiques ou industrielles qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Je remercie profondément Muriel Cerny pour toutes les analyses chromatographiques (CLHP, CG, SPE) réalisées sur les phospholipides sans lesquelles ce travail n'aurait pu aboutir. Je la remercie également pour sa gentillesse, sa disponibilité, les échanges sur GoT.

Je remercie Audrey Cassen pour son aide dans la réalisation et l'exploitation des analyses RMN mais aussi pour la fourniture d'émulsions d'oléosomes de tournesol. Je la remercie également pour son naturel, sa bonne humeur et son humour qui ont égayé le bureau en 2016-2017.

Je remercie Romain Valentin pour son aide à la préparation de la soutenance mais aussi pour son expertise scientifique dans les propriétés interfaciales des tensioactifs biosourcés, objet de nombreuses discussions très enrichissantes.

Je remercie Gilles Humbert pour sa disponibilité et sa haute technicité qui ont permis la réalisation de pièces indispensables au bon fonctionnement de la colonne à ultrasons, citons notamment le châssis, le module de filtration, les raccords pour la recirculation, la pâle d'agitation.

Je remercie Marc Védrenne pour l'analyse des phospholipides et la disponibilité et la gentillesse dont il a alors fait preuve.

Je remercie Anne Lung pour l'utilisation de ses résultats en ADF/NDF sur les graines de caméline, pour l'utilisation du lyophilisateur et pour ses remarques et conseils qui aident à toujours maintenir un environnement de travail propre.

Je remercie Bruno Payré et Dominique Goudounèche pour la formation sur la Cryo-MEB et leur aide pour les analyses réalisées au CMEAB.

Je remercie Brigitte Dubreuil pour son aide à l'implémentation d'un mode pulsé sur la colonne à ultrasons et sa disponibilité lorsque ses compétences en électronique ont été sollicitées.

Je remercie Clément Dubéros et Monique Gueunier pour leur collaboration au sein du programme SMONFERT. J'ai beaucoup apprécié leur gentillesse et amabilité.

Je remercie mon stagiaire Kambiz Matboo-Raftarhaghi pour son travail sur le dosage des phospholipides par spectrométrie infrarouge.

Je remercie Olivier Leroux d'être venu à ma soutenance, pour sa gentillesse et son aide dans l'acquisition de compétences en rhéométrie.

Je remercie Winda Rahmalia pour m'avoir associé à ses travaux sur les propriétés électroniques de la Bixine, un sujet passionnant qui m'a inspiré à utiliser une oxydation par photosensibilisation des phospholipides. Je la remercie pour son énergie, sa persévérance, son sourire.

Je remercie Christopher Wallis pour m'avoir initié aux polymères hyperbranchés et pour l'article que nous avons rédigé avec Marine. Je le remercie pour sa grande curiosité (scientifique mais aussi historique, musicale...), sa perspicacité, nos nombreuses discussions.

Je remercie Sophie Capblancq pour son aide à l'utilisation du SUNTEST et pour son sourire communicatif. Je la remercie aussi pour sa grande cuisine et pour m'avoir apporté son soutien à ma soutenance.

Je remercie Dominique Laporte d'être venue à ma soutenance et pour son aide à l'utilisation du spectrophotomètre.

Je remercie Karine Trémauville, Isabelle Noël, Marie-Christine Talou, Ingrid Pelletier, Emmanuelle Dao, Isabelle Bauvies, Christina Labéjof qui permettent ou ont permis à tous les rouages de ce laboratoire de bien fonctionner ensemble. Je remercie aussi Emmanuelle pour m'avoir régulièrement fait goûter les fruits de son jardin ou de sa cuisine, Karine pour sa jovialité et sa réactivité, Christina pour ses chouquettes, son aide dans l'organisation de la soutenance et sa constante bonne humeur.

Je remercie Mireille Juan pour avoir assuré la coordination de l'équipe Lipochimie et aussi pour sa gentillesse et les nombreux repas partagés au RU.

Je remercie Didier Dangla pour toute l'aide logistique apportée pendant toutes ces années, sa profonde humanité, sa grande disponibilité. Je le remercie d'avoir abandonné temporairement ses nouvelles activités pour assister à ma soutenance.

Je remercie Gérard Vilarem et Carlos Vaca-Garcia pour avoir assuré la bonne marche du LCA pendant ces années. Ils ont succédé à Marie Elisabeth Borredon et Antoine Gaset que je remercie également pour m'avoir accueilli au sein du LCA.

Je remercie ensuite mes amis du LCA qui m'ont parfois considérablement aidé au niveau scientifique mais dont l'amitié m'a été encore plus précieuse.

Je remercie Eric Lacroux pour toute son aide dans l'extraction du mucilage de graines et la conception de la colonne à ultrasons en recirculation. Je le remercie également pour sa décontraction, son humour, tous les moments partagés au labo, en mission et particulièrement en Floride lors du congrès AOCS 2017.

Je remercie Gwendoline Gravé pour son aide dans l'extraction du mucilage de graines, la collecte et le traitement des données recueillies. Je la remercie pour son énergie, sa sollicitude mais aussi pour ses talents d'hôte, son organisation de soirées jeux, week-ends et escape games mémorables. Je la remercie aussi pour le prêt de sa Getz.

Je remercie Guadalupe Vaca-Medina pour les nombreuses années passées sur les graines oléoprotéagineuses, son aide dans la préparation de la soutenance mais aussi pour les nombreux moments partagés hors du labo.

Je remercie Mike pour sa gentillesse, son humilité, son soutien au LCA et à côté. Sa présence a beaucoup compté dans le bureau et m'a motivé à réaliser cette thèse.

Je remercie Justine Pincemaille, Rémi Nguyen, Alexis Duda, William Tapia pour les différents restos, escape games, soirées passées en si bonne compagnie.

Je remercie Lionel Rémissé, Sarra Tadrent et Clément Giry pour leurs remarques, leur aide pour la logistique de la soutenance mais aussi pour les soirées passées ensemble et les pauses thés si conviviales. Je remercie également Clément Giry pour les nombreuses réunions passées avec Gwendoline et David, ses idées de sorties et ses talents culinaires qui ont pu être appréciés de même que sa culture marseillaise.

Je remercie David Bertrand pour sa gentillesse, sa sollicitude, son goût partagé pour les jeux de société et son esprit libre.

Je remercie Romain Armengeau pour toute son aide apportée au quotidien avec tant de spontanéité. Je le remercie également pour les nombreuses discussions politico-sociales au RU ou au bureau.

Je remercie ensuite mes amis hors LCA. Ils ont pu connaître ce laboratoire mais c'était avant ma thèse. Je les remercie en tout cas pour tout le soutien qu'ils ont pu m'apporter au cours de ces trois années et demi.

Je remercie Sébastien pour son amitié constante et tous les moments partagés pendant cette thèse, faciles ou difficiles. Je le remercie notamment pour sa disponibilité et son soutien, pour les congés pris pour ma soutenance, m'ayant fortement aidé à la préparer.

Je remercie Verónica, Nicolas et leur bébé Emilio pour les soirées hebdomadaires passées chez eux, pauses indispensables où la thèse se faisait oublier dans les bons plats mijotés alors. Je les remercie aussi pour les canelés, le marché de Saint Aubin, les week-ends, les vacances passées ensemble.

Je remercie Isabelle pour son amitié, son hospitalité à Joué-les-Tours, ses efforts pour descendre à Toulouse, les nombreux partages d'excursions touristiques et culturelles.

Je remercie Anthony pour son amitié, les sorties et week-ends effectués pendant ces 3,5 années. Je le remercie de s'être rendu disponible pour ma soutenance. Je ne le remercie pas par contre pour les parties de bowlings qu'il ne m'a pas laissé gagner.

Je remercie Clément pour sa bonne humeur et pour tous les partages musicaux autour du piano ou des moments de convivialité autour d'une bonne bière.

Je remercie Erik et Andrea, Bertrand et Fernanda, Hervé et Shengnan pour les parties de cartes, les nombreuses rigolades au cours de week-ends à Toulouse et ailleurs. Je remercie particulièrement Andréa et Shengnan d'être venues à ma soutenance. Je remercie aussi Erik pour son gâteau arc-en-ciel, les parties de Loup Garou, les blagues (pas) toujours fines, Andrea pour sa sympathie, ses rires, son autodérision. Je remercie aussi Bertrand pour sa sérénité, sa gentillesse, ses talents de bricolage et la garbure béarnaise, Fernanda pour son humour et son hospitalité. Je remercie aussi Hervé pour les nombreuses parties de badminton qui ont permis de décompresser le mercredi midi. Avec Shengnan et leur fille Lola, je les remercie d'avoir apporté beaucoup de sourires et de gaieté au cours des nombreuses sorties passées ensemble. Je ne les remercie pas par contre pour le week-end passé au ski où je me suis blessé le genou.

Je remercie Luc pour sa très longue amitié orthézienne (depuis la maternelle), les partages autour de la musique (souvent un peu trop Hard pour moi), les BDs, le cinéma.

Je remercie Shasha pour son naturel, son humour, sa gentillesse, ses encouragements depuis la Chine.

Je remercie Anne, son mari Philippe et leurs enfants Louise et Thomas pour leur amitié, leur gentillesse et leur hospitalité.

Je remercie Stéphanie pour sa bonne humeur, les pauses au LCA, les retrouvailles à Saint Orens avec Mike.

Je remercie Jazia, Christian et Mamadou pour leurs témoignages d'amitié si loin de Toulouse.

Je remercie Pinpin et Arielle pour leur hospitalité et leur gentillesse calédonienne.

Je remercie Hervé d'être venu à ma soutenance, pour ses encouragements et ses conseils.

Je remercie Jean-Brieux pour les discussions et partages musicaux. Libérés de nos engagements doctoraux, j'espère que notre projet de livre pourra davantage se concrétiser.

Je remercie Julien pour notre longue amitié bordelaise. J'espère que nos discussions jusqu'au bout de la nuit, les cinémas, nos délires vont repartir de plus belle après cette thèse.

Je remercie enfin ma famille. Sans son amour et son soutien, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail.

Je remercie tout d'abord ma mère qui m'a donné le goût des sciences et m'a toujours accompagné de son amour, même de là-haut.

Je remercie mon père pour m'avoir toujours soutenu et supporté pendant les week-ends et les vacances de ces années de thèse. Je le remercie aussi pour sa tolérance, pour son partage de connaissances et ses compétences de linguiste qui m'ont permis d'améliorer mon écriture et mon langage.

Je remercie ma sœur Isabelle, son compagnon Rémy et mes neveux et nièces Jolan, Hanaé et Maël d'être venus de Guadeloupe. Leur présence et leur amour m'ont été d'une grande aide non seulement pour la soutenance mais pendant toutes les années de cette thèse.

Je remercie mon frère d'être venu de Nouvelle Calédonie pour ma soutenance. Sa présence m'a beaucoup touché de même que son soutien dans les moments de doute.

Je remercie aussi Nancy et mes nièces Noa et Solveig pour toute leur affection qui m'ont permis de décompresser en Nouvelle Calédonie ou en métropole.

Je remercie Annie pour m'avoir tout le temps encouragé pendant ces années avec sa profonde affection, soutenu dans tous les moments difficiles. Je n'oublie pas aussi son apport scientifique avec les lointaines mais nombreuses années de cours de physique-chimie.

Je remercie mon parrain Jeannot de m'avoir apporté tant d'amour et d'avoir toujours placé sa confiance en moi. J'aurais tant souhaité le voir présent à ma soutenance. Sa disparition quelques

semaines avant le début de la thèse n'a pas fait oublier ce qu'il a apporté en humanité, humilité, gentillesse et sollicitude.

Je remercie ma cousine Sandrine pour son affection et sa spontanéité. Je la remercie de même que Cédric d'avoir tout de suite accepté de venir à ma soutenance. Je remercie aussi son fils Thomas d'avoir essayé de venir.

Je remercie ma cousine Anne, son mari Roland et leur enfant Thomas pour m'avoir témoigné de leur affection à Tokyo, Koumac ou Cestas. Je remercie aussi Anne de m'avoir ouvert la voie même si je pense qu'elle comprendrait sûrement mieux ma thèse ès sciences des agroressources que je n'ai compris la sienne en astrophysique.

Je remercie mes oncles Jacques et Pierre qui m'ont donné le goût des études. Je les remercie d'être venus m'apporter leur soutien. Je remercie aussi ma défunte tante Marie-Françoise qui a tant fait pour l'unité de cette famille.

Je remercie Françoise d'être venue avec toute sa bonne humeur communicative.

Je remercie ma grand-mère Marguerite, ma marraine Christiane et son mari Claude, aujourd'hui disparus mais dont l'héritage moral et humain m'a porté pendant cette thèse.

Je remercie Nora, chienne extrêmement dynamique et affectueuse qui a apporté beaucoup de chaleur au cours de mes week-ends orthéziens.

Enfin, je terminerai par quelques remerciements particuliers

Je voudrais ainsi remercier les différents instituteurs, enseignants au collège, lycée, prépa, école d'ingénieurs, DEA... qui ont compté pour moi et ont toujours su partager leur goût des sciences (M. Ricarrère, M. Hounie à la Chaussée de Dax, M. Thiery, Mme Thomas, Mme Cardine, Mme Ponticq au collège/lycée Gaston Phébus, M. Roussell à la prépa PCSI Camille Jullian, M. Bothorel à l'ENSCPB, M. Schvoerer au CRPAA).

Enfin, si ce sont surtout des scientifiques qui ont inspiré et guidé ces travaux, ce sont principalement des musiciens qui m'ont aidé à trouver l'inspiration au cours des longues heures de rédaction de ce manuscrit. Je remercie ainsi particulièrement Gottschalk, Liszt, Chopin, Tchaïkovski, Espadéro, Beethoven, Verdi mais aussi Hurwitz, Zimmer, Horner, Muse, AC/DC, U2, Queen... pour m'avoir accompagné de leur musique pendant la rédaction de cette thèse.

Table des matières

<i>Table des matières.....</i>	<i>i</i>
<i>Liste des abréviations.....</i>	<i>iii</i>
<i>Introduction Générale</i>	<i>1</i>
<i>Chapitre 1. Synthèse Bibliographique.....</i>	<i>7</i>
1.1. Le Mucilage.....	9
1.2. Les Phospholipides.....	21
1.3. Extraction des phospholipides végétaux	34
1.4. Oxydation des phospholipides	38
1.5. Perméabilité des bicouches lipidiques.....	47
1.6. Bicouches lipidiques oxydées	56
1.7. Conclusion sur la partie bibliographique	68
<i>Chapitre 2. Matériels et Méthodes</i>	<i>69</i>
2.1. Méthodes d'extraction du mucilage	71
2.2. Appareils de conditionnement du mucilage	74
2.3. Appareils/Méthodes d'analyse du mucilage	75
2.4. Appareils/Méthodes d'analyse des phospholipides.....	82
2.5. Appareils/Méthodes d'analyse des vésicules	86
2.6. Extraction de l'huile	89
2.7. Modélisation moléculaire	90
2.8. Modélisation Gros-Grains	92
2.9. Exploitation des données in silico	94
2.10. Traitement statistique des données.....	94

Chapitre 3. Extraction du mucilage de caméline.....	97
3.1. Caractérisation des graines.....	99
3.2. Utilisation d'une sonde à ultrasons.....	103
3.3. Utilisation d'une colonne à ultrasons.....	105
3.4. Composition en monosaccharides.....	132
3.5. Composition en acides aminés.....	134
3.6. Teneur en cendres.....	137
3.7. Conclusion sur l'extraction du mucilage.....	138
Chapitre 4. Extraction des phospholipides.....	141
4.1. Mise au point d'une méthode simplifiée d'analyse des phospholipides.....	143
4.2. Extraction des phospholipides de l'huile.....	160
4.3. Extraction de l'huile des graines de caméline.....	163
4.4. Extraction de l'huile des tourteaux.....	170
4.5. Conclusion sur l'extraction des phospholipides.....	179
Chapitre 5. Modification des phospholipides.....	181
5.1. Etude in vitro de l'oxydation des phospholipides.....	183
5.2. Etude in silico.....	218
5.3. Conclusion sur la modification chimique des phospholipides.....	230
Conclusion générale.....	232
Références.....	235
Liste des figures.....	259
Liste des tableaux.....	265
ANNEXES.....	268

Liste des abréviations

PL : Phospholipide

DM : Dynamique moléculaire

MB : Bleu de méthylène

EtOH : Ethanol

EtAc : Acétate d'éthyle

MeOH : Méthanol

DMSO : Diméthylsulfoxyde

CG : Chromatographie en phase gazeuse

SPE : Extraction en phase solide

CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance

Suffixes des phospholipides :

PA : Acide phosphatidique

PE : Phosphatidyléthanolamine

PC : Phosphatidylcholine

PI : Phosphatidylinositol

PG : Phosphatidylglycérol

Préfixes des phospholipides:

M : Myristyl

P : Palmityl

O : Oléyl

L : Linoléyl ou Lyso (si un seul préfixe)

Ln : Linolényl

S : Stéaryl

D : Di (exemple : DLPC : dilinoléylphosphatidylcholine)

Phospholipides oxydés:

9-DLPC-OOH : 1-linoléyl, 2-[9-hydroperoxy-(10E, 12Z)linoléyl]-3-*sn*-phosphatidylcholine

13-DLPC-OOH : 1,linoléyl, 2-[(9Z, 11E)-13-hydroperoxylinoléyl]-3-*sn*-phosphatidylcholine

9,9-DLPC-OOH : 1,2-[9-hydroperoxy-(10E, 12Z)linoléyl]-3-*sn*-phosphatidylcholine

13,13-DLPC-OOH : 1,2-[13-hydroperoxy-(9Z, 11E)linoléyl]-3-*sn*-phosphatidylcholine

Introduction Générale

Avec le développement croissant des filières d'agriculture biologique/raisonnée et des circuits courts, il apparaît que les consommateurs associent de plus en plus le souci de leur santé avec celui de leur environnement. De même, il est de plus en plus exigé que l'aliment ne soit pas trop sucré, salé et même qu'il puisse posséder des vertus thérapeutiques avec des ingrédients susceptibles d'améliorer le bien-être et la qualité de vie. Il n'y a qu'un pas, ainsi, à ce que les médicaments ou les produits de soin soient eux-aussi regardés de plus près. S'il n'est encore pas toujours possible de trouver des alternatives vertes aux principes actifs utilisés dans la plupart des cas, le conditionnement de ces derniers et leur formulation peuvent bénéficier de nombreux ingrédients naturels ou biosourcés qui associent des propriétés hautement valorisables (tensioactives, émoullientes, épaississantes...). Dans ces ingrédients, les phospholipides occupent une place de choix. En plus de leurs propriétés tensioactives reconnues qui leur permettent d'être utilisés dans de nombreuses formulations alimentaires et cosmétiques (principalement sous le nom de «*lécithine*»), ils ont la capacité de former des vésicules («*liposomes*») dans l'eau et ainsi de pouvoir encapsuler des substances afin d'en assurer le conditionnement et même d'en gérer la libération. La propriété la plus critique concernant le vecteur d'une substance active est en effet sa capacité à libérer cette dernière au bon moment de façon à en assurer le transport vers la zone à traiter. Il importe ainsi de pouvoir jouer sur une large gamme de perméabilités et de stabilités selon différentes contraintes chimiques et mécaniques. La synthèse chimique à façon de molécules ou polymères permet d'obtenir des propriétés de degrés et cinétiques très précis, s'adaptant à l'environnement chimique (par exemple pH et force ionique). Cette synthèse est principalement réalisée à partir de synthons d'origine fossile bien qu'il soit possible d'obtenir une large gamme de molécules ou macromolécules à partir de synthons biosourcés (Sheldon, 2014). De par leur forte variabilité naturelle, dépendant de la nature de leurs têtes polaires et chaînes grasses, les phospholipides peuvent former déjà une importante gamme de vésicules ou membranes différentes, telles qu'elles se rencontrent dans les organismes vivants. Cependant, leur modification chimique pourrait élargir celle-ci, notamment au niveau de la taille et de la perméabilité de ces organisations. Une modification naturelle des phospholipides est l'oxydation, généralement responsable d'une augmentation de la perméabilité des vésicules et d'une rupture de ces dernières dans le cas critique. Cependant, est-il possible de contrôler cette oxydation pour pouvoir gérer la perméabilité de vésicules phospholipidiques ? C'est la première question qui a été posée ici. L'application potentielle de telles vésicules dépend évidemment de la précision de leur

degré de modification chimique et du coût ainsi engendré. Les modifications simples pourraient par exemple trouver des applications dans des formulations agronomiques, permettant dans ce cas d'apporter des nutriments ou des substances phyto-actives aux plantes. Le projet SMON-FERT RECH n°14050981 (Systèmes Moléculaires Organisés Naturels (SMON) comme véhicules des matières actives bioFERTilisantes), s'appuie justement sur des productions agricoles régionales, notamment de tournesol et de soja, pour obtenir de nouvelles structures chimiques biosourcées capables de transporter des nutriments ou principes actifs aux plantes, en alternatives aux adjuvants phytosanitaires classiques. Ce projet a été initié entre le laboratoire de Chimie Agro-Industrielle, et la société AGRONUTRITION (Carbonne, Occitanie) rassemblés au sein du LabCom C2R Bionut (Laboratoire Commun de la Chimie du Carbone renouvelable pour la biofertilisation et la nutrition des plantes), en partenariat avec le laboratoire LRSV (Toulouse, Occitanie). Il pourrait ainsi bénéficier de telles vésicules. Citons également dans ce projet d'autres structures composées de phospholipides comme les émulsions directes H/E (Huile dans Eau) d'oléosomes natifs et les émulsions complexes (H/E, E/H/E...) d'oléosomes modifiés des plantes oléoprotéagineuses. Dans le premier cas, avec un cœur composé de triglycérides et une membrane constituée de phospholipides (monocouche) et de protéines agissant en synergie (Deleu *et al.*, 2010), ces oléosomes peuvent encapsuler des composés lipophiles. Dans le deuxième cas, l'hydrolyse des triglycérides permet l'obtention d'émulsions complexes (H/E, E/H/E...) et ainsi l'encapsulation de composés hydrophiles (Emulsions E/H/E) et lipophiles (H/E, E/H/E). Un procédé contrôlé d'oxydation des phospholipides pourrait ainsi également intervenir sur les propriétés encapsultrices de ces structures. Si cette application des phospholipides forme une boucle, allant de la plante à la plante, une approche véritablement écoresponsable (« du berceau au berceau ») doit mettre l'accent sur l'origine des phospholipides. Présents dans la plupart des graines oléagineuses, les phospholipides commerciaux viennent cependant presque exclusivement du soja et leur mode d'obtention est rarement précisé. Il importe de varier leur source en utilisant une graine préalablement choisie mais surtout de les obtenir au travers d'un schéma intégré à multi-sortie et à zéro déchet. Le laboratoire de chimie agro-industrielle s'est depuis toujours intéressé à la valorisation des graines oléoprotéagineuses au sein de nombreux projets impliquant des partenaires académiques et industriels, qu'ils soient interrégionaux (OLEOMA 2004-2010 RECH 0401116, 0514077, 07003773, 09007560 UCAI/ITERG) ou européens (IBIOLAB 2006-2009 UCAI/ITERG). Actuellement, en collaboration avec l'entreprise PANAM (Villemur-sur-Tarn, Occitanie), une filière de culture et valorisation de graines de chia (*Salva Hispanica*) a été mise en place en France (Projet FEDER CHIA-EASYNOV 2017-2018 RECH 16004168

UCAI/PANAM/EMERAUDE) tandis qu'avec l'Institut Jean Pierre Bourgin de Versailles (IJPB), le CRT-CATAR de Toulouse et de la co-entreprise OLEAD (Terres Inovia, Iteq, Sofiproteol), une filière de culture et de transformation de graines de Caméline (*Camelina Sativa*) a été développée (Réseau Carnot 3BCAR : CAMELINOIL, ITE PIVERT n° 2015-GENESYS-WP3P18-063 PROBIORAF INRA-UCAI/CRT-CATAR/INRA-IJPB/OLEAD). Le développement commercial de la graine de chia tient à la teneur très importante de son huile en acide gras linoléique OMEGA 3 ce qui lui ouvre un marché potentiel en France pour concurrencer les graines provenant d'Amérique du Sud. La graine de Caméline est déjà installée en France depuis des millénaires mais est sous exploitée, ayant été remplacée peu à peu par le colza, en particulier depuis la deuxième guerre mondiale. Elle porte d'ailleurs le nom peu flatteur de lin bâtard. Pourtant, de nombreuses études nous apprennent qu'en plus d'avoir un cycle de développement plus court et un faible besoin d'intrants (D.H. Putnam *et al.*, 1993), elle offre une bonne résistance aux maladies et nuisibles (Conn *et al.*, 1988) et même au froid (Zubr, 1997) (types « hiver »). Elle offre de même une grande variabilité génétique qui est étudiée depuis plusieurs années à l'INRA. Ainsi, il a été possible, notamment au Royaume-Uni (Ruiz-Lopez *et al.*, 2014, 2012), de sélectionner des variétés riches en Omega 3 pour lui apporter une plus-value comme huile alimentaire. De même, elle a été cultivée dans certaines régions des Etats-Unis pour des essais d'applications comme biocarburant (Murphy, 2011). Cette graine pourrait donc trouver une meilleure place dans les schémas agronomiques, qu'elle soit destinée à des applications alimentaires ou industrielles. Dans ce dernier cas, son cycle court lui permet de se positionner facilement dans la rotation en complément plus qu'en compétition de cultures vivrières. Au sein des projets camelinoil, avec l'IJPB, la recherche est actuellement plutôt tournée vers le développement de variétés riches en acides gras monoinsaturés. Ces derniers pourraient être hydroxylés de façon à offrir une alternative à l'huile de ricin, celle-ci étant hautement stratégique pour de nombreuses applications industrielles (Ogunniyi, 2006). A la fois les graines de chia et de caméline se caractérisent par une couche mucilagineuse plus ou moins épaisse à leur surface. Ce « mucilage », constitué majoritairement de polysaccharides, a la faculté de gonfler en présence de l'eau, permettant de fortement épaissir une suspension aqueuse de graines. Ses propriétés, comme nous le verrons, lui permettent de trouver des applications en formulation pharmaceutique, additif ou complément alimentaire. Cependant, sa présence dans les tourteaux rend ceux-ci peu utilisables en alimentation animale (Cherian, 2012) et il peut être un obstacle à la trituration des graines ou leur traitement aqueux. Sa séparation semble ainsi être une étape préalable à l'extraction et la transformation des lipides des graines et a fortiori des phospholipides. Le laboratoire a acquis depuis plusieurs années une expertise dans la dé mucilagination de graines de lin par voie

ultrasonore, cette méthode permettant une extraction privilégiée des composés surfaciques des graines (Fabre et al., 2015b, 2015a). C'est de même une technologie qui peut être employée pour chauffer, homogénéiser, organiser des milieux et elle sera donc le pivot technologique de ces travaux. De nombreux essais ont déjà été entrepris concernant l'extraction du mucilage de graines de chia (Campos *et al.*, 2016; Castejón *et al.*, 2017; Orifici *et al.*, 2018), et la variété ORURO de chia développée par PANAM a montré sa bonne compatibilité avec un climat tempéré. Cependant, les graines de caméline ont été préférées dans le cadre de cette étude, à la fois pour étendre la connaissance de son mucilage, peu documenté, mais aussi parce que la caméline est une graine bien plus mature au plan agronomique en France, permettant une plus grande potentialité de valorisation de ses coproduits. Une représentation des deux axes de recherche qui seront développés au cours de ces travaux est visible sur la Figure A. Une étude bibliographique dressera d'abord un état de l'art des connaissances sur le mucilage des graines oléoprotéagineuses et sur les phospholipides pour pouvoir mieux comprendre la méthodologie employée pour les extraire, les caractériser et en interpréter des propriétés chimiques et physico-chimiques. Les démarches entreprises pour tout d'abord séparer le mucilage de graines de Caméline puis d'extraire l'huile et les phospholipides de graines dé mucilaginéées seront alors détaillées en tentant de comprendre l'influence de divers paramètres externes (technologiques, chimiques...) ou internes aux graines sur le rendement et certaines caractéristiques du mucilage et des phospholipides extraits. De façon à étudier en parallèle la modification chimique des phospholipides, une étude *in vitro* sur une lécithine de soja commerciale en solution sera réalisée, cette dernière source étant bien davantage disponible et peu onéreuse. De même, une étude « quasi » *in vivo* sera réalisée sur une émulsion d'oléosomes de tournesol et, enfin, une étude *in silico* permettra de modéliser l'arrangement de phospholipides natifs et modifiés. L'ensemble permettra de mieux appréhender comment cette démarche intégrée et à multi-sortie peut s'inscrire dans un schéma de valorisation des graines de Caméline.

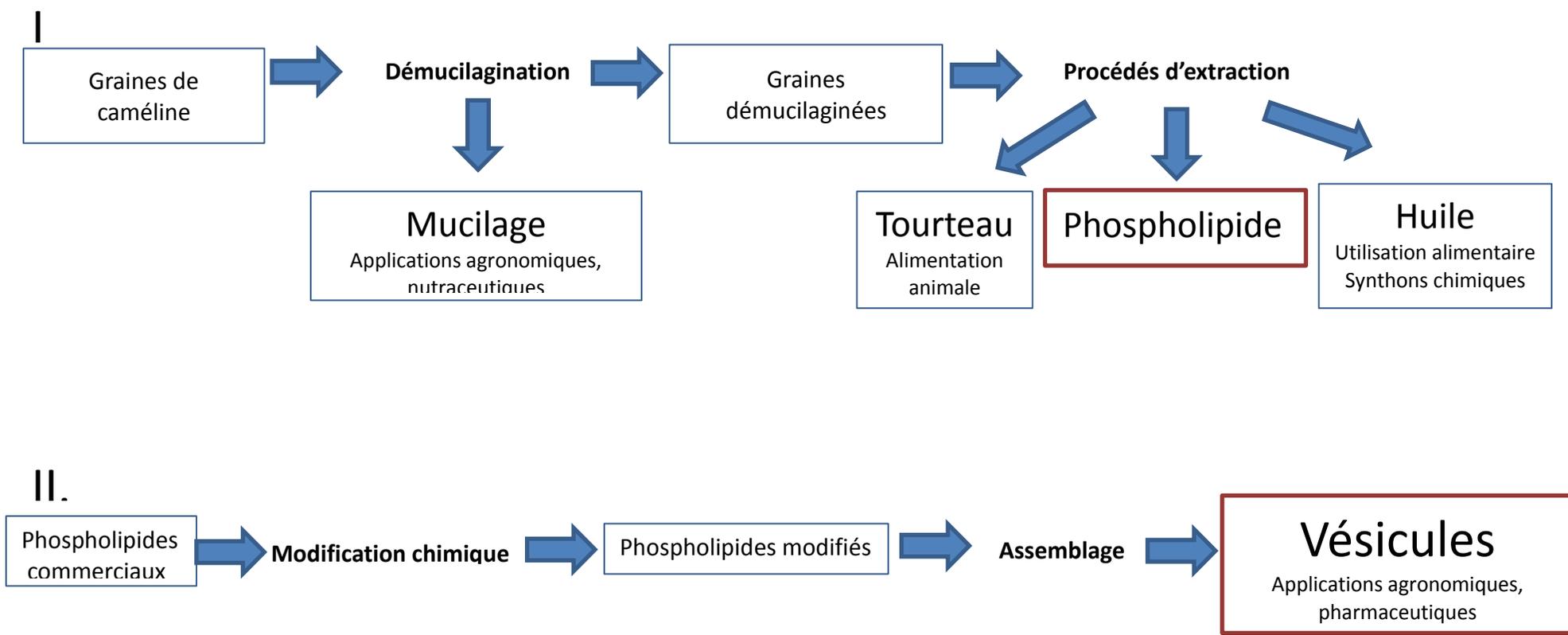


Figure A. Axes de recherche menés parallèlement pour l'obtention de phospholipides à partir de graines de caméline (I) et de vésicules modifiées à partir de phospholipides commerciaux (II)

Objectifs techniques

- Développer un procédé intégré permettant d'extraire les phospholipides de la graine de caméline tout en valorisant les co-produits.
- Prouver la faisabilité d'une oxydation contrôlée de phospholipides commerciaux selon une chimie respectueuse de l'environnement.
- Utiliser et mettre au point des méthodes d'analyse simplifiées pour le suivi de l'extraction du mucilage, l'analyse de sa composition de même que pour suivre l'extraction des phospholipides.

Objectifs scientifiques

- Déterminer quelles sont les forces qui gouvernent l'extractabilité du mucilage de Caméline.
- Comprendre comment la composition du mucilage varie en fonction de ses conditions d'extraction.
- Connaître, en se servant d'outils analytiques et de modélisation moléculaire les leviers permettant le contrôle de l'oxydation des phospholipides et leur agrégation pour former des vésicules d'une certaine perméabilité.

Mots-Clés : Phospholipide, Vésicule, Mucilage, Caméline, Oxygène singulet, Ultrasons, Modélisation moléculaire, Bleu de méthylène, Photosensibilisation.

Chapitre 1. Synthèse

Bibliographique

Cette thèse ayant pour objectif de tracer une ligne méthodologique, technologique et scientifique entre des graines à mucilage comme la caméline et des liposomes modifiés, il est nécessaire de présenter plus en détail l'état des connaissances actuelles sur les différents objets de ce parcours, notamment le mucilage et les phospholipides.

1.1. *Le Mucilage*

a. Nature et composition

Le mucilage est une substance qui se retrouve dans la majorité des plantes. Sa principale caractéristique est qu'elle forme un gel en présence d'eau. Elle se trouve en surface des graines qui en contiennent, dans l'apoplasme des cellules épidermiques. Elle comporte principalement des polysaccharides, avec des chaînes neutres et acides. Les chaînes acides comportent des acides uroniques et peuvent s'apparenter à de la pectine. Concernant les graines oléoprotéagineuses, le lin est l'espèce la plus documentée (Tableau 1-1).

Tableau 1-1. Nombre de références concernant le mucilage de lin, arabidopsis, moutarde et chia selon SCIFINDER, consulté en mars 2019.

Graine	Terme rentré	Terme présent	Concept présent
Lin	Flaxseed mucilage	113	356
	Flaxseed gum	544	609
	Linseed mucilage	63	356
	Linseed gum	84	463
	Linum Usitatissimum mucilage	9	189
	Linum Usitatissimum gum	15	232
	Arabidopsis mucilage	25	204
Arabidopsis	Arabidopsis gum	0	13
	Thale cress mucilage	0	126
Moutarde	Mustard mucilage	40	62
	Mustard gum	19	21
Chia	Chia mucilage	38	85
	Chia gum	13	18
	Salvia hispanica mucilage	7	59
	Salvia Hispanica gum	0	25
Caméline	Camelina mucilage	1	7
	Camelina gum	6	8

Cependant, l'arabidopsis fournit un grand nombre d'études ayant trait à la physiologie de la graine et la structure du mucilage. C'est ainsi un modèle intéressant pour comprendre comment ce dernier se forme (Figure 1-1) et où il se situe (Figure 1-2 et Figure 1-3)

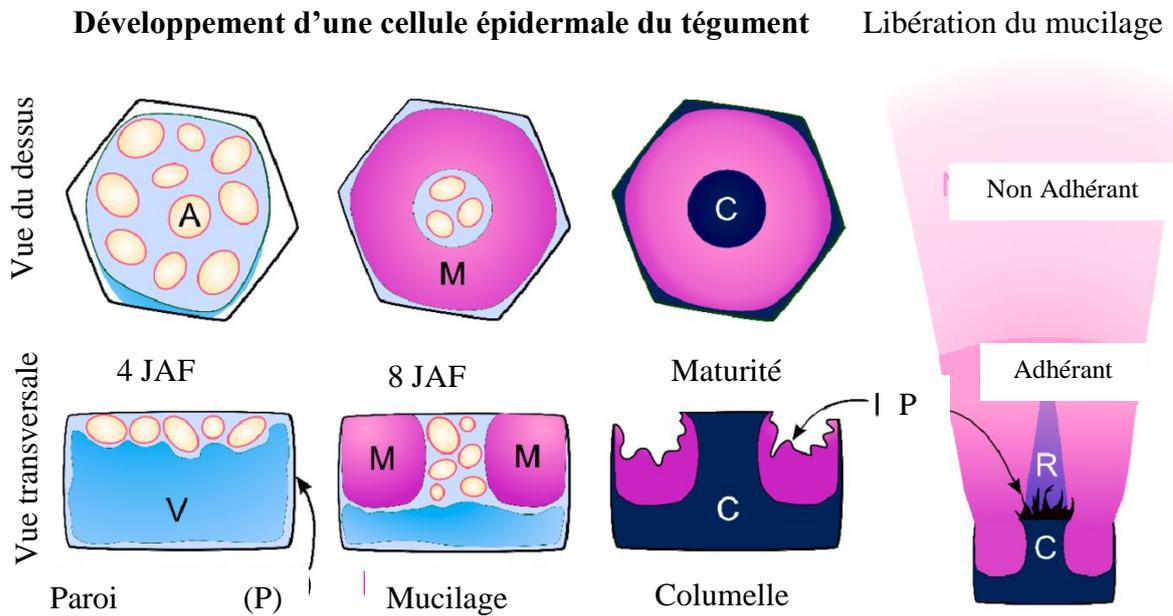


Figure 1-1. Image du développement du mucilage des graines (adapté d'article (Voiniciuc *et al.*, 2015b) – Licence CC BY 4.0) – JAF : jours après floraison

Les cellules épidermales du tégument synthétisent tout d'abord une paroi primaire et deux parois secondaires. Quatre jours après floraison (JAF), ces cellules contiennent une large vacuole et ont accumulé des amyloplast* (A). Du quatrième au huitième jour, les cellules synthétisent des polysaccharides mucilagineux (M). Ceux-ci se placent sous la forme d'un anneau épais autour d'une colonne cytoplasmique qui sera peu à peu remplacée par ce qu'on appelle la columelle (C). Si elles sont hydratées, les cellules explosent, rompant la paroi primaire pour libérer le mucilage, à la fois sous forme de rayons et sous forme d'un ensemble plus dispersé avec une partie adhérente au tégument et une partie libre.

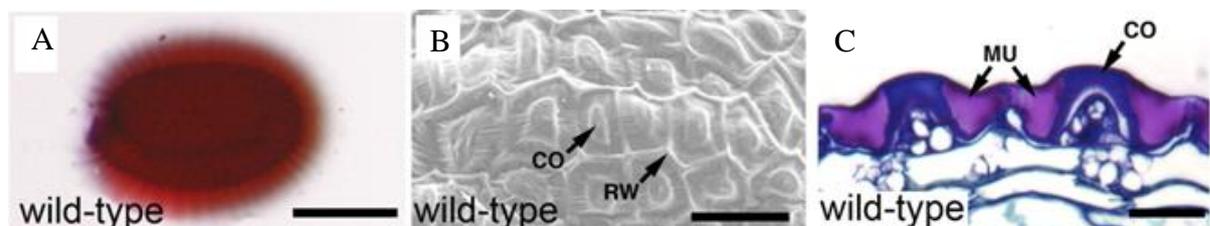


Figure 1-2. Image du mucilage d'*arabidopsis thaliana* (Walker *et al.*, 2011) - Mu :mucilage, CO : Columelle ; RW : paroi radiale (copyright de "American Society of Plant Biologists").

* Organite composé d'une ou plusieurs membranes spécialisé dans le stockage d'amidon

Sur ces images microscopiques (Figure 1-2), se retrouvent la columelle, le mucilage avec une libération sous forme de rayons et d'un halo (coloration au bleu de toluidine et rouge de ruthénium)

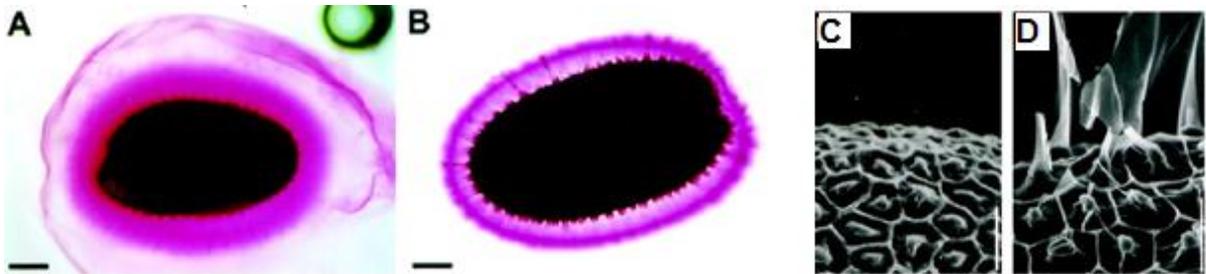


Figure 1-3. Structure et développement de la coque d'*arabidopsis thaliana* (Western *et al.*, 2000) (copyright de "American Society of Plant Biologists").

Dans une autre publication, (Figure 1-3), une graine hydratée colorée au rouge de ruthénium développe deux couches de mucilage (A). Après agitation dans l'eau (image B), seule la première couche, adhérente, est encore visible et les rayons sont observables au-dessus des columelles. Les images C et D correspondent à des observations par microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface de la graine sèche (C) et hydratée puis séchée (D). Le mucilage est visible au-dessus des columelles. Chez *Arabidopsis Thaliana*, le mucilage se compose ainsi de deux parties, une couche externe et diffuse qui peut facilement être enlevée par simple agitation et une couche plus interne qui serait plus fortement attachée à la coque de la graine. Ces deux couches sont principalement composées de rhamnogalacturonan I (RG-I)(Ralet *et al.*, 2016). Cependant, la couche interne contiendrait également de la cellulose avec des quantités mineures d'autres polymères. La cellulose serait présente sous la forme de microfibrilles qui maintiendraient le mucilage attaché à la graine (Macquet *et al.*, 2007). Selon d'autres sources, cette adsorption du mucilage à la cellulose de la graine se ferait principalement par des chaînes hautement ramifiées de xylane (Ralet *et al.*, 2016; Voiniciuc *et al.*, 2015a). L'adhésion serait, de plus, assurée par des interactions entre cellulose, xylanes, pectines et glycoprotéines (Voiniciuc *et al.*, 2015a). Au final, le mucilage non adhérent aurait une concentration de 1,6% et le mucilage adhérent une concentration de 2,2% (Zhao *et al.*, 2017), soit un total de 3,8% de mucilage, une valeur comparable à celle d'autres plantes comme le lin, la chia et la moutarde (Tableau 1-2). Le mucilage de lin existerait également sous les deux états « adhérent » et « non adhérent » (Figure 1-4) (Naran *et al.*, 2008). Cependant, il serait plus abondant que pour *arabidopsis thaliana*. La partie facilement soluble ne représenterait que 2% de la masse totale de la graine.

Tableau 1-2. Quantité de mucilage et composition en protéines et minéraux de ce dernier dans diverses graines. Muc : Mucilage, Prot. : Protéine, Min : Minéraux, Mw : Masse moléculaire, ext. : couche externe du mucilage ; int. : couche interne du mucilage ; N.D. : Non disponible dans la littérature consultée

Graine	% Muc. (graine)	% Prot. (Muc.)	% Min. (Muc.)	Chaîne neutre	Chaîne acide	Mw (Da)
Lin	3-9 (Fedeniuk et Biliaderis, 1994)	4-20 (Cui, 2001; Oomah <i>et al.</i> , 1995)	3-9 (Cui, 2001; Oomah <i>et al.</i> , 1995)	Galacto- arabinoxylan (Erskine et Jones, 1957; Fedeniuk et Biliaderis, 1994; Hunt et Jones, 1962)	Rhamno- galacturonan (Cui <i>et al.</i> , 1994c; Naran <i>et al.</i> , 2008)	1,5.10 ⁶ (neutre) 1,10 ⁵ (acide) (Qian <i>et al.</i> , 2012; Warrand <i>et al.</i> , 2003)
<i>Arabidopsis</i>	4 (Zhao <i>et al.</i> , 2017)	N.D.	N.D.	< 15 % (Ralet <i>et al.</i> , 2016) Cellulose, Xylose (Voiniciuc <i>et al.</i> , 2015a)	Rhamno- galacturonan (Ralet <i>et al.</i> , 2016)	6.10 ² (ext.), 5.10 ⁴ (int.) (Macquet <i>et al.</i> , 2007)
Moutarde	2-5 (Cui <i>et al.</i> , 1993a; Woods et Downey, 1980)	2-4 (Cui <i>et al.</i> , 1994a)	2-15 (Cui <i>et al.</i> , 1994a)	Polysaccharide cellulosique (Wu <i>et al.</i> , 2016b)	Polysaccharide pectique (Wu <i>et al.</i> , 2016b)	4,10 ⁶ (Wu <i>et al.</i> , 2016b)
Caméline	7-10 (Sarv <i>et al.</i> , 2017; Zubr, 2010)	10-15 (Sarv, 2017)	6 (Taylor <i>et al.</i> , 1847)	Galactose, Glucose, Rhamnose, Xylose. (Li <i>et al.</i> , 2016)	Gal- Rhamnogala cturonan (North <i>et al.</i> , 2014)	N.D.
Chia	3-12 (Capitani <i>et al.</i> , 2013; Muñoz <i>et al.</i> , 2012; Orifici <i>et al.</i> , 2018; Timilsena <i>et al.</i> , 2016b)	11 (Capitani <i>et al.</i> , 2013)	8 (Capitani <i>et al.</i> , 2013)	Xylose, Glucose Mannose, Arabinose, Glucose, Acides uroniques (Hernandez, 2012; Timilsena <i>et al.</i> , 2016b)		2,10 ⁶ (Timilsena <i>et al.</i> , 2016b)

Dans le lin, le mucilage représente de 3 à 9% de la masse de la graine (Fedeniuk et Biliaderis, 1994). Une grande partie semble donc concerner des polysaccharides fortement attachés à la graine. Les polysaccharides acides sont principalement de la forme rhamnogalacturonan (Cui *et al.*, 1994c; Naran *et al.*, 2008) comme pour *arabidopsis*. Les

polysaccharides acides de la graine de lin seraient cependant bien plus branchés que ceux d'*arabidopsis* (Naran *et al.*, 2008). De plus, le mucilage de lin contient une forte proportion de polysaccharides neutres de forme (galacto)arabinoxylan (Erskine et Jones, 1957; Hunt et Jones, 1962) de plus haut poids moléculaire, et qui seraient responsables d'une viscosité et élasticité accrue de ce mucilage (Cui *et al.*, 1994c; Warrand *et al.*, 2005).

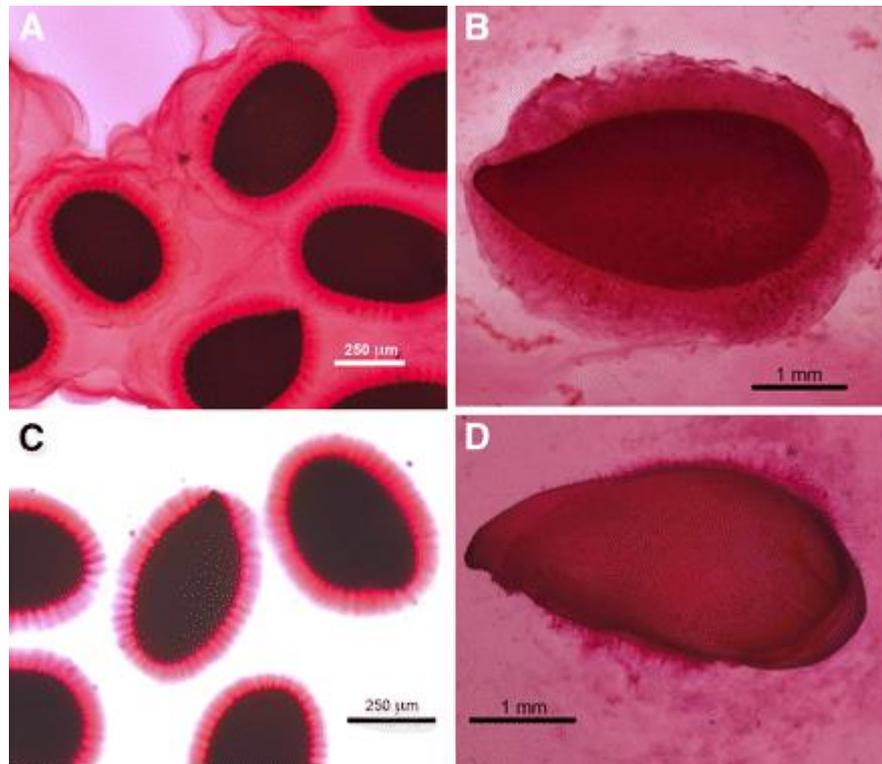


Figure 1-4. Mucilage de lin révélé au rouge de ruthénium (Naran *et al.*, 2008) illustrant les deux couches de mucilage (A et B : graines hydratées, C et D : graines hydratées toute une nuit et agitées (coloration au rouge de ruthénium))-(copyright de "American Society of Plant Biologists")

Concernant la chia, le mucilage comporte également des carbohydrates neutres et acides. Il contiendrait xylose, mannose, arabinose, glucose et des acides glucuroniques et galacturoniques mais ne contiendrait pas de rhamnose, ni de galactose (Hernandez, 2012), monosaccharides prépondérants dans les mucilages de lin et d'*arabidopsis*. Cependant, des chercheurs citent la présence d'un oligosaccharide, le plantéose dans le mucilage de chia avec la présence de galactose (Xing *et al.*, 2017). Cette présence de galactose est confirmée dans des graines de chia australiennes (Timilsena *et al.*, 2016b). L'acide 4-O-méthyl glucuronique serait, selon cette étude, responsable de la forte viscosité du mucilage de chia à cause de nombreux enchevêtrements intermoléculaires. Des rendements d'extraction importants peuvent être obtenus par un choix judicieux de la température et du rapport graines : eau. Ainsi, un rendement de 7,86% de mucilage est obtenu par une extraction à 80°C pendant 2

heures avec un rapport graines : eau de 1 :40 (Felisberto *et al.*, 2015). A une température de 85°C pendant 2 heures et un ratio graines : eau de 1 :31, un rendement de 11,6% a été aussi obtenu (Orifici *et al.*, 2018)

Le mucilage de la graine de moutarde représenterait de 2 (Woods et Downey, 1980) à 5% du poids de la graine (Cui *et al.*, 1993a) et contiendrait une forte proportion de glucose (Cui *et al.*, 1993a, 1994b; Wu *et al.*, 2009) avec la présence de galactose, rhamnose, mannose, xylose et acide uronique. Cette forte proportion d'acide uronique et de glucose de même que l'arrangement de ce dernier incitent à identifier des polysaccharides pectiques et cellulosiques (84% et 16% respectivement) (Wu *et al.*, 2016b)

Au niveau de la caméline, le mucilage représenterait 6,7% de la graine selon une étude utilisant différentes graines provenant d'Europe et de Scandinavie (Zubr, 2010). Cette valeur est trouvée en faisant une extraction aqueuse du mucilage en agitant des graines dans l'eau à 40°C pendant 4 heures et en relavant plusieurs fois les graines filtrées à l'eau. Ce rendement est du même ordre de grandeur que pour le lin. Dans une autre étude, 10% de la masse de la graine ont été extraits. Dans ce cas, les graines ont été mélangées pendant 3 heures avec de l'eau à 55-60°C. Le mucilage alors extrait comporte de 10 à 15% de protéines (Sarv, 2017). Les monosaccharides les plus représentés sont le galactose, le glucose, le rhamnose et le xylose (Li *et al.*, 2016).

D'après les données rassemblées dans le Tableau 1-2, malgré une grande variabilité des données, il apparait que le mucilage peut représenter jusqu'à 12% de la masse d'une graine. La chaîne acide est généralement constituée de rhamnogalacturonan I et est donc proche de la pectine. Au niveau de la chaîne neutre, le mucilage semble généralement contenir du xylose et du glucose. Ce dernier se trouve vraisemblablement sous forme de cellulose et serait en grande partie responsable de la partie adhérente du mucilage. Le mucilage d'*arabidopsis* semble constitué de polysaccharides plus courts que celui de lin, chia et moutarde. La quantité extraite de mucilage de même que ses teneurs en protéines et cendres semblent très liées aux conditions d'extraction qui diffèrent entre toutes les publications.

b. Modes d'extraction

L'extraction de la couche mucilagineuse peut parfois se faire par abrasion, notamment sur des graines assez épaisses comme le lin (Hu et Liu, 1999; Myllymaki, 2000). Cependant, le mucilage, riche en composés polaires, se solubilise assez facilement dans l'eau. Il est donc

généralement extrait par l'utilisation de ce solvant, seul ou avec la présence d'enzymes (Wanasundara et Shahidi, 1997; Wu *et al.*, 2010). En présence d'eau, le mucilage va rapidement gonfler, éclater les cellules mucilagineuses et se déployer autour de la graine. Sa diffusion dans le milieu sera d'autant plus efficace que la quantité d'eau par rapport à la quantité de graines sera élevée. De même, une température élevée permettra d'augmenter cette vitesse d'extraction. Ainsi, de nombreuses publications mentionnent cette extraction à l'eau selon diverses durées et températures. Un changement de pH peut également être réalisé pour accroître la solubilité du mucilage (Singer *et al.*, 2011). Cependant, cela peut également augmenter la solubilisation des protéines. De même, une température trop élevée pourrait provoquer la dénaturation des protéines de la graine et provoquer la dégradation d'autres composés valorisables de la graine (omega-3, omega-6, stérols...). La cinétique de libération du mucilage peut être accélérée par des forces de cisaillement importantes qui peuvent notamment faciliter le décrochage des chaînes de polysaccharides adhérentes à la graine. Parmi ces méthodes d'agitation, citons la cavitation et en particulier les ultrasons qui permettent une extraction localisée en surface et permettent de limiter le temps nécessaire à l'extraction du mucilage. Alliée à la perturbation mécanique du milieu, l'implosion de bulles de cavitation induites par les ultrasons peut projeter des puissants jets de liquide et produire des points chauds où la température et la pression peuvent être très élevées ($T > 1000 \text{ K}$, $P > 500 \text{ Atm}$ (cf. Figure 1-5)).

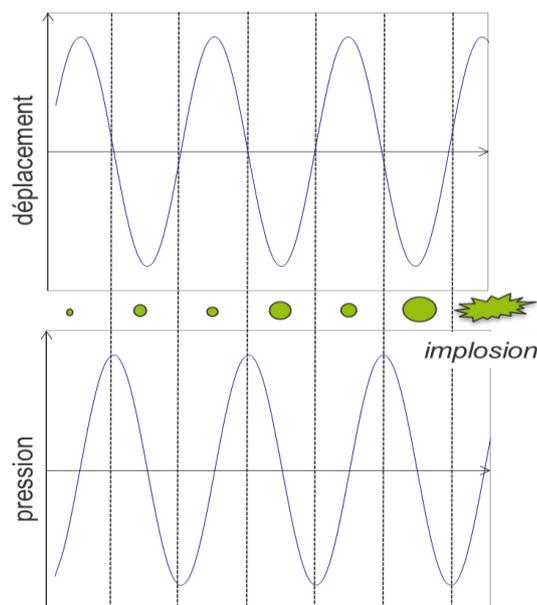


Figure 1-5. Schéma illustrant la formation et l'implosion d'une bulle de cavitation. Des micro-déplacements de céramiques piézoélectriques induisent des périodes de haute pression/basse pression acoustiques. Des bulles de cavitation sont ainsi créées et croissent jusqu'à un point critique avant d'imploser violemment.

Ainsi, la matière végétale soumise aux ultrasons reçoit des contraintes mécaniques importantes qui peuvent favoriser la lyse des cellules végétales et permettre ainsi la libération de composés d'intérêt. Il est alors possible de privilégier l'extraction des composés surfaciques (extraits par une action cisailante) par rapport aux composés internes (extraits par diffusion). Par conséquent, l'extraction par ultrasons s'accompagne en général d'une diminution de la quantité de protéines et polysaccharides provenant de l'endosperme des graines (Fabre *et al.*, 2015b). Si les ultrasons ont été utilisés pour l'extraction du mucilage de lin et ont permis l'extraction totale du mucilage en 5 minutes effectives à une puissance nominale de 1000 W/L, ils permettent également l'extraction du mucilage d'*arabidopsis* (Zhao *et al.*, 2017). Dans ce dernier cas, quelques graines peuvent être débarrassées du mucilage adhérent en quelques dizaines de secondes avec des ultrasons de très forte puissance. En effet, 20 secondes seulement sont nécessaires à une puissance nominale de 78 000 W/L. Pour la chia, des auteurs ont ajouté un traitement par sonde ultrasonore pendant 3 minutes à une extraction aqueuse à 50°C pendant deux heures à un ratio graines: eau de 1 :50 (Castejón *et al.*, 2017). Ils obtiennent ainsi un rendement de 6,52%. Le volume utilisé pour l'extraction ultrasonore n'est pas précisé. Ainsi, il est difficile de comparer leur rendement à ceux obtenus pour d'autres graines. En tout cas, le but d'utiliser les ultrasons était ici d'éviter le recours à des pH élevés. Avec l'utilisation des ultrasons, en diminuant le temps d'extraction et le recours à des conditions chimiques extrêmes, les graines sont moins fragilisées. Cependant, une coque fine pourra se déstructurer plus facilement sous l'action d'un tel cisaillement et la rupture de son intégrité pourra alors entraîner une augmentation brutale de la diffusion de composés internes. Les ultrasons ont aussi un effet hydrolysant. En effet, ils permettent de dépasser l'énergie d'activation de l'hydrolyse des polysaccharides. Ainsi, si leur action cisailante provoque une baisse de la viscosité du mucilage, viscosité qui peut croître à nouveau à l'arrêt des ultrasons (thixotropie du mucilage), leur action peut provoquer des coupures de chaînes et, ainsi, une diminution de la viscosité intrinsèque du mucilage.

c. Applications du mucilage en formulation

Le mucilage a des propriétés rhéologiques remarquables du fait de la nature des chaînes polymériques qui le constituent. Ainsi, ajouté à de faibles pourcentages dans l'eau (0,1-1%), il permet d'augmenter rapidement la viscosité du milieu tout en lui donnant un comportement rhéofluidifiant et élastique prédominant. Avec sa capacité de rétention d'eau, il forme un épaississant de choix pour la formulation d'émulsions alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques ou techniques.

Ainsi, concernant les formulations alimentaires, il permet, entre autres, d'agir sur la texture, la cristallisation, la stabilité au crémage/sédimentation, protège la formulation contre les dégradations dues aux cycles gel/fusion (Imeson, 2011). Cependant, si les protéines peuvent posséder des acides aminés plus hydrophobes (tryptophane, phénylalanine, leucine...) que d'autres et posséder des propriétés tensioactives avérées, les polysaccharides ont rarement un enchaînement de motifs apolaires suffisant. Ainsi, le mucilage, à moins d'avoir une concentration en protéines importante a généralement peu de propriétés tensioactives. La comparaison de divers épaississants avec le mucilage de lin (Tableau 1-3) indique que ce dernier a une viscosité intrinsèque proche de celle de la gomme de guar dont il partage également le profil rhéométrique en écoulement. Ainsi, le mucilage de lin pourrait aisément remplacer la gomme de guar dans des formulations alimentaires. Le mucilage de chia semble avoir des propriétés épaississantes encore plus importantes, proches de celles de la gomme de caroube. Notons également que la plupart des épaississants détaillés dans ce tableau sont en grande partie constitués de galactose.

a. Le mucilage de Caméline

De même que pour le lin, le mucilage de caméline se trouve dans des cellules mucilagineuses à la surface des graines. Comme vu précédemment, il existe peu de références bibliographiques sur ce mucilage. Cependant, certains travaux académiques sont disponibles.

Composition du mucilage

Ainsi, les polysaccharides du mucilage de caméline seraient composés de 5 sucres neutres : rhamnose, arabinose, galactose, glucose et xylose ou mannose (Sanchez, 2014). En effet, la méthode utilisée dans cette étude ne permet pas de repérer les acides uroniques et ne permet pas de différencier le xylose du mannose. De plus, elle n'est ici que semi-quantitative. Le rapport des aires relatives indique une forte majorité de galactose et glucose par rapport au rhamnose, arabinose et xylose/mannose.

Dans une autre étude (Li *et al.*, 2016), le mucilage contient en majorité du galactose (58,1%) puis du glucose (25,0%), du rhamnose (11,6%) et du xylose (5,2%). L'arabinose n'est pas mentionné et, ici non plus, le dosage des monosaccharides acides n'a pas été pris en compte.

Tableau 1-3. Propriétés de mucilages et quelques épaississants/gélifiants utilisés comme additifs alimentaires. a. données issues de la revue de Wüstenberg (Wüstenberg, 2014). Ins. : insoluble, diss. : dissolution, C : concentration, N.D. : non disponible.

Epaississant	Code	Polymère principal	Monomères principaux	Solubilité dans l'eau (T amb.)	Comportement rhéologique	Viscosité à 10s ⁻¹ A C=0,3% m/V 20-25°C	Viscosité Intrinsèque, 25°C
Agar	E406	Galactane ^a	Galactose ^a	Ins. à T<85°C ^a	Gel après diss. à chaud et T<T _{gel}	Inapplicable	Inapplicable
Carraghennane	E407	Galactane sulfatée	Galactose ^a	Sels solubles Ins. à T<80°C ^a	Gel après diss. à chaud et T<T _{gel}	Inapplicable	Inapplicable
Gomme de Caroube	E410	Galactomannane	Galactose, Mannose	Soluble	Pseudoplastique à 1%	20-60 mPa.s (Garcia-Ochoa et Casas, 1992) ~1600 mPa.s (C=1%) (El Batal <i>et al.</i> , 2012)	16dL/g (Elfak <i>et al.</i> , 1977)
Gomme de Guar	E412	Galactomannane ^a	Galactose, Mannose ^a	Très soluble	Pseudoplastique à 0,5%	30-40 mPa.s (Mazza et Biliaderis, 1989)	11,0 dL/g (Wang <i>et al.</i> , 2015) 19,2 dL/g (Elfak <i>et al.</i> , 1977), 11,3 dL/g, 1M NaCl (Cui et Mazza, 1996),

Gomme arabique	E414	Arabinogalactane ^a	Galactose, Arabinose, Rhamnose, Acide glucuronique ^a	Très soluble	Pseudoplastique à partir de 25%	1-2 mPa.s (Mazza et Biliaderis, 1989)	0,18 dL/g, 0,1M NaCl (Gómez-Díaz <i>et al.</i> , 2008); 0,14 dL/g, 1M NaCl (Cui et Mazza, 1996),;
Xanthane	E415	Cellulosique ^a	Glucose, Mannose, Acide glucuronique ^a	Très soluble		150 mPa.s (Mazza et Biliaderis, 1989)	57,1 dL/g (Brunchi <i>et al.</i> , 2014) ; 13.5 dL/g, 1M NaCl (Cui et Mazza, 1996),
Mucilage de lin		Arabinoxylan, Rhamnogalacturonan	Arabinose, Xylose, Rhamnose, Galactose, Acide galacturonique	Très soluble	Pseudoplastique à partir de 0,2% (Mazza et Biliaderis, 1989)	15-20 mPa.s (Mazza et Biliaderis, 1989)	4,3-6,6 dL/g, 1M NaCl (Cui et Mazza, 1996) ; 11,7-13.2 dL/g, 40°C (Fabre <i>et al.</i> , 2015b),
Mucilage de Moutarde		Glucane	Glucose, Galactose	Très soluble	Pseudoplastique à 0,3%	~20mPa.s (Cui <i>et al.</i> , 1993b)	N.D.
Mucilage de chia		N.D. (Arabinoxylan ?)	Xylose, Arabinose, Mannose	Très soluble	Pseudoplastique à 0,25%	~ 100 mPa.s (C=0,25%) (Capitani <i>et al.</i> , 2015)	7,2dL/g, 1M NaCl (Goh <i>et al.</i> , 2016) 16dL/g, 20°C (Timilsena <i>et al.</i> , 2015),

Propriétés rhéologiques du mucilage

Les propriétés rhéologiques du mucilage de caméline ont été plus détaillées. L'influence de la température, de la concentration et du pH ont été étudiés par plusieurs chercheurs. En étude rotationnelle, une solution de mucilage de caméline montre déjà un comportement rhéofluidifiant à une concentration de 0,1% (Sanchez, 2014) et, en étude oscillatoire, une dominante élastique dès 0,1% à haute fréquence (1-10 Hz) et dès 0,5% sur la gamme de fréquences de 0,1 à 10 Hz (Li *et al.*, 2016). La déformation appliquée n'est cependant pas indiquée. Typiquement, si sa courbe d'écoulement est tracée pour plusieurs pH (pH=2, 3, 7, 9, 10, 11,12), la viscosité est la plus élevée à un pH entre 11 et 12 et la plus faible à un pH entre 2 et 3 (Cao *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016). Pour une solution faiblement concentrée, à 0,5%, la viscosité ne diminue pas profondément avec la température, passant d'environ 40 000 mPa.s à 30 000 mPa.s de 10 à 90°C (Li *et al.*, 2016). Concernant l'influence d'additifs, NaCl, CaCl₂ et le sucre n'ont pas montré d'effet significatif à une concentration de 0,5 à 5% sur la viscosité d'une solution de mucilage. Seul CaCl₂, à une concentration de 10%, entraîne une diminution significative de la viscosité (Li *et al.*, 2016) . Enfin, le mucilage de caméline serait totalement soluble dans l'eau de même que dans l'huile (Sarv *et al.*, 2017).

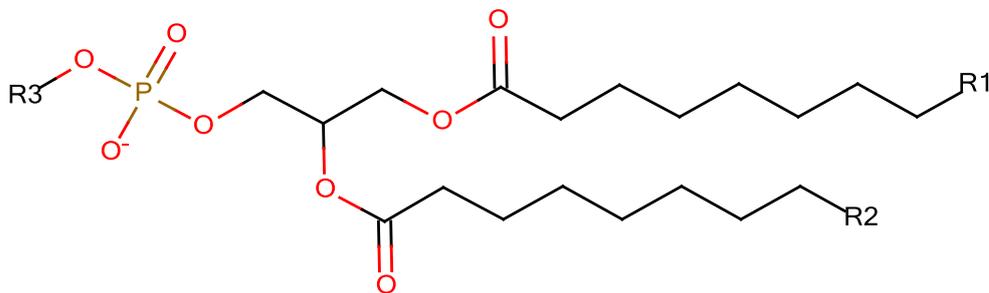
Propriétés et applications du mucilage de caméline

La caméline est une plante très économique, peu exigeante en énergie pour sa production. Ainsi, son huile pourrait être obtenue à bas coût et trouver de nombreuses applications (Sanchez, 2014) en alimentation humaine ou dans des applications techniques. Des essais d'utilisation de l'huile de caméline comme biocarburant ont été d'ailleurs entrepris avec un certain succès (Borah *et al.*, 2019; Moser, 2010; Murphy, 2011), notamment sur des vols commerciaux (IATA, 2018). Cependant, son mucilage est actuellement sous-exploité au vu de ses propriétés rhéologiques. En alimentation humaine, si l'huile de caméline, étant donné sa richesse en omega-3 et son haut ratio omega3/omega6 peut s'utiliser en complément alimentaire et aider au développement cérébral, le mucilage de caméline, malgré un profil proche de celui du lin, n'est pas exploité en nutraceutique. Il n'est revendiqué expressément dans aucun brevet comme agent épaississant même si des articles le citent comme une alternative à des épaississants plus chers, notamment la gomme de guar en tant que liant pour hydromulch ou agent agglomérant pour litière de chat (Vaughn *et al.*, 2013). Ses capacités filmogènes sont aussi démontrées dans un article récent (Qi *et al.*, 2016).

1.2. Les Phospholipides

a. Nature

Les phospholipides sont les principaux lipides polaires présents dans les membranes animales mais également dans certaines membranes végétales. Ils sont composés d'un glycérol, un phosphate, deux acides gras et un alcool (Molécule 1-1). La partie formée par les deux acides gras positionnés sur le carbone 1 et 2 du glycérol constitue la section hydrophobe du phospholipide tandis que la partie formée par le groupement glycérol, phosphate et alcool constitue la section hydrophile. En ce sens, un phospholipide est une molécule amphiphile.



Molécule 1-1. Représentation générale d'un phospholipide. R1 et R2 sont des chaînes carbonées. R3 est un groupement polaire qui détermine la nature du phospholipide

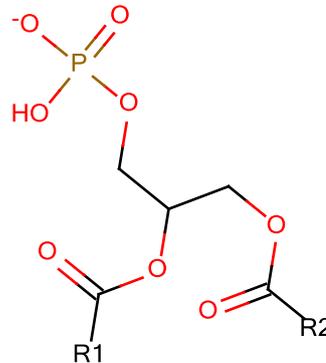
En général, chez les mammifères, la chaîne grasse positionnée sur le premier carbone du glycérol est saturée tandis que la deuxième chaîne, sur le deuxième carbone, est insaturée. Sept classes de phospholipides peuvent se décliner en fonction de la nature de l'alcool condensé sur le groupement phosphate. En fonction de ce groupement, les phospholipides peuvent porter une charge nette nulle (zwitterions) ou négative au pH physiologique mais aussi une charge positive à des pH très acides.

Ainsi, les classes sont :

1. Acide phosphatidique	Aucun alcool	PA
2. Phosphatidylcholine	Choline	PC
3. Phosphatidylethanolamine	Ethanolamine	PE
4. Phosphatidylinositol	Inositol	PI
5. Phosphatidylglycérol	Glycérol	PG
6. Phosphatidylsérine	Sérine	PS
7. Diphosphatidylglycérol	Phosphatidylglycérol	DPG ou CL

Pour chacune de ces classes de phospholipides, la formule chimique, la charge, l'abondance naturelle, les rôles métaboliques de même que les interactions chimiques généralement observées avec ces molécules peuvent être détaillées.

- Acide phosphatidique (PA)



Molécule 1-2. Représentation simplifiée d'un acide phosphatidique. R1 et R2 sont des chaînes carbonées.

Cet acide (Molécule 1-2) est peu présent en général dans les membranes biologiques mais il y joue un rôle essentiel. Ce phospholipide est à la fois le précurseur d'autres phospholipides (Vance, 1996) mais aussi le résultat d'une hydrolyse enzymatique de phospholipides plus complexes. Il peut ainsi être directement généré par l'action de la phospholipase D sur la phosphatidylcholine (Lambeth et Ryu, 1996). Il porte une charge nette négative d'environ -1,5 au pH physiologique (Stillwell, 2016a). Il est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires (Stillwell, 2016b), notamment la transmission de signaux chimiques (Lambeth et Ryu, 1996).

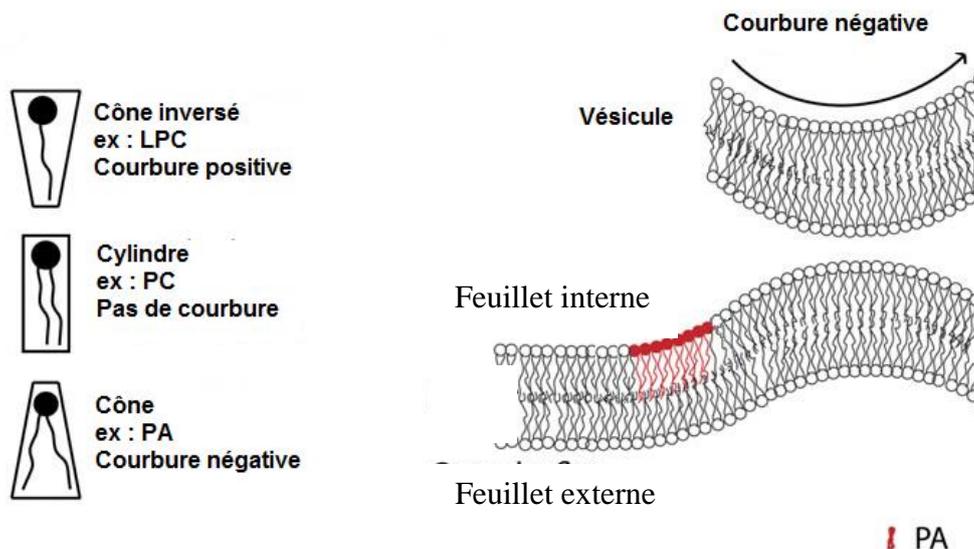
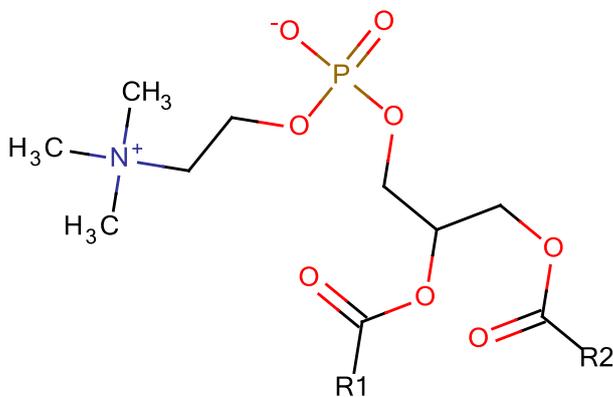


Figure 1-6. Représentation d'une bicouche avec acide phosphatidique (en rouge) induisant une courbure négative (dessin adapté et simplifié (Bullen et Soldati-Favre, 2016))

Concernant ses propriétés tensioactives, c'est une molécule amphiphile (comme tous les phospholipides) qui a une forme conique. Elle s'insérerait ainsi difficilement dans des bicouches planes (Bullen et Soldati-Favre, 2016) et génèrerait une courbure membranaire négative comme peut le montrer la Figure 1-6 (Kooijman *et al.*, 2003). Concernant l'interaction de ce phospholipide avec les protéines, il est remarqué que les résidus lysine et arginine dans les protéines peuvent augmenter la charge de PA en interagissant avec son groupement phosphate. PA pourrait également favoriser l'insertion interfaciale de protéines (Kooijman *et al.*, 2007).

- Phosphatidylcholine (PC)

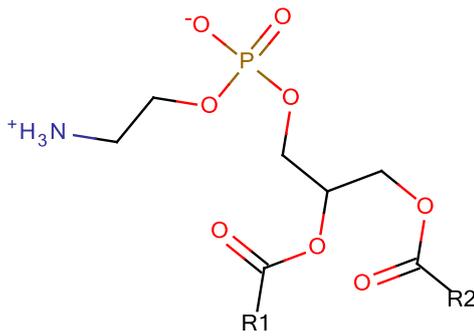


Molécule 1-3. Représentation simplifiée d'une phosphatidylcholine

La phosphatidylcholine (Molécule 1-3) est le phospholipide qui est en général le plus concentré dans les végétaux et le phospholipide principal des membranes animales. C'est une source de diverses molécules intervenant dans les signaux biologiques. En général, PC a un acide gras saturé en position sn-1 et insaturé en position sn-2. Il possède une forme cylindrique lui permettant de facilement s'intégrer dans des membranes. Il forme d'ailleurs très facilement des bicouches lipidiques. PC peut se lier à certaines protéines membranaires, à la fois par des interactions venant de la tête polaire et des chaînes grasses. Le phosphate est stabilisé par l'histidine ou l'arginine (Yeagle, 2016).

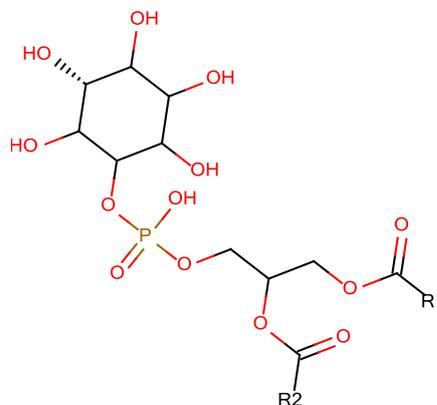
Du fait de son abondance, c'est le phospholipide le plus employé pour ses propriétés tensioactives largement utilisées pour l'alimentation. C'est d'ailleurs le constituant essentiel de la lécithine dont c'est parfois le synonyme. Cependant, s'il permet une forte diminution de la tension interfaciale huile/eau, du fait de sa nature zwitterionique, il ne provoque que peu de répulsion électrostatique dans une large gamme de pH.

- Phosphatidylethanolamine (PE)

**Molécule 1-4. Représentation simplifiée d'une phosphatidyléthanolamine**

Autre phospholipide très présent dans les végétaux (Molécule 1-4), deuxième plus abondant chez les humains et majoritaire chez les bactéries, la phosphatidyléthanolamine est moins encline à faire des phases lamellaires que la phosphatidylcholine mais plutôt des phases hexagonales inverses (Bergensstahl, 2008). Elle est aussi appelée Céphaline car elle est un composant de la substance blanche du cerveau. Elle se retrouve principalement dans le feuillet intérieur de la bicouche lipidique des membranes plasmiques (Mishkind, 2000). Au contraire de PC qui garde une nature zwitterionique sur une large gamme de pH, PE possède en général une charge nette légèrement négative. Sa tête polaire est assez petite et peu hydratée (Stillwell, 2016a). Elle serait de même moins hydrophile que PC. PE peut se lier fortement par liaison hydrogène et ionique à un phospholipide voisin, formant une paire d'ion entre l'amine + d'un PL et le phosphate – de l'autre. L'importance de PE a récemment émergé en association avec la maladie d'Alzheimer et Parkinson (Calzada *et al.*, 2016).

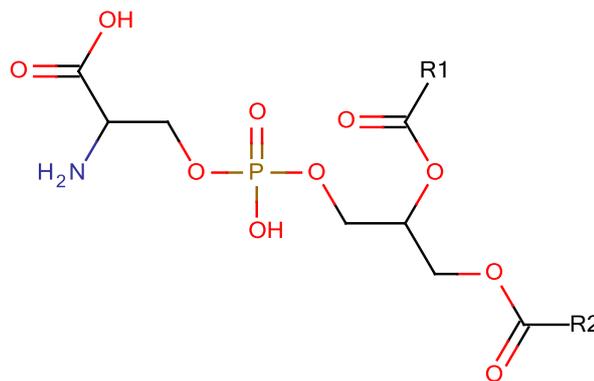
Phosphatidylinositol (PI)

**Molécule 1-5. Représentation simplifiée d'un phosphatidylinositol**

Ce phospholipide (Molécule 1-5) se trouve principalement sur la face interne des bicouches lipidiques. Il se retrouve en abondance dans les phospholipides végétaux mais moins dans les animaux si ce n'est dans le système nerveux. Il peut constituer 10% des phospholipides du cerveau. Il porte une charge nette négative au pH physiologique.

Comme PC, il porte en général une chaîne grasse saturée en position 1 et insaturée en position 2. Un grand nombre d'événements cellulaires sont rendus possibles par les phosphoinositides (Di Paolo et De Camilli, 2006). Ainsi, il a un rôle central dans la signalisation cellulaire, notamment avec ses formes dérivées, phosphorylées, qui peuvent permettre l'ouverture de canaux ioniques. PI peut aussi lier un grand nombre de protéines à la surface des membranes par un pont glycosyle (Ferguson et Williams, 1988; Yeagle, 2016).

- Phosphatidylsérine (PS)

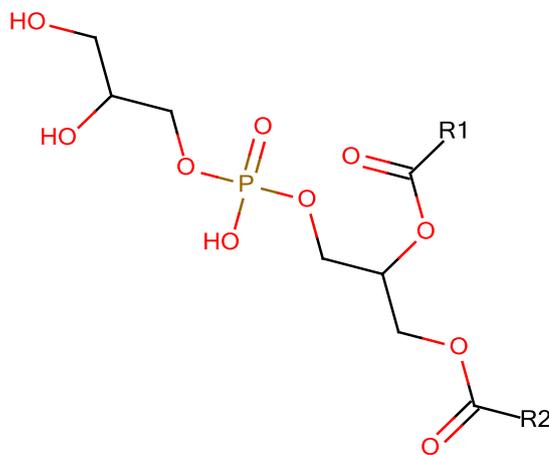


Molécule 1-6. Représentation simplifiée de la phosphatidylsérine

Si les concentrations de phosphatidylsérine (Molécule 1-6) sont relevées dans un grand nombre de végétaux (Frank, 2013), il apparaît que ce phospholipide est indétectable ou à l'état de trace dans la plupart des plantes, semblant se retrouver principalement dans les oléosomes (Tzen et al., 1993). Si la phosphatidylsérine est un phospholipide que l'on retrouve faiblement dans les végétaux, c'est le phospholipide majoritaire de la membrane des neurones et des études montrent qu'il aurait justement un rôle essentiel dans la transmission des messages neuronaux, une déficience en phosphatidylsérine pouvant être liée à des cas de dépression ou de diminution des facultés cognitives (Cenacchi *et al.*, 1993) même si cela est sujet à controverse (Jorissen *et al.*, 2001). Au niveau des propriétés surfaciques, la phosphatidylsérine peut exercer des répulsions électrostatiques car c'est un anion sur une large gamme de pHs ($pK_{a1}=2,1$ et $pK_{a2}=2,2$). Cependant, PS est peu stable en solution aqueuse, particulièrement

en milieu acide (Liu *et al.*, 2015). PS se place quasi-exclusivement sur la couche interne de la bicouche membranaire et, lors de l'apoptose, les cellules peuvent exposer de la phosphatidylsérine sur la couche externe de la membrane plasmique, juste avant d'être phagocytées (Fadok *et al.*, 1992). L'intérêt de PS dans les membranes plasmiques a incité des chercheurs à la synthétiser pour concevoir des liposomes pour la vectorisation de principes actifs. Il peut être utilisé comme complément alimentaire sous forme de capsule, en tant qu'ingrédient pour des aliments, dans des formulations cosmétiques sous forme de sel de calcium ou dans une émulsion huile dans eau (Liu *et al.*, 2015).

- Phosphatidylglycérol (PG)



Molécule 1-7. Représentation simplifiée du phosphatidylglycérol

Le phosphatidylglycérol (Molécule 1-7) se retrouve de façon plus rare dans les plantes et ne compte que de 1 à 2% des lipides des tissus animaux (Uphoff *et al.*, 2008). Cependant, son manque chez certains animaux peut conduire à une détresse respiratoire sévère car il participe à la formation du surfactant pulmonaire. Il se retrouve sinon en abondance dans les parois des bactéries (Stillwell, 2016b). C'est aussi un précurseur de la cardiolipine.

- Cardiolipine (Phosphatidyldiglycerol)

La cardiolipine est constituée d'un assemblage de deux molécules de phosphatidylglycérol. Elle a donc 4 chaînes grasses et deux groupements phosphates. Elle est essentielle pour les membranes impliquées dans la phosphorylation oxydative (Hoch, 1992). Elle est très présente dans les mitochondries et est impliquée dans l'activation de plusieurs enzymes, notamment celles participant aux fonctions respiratoires (Uphoff *et al.*, 2008).

b. Présence dans les graines végétales

Dans les cellules végétales, les organites se trouvent dans un cytoplasme séparé du milieu extérieur par une membrane. Celle-ci est composée d'une bicouche de lipides amphiphiles constitués principalement de phospholipides (Figure 1-7)

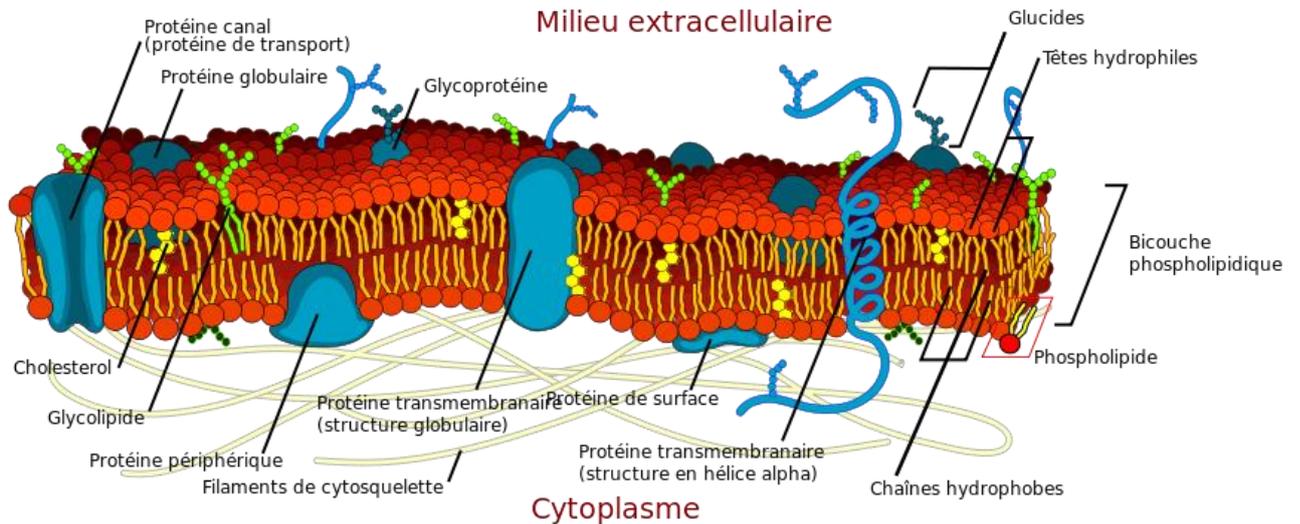


Figure 1-7. Structure d'une membrane cellulaire (Image libre de droit issue de « commons.wikimedia.org »).

Parmi les organites présents dans les cellules végétales des graines oléagineuses, nous trouvons principalement des corps lipidiques appelés oléosomes qui sont en général entourés d'une membrane avec une monocouche de phospholipides (Figure 1-8, Figure 1-9).

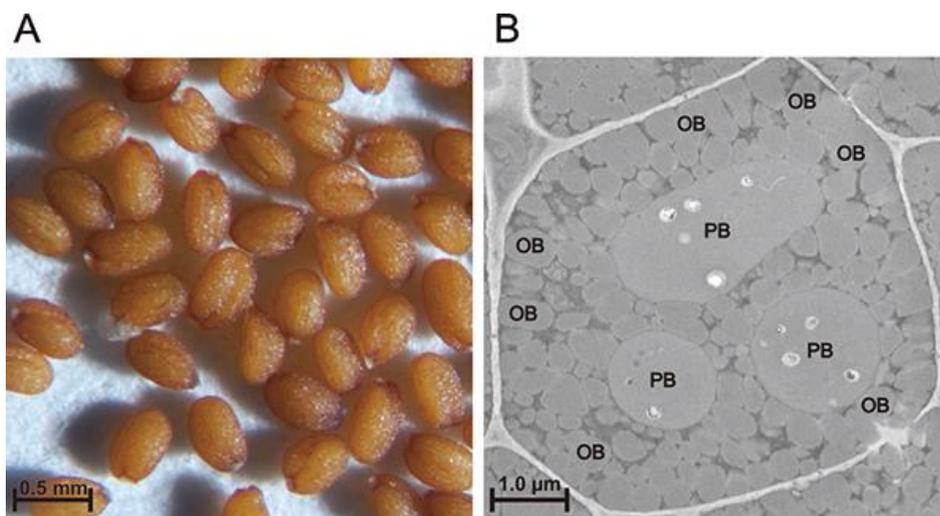


Figure 1-8. Illustration de graines d'*arabidopsis* (Kanai *et al.*, 2016) en vue normale (A) et en coupe microscopique (B). OB : corps lipidique (oil-body) ; PB : corps protéique (protein-body)

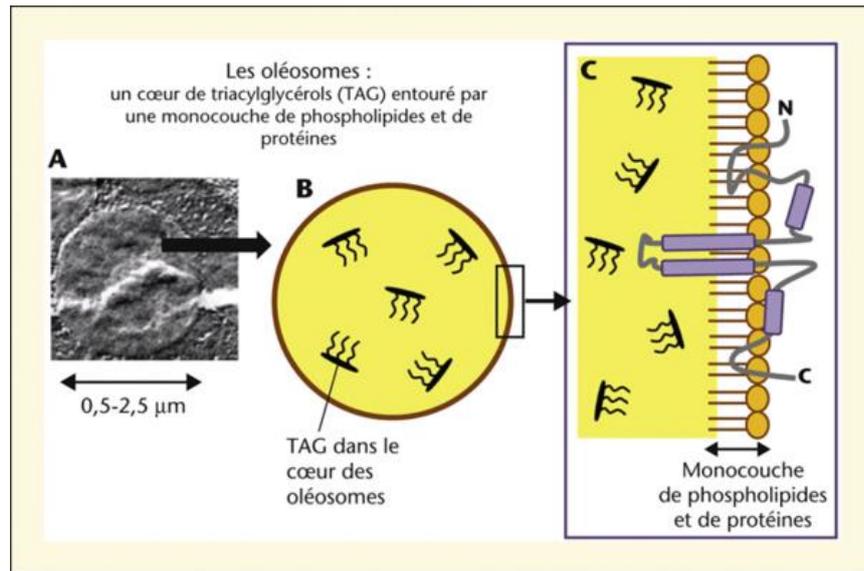


Figure 1-9. Illustration d'un oléosome avec la monocouche de phospholipides représentée (Buchanan *et al.*, 2015)

Ainsi, les phospholipides vont principalement se retrouver dans des graines oléagineuses et/ou comportant une importante surface membranaire. Si nous observons justement le marché des huiles végétales (Figure 1-10), il apparait que celui-ci est largement dominé par les huiles de palme et de soja, suivies par le colza, le tournesol, l'huile de noyau de palme, l'huile d'arachide, de coton, de coprah et d'olive. Il est ainsi intéressant de s'intéresser aux phospholipides contenus dans ces différentes graines ainsi que les graines mucilagineuses détaillées précédemment.

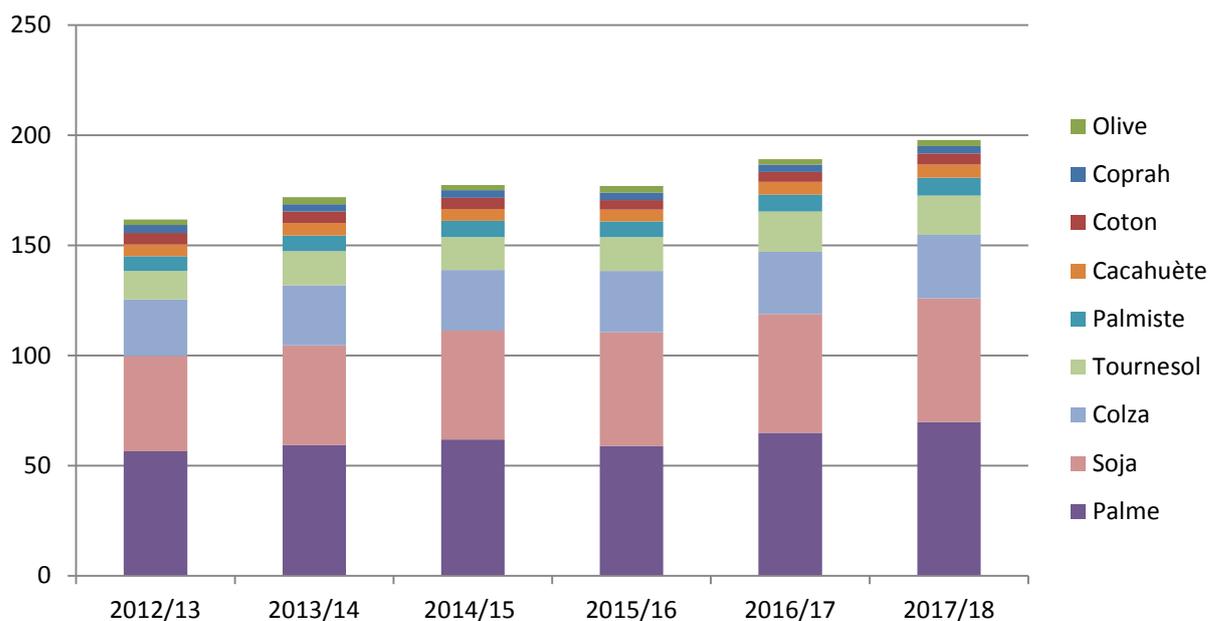


Figure 1-10. Représentation de la production mondiale (en millions de tonnes) de différentes huiles végétales (chiffres issus du département américain d'agriculture - (USDA Economic Research Service, 2018))

Malgré la forte consommation et production d'huile de palme au niveau mondial, peu d'études ont été référencées concernant l'analyse de la teneur et la composition des phospholipides de l'huile extraite du mésocarpe (huile de palme) ou du noyau du fruit (huile de palmiste). Les gouttelettes récupérées dans les résidus d'extraction de presses à huile seraient concentrées en phospholipides (10% massique de l'huile) et ces derniers seraient principalement composés de PG (37%), PE (21%) et PI (11%) avec une prédominance des acides palmitiques et oléiques comme pour les triglycérides (Chow et Ho, 2002). Par contre, selon une autre étude, les phospholipides ne se trouvent qu'à une concentration de 0,1 à 0,2mg/g de l'huile extraite du mésocarpe par le mélange habituel chloroforme/méthanol (1 :2 v/v) (Goh *et al.*, 1982). Ces phospholipides seraient alors majoritairement composés de PC avec des concentrations importantes et équivalentes de PE et PI. Si l'acide palmitique est l'acide gras le plus commun dans les phospholipides, l'acide linoléique est largement plus représenté dans les phospholipides que dans les triglycérides de l'huile. Au contraire du palme, le soja a fait l'objet de beaucoup plus d'études concernant ses phospholipides qui forment l'essentiel de ceux que l'on peut trouver sur le marché. En effet, avec des concentrations allant jusqu'à 2% des graines et 3% de l'huile extraite par solvant, c'est un coproduit intéressant à valoriser. Les phospholipides seraient majoritairement à base de PC, suivi de PE et PI et seraient principalement composés des acides linoléique, palmitique, oléique et stéarique (Liu et Ma, 2011). Cependant, des chercheurs ont pu extraire des oléosomes avec une plus forte concentration en PE (Martin et Wilson, 1985). Une revue (Szuhaj, 1989) montre ainsi la variabilité des classes de phospholipides et de leur répartition en acides gras (Tableau 1-4, Tableau 1-5).

Tableau 1-4. Composition des phospholipides de soja – extrait d'article (J.P. Cherry et W.H. Kramer, 1989)

Composant	Abréviation	Gamme de concentrations (%)		
		Faibles	Intermédiaires	Elevées
Phosphatidylcholine	PC	12,0-21,0	29,0-39,0	41,0-46,0
Phosphatidyléthanolamine	PE	8,0-9,5	20,0-26,3	31,0-34,0
Phosphatidylinositol	PI	1,7-7,0	13,0-17,5	19,0-21,0
Acide Phosphatidique	PA	0,2-1,5	5,0-9,0	14
Phosphatidylsérine	PS	0,2	5,9-6,3	
Lysophosphatidylcholine	LPC	1,5	8,5	
Lysophosphatidylinositol	LPI	0,4-1,8		
Lysophosphatidylsérine	LPS	1		
Acide Lysophosphatidique	LPA	1		

Tableau 1-5. Composition en acides gras des phospholipides de soja (J.P. Cherry et W.H. Kramer, 1989)

Acide gras	Abréviation	Gamme de concentrations (%)		
		Faibles	Intermédiaires	Elevées
Myristique	C14:0	0,3-1,9		
Palmitique	C16:0	11,7-18,9	2,5-26,7	42,7
Palmitoléique	C16:1	7,0-8,6		
Stéarique	C18:0	3,7-4,3	9,3-11,7	
Oléique	C18:1	6,8-9,8	17,0-25,1	
Linoléique	C18:2	17,1-20,0	37,0-40,0	55,0-60,8
Linoléinique	C18:3	1,6	4,0-6,2	9,2
Arachidique	C20:0	1,4-2,3		

Tableau 1-6. Concentration en phospholipides de diverses graines, de l'huile extraite des graines et du tourteau (lorsque les valeurs sont en pourcentage de phosphore, celles-ci ont été multipliées par 24) – (NT : valeur non trouvée)

Graine	mg/g de graine	mg/g d'huile	mg/g d'huile (tourteau)
Arachide	3,6 (Guo et al., 2005) ; 6,2 (Wagner et Wolff, 1964) ; 5 (Pardun, 1989; Singleton et Stikeleather, 1995)	4-16 (Pasini et al., 2013); 3-4 (Pardun, 1989), 16 (Yoshida et al., 2005)	
Cameline	NT	45 (Belayneh et al., 2017) – Avec SC-CO ₂ + EtOH	93 (Cansell et al., 2017)
Chia	NT	NT	9 (Bushway et al., 1984)
Colza	15 (Goraj-Moszora et Drozdowski, 1990; Pardun, 1989; Weihrauch et Son, 1983)	21-28 (Hamama et al., 2003);	NT
Colza (Canola)	15-19 (Goraj-Moszora et Drozdowski, 1990)	2-5 (Pardun, 1989) NT	NT
Colza 00	10-18 (Goraj-Moszora et Drozdowski, 1990)	NT	NT
Colza (Oléosome)	20 (Tzen <i>et al.</i> , 1993a)	NT	NT
Coco	NT	2 (Krishnamurthy et Chandrasekhara, 1983) 13-27 (Pardun, 1989)	4 (Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 1987)
Coton	38 (Chernenko <i>et al.</i> , 1993)		
Lin	7,5 (Pardun, 1989)	18 (Pardun, 1989) ; 8,3 (Teneva <i>et al.</i> , 2014)	48-76 (Cansell <i>et al.</i> , 2017)
Olive (graine)	0,2 (Vioque et Maza, 1973)	NT	NT
Olive (noyau)	4,1 (Alter et Gutfinger, 1982)	NT	NT
Olive (chair)	3,6 (Alter et Gutfinger, 1982)	NT	NT
Palme (mésocarpe)	NT	1-2 (Goh <i>et al.</i> , 1982)	
Palme (noyau)	NT	NT	NT
Ricin	~2 (Elsebaïy <i>et al.</i> , 1980)	NT	NT
Soja	4,9 (Guo <i>et al.</i> , 2005) ; 20,4 (Weihrauch et Son, 1983)	15-25 (Gunstone, 2008); 18-32 (Pardun, 1989)	NT
Tournesol	10,9 (Weihrauch et Son, 1983), 5 (Pardun, 1989)	<12 (Gunstone et Harwood, 1994); 5-10 (Pardun, 1989) ; 46,1 (Yoshida <i>et al.</i> , 2001a)	NT

Concernant le colza, les concentrations en phospholipides des graines sont légèrement plus faibles que pour le soja (1,5% des graines -Tableau 1-6), ce qui explique la plus faible disponibilité des phospholipides de colza sur le marché. Le tournesol est une autre graine contenant une concentration significative en phospholipides (jusqu'à 1% de la graine). Ces derniers sont riches en phosphatidylcholine avec des proportions de classes similaires (Tableau 1-7). L'arachide, avec une concentration maximale de 0,6% de phospholipides dans la graine et de 1,6% de l'huile est moins exploitable pour cette ressource. Notons que deux équipes ont détecté de la phosphatidylsérine dans les oléosomes d'arachide (Inanaga *et al.*, 1990; Tzen *et al.*, 1993a). Le coton est une autre ressource comparable au soja pour sa richesse en phospholipides. Deux études sur les trois référencées par une revue indiquent la présence de phosphatidylsérine (Frank, 2013). Concernant l'huile de coprah, celle-ci contient très peu de phospholipides (0,2%), encore une fois majoritairement composés de PC. Le noyau ou la chair de l'olive contiennent environ 0,4% de phospholipides avec toujours une prédominance de PC et du PS retrouvé cependant dans la chair.

Au sujet des graines à mucilage, notons une concentration très importante de phospholipides dans l'huile extraite des graines et l'huile extraite de tourteaux de caméline par le CO₂ supercritique en présence d'éthanol (quasi-exclusivement PI). Cette concentration est un peu inférieure dans l'huile extraite de tourteaux de lin. Pour le tourteau de chia, l'étude considère des paramètres différents mais la quantité de phospholipides trouvée est cependant très inférieure. L'huile extraite des graines par pressage contient en général peu de phospholipides, ces derniers ne s'expriment pas facilement avec l'huile. D'après les résultats précédents, il est possible de constater un manque évident de données concernant la teneur en phospholipides de certaines graines comme la caméline et la chia.

L'observation des classes de phospholipides montre parfois des variations importantes pour une même espèce, comme l'exemple du lin peut le montrer avec une composition relative en PC qui peut aller du simple au double selon les études (Tableau 1-7). Cette variabilité peut s'expliquer par les génotypes mais aussi par des conditions d'extraction, de traitement ou de récolte différents. Cependant, la prédominance de la phosphatidylcholine se retrouve dans quasiment tous les cas avec ensuite PE et PI en proportions variables. Les autres classes sont en général minoritaires même si la concentration importante de phosphatidylsérine dans la graine de coton des deux variétés étudiées en 1970 par l'équipe de Nockrashy et Frampton est remarquable (Nockrashy et Frampton, 1970).

Tableau 1-7. Classes de phospholipides dans différentes graines (N.I : non identifiés ; C.L. : corps lipidique ; LP : Lysophospholipide)

Graine	PC	PE	PI	PA	PG	PS	DPG	LP	N.I	Références
Arachide	66	13	16	2	3					(Singleton et Stikeleather, 1995)
Arachide	51	17		2	2	17				(Inanaga <i>et al.</i> , 1990)
Arachide (C.L)	62	5	8			25				(Tzen <i>et al.</i> , 1993a)
Cameline	79	7	79	5		1				(Mansour <i>et al.</i> , 2014)
	(PC+PI)		(PC+PI)							
Caméline	22	4	74							(Belayneh <i>et al.</i> , 2017)
Coco	35	25	19	3				8		(Krishnamurthy et Chandrasekhara, 1983)
Colza	40	23	12	7					18	(Deleu <i>et al.</i> , 2010)
Colza HO	33-49	24-30	13-16	12-23						(Abidi <i>et al.</i> , 1999)
Colza printemps	30-59	20-65	5-30							(Beermann <i>et al.</i> , 2003)
Colza hiver	58-74	13-28	13-16							(Ambrosewicz-Walacik <i>et al.</i> , 2015)
Colza	42	28	21	2	5			2		(Goraj-Moszora et Drozdowski, 1990)
Colza (C.L)	60	6	14			20				(Tzen <i>et al.</i> , 1993a)
Colza 00	57	17	18	2	4			3		(Goraj-Moszora et Drozdowski, 1990)
Coton GHerb	42	7	14			13		17		(Nockrashy et Frampton, 1970)
Coton GHIGlanced	37	22	111			14		8		(Nockrashy et Frampton, 1970)
Coton (C.L)	59	5	18			19				(Tzen <i>et al.</i> , 1993a)
Coton (C.L)	35	21	34	4						(Chapman, 1991)
Lin (C.L)	57	3	7			33				(Tzen <i>et al.</i> , 1993a)
Lin	35	11	38	7			4			(Teneva <i>et al.</i> , 2014)
Lin	18	28	26	2	11					(Herchi <i>et al.</i> , 2012)
Olive (chair)	49	5	18			7				(Alter et Gutfinger, 1982)
Palmier à huile	27	21	32 (+PS)		20	32				(Chow et Ho, 2002)
						(+PI)				
Palmier à huile	34-35	22-26	21-25		5-7				7-8	(Kulkarni <i>et al.</i> , 1991)
Tournesol	54	14	32							(Yoshida <i>et al.</i> , 2001b)
Tournesol	56	12	7	4	4	2				(Elsebaïy <i>et al.</i> , 1980)
Tournesol	61	19	20							(Guo <i>et al.</i> , 2005)
Tournesol (C.L)	79	13	8	0						(Millichip <i>et al.</i> , 1996)
Soja	32	20	14		16		18			(Omogbai, 1990)
Soja (C.L)	15	29	25		1		6			(Martin et Wilson, 1985)
Soja (C.L)	58	15	14	13						(Simpson et Nakamura, 1989)
Soja (C.L)	57	13	16	10	3					(Simpson et Nakamura, 1989)
Soja	22	14	12	6	2			3	4	(Gunstone, 2008)
Soja	54	30	17							(Guo <i>et al.</i> , 2005)

Concernant la composition en acides gras des phospholipides extraits (Tableau 1-8), les valeurs peuvent encore une fois varier selon les mêmes paramètres que précédemment. Cependant, des chaînes à 16 ou 18 atomes de carbone sont très majoritairement rencontrées.

Tableau 1-8. Répartition des acides gras des phospholipides de plusieurs graines (N.I. : non identifié, J.A.F : jours après floraison)

	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	N.I.	
Arachide	0,9	14	0,6	5	52	22		15	6	38	6	(Offem <i>et al.</i> , 1993)
Arachide		25	3	4	33	35						(Singleton et Pattee, 1981)
Coton		25			33	42						(Vijayalakshmi et Rao, 1972)
Coton	1	33		4	16	46						(Chernenko <i>et al.</i> , 1983)
Colza (Hiver)	0,1	6	0,3	1,5	58	20	8	1	1	0,3	4	(Beermann <i>et al.</i> , 2003)
Colza (Printemps)	0,1	5	0,3	2	57	19	9	0,6	2	0,4	5	(Beermann <i>et al.</i> , 2003)
Colza (lécithine)		7		1	56	25	6				5	(van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008)
Palme		38		1	37	32						(Goh <i>et al.</i> , 1982)
Palme		29		18	29	17						(Kulkarni <i>et al.</i> , 1991)
Soja	0,1	18	0,4	4	5	63	9				1	(Yoshida <i>et al.</i> , 1997)
Soja (lécithine)		16		4	17	55	7				1	(van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008)
Tournesol (lécithine)		11		4	18	63	0				4	(van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008)
Tournesol (oléosome)		8		7	56	29						(Millichip <i>et al.</i> , 1996)
Caméline		12		6	17	22	29		13		3	(Kirkhus <i>et al.</i> , 2013)
Caméline		8		3	15	20	34	13	2		3	(Belayneh <i>et al.</i> , 2018)
Caméline		14		4	36	29	12		1,7		3,3	(Mansour <i>et al.</i> , 2014)
Caméline (tourteau)		18		6,5	24	28	16	0,2	2		5	(Cansell <i>et al.</i> , 2017)
Chia	9	16	5	8	30	10	13			2	3	(Bushway <i>et al.</i> , 1984)
Lin		20		2	28	30	20					(Herchi <i>et al.</i> , 2012)
Lin (tourteau)		18		7	24	36	11	0,1	0,3		3	(Cansell <i>et al.</i> , 2017)

L'acide linoléique, généralement majoritaire dans les triglycérides des huiles de lin et de chia n'est que peu représenté dans les acides gras des phospholipides. Si les données concernant les classes de phospholipides sont associées à leur composition en acides gras, il ressort qu'à cause des variabilités intra-espèces, il est difficile d'exprimer des différences

significatives entre les graines mais plutôt des tendances. D'après une équipe de recherche (Teneva *et al.*, 2014), les phospholipides du lin seraient principalement composés de PC (26-43%) et PI (36 à 40%) avec comme acides gras majeurs C18:0 et C18:1. Cependant, une autre équipe (Herchi *et al.*, 2012) a déterminé que PE et PI sont les classes majoritaires et les principaux acides gras représentés sont C16:0, C18:1 et C18:2 avec assez peu de C18:3 qui est pourtant un acide gras majeur de l'huile.

Concernant la caméline, selon une équipe (Mansour *et al.*, 2014), PC est le phospholipide majoritaire mais pour une autre (Belayneh *et al.*, 2017), il s'agit de PI avec une forte variabilité en fonction des conditions d'extraction sous CO₂ supercritique en présence d'éthanol. PC comprend surtout des combinaisons 18:2/18:2 et 18:1/18:2 (Buré *et al.*, 2016). Selon l'équipe de Maged Mansour (Mansour *et al.*, 2014), l'acide oléique serait plus représenté que l'acide linoléique et linoléique mais selon celle de Bente Kirkhus (Kirkhus *et al.*, 2013), dans l'huile, la composition en acides gras des phospholipides est dans l'ordre inverse avec tout d'abord l'acide linoléique, puis linoléique et enfin oléique.

Dans le ricin, étrangement, la bibliographie indique l'absence de l'acide ricinoléique de la composition des phospholipides (Kondoh et Kawabe, 1975). Les acides gras majoritaires étant, dans l'ordre, l'acide linoléique, oléique et palmitique. Les classes PC, PE et PI semblent équivalentes.

Dans la chia, les acides gras principaux des phospholipides seraient l'oléique, le linoléique et le palmitique (Bushway *et al.*, 1984).

1.3. Extraction des phospholipides végétaux

Les phospholipides sont en général des sous-produits issus du raffinage de l'huile extraite à partir de graines oléagineuses. Si la très grande majorité des phospholipides commerciaux provient du soja, les technologies ont également été mises au point pour le colza et le tournesol. Cependant, il est rare de trouver mention d'un rendement d'extraction dans les références bibliographiques, les protocoles s'intéressant davantage à la concentration résiduelle de phospholipides dans l'huile dégommée. Le mode d'obtention de l'huile a alors une grande importance. Selon que celui-ci fasse appel à un pressage mécanique, une extraction par solvant organique ou un mélange des deux, la quantité de phospholipides dans l'huile pourra être très différente. Concernant le soja, la très grande majorité des extractions d'huile se fait par solvant.

1.3.i. Extraction par solvant

a. Extraction par hexane

L'hexane est un solvant totalement apolaire qui extrait parfaitement les triglycérides et peut être utilisé aussi pour l'extraction de phospholipides non hydratés. Ainsi, dans un brevet de 2008 (Sunder, 2008), ce solvant est utilisé pour extraire la lécithine de soja. Cependant, ce brevet indien ne fait nullement mention du rendement d'extraction des phospholipides mais plutôt de la composition de la lécithine extraite et purifiée. Ainsi, le rendement d'extraction en phospholipides est plus important si la quantité d'hexane augmente (Nash et Frankel, 1986) mais une extraction au Soxhlet avec 5% d'acide acétique ajoutés à l'hexane permet d'augmenter par trois le rendement d'extraction des phospholipides par rapport à l'hexane seul (0,75% contre 0,24% de la masse des flocons de soja) (Bhagya, 1992). Un autre brevet (Snyder, 2004) montre qu'une farine de soja permet une meilleure extraction d'huile que des flocons mais qu'une augmentation de l'humidité de 4 à 9% permet d'augmenter grandement la quantité de phospholipides extraits par l'hexane.

b. Extraction par éthanol

Des chercheurs ont effectué des essais d'extraction d'huile de soja avec de l'éthanol à différents grades (Arnold et Choudhury, 1962). L'éthanol le plus pur permet d'extraire, sur un broyat de graines (600mL pour 100g d'échantillon), environ 19g de lipides. Cependant, dans cette extraction, des composés solides sont aussi extraits et sont traités par du diéther. Au total, l'huile de soja extraite contient 3,3% de phospholipides, (ce qui fait 0,63% du broyat) et ainsi un rendement proche de celui obtenu par un mélange hexane et acide acétique.

c. Extraction par CO₂ supercritique et éthanol

Le CO₂ supercritique, de par une très faible tension de surface et une haute diffusivité, pénètre facilement dans la matière organique. C'est généralement un bon solvant pour les composés non polaires. Utilisé seul, il solubilise assez peu les phospholipides mais, utilisé avec de l'éthanol, il permet d'obtenir une fraction enrichie en phospholipides. L'équipe de Luigi Montanari (Montanari *et al.*, 1999) a ainsi fait une extraction avec tout d'abord du CO₂ supercritique seul sur des flocons de soja pour extraire l'huile (principalement triglycérides) et du CO₂ supercritique additionné d'éthanol sur les flocons partiellement délipidés de soja (FDS) pour extraire les phospholipides. A 70°C et 68,9 MPa, ils obtiennent une quantité de

phospholipides extraits (1,08% des FDS) légèrement supérieure à celle obtenue par un mélange de solvants benzène, éthanol et éther de pétrole (réactif de Bollmann) (0,97 % des FDS). Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues par l'hexane, hexane/acide acétique et l'éthanol.

d. Extraction par mélange acétate d'éthyle/éthanol

Le mélange acétate d'éthyle/éthanol est un mélange actuellement utilisé pour remplacer le couple si connu méthanol/chloroforme utilisé dans les protocoles d'extraction d'huile de Folch ou Bligh and Dyer (Breil *et al.*, 2017). Il permet d'avoir un rendement d'extraction lipidique sur des levures à peine moins important que l'extraction de Folch. Cependant, son utilisation dans le cas de l'extraction des phospholipides de graines n'a pas encore été effectuée selon la littérature.

1.3.ii. Extraction par pressage mécanique

Lors du pressage des graines, les composés liquides s'écoulent d'autant plus facilement qu'ils ont des liens faibles avec les matrices solides les contenant et que leur point de fusion et point d'écoulement sont bas. Il est ainsi évident que les valeurs des contraintes mécaniques et de la température de pressage auront une forte influence sur la quantité de liquide extraite (Evon *et al.*, 2013; Kartika *et al.*, 2005). Les lipides neutres, contenus dans des oléosomes, ont un comportement de liquide newtonien et peuvent s'extraire assez facilement comme le contenu de poches qui explosent sous la contrainte. Cependant, les phospholipides, s'ils sont liquides individuellement à la température d'extraction, sont organisés généralement sous forme de monocouches (oléosomes) ou bicouches (membranes) et ont donc un comportement viscoélastique avec également des interactions protéines / phospholipides / carbohydrates.

Yingzi Wu et Tong Wang (Wu et Wang, 2003) comparent les classes et la composition en acides gras des phospholipides de soja extraits avec un extrudeur et une monovis et avec de l'hexane à 60°C. Si peu de différences de composition des phospholipides sont observées avec ces deux voies d'extraction, il n'est pas ici fait mention de différences de rendement d'extraction. L'équipe de Maud Cansell (Cansell *et al.*, 2017) montre que l'huile contenue dans un tourteau obtenu après pressage non chauffé de différentes graines (cameline, lin, sésame...) est enrichi en phospholipides avec entre 6 et 9% de phospholipides dans l'huile extraite du tourteau de cameline et entre 5 et 8% de phospholipides dans l'huile extraite du tourteau de lin. Enfin, une autre équipe (Ambrosewicz-Walacik *et al.*, 2015) montre que la

teneur en phospholipides d'une huile extraite par pressage va fortement varier en fonction du conditionnement des graines et de la température de pressage.

Tableau 1-9. Teneur en phospholipides de plusieurs huiles de colza en fonction de leur traitement et de différentes références (tableau adapté et corrigé de l'article de Ambrosewicz-Walacik *et al.*, 2015).

Type/Origine de l'huile de colza	Teneur en PL de l'huile extraite (%)	
Graines pressées à froid (<55°C)	0,029	(Cvengroš <i>et al.</i> , 1999)
Graines pressées à 80-90°C	0,0252	
Graines pressées à 90-100°C	0,0324	
Graines préchauffées à 80°C/30 min, pressées à 105-110°C	0,0442	(Prior <i>et al.</i> , 1991)
Graines préchauffées à 100°C/30 min, pressées à T<105°C	0,0834	
Graines préchauffées à 100°C/30 min, pressées à 105-127°C	0,1284	
Pressage sur flocons de graines préchauffées	0,54	(Przybylski et Eskin, 1991)
Pressage sur graines entières préchauffées	0,63	
Huile Brute	0,57	
Huile Neutralisée	0,04	(Szydłowskaczerniak, 2007)
Huile Blanchie	0,02	
Huile raffinée	0,02	

Ainsi, de grandes variabilités apparaissent dans les teneurs en phospholipides d'huiles obtenues par pressage (Tableau 1-9). Cependant, autant certains résultats sont détaillés (Prior *et al.*, 1991), autant d'autres (Przybylski et Eskin, 1991; Szydłowskaczerniak, 2007) proviennent d'huiles dont les conditions d'obtention sont mal précisées. D'après le Tableau 1-9, il semble qu'un préchauffage des graines de même qu'une température élevée de fourreau permette une meilleure extraction des phospholipides. Plusieurs protocoles d'extraction des phospholipides sont alors utilisables à partir d'une huile extraite par pressage, selon que ceux-ci se déroulent en mode batch ou continu (Liu et Ma, 2011). En mode batch, l'extraction se fait tout d'abord par une filtration des impuretés de l'huile et une phase de préchauffage de l'huile à 80°C. Ensuite, en fonction de la quantité de phospholipides estimée dans l'huile, une certaine quantité d'eau est rajoutée, en général 3,5 fois la quantité de phospholipides. L'eau ajoutée est souvent chauffée et peut être utilisée seule ou avec l'ajout de sels. De même, elle peut être ajoutée en une fois ou graduellement. Le milieu est agité rapidement au début et plus lentement lorsque des ensembles commencent à précipiter. La phase surnageante est alors de l'huile raffinée tandis que la phase précipitée contient les phospholipides hydratés. Ces phospholipides peuvent être déshydratés partiellement ou

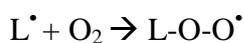
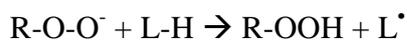
totallement par chauffage à 80°C et mise sous vide. Un solide ou une pâte de couleur marron est alors récupérée. Elle peut être blanchie avec un traitement à l'eau oxygénée. Cependant, elle contient encore beaucoup de lipides neutres et peut être purifiée d'avantage selon les besoins. Cette purification est généralement réalisée avec l'acétone, un solvant dans lequel les phospholipides sont peu solubles au contraire de l'eau et des lipides neutres. Dans un exemple d'utilisation (Liu et Ma, 2011), *l'acétone en large excès (10 fois la masse du concentrat de phospholipides) est ajoutée. Après agitation et sédimentation, la phase supérieure est éliminée et encore trois autres lavages sont réalisés avec un rapport 5:1 d'acétone. Le précipitat de phospholipides est alors centrifugé et encore une masse d'acétone double de celle du concentrat est ajoutée. Après centrifugation, le précipitat contient encore de l'acétone et est alors séché.* Il est étonnant de ne pas trouver de mention de température dans cette étape de purification, celle-ci ayant une grande importance dans la solubilité des différents composants dans l'acétone. En mode continu, l'huile est chauffée à 80°C et centrifugée avant d'être additionnée de 2% d'eau (m/m) à 80°C. L'huile dégommée et le sédiment sont centrifugés et le sédiment est envoyé dans un évaporateur à film mince pour être séché à moins de 1% d'humidité.

1.4. Oxydation des phospholipides

Il existe de très nombreux systèmes oxydants pour les phospholipides (Reis et Spickett, 2012), que ce soit avec des couples métaux/eau oxygénée, composés azoïques, avec activation avec les ultraviolets mais aussi des oxydants enzymatiques.

Auto-Oxydation

En 1980, des chercheurs ont laissé une solution de 1-palmityl, 2-linoleylphosphatidylcholine s'évaporer jusqu'à former un film mince. Celui-ci a ensuite été exposé à un courant d'air sec pendant 16 heures. Plusieurs composés d'oxydation sont alors détectés par CCM, CLHP et des peroxydes sont identifiés avec l'apparition de diènes conjugués (Porter *et al.*, 1980). Leur formation serait due à une réaction en chaîne radicalaire.



Ils trouvent alors, comme composés (notation sur la chaîne linoléique) : 9-cis, 11-trans, 13-hydroperoxy ; 9-trans, 11-trans, 13-hydroperoxy ; 10-trans, 12-cis, 9 hydroperoxy et 10-trans,

12-trans , 9-hydroperoxy. Dans leur étude, les auteurs ont ensuite réduit les hydroperoxydes avec de la triphénylphosphine pour obtenir des phospholipides monohydroxylés. Concernant justement l'oxydation de l'acide linoléique, tous modes d'oxydation confondus, si l'hydroperoxyde peut se former au niveau des carbones 8, 9, 10, 11, 12, 13 et 14, la bibliographie indique une prépondérance de références concernant la position 13 (1103 références au 26 mars 2019) et la position 9 (576 références au 26 mars 2016) par rapport aux autres positions, les positions 11 et 14 étant très peu mentionnées. Dans les deux cas favorisés, la migration de l'insaturation provoque l'apparition d'une conjugaison avec une liaison *cis* et l'autre *trans*.

Avec initiateurs de radicaux

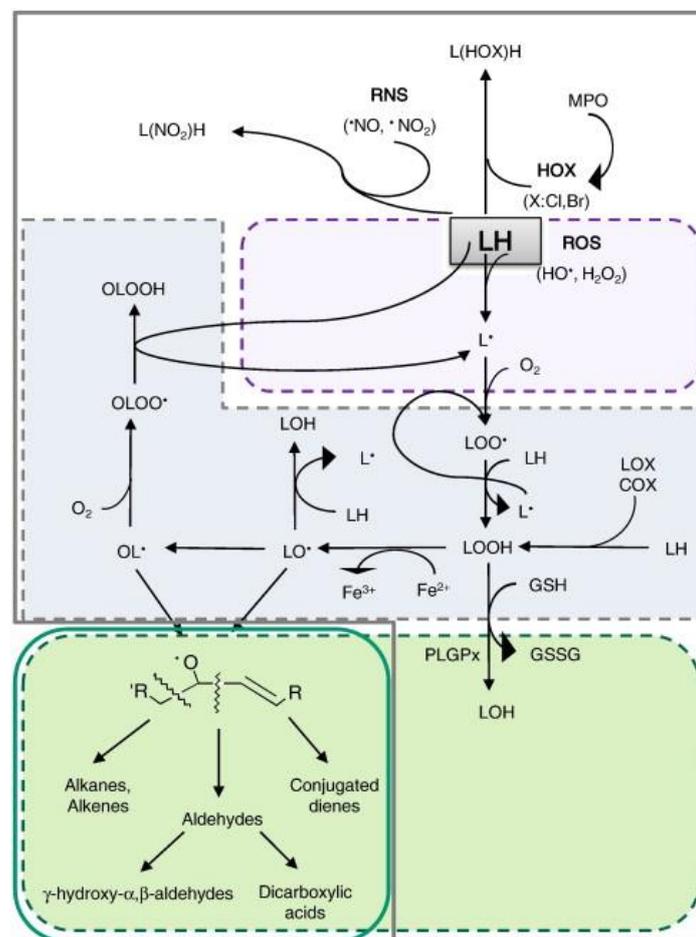


Figure 1-11. Processus d'oxydation de la chaîne grasse d'un phospholipide (LH) après attaque par des espèces réactives à base d'oxygène (ROS) ou d'azote (RNS) – MPO : myeloperoxidase, LOX : lipoxygénase, COX : cyclooxygénase (Reis et Spickett, 2012).

Dans le cas de la peroxydation radicalaire, la Figure 1-11 montre un grand nombre de voies menant à des hydroperoxydes, peroxydes et des produits de scission. La chaîne grasse

LH est attaquée par un radical libre et perd un hydrogène. La réaction radicalaire peut se propager alors de différentes façons. L'addition de molécules de dioxygène peut se faire plusieurs fois sur les chaînes polyinsaturées. Dans les chaînes insaturées, les atomes d'hydrogènes situés sur les groupes –CH₂– adjacents aux doubles liaisons sont relativement labiles et peuvent assez facilement partir avec une attaque radicalaire, donnant une espèce radicalaire. Une étude de 1994 révèle qu'avec un initiateur de radicaux hydrosolubles, l'hydroperoxydation de phosphatidylcholine ou phosphatidyléthanolamine ne présente pas de grandes différences, la nature des acides gras jouant un plus grand rôle que la nature de la tête polaire (Yazu *et al.*, 1994). Plusieurs autres études d'oxydation des phospholipides peuvent être citées, que ce soit avec H₂O₂ seul, avec des catalyseurs comme FeCl₂ au travers de la réaction de Fenton (Megli et Russo, 2008) :



mais aussi avec l'utilisation d'initiateurs de radicaux azoïques :

AMVN : 2,2'-azobis(2,4-diméthyl-valéronitrile) (Shvedova *et al.*, 2001)

MeOAMVN : 2,2'-azobis(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile) (Mazari *et al.*, 2010),

AAPH : 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (Kawai *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1995).

Avec enzymes et bactéries

L'oxydation enzymatique d'acides gras est connue depuis de nombreuses années. Citons par exemple deux études utilisant une lipoxigénase de soja pour oxyder l'acide linoléique (Iacazio *et al.*, 1990; Nor *et al.*, 2003). Ils forment alors principalement l'acide 9,-*cis*, 11-*trans* 13-hydroperoxylinoléique. Ce dernier est ensuite réduit par du NaBH₄. D'autres chercheurs ont oxydé l'acide oléique par *Pseudomonas* sp. 42a2 pour former un hydroperoxyde (acide 10-hydroperoxy-8-octadécénoïque) un monohydroxyle (acide 10-hydroxy-8-octadécénoïque) et un dihydroxyle (acide 7,10-8-octadécénoïque) (Guerrero *et al.*, 1997). Le champignon *Gaeumannomyces graminis* a aussi pu convertir l'acide linoléique en acide 8-hydroxylinoléique et acide 7,8 dihydroxylinoléique (Brodowsky et Oliw, 1992). 30mg de mycelia ont été incubés avec 2µg d'acide linoléique dans 0,8 mL de tampon borate pendant 30 minutes dans une atmosphère de ¹⁸O₂. En fait, c'est une action en deux étapes avec une action de dioxygénase puis une peroxydase et une hydroperoxyde isomérase.

Avec l'oxygène singulet

Le dioxygène possède plusieurs états excités singulet, de plus haute énergie que l'état triplet. Rappelons que la multiplicité de spin se calcule sous la forme $2S+1$ où S est le moment angulaire de spin. L'état singulet correspond à une multiplicité 1 et l'état triplet à une multiplicité de 3. Les trois états intervenant peuvent être représentés ainsi (Figure 1-12).

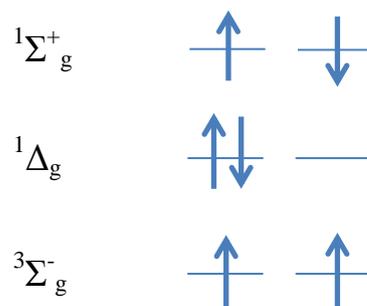


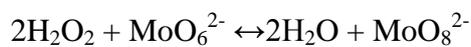
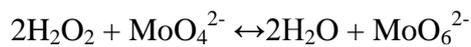
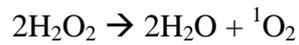
Figure 1-12. Représentation d'états excités du dioxygène

Le deuxième état excité, $^1\Sigma_g^+$ a une configuration électronique identique à celle de l'état fondamental sauf que les deux électrons ont des spins opposés. L'état $^1\Delta_g$ est relativement stable, pouvant rester jusqu'à 1ms en solution (Merkel et Kearns, 1972a). Dans cet état, l'oxygène est plus oxydant, plus électrophile notamment et peut donc facilement réagir avec des liaisons insaturées. Il est donc adapté à la formation de composés peroxydés. Cet état singulet est cependant transitoire et nécessite des conditions adéquates pour pouvoir perdurer assez longtemps pour interagir avec les substrats à oxyder. La vitesse de disparition de l'oxygène singulet dans différents solvants (Kochevar et Redmond, 2000) est indiquée ci-dessous (Tableau 1-10).

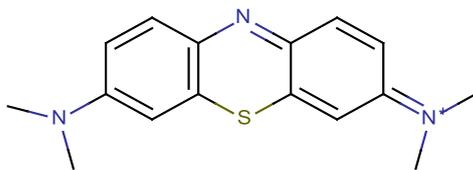
Tableau 1-10. Vitesse de disparition de l'oxygène singulet (K_d) dans plusieurs solvants.

Solvant	K_d (s^{-1})
Eau	3×10^5
Méthanol	$9,6 \times 10^4$
Ethanol	$6,7 \times 10^4$
Benzène	$3,1 \times 10^4$
Acétonitrile	$1,5 \times 10^4$
Chloroforme	$4,0 \times 10^3$

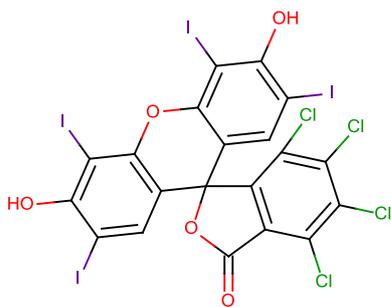
D'après le Tableau 1-10, l'oxygène singlet a une décroissance rapide dans l'eau par rapport aux autres solvants. Notons l'acétonitrile qui possède une vitesse assez lente et est moins toxique que le chloroforme ou le benzène. La production d'oxygène singlet peut se faire de diverses façons. Une voie courante est la dismutation de l'eau oxygénée avec l'aide de catalyseurs, citons notamment les ions molybdates (Aubry et Cazin, 1988; Boehme et Brauer, 1992)



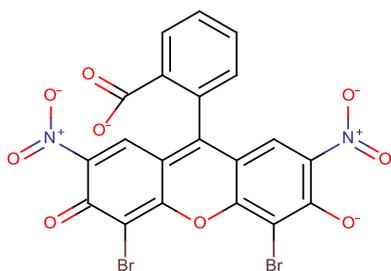
Une autre voie est la photosensibilisation d'un composé colorant. Il en existe plusieurs dont les plus courants sont l'éosine, le rose de Bengale et le bleu de méthylène (Molécule 1-8).



Bleu de méthylène



Rose de Bengale



Eosine

Molécule 1-8. Représentation de trois photosensibilisateurs courants

L'excitation du photosensibilisateur est assurée par une source de lumière. Celle-ci va porter le photosensibilisateur à un état excité singulet S_n . Il va alors se relaxer jusqu'à l'état de plus faible énergie, S_1 . Une conversion intersystème génère un état triplet T_1 de plus grande durée de vie que S_1 . La Figure 1-13 présente l'exemple du bleu de méthylène.

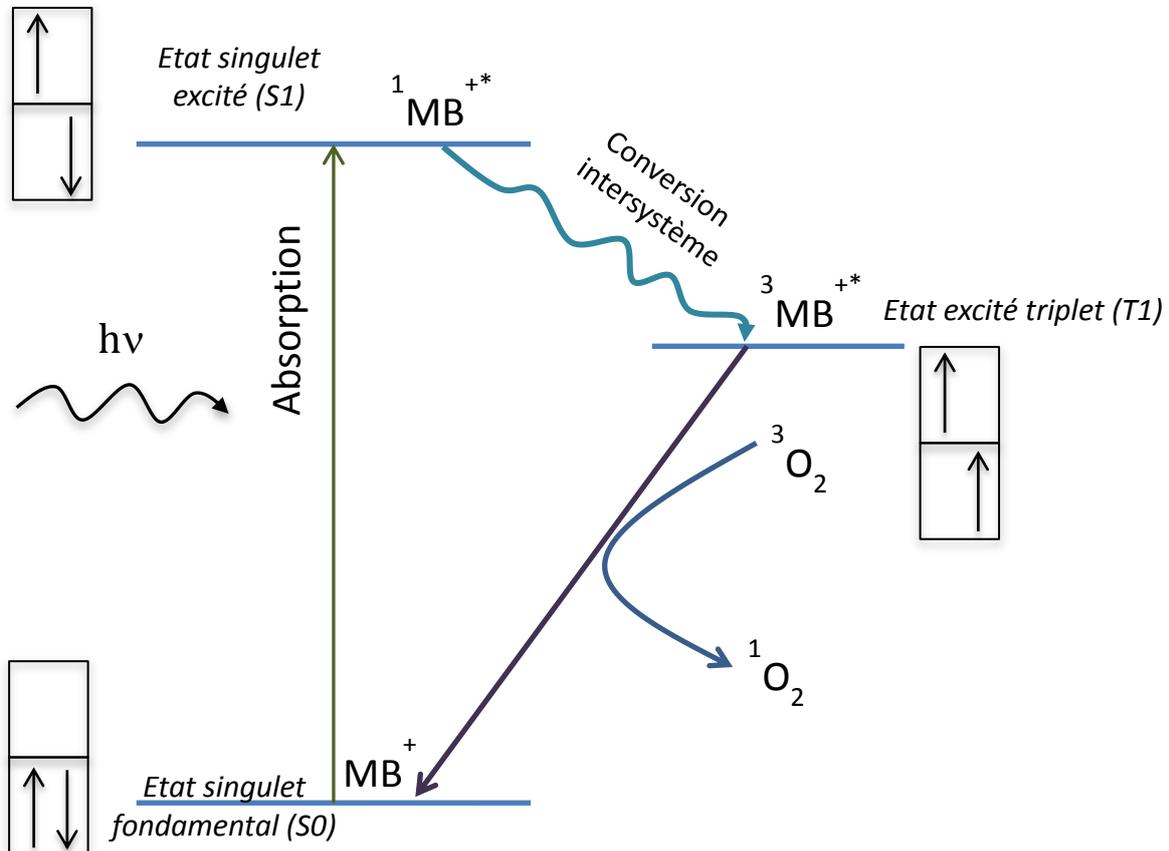


Figure 1-13. Représentation de la photosensibilisation avec le bleu de méthylène

Rappel : La conversion intersystème est une transition à énergie constante d'un état singulet vers un état triplet. L'inversion de spin qui en résulte est rendue possible par un couplage spin-orbite fort, ce qu'on retrouve principalement dans des molécules avec des atomes lourds. La durée de vie de l'état T_1 va lui permettre de réagir de deux façons possibles.

Mécanisme de type I.

Dans ce cas, un transfert d'électron ou une déhydrogénation entre un état excité du photosensibilisateur et le substrat va produire des radicaux libres. Ces derniers peuvent alors réagir avec l'oxygène pour former des anions radicaux $O_2^{\bullet -}$. Ce mécanisme nécessite une proximité entre le photosensibilisateur et le substrat.

Mécanisme de type II.

Dans ce cas, une collision entre le photosensibilisateur et de l'oxygène sous forme triplet va amener ce dernier à l'état singulet par transfert d'énergie. L'oxygène singulet une fois produit va pouvoir réagir avec des molécules insaturées. Concernant l'acide linoléique (Figure 1-14) :

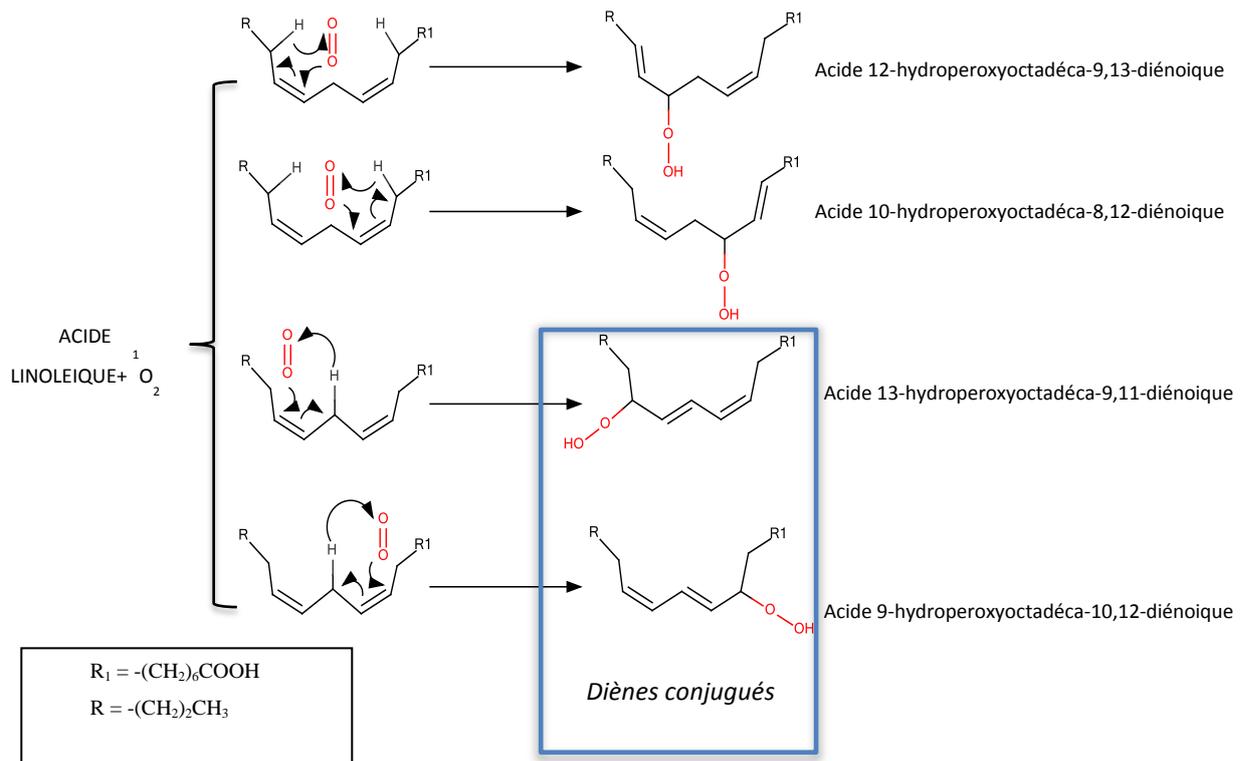


Figure 1-14. Mécanismes réactionnels simplifiés de la réaction entre l'acide linoléique et l'oxygène singulet

De très nombreux exemples de peroxydation des phospholipides par photosensibilisation sont disponibles dans la littérature. En 1981, une équipe a analysé les hydroperoxides formés par l'oxydation de la phosphatidylcholine avec de l'oxygène singulet (Terao *et al.*, 1981). 100mg de dilinoleylphosphatidylcholine ont été dissous dans 5mL de méthanol avec 0,1 mM de bleu de méthylène. Le milieu a ensuite été illuminé par une lampe de tungstène 30W pendant 12 heures avec une intensité de 10mW/cm². Deux fractions sont alors obtenues, l'une contenant 2 hydroperoxylinoleates et l'une contenant à la fois un hydroperoxylinoleate et un linoléate non oxydé. Les quatre isomères de position 9-, 10-, 12-, 13- étaient représentés avec cependant une prédominance des positions 9 et 13 (ratios 9- :10- :12- :13- = 34 :16 :16 :34). Des chercheurs ont comparé le rendement de formation d'oxygène singulet permise par plusieurs photosensibilisateurs, comme le bleu de méthylène, l'érythrosine, l'hématoporphyrine et la riboflavine dans le méthanol et leur sélectivité concernant

l'oxydation d'esters d'acides gras polyinsaturés en considérant un mécanisme de type II (Chacon *et al.*, 1988). Pour le linoléate de phényle, quel que soit le photosensibilisateur utilisé, la sélectivité est identique avec les peroxydes situés préférentiellement en positions 9 et 16 (9-OOH et 16-OOH : 20,5-22% et 26,5-31,2% respectivement alors que les positions 10, 12, 13 et 15 représentent chacune entre 10 et 14%). Sinon, le bleu de méthylène a un rendement de formation d'oxygène singulet équivalent à l'hématoporphyrine et l'érythrosine mais a une moindre cinétique de décomposition que les autres photosensibilisateurs testés dans le méthanol. Plusieurs revues permettent de comparer le rendement d'oxygène singulet entre plusieurs photosensibilisateurs (Kochevar et Redmond, 2000; Redmond et Gamlin, 1999; Tanielian *et al.*, 1984) (Tableau 1-11).

Tableau 1-11. Comparaison du rendement d'oxygène singulet entre plusieurs photosensibilisateurs

Sensibilisateur	Rendement d'oxygène singulet	Solvant
Bleu de méthylène	0,42-0,49 (Spiller <i>et al.</i> , 1998)	Ethanol
Bleu de méthylène	0,50 (Tanielian et al., 1984)	Méthanol
Bleu de méthylène	0,52 (Usui et Kamogawa, 1974)	Eau
Rose de Bengale	0,68 (Gottschalk <i>et al.</i> , 1986) , 0,79 (Spiller <i>et al.</i> , 1998)	Ethanol
Rose de Bengale	0,76 (Neckers, 1989) 0,79 (Gollnick, 2007; Merkel et Kearns, 1972b)	Méthanol
Rose de Bengale	0,75(Gandin <i>et al.</i> , 1983)	Eau
Tétraphénylporphyrine	0,88-0,89 (Tanielian et al., 1984)	Benzène, Toluène
Eosine	0,42(Tanielian et al., 1984)	Méthanol
Eosine	0,42 (Tanielian et al., 1984)	Ethanol
Chlorophylle	0,60 (Battino, 1981)	Benzène
Chlorophylle	0,68(Battino, 1981)	Toluène
Rubrène	0,90 (Tanielian et al., 1984b)	Benzène
Erythrosine B	0,63 (Gandin <i>et al.</i> , 1983)	Eau
Erythrosine B	0,69 (Gandin <i>et al.</i> , 1983)	Ethanol
Riboflavine	0,47 (Chaon <i>et al.</i> , 1987)	Méthanol

Les exemples de photosensibilisateurs ci-dessus ont des absorptions importantes dans le visible du fait de la présence d'hétéroatomes et de cycles conjugués. Les avantages du bleu de méthylène par rapport à d'autres photosensibilisateurs sont son rendement d'oxygène singulet

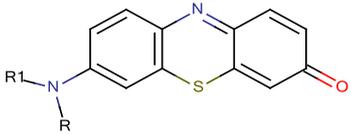
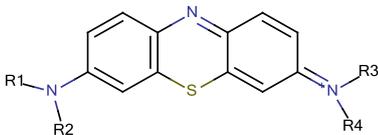
important, sa grande solubilité dans l'eau et l'éthanol, sa stabilité chimique et son plus faible nombre d'atomes. Concernant les lipides et a fortiori les phospholipides, les photosensibilisateurs les plus utilisés sont le bleu de méthylène et le rose de Bengale.

Bleu de méthylène

Si le comportement du bleu de méthylène est analysé dans des solvants de différentes polarités, il apparaît que son absorbance est plus importante dans l'éthanol puis le méthanol, l'eau et l'isobutanol avec un pic se situant respectivement à 678, 676, 667 et 685 nm (Mahmood *et al.*, 2013). L'éthanol apparaît ainsi comme un solvant de choix pour l'utilisation du bleu de méthylène comme photosensibilisateur. Le bleu de méthylène peut cependant être de même oxydé et perdre en absorption en fonction des composés qu'il va former en solution. Selon une étude assez ancienne (Marshall, 1976), plusieurs colorants pourraient être produits par l'oxydation du bleu de méthylène (Tableau 1-12). La décoloration du bleu de méthylène interviendrait à cause d'une interaction entre les groupes hydroperoxydes et l'état triplet du photosensibilisateur (Tanielian *et al.*, 1992). Une lyse de l'hydroperoxyde produirait des radicaux qui interviendraient à la fois dans la décoloration du colorant et la scission de la chaîne du substrat (polybutadiène dans leur exemple). Selon une autre étude, la décoloration du bleu de méthylène interviendrait par sa réduction au travers de l'hydrogène porté par les fonctions -OOH. Ainsi :

$\text{LOOH} + \text{MB} \rightarrow \text{LOO}^\bullet + \text{MB-H}$, la forme MB-H n'étant plus colorée dans ce cas, ce serait la forme 13-OOH de l'acide linoléique qui serait préférentiellement responsable du don d'hydrogène (Toyosaki, 1996).

Tableau 1-12. Principaux produits d'oxydation du bleu de méthylène

Composé	
Thionolines	
Le composé avec R=R1=Me est le Violet de méthylène	
Thionines	
Selon que R1 – R4 sont des méthyles ou des hydrogènes, plusieurs composés sont possibles	

1.5. *Perméabilité des bicouches lipidiques.*

Au sein d'un liposome, les composés polaires sont solubilisés dans la phase interne tandis que les composés apolaires se retrouvent à l'intérieur de la bicouche phospholipidique. Celle-ci est alors la membrane gouvernant les phénomènes de diffusion des différents types de composés (ions, eau, composés polaires et composés apolaires). Dans la membrane cellulaire, rappelons que les trois classes principales de lipides sont les phospholipides, les sphingolipides et le cholestérol avec des protéines dans un rapport protéines/lipides de 1/40.

Deux modes de transport sont à l'œuvre :

- le transport actif qui fait intervenir des « transporteurs » interagissant avec différentes parties de la membrane cellulaire pour permettre la diffusion de composés par un apport d'énergie métabolique.
- le transport passif pour lequel la diffusion au travers de la membrane ne nécessite pas d'énergie mais est le résultat de gradients électriques ou de concentration.

Seul le transport passif de molécules à travers des bicouches phospholipidiques sera détaillé. Plusieurs données expérimentales de perméabilités peuvent déjà être mentionnées (Tableau 1-13, Tableau 1-14). Ces valeurs indiquent une perméabilité très importante des gaz comme l'oxygène et le gaz carbonique, une perméabilité bien plus faible de l'eau mais supérieure à celles de l'urée et du glycérol. Le glucose se situe bien en dessous de ces dernières valeurs mais les composés possédant les plus faibles perméabilités sont les ions, exception faite du proton H^+ . Plusieurs modèles physiques ont été développés pour rendre compte du transport de solutés à travers une membrane de phospholipides. Certains sont plus adaptés à certains types de solutés ou de phospholipides. En effet, les perméabilités d'une petite molécule hydrophile, hydrophobe, chargée, d'un ion ou d'une molécule plus grosse ne font pas forcément intervenir les mêmes mécanismes. Au cours des dernières années, la modélisation moléculaire a permis de corroborer les observations expérimentales et les modèles postulés précédemment.

a. Modèle de solubilité - diffusion.

Un des premiers modèles est celui de la solubilité/diffusion qui considère que la perméabilité va être directement corrélée au coefficient de partage du soluté entre l'eau et la bicouche. Une fois solubilisé dans la bicouche, le soluté diffuse avec un certain coefficient.

Tableau 1-13. Perméabilité de l'eau mesurée pour plusieurs bicouches de phospholipides (en cm/s).

Membrane Lipidique artificielle	DOPS	SOPC	DMPC	DLPC	DLPE	POPC	DOPC	SLnPC	PC Courte chaîne (20 Å)	PC Chaîne longue (37,5 Å)
3,4x10 ⁻³ (Walter et Gutknecht, 1986)	1,25x10 ⁻⁴ (Petrache, 2004)	1,6x10 ⁻² (Huster <i>et al.</i> , 1997)	0,8x10 ⁻⁴ (Kučerka <i>et al.</i> , 2005)	1,0x10 ⁻⁴ (Kučerka <i>et al.</i> , 2005)	0,2x10 ⁻⁴ (McIntosh et Simon, 1986) (35°C)	1,3x10 ⁻⁴	1,6x10 ⁻⁴ (Kučerka <i>et al.</i> , 2008)	3,4x10 ⁻² (Huster <i>et al.</i> , 1997)	2,5x10 ⁻² (Paula <i>et al.</i> , 1996)	5,0x10 ⁻³ (Paula <i>et al.</i> , 1996)

Tableau 1-14. Perméabilité de divers solutés mesurée dans quelques bicouches lipidiques (en cm/s)

Composé	Membrane/Vésicule artificielle	PC ou Lécithine d'œuf (EPC ou EL)	DOL	PC Courte chaîne (20 Å)	PC Chaîne longue (37,5 Å)
O ₂	23 (Subczynski <i>et al.</i> , 1989)				
CO ₂	0,35 (Gutknecht, 1988)				
Urée	10 ⁻⁶ (Finkelstein, 1976; Orbach, 1980)	4x10 ⁻⁶ (Nitsche et Kasting, 2013) (EL/EPC) ; 3,6x10 ⁻⁶ (Gallucci <i>et al.</i> , 1971)		3,4x10 ⁻⁶ (Paula <i>et al.</i> , 1996)	6,0x10 ⁻⁷ (Paula <i>et al.</i> , 1996)
Glycérol	10 ⁻⁶ (Finkelstein, 1976; Orbach, 1980)	5,4x10 ⁻⁶ (EL) (Nitsche et Kasting, 2013) 5,7x10 ⁻⁶ (Gallucci <i>et al.</i> , 1971)		6,2 x10 ⁻⁶ (Paula <i>et al.</i> , 1996)	1,1x10 ⁻⁶ (Paula <i>et al.</i> , 1996)
Glucose	1,5x10 ⁻¹⁰ (DMPC) (Bresseleers <i>et al.</i> , 1984) 9x10 ⁻¹¹ (DOPC) (Terashima <i>et al.</i> , 1999)	3x10 ⁻¹¹ (Brunner <i>et al.</i> , 1980)			
K ⁺			3,5x10 ⁻¹² à 303K (Paula <i>et al.</i> , 1998, 1996)	1,5x10 ⁻¹⁰ (Paula <i>et al.</i> , 1996)	1,7x10 ⁻¹² (Paula <i>et al.</i> , 1996)
Cl ⁻		55x10 ⁻¹² à 277K (Hauser <i>et al.</i> , 1973)	12,1x10 ⁻⁹ à 303K (Paula <i>et al.</i> , 1998)		
Ca ²⁺	2,5x10 ⁻¹¹ (Rossignol <i>et al.</i> , 1985)				
Na ⁺		2,1x10 ⁻¹³ (Brunner <i>et al.</i> , 1980)			
H ⁺	10 ⁻⁴ (Rossignol <i>et al.</i> , 1985)	10 ⁻⁸ (Cafiso et Hubbell, 1983)		1,3x10 ⁻² (Paula <i>et al.</i> , 1996)	4,9x10 ⁻⁵ (Paula <i>et al.</i> , 1996)

La corrélation entre le coefficient de partage et la perméabilité a d'abord été avancée par Meyer et Overton il y a plus d'un siècle (Meyer, 1899; Missner et Pohl, 2009; Overton, 1901) :

$P=K.D_c/d_c$ où P est la perméabilité, K est le coefficient de partage eau/membrane, D_c , le coefficient de diffusion et d_c l'épaisseur de la membrane. Le modèle de solubilité/diffusion a été plusieurs fois corrigé et/ou développé pour rendre compte notamment de l'influence de l'arrangement des chaînes sur la perméabilité (Xiang et Anderson, 1997 ; Parisio *et al.*, 2013).

b. Modèle des pores transitoires

Si les modèles de solubilité/diffusion sont pratiques du point de vue d'un traitement d'un grand nombre de données expérimentales, ils ne permettent pas réellement de comprendre les mécanismes mis en œuvre lors du passage d'un soluté au travers de la membrane. De même, s'ils sont assez fiables pour les composés hydrophobes, ils ne sont pas adaptés à l'étude de la perméabilité des composés polaires, de l'eau et des ions. Plusieurs hypothèses sont alors à l'œuvre, certaines n'excluant pas forcément les autres, comme le modèle des pores transitoires. Avec les fluctuations thermiques, les chaînes grasses peuvent s'écarter et les phases internes et externes se rapprocher, provoquant l'apparition de pores qui permettraient aux solutés de traverser la membrane à différentes vitesses. Selon certains chercheurs, il est entendu que le flux d'eau à travers la couche hydrophobe de la bicouche est possible grâce à la formation spontanée de pores (Przybyło *et al.*, 2014). Cela rejoint d'autres travaux indiquant que l'eau diffuse à travers des pores transitoires provenant de fluctuations de densité au sein de la bicouche (Jansen et Blume, 1995). Le modèle solubilité/diffusion entraîne peu de variations de la perméabilité en fonction de l'épaisseur de la bicouche tandis que le modèle poreux montre une relation exponentielle. Ainsi l'eau, l'urée et le glycérol voient leur perméabilité être diminuée par 5 si les chaînes grasses passent de 14 à 24 atomes de carbone tandis que les protons et les ions potassium diminuent de deux ordres de grandeurs entre 14 et 18 atomes. La formation de pores ne semble plus pouvoir se former aux chaînes longues saturées, certainement à cause d'une plus grande stabilité de la bicouche (Paula *et al.*, 1996).

c. Modèles du volume libre et des perturbations

Si les pores considèrent un passage privilégié entre la phase externe et interne, certains modèles imaginent plutôt une perméabilité de proche en proche en utilisant le volume libre ou des défauts transitoires (perturbations) dans la bicouche membranaire. Les deux modèles se

rejoignent cependant assez facilement. Le modèle de Träuble (Träuble, 1971), affiné par Haines et Liebovitch en 1995 est lié à l'expansion latérale de la bicouche. Le mouvement latéral des phospholipides induit une cavité dans le réseau de têtes polaires dans laquelle l'eau peut pénétrer. Cette eau est ensuite recouverte par un groupe adjacent et elle se place dans l'espace créé par une irrégularité de la chaîne. L'eau se place entre deux irrégularités et traverse la membrane pendant que les chaînes bougent latéralement (Figure 1-15) (Haines et Liebovitch, 1995).

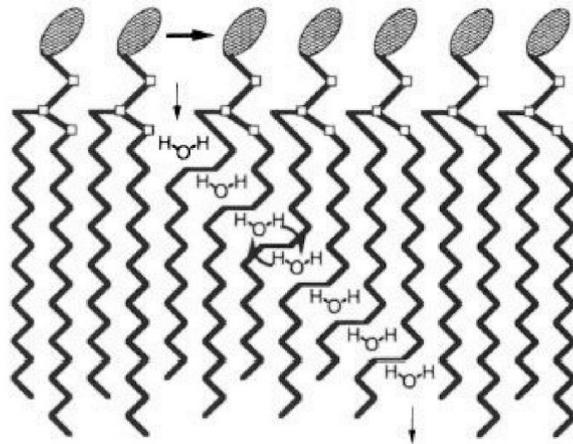


Figure 1-15. Mouvement d'une molécule d'eau le long d'une couche de phospholipides selon le déplacement d'irrégularités (Haines et Liebovitch, 1995)

Dans le cas du volume libre, la perméabilité serait d'autant plus dépendante du volume moléculaire. Le soluté « sauterait » d'une poche de volume important à l'autre. Ce modèle se rapprocherait de la diffusion dans des membranes de polymères selon eux (Walter et Gutknecht, 1986). Cette hypothèse des sauts est notamment formulée pour des petites molécules. En 1996, une équipe retrouve le modèle de Träuble par modélisation moléculaire et le relie à celui du volume libre (Jin et Hopfinger, 1996). Ainsi, ils indiquent un transport par perturbation (kink) dans les zones à fort angle de torsion et un transport par volume libre dans les zones à faible angle de torsion, aboutissant à un modèle à trois zones : la zone de la tête polaire (volume libre et insertion d'eau par liaisons hydrogène), la zone assez dense hydrocarbonée (déplacement par perturbation), la zone de fin des chaînes grasses (volume libre important). Ce modèle à trois couches a été repris par des chercheurs qui montrent qu'une augmentation des insaturations augmente le volume libre dans le milieu de la membrane (Rabinovich *et al.*, 2005). Un découpage de la bicouche en quatre zones a aussi été proposé avec des simulations numériques allant dans ce sens (Marrink *et al.*, 1996; Marrink et

Berendsen, 1996, 1994). La 1^{ère} zone correspond à celle où les têtes polaires sont encore peu présentes mais où se retrouvent alors surtout les molécules d'eau liées faiblement aux groupements cholines. La deuxième zone correspond aux têtes polaires à proprement parler et les molécules d'eau sont fortement liées à celles-ci. La troisième zone correspond à la zone la plus ordonnée des queues lipidiques avec une forte densité. La quatrième zone comporte la majeure partie de la fin des chaînes lipidiques. Cette région est beaucoup moins ordonnée et a une plus faible densité. La répartition du volume libre dans ces quatre régions a ensuite été analysée, permettant de postuler la possibilité de faire une relation quantitative entre la perméabilité de petites molécules et le volume libre.

d. Paramètres influents

Si les modèles vus ci-dessus privilégient le volume libre et le coefficient de partage Eau/Bicouche, certains paramètres qui y sont plus ou moins liés semblent exercer une certaine importance sur la perméabilité des bicouches lipidiques. Ainsi, certains paramètres sont connus pour généralement influencer la perméabilité « P » de l'eau et de la plupart des solutés dans un certain sens :

- le poids moléculaire du soluté ($M_w \nearrow \rightarrow P \searrow$) (Cohen et Bangham, 1972; Lieb et Stein, 1969; Terashima *et al.*, 1999)
- l'aire de la section transversale du soluté ($A \nearrow \rightarrow P \searrow$) (Xiang et Anderson, 1998)
- la longueur de la chaîne alkyle des phospholipides (Longueur $\nearrow \rightarrow P \searrow$) (Sugii *et al.*, 2005)
- la nature de la tête polaire (PC/PE $\nearrow \rightarrow P \searrow$) (Huster *et al.*, 1997; Singer, 1981)
- le pH qui va modifier la charge des têtes polaires (Charge $\nearrow \rightarrow$ Ecart entre têtes polaires $\nearrow \rightarrow P \nearrow$) (Graham et Lea, 1972)
- l'état gel/liquide de la bicouche (Etat liquide $\nearrow \rightarrow P \nearrow$) (Gerritsen *et al.*, 1980; Noordam *et al.*, 1980; Rossignol *et al.*, 1985)

D'autres ont une influence qui mérite d'être détaillée :

- Les insaturations.

La perméabilité du glycérol au travers de membranes de lécithine suit l'ordre $DSL < SOL < DOL < DLL$ (De Gier *et al.*, 1968). Ainsi, plus les phospholipides sont insaturés, plus la perméabilité du glycérol est importante. Rappelons ici que les insaturations, particulièrement

en configuration *cis*, en introduisant un arrangement moins régulier et moins dense des chaînes peuvent induire des perméabilités plus importantes que les chaînes saturées (Huster *et al.*, 1997). Terashima *et al.*, montrent un comportement différent pour les molécules chargées avec une forte dépendance de la charge sur la perméabilité. Ainsi, des molécules non chargées comme du glucose ou de l'aniline passeront plus facilement dans des phospholipides aux chaînes longues insaturées que dans des chaînes courtes mais saturées (DOPC par rapport à DMPC). En revanche, des molécules chargées comme la lysine ou le glutamate (chargées négativement) passeront plus facilement dans DMPC que dans DOPC (Terashima *et al.*, 1999). Selon cette étude, une chaîne saturée, plus compacte, permet une meilleure neutralisation des charges qu'une chaîne insaturée. Celle-ci exercera alors plus de répulsion envers des molécules chargées.

- La capacité à former des liaisons hydrogène.

Citons déjà la règle des 5 de Lipinski (Lipinski, 2004; Lipinski *et al.*, 2001, 1997), selon laquelle un composé est peu susceptible d'être absorbé par une membrane lipidique si :

$\log P > 5$; $M_w > 500$ g/mole ; plus de 5 donneurs d'hydrogène ; plus de 10 (5x2) accepteurs d'hydrogène (atomes d'oxygène ou d'azote)

De même, une corrélation a pu être trouvée entre l'énergie d'activation pour la perméabilité au travers de liposomes et le nombre de liaisons hydrogène que le soluté peut former avec l'eau (Cohen, 1975; Stein, 1986). Ainsi, il apparaît que cette énergie va dans le sens : (Glycérol > Urée > Eau). Cela rejoint les observations généralement faites d'une perméabilité plus faible du glycérol que l'urée et l'eau (Peterlin *et al.*, 2012) (Tableau 1-13, Tableau 1-14). La présence de cholestérol permet d'augmenter cette énergie d'activation, le cholestérol diminuant l'aire occupée par molécule membranaire pour aboutir à un état plus condensé, réduisant la mobilité des chaînes hydrocarbonées (Cohen, 1975).

- L'aire par lipide ou volume moléculaire des lipides.

Sur la figure (Figure 1-16) est introduite la notion d'aire par lipide A et la différence $a = A - A_0$ qui est l'aire de surface libre. Xiang et Anderson, en 1997, montrent l'importance de la compacité des chaînes, reliée à l'aire de surface libre sur la perméabilité quel que soit l'arrangement des chaînes, leur longueur, ou la structure de la bicouche (Xiang et Anderson,

1997). Si le volume libre est un paramètre important à prendre en compte, plusieurs équipes indiquent que, dans le cas de la perméabilité de l'eau, celui-ci ne serait pas suffisant pour un certain nombre de cas. Leur conclusion est que l'aire occupée par lipide est le paramètre le plus important et que l'épaisseur de la bicouche, la longueur de la chaîne, sa saturation et la composition de la tête polaire ne seraient pas critiques. Elles sont cependant déterminantes pour fixer ce premier paramètre (Mathai *et al.*, 2008; Nagle *et al.*, 2008). Selon une étude récente, l'influence des liaisons hydrogène est contenue dans les autres paramètres et l'aire de surface libre est considérée comme un paramètre critique pour déterminer le partitionnement du soluté et sa mobilité dans toutes les régions de la bicouche (Nitsche et Kasting, 2016). Selon cette même étude, les phospholipides de la bicouche, dans l'état cristallin, occupent une aire minimale, généralement observée de 40,8 Å.

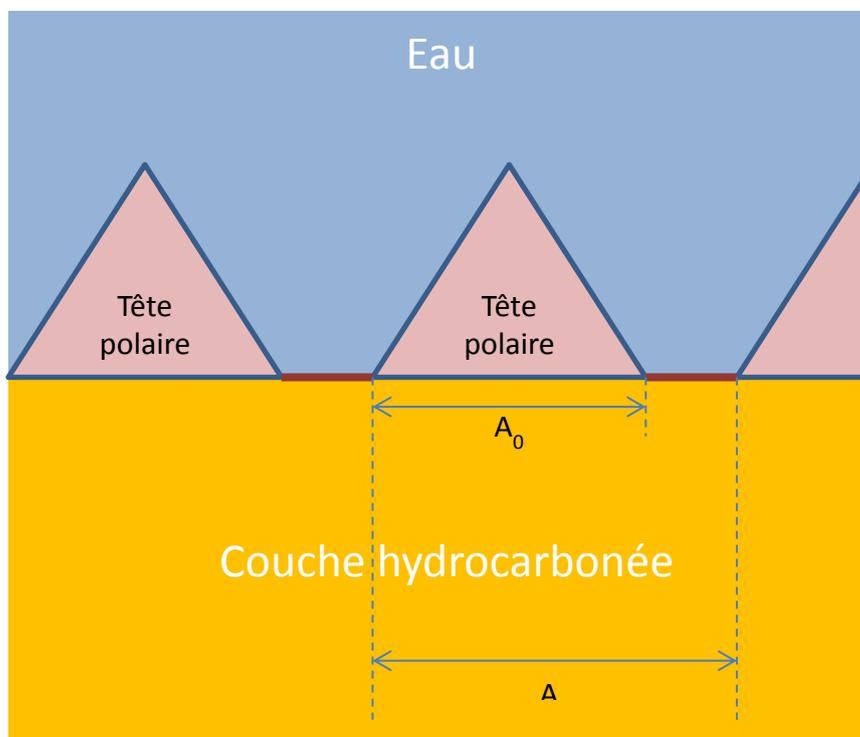


Figure 1-16. Illustration montrant l'aire par lipide A et l'aire de surface libre ($A-A_0$) qui permet le passage d'un soluté à travers la zone polaire jusque dans la partie hydrophobe de la bicouche.

Les aires par lipides peuvent être calculées selon diverses méthodes : rayons X gravimétriques (GX), profils de densité électronique, diffraction des neutrons... Quelles que soient les méthodes utilisées, il ressort que DOPC a une aire par lipide plus importante que DPPC, laquelle est plus importante que DMPC, dans l'ordre des longueurs de chaîne (Nagle et Tristram-Nagle, 2000).

e. *Relations Quantitatives Structures-Propriétés (QSPR)*

Au vu des différents paramètres reconnus avoir une influence sur la perméabilité, plusieurs modèles de corrélation peuvent être mentionnés. Un modèle QSAR a été construit à partir de résultats expérimentaux obtenus par la méthode PAMPA (parallel artificial membrane permeation assay²) montrant que la capacité à former des liaisons hydrogènes ainsi que l'hydrophobicité à un certain pH permet de rendre compte de la perméabilité de diverses molécules (Fujikawa *et al.*, 2005). Flaten *et al.* ont pu corréler des mesures de perméabilités d'un grand nombre de principes actifs avec, notamment, l'aire de surface polaire (PSA) et le logD expérimental (Flaten *et al.*, 2006). Mitragotri *et al.* relient la perméabilité de la région ordonnée de la bicouche (coefficient de perméation et diffusion) avec la densité des chaînes lipidiques, l'aire libre et le paramètre d'arrangement (« order parameter ») des chaînes. Selon eux, la dépendance de la perméabilité par rapport à la taille des solutés ne s'expliquerait pas par des pores transitoires mais plutôt par un travail différent pour la création de cavités de rayon r . Ce dernier variant comme $\exp(-r^2)$ pour des solutés relativement gros et comme $\exp(-r)$ pour des solutés petits. D'ailleurs, ici aussi, plutôt que le volume moléculaire, c'est l'aire de la section transversale qui est prise en compte (Mitragotri *et al.*, 1999). Leung *et al.* ont utilisé des modèles de mécanique moléculaire pour rendre compte de la perméabilité de certains solutés. Ils trouvent que l'énergie libre de désolvatation des solutés est un paramètre fondamental dans le modèle QSPR développé (Leung *et al.*, 2012). Nitsche *et al.* ont mis au point une corrélation universelle pour prédire les coefficients de perméabilité de phospholipides par rapport, principalement, à l'aire par chaîne phospholipidique mais aussi le coefficient de partition eau/1-9 décadiène, la densité surfacique relative des lipides, un facteur solvant et la masse molaire (Nitsche et Kasting, 2016).

f. *Diffusion des ions ou des molécules chargées*

En général, du fait de leur haut degré d'hydratation, les ions traversent très difficilement les bicouches lipidiques, quelle que soit leur taille. En effet, l'enthalpie d'hydratation de Na^+ par exemple est de -405kJ/mol alors que la barrière énergétique pour la perméation de cet ion est d'environ 230kJ/mol (Wilson et Pohorille, 1996). La charge de l'ion va avoir également une incidence sur sa capacité à pénétrer la bicouche selon la charge de la tête polaire des phospholipides (Qiao et Olvera de la Cruz, 2013). Selon Deamer *et*

² Méthode consistant à tester la perméabilité d'une substance entre un compartiment donneur et accepteur à travers une membrane lipidique. En général, les puits d'une microplaque sont le compartiment donneur avec la substance. Une membrane et un compartiment accepteur sont placés dessus chaque puits.

Bramhall, la perméabilité des anions est plus importante que celle des cations et celle du proton-hydroxyde beaucoup plus importante que des ions inorganiques (Deamer et Bramhall, 1986). De manière plus générale, alors que les anions ont des perméabilités de 10^{-12} cm/s environ, les cations ont plutôt des perméabilités de l'ordre de $10^{-13} - 10^{-14}$ cm/s (Terashima *et al.*, 1999). Les différences entre anions et cations pourraient s'expliquer par le fait que les anions diminueraient la largeur hydrophobe effective de la membrane par des attractions charge-dipôle tandis que les cations l'augmenteraient (Tepper et Voth, 2006). Volkov *et al.* indiquent que le rayon ionique a une grande importance dans la perméabilité des ions. Pour des lipides à courte chaîne, ils privilégient une perméabilité par des pores transitoires (Volkov *et al.*, 1997). Cependant, selon Wilson *et al.*, le transport des ions s'accompagne de l'apparition de défauts dans la bicouche, l'ion restant solvanté durant ce processus et ne profiterait pas du mécanisme de formation de pores. Ce phénomène est connu sous le nom de « ion-induced defect mechanism » (Wilson et Pohorille, 1996). Au travers d'expériences et de modélisation, Vorobyov *et al.* indiquent que le transport des ions ne passe pas par un modèle solubilité/diffusion mais aussi par l'apparition de défauts locaux induits par les ions (Vorobyov *et al.*, 2014) (Figure 1-17).

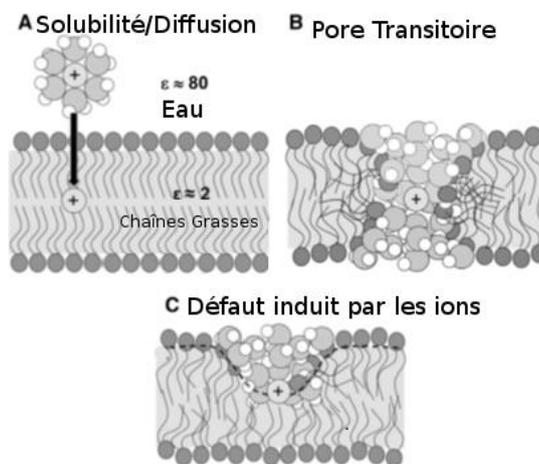


Figure 1-17. Mécanismes de perméation des ions au travers de membranes lipidiques (Vorobyov *et al.*, 2014)

Cardenas *et al.* montrent que le tryptophane traverse plus rapidement une membrane phospholipidique s'il est chargé positivement (Cardenas *et al.*, 2015). Ici aussi, l'influence de défauts locaux est avancée. Un composé chargé positivement tire les groupements phosphates et les groupes polaires glycériques dans la direction du centre de la membrane. Cependant, un anion plus petit, ayant peu d'effet sur l'intérieur hydrophobe de la membrane se déplacerait plus facilement qu'un cation. L'arginine se comporte comme Na^+ , K^+ et Cl^- avec des profils d'énergie libres et de coefficients de diffusion qui dépendent peu de la charge et de la nature

de l'ion. Ce mécanisme pourrait être en compétition avec le modèle des pores transitoires pour expliquer la perméation non seulement des ions mais de peptides et protéines. Dans tous les cas, ils indiquent que l'ion resterait hydraté pendant sa diffusion.

1.6. Bicouches lipidiques oxydées

La communauté scientifique s'intéresse depuis déjà un certain temps aux conséquences d'une modification des phospholipides, principalement l'oxydation, sur la perméabilité des membranes cellulaires. Les effets provoqués par une oxydation des phospholipides sur les mécanismes d'échanges de nutriments, de protéines, et de principes actifs peuvent induire des conséquences considérables sur la santé humaine. Il est en général reconnu que la perméabilité des bicouches lipidiques est augmentée par une oxydation des phospholipides. Il est intéressant de s'intéresser plus en détail à ce phénomène.

Dès 1980, Vladimirov *et al.* constatent une décroissance de la fluidité membranaire suite à la peroxydation des lipides et une modification de sa perméabilité. Ils notent une détérioration des fonctions barrière de la bicouche lipidique (Vladimirov *et al.*, 1980). Selon Tanfani *et al.*, en augmentant la quantité de phosphatidylcholine oxydée dans les liposomes, une augmentation de la polarité interne est observée et une diminution de la fluidité membranaire apparaît (Tanfani et Bertoli, 1989). Dans une étude datant de 1990, des liposomes ont été constitués avec des mélanges de phosphatidylcholine oxydée et non oxydée. Une analyse en DSC a pu montrer que la quantité d'eau piégée dans les liposomes diminuait lorsque la proportion en phosphatidylcholine oxydée augmentait. De même, des liposomes réalisés avec plus de 50% de phosphatidylcholine oxydée ne montrent pas d'eau piégée (Tanfani *et al.*, 1990). Toujours selon Tanfani, la perméabilité d'une membrane composée de phosphatidylcholine peut être modifiée par l'oxydation. Ainsi, dans une vésicule composée de phosphatidylcholine oxydée, la perméabilité augmente en fonction du degré d'oxydation des lipides (Tanfani *et al.*, 1989). En 2012, Jurkiewicz *et al.* ont montré que les phospholipides oxydés entraînaient une diminution des températures de transition de phase, une expansion latérale et un rétrécissement de la bicouche lipidique, des altérations des profils d'hydratation de la bicouche, une mobilité lipidique accrue de même qu'un échange de lipides entre les couches (flip-flop) augmenté (Jurkiewicz *et al.*, 2012), comme l'indiquaient aussi d'autres chercheurs (Volinsky *et al.*, 2011). Dans des cas extrêmes, la bicouche est désintégrée. Lorsque l'oxydation est limitée à une forme hydroxyde ou hydroperoxyde, les conséquences de l'oxydation sont plus modérées. Il est en effet important de différencier les effets

provoqués par différents produits d'une oxydation sans scission des chaînes grasses et une oxydation qui aboutit à la formation d'aldéhydes. Selon Aikens *et al.*, une bicouche de DLPC avec 5% d'hydroperoxydes arrive à maintenir son intégrité structurale (Aikens et Dix, 1993). Selon Riske *et al.*, l'irradiation de phospholipides insaturés avec un photosensibilisateur à base de porphyrine provoque la formation d'hydroperoxydes qui migrent à la surface de la bicouche (Riske *et al.*, 2009). Le phospholipide oxydé occupe alors une plus large surface (voir Figure 1-18). Cela ne serait pas le cas pour un groupement peroxyde (Garrec *et al.*, 2014a). Par contre, même avec 60% d'hydroperoxyde, l'intégrité membranaire est conservée. Megli *et al.*, montrent que PLPC oxydée, avec un hydroperoxyde en position 9, permet même d'obtenir une bicouche plus rigide. Les hydroperoxydes permettent de maintenir la structure membranaire tandis que les composés carboxyles, issus d'une oxydation plus poussée provoquent rapidement une rupture de la membrane (Megli *et al.*, 2009). En 2014, Itri *et al.* indiquent, comme Riske *et al.* auparavant, que l'hydroperoxydation d'un phospholipide provoque une augmentation de son aire mais n'observent pas de modification significative de la perméabilité membranaire, au contraire de ce qui se passe avec un phospholipide aux chaînes plus courtes (Itri *et al.*, 2014; Riske *et al.*, 2009).

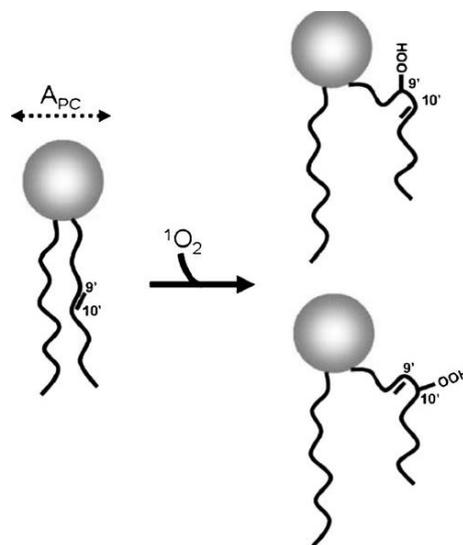


Figure 1-18. Représentation de l'augmentation de l'aire par lipide suite à la formation d'un hydroperoxyde. (Riske *et al.*, 2009).

Certaines études mentionnent cependant une augmentation de la perméabilité à l'eau. Les effets de la peroxydation de PLPC ont été modélisés par dynamique moléculaire (Wong-ekkabut *et al.*, 2007). Les chercheurs montrent une augmentation de la perméabilité de l'eau avec l'augmentation de la concentration en hydroperoxydes, une augmentation plus notable lorsque l'hydroperoxyde se situe en position 13 plutôt qu'en position 9. Ils montrent

également que l'augmentation de la concentration en espèces oxydées induit une augmentation de l'aire par lipide moyenne et une diminution de l'épaisseur de la bicouche avec une inclinaison des chaînes oxydées vers la phase aqueuse. Conte *et al.* ont également effectué l'oxydation de PLPC en hydroperoxydes ou hydroxydes en position 13. Ils ont pu montrer une pénétration augmentée de l'eau dans la bicouche en parallèle d'une augmentation de la polarité au centre de la bicouche de même qu'une faculté accrue à créer des liaisons hydrogène (Conte *et al.*, 2013). Cependant, comme mentionné plus haut, les effets sur la perméabilité et l'intégrité membranaire sont mineurs par rapport à ceux provoqués par des scissions oxydatives. Cwiklik et Jungwirth montrent par dynamique moléculaire qu'une oxydation massive de DOPC (par scission de l'acide oléique) provoque une destruction de la bicouche dans des temps courts (simulation de moins de 100ns) (Cwiklik et Jungwirth, 2010). Runas et Malmstadt montrent justement que l'incorporation du produit d'oxydation POxnoPC (comportant une chaîne raccourcie -nonanal- cf. Figure 1-19) à moins de 10% dans une bicouche de PLnPC augmente d'un facteur 10 la perméabilité d'une molécule fluorescente. Au-delà de 12,5%, l'intégrité membranaire est détruite (Runas et Malmstadt, 2015).

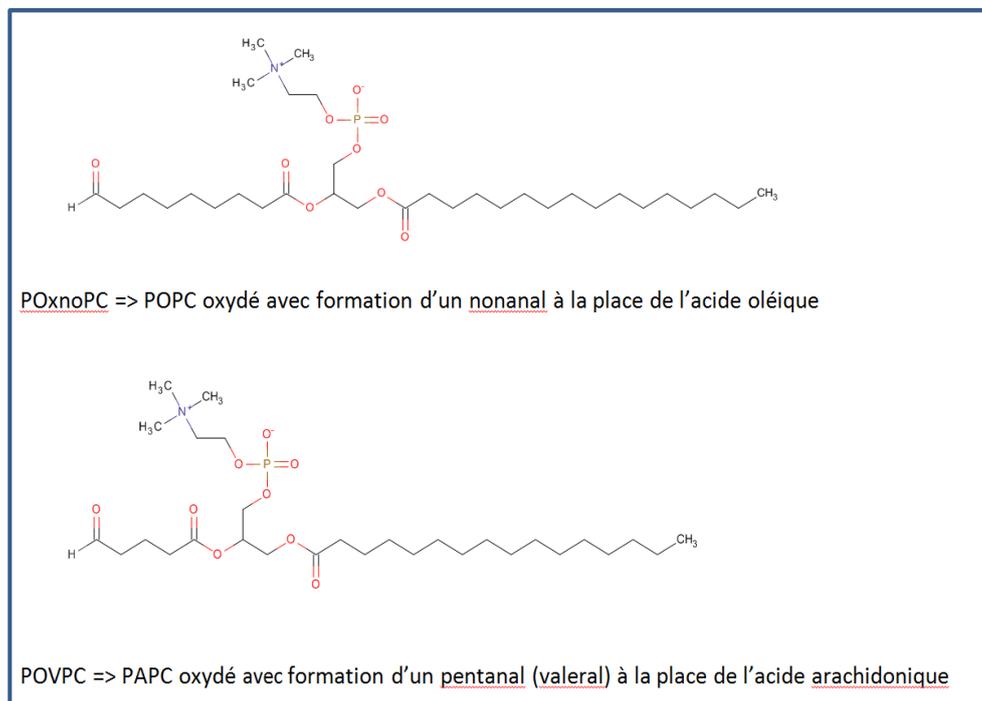


Figure 1-19. Deux molécules issues de la scission oxydative de phospholipides

D'après la bibliographie, c'est notamment le nombre et la largeur des pores créés qui seraient en cause. Ceux-ci se forment d'autant plus facilement que l'ordre moléculaire est fortement réduit ou l'aire par lipide largement augmentée. Wratten *et al.*, montrent que la

présence de petites quantités (2-5%) de phospholipides oxydés (PLPCOOH) dans des membranes de PLPC induit une diminution de l'ordre moléculaire (Wratten *et al.*, 1992). Van der Paal *et al.* prédisent par modélisation moléculaire cette diminution de l'ordre des lipides avec la peroxydation des phospholipides avec, également, une formation de pores à haut degré d'oxydation. L'ajout de cholestérol permet au contraire d'augmenter cet ordre moléculaire et de protéger la membrane contre la formation de pores. Cela explique selon eux pourquoi la technologie plasma³ permet, en oxydant les membranes, de fragiliser préférentiellement les cellules cancéreuses, plus pauvres en cholestérol (van der Paal *et al.*, 2016). Kotova *et al.* font aussi l'hypothèse de la formation de défauts hydrophobes ou de pores-hydrophobes qui rendraient la membrane plus perméable aux composés amphiphiles mais moins aux composés hydrophiles et ions inorganiques. En effet, après une oxydation d'un liposome formé à partir de PC de jaune d'œuf et de cholestérol par photosensibilisation, une augmentation de la perméabilité d'une molécule amphiphile (acide 2-n-octylmalonique) est observée mais pas de KCl ni d'ammoniac. Ils observent de même une augmentation d'échange de lipides entre les deux couches (flip-flop) (Kotova *et al.*, 2011). Lis *et al.* montrent que l'incorporation de POVPC (1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine) – (Figure 1-19) à 15 ou 30% dans une membrane de PC d'œuf ou de DOPC augmente légèrement la perméabilité de l'eau. Ce n'est que lorsqu'un pore est formé que la perméabilité croît fortement. La vitesse d'ouverture de pores dépend de la quantité de POVPC introduite. POVPC, par une réorientation facilitée des chaînes permet la pénétration d'eau à l'intérieur de la membrane et l'ouverture de pores. Ensuite, les groupes polaires des chaînes oxydées stabilisent le pore par liaisons hydrogènes (Lis *et al.*, 2011). Selon Itri *et al.*, l'oxydation par photosensibilisation avec un mécanisme de type II forme un hydroperoxyde qui peut augmenter la surface de la membrane sans affecter significativement la perméabilité. Avec un mécanisme de type I, cependant, une formation d'aldéhydes et d'acides carboxyliques est possible, pouvant aboutir à la formation de pores hydrophiles et, à haut degré d'oxydation, la rupture de la membrane (Itri *et al.*, 2014).

Le type ou degré d'oxydation peut être relié à plusieurs facteurs, notamment par exemple, la quantité de photosensibilisateur. Selon Caetano *et al.*, la lyse des membranes de vésicules géantes intervient par photodécomposition dans des solutions aqueuses de bleu de méthylène. Ils montrent qu'en dessous d'une concentration de 25 μM en bleu de méthylène, la

³ Technologie récente de traitement de cellules cancéreuses par application d'un plasma produit à partir de différents gaz.

dégradation des phospholipides de DOPC est peu décelable. Cependant, avec l'augmentation de la concentration, la taille des vésicules diminue avec la formation de lenticules bleues. La réduction de la taille est indiquée comme le résultat de l'éjection par la membrane de produits de peroxydation solubles. A très haute concentration, au-dessus de 100 μ M, la destruction des vésicules est rapide avec formation de larges pores. De même, le bleu de méthylène pourrait selon eux accompagner des phospholipides de la membrane vers la solution et l'interface eau-air. La scission oxydative de l'acide oléique et la formation de l'acide nonanoïque, plus tensioactif, s'accompagnent d'ailleurs d'une diminution de la tension de surface (Caetano *et al.*, 2007).

En parallèle de l'intensité de l'oxydation, il faut également mentionner la sensibilité des phospholipides à l'oxydation. Ainsi, la nature des phospholipides peut avoir une importance. Eisenberg *et al.* avaient déjà montré que la lyse de liposomes intervenait différemment selon l'intensité de l'oxydation, notamment avec la quantité d'oxygène singulet générée. Ils indiquent aussi que, plus le nombre d'insaturations est important, plus la lyse se fait facilement. Ainsi, une membrane de DLnPC se lysera plus vite qu'une membrane de DLPC et qu'une membrane de DOPC (Eisenberg *et al.*, 1992). De même, Mazari *et al.* indiquent que la position de la chaîne insaturée peut influencer l'oxydation (Mazari *et al.*, 2010). Par exemple, selon cette étude, PLPC s'oxyde moins vite que LPPC. Ainsi, un acide gras en position 1 du motif glycérique est plus facilement exposé.

Enfin, il est important de citer une étude récente qui mentionne un produit d'oxydation ayant un effet positif sur l'intégrité membranaire. Ainsi, Yusupov *et al.* montrent que l'oxydation d'une membrane de DOPC avec des oxygènes réactifs (par plasma) peut provoquer l'apparition de plusieurs produits selon une modélisation et des expériences effectuées. Ainsi, si la modélisation indique une oxydation de la tête polaire pour former un groupe NC_3H_8^+ , l'expérience montre principalement deux produits d'oxydation, l'un avec une scission oxydative avec formation ainsi de deux aldéhydes (ALD) et l'autre avec le départ d'un alcool gras (OX2), ce dernier produit, au contraire des autres produits d'oxydation, diminuant l'aire par lipide, augmentant l'ordre et l'épaisseur de la membrane. Leur modélisation montre également que l'oxygène réactif touche d'abord les têtes polaires puis les chaînes grasses, provoquant une baisse du facteur d'ordre des lipides, ce qui permet à l'oxygène réactif de pénétrer à l'intérieur des cellules par la formation de pores (Yusupov *et al.*, 2017). Le Tableau 1-15 résume les conséquences de différents modes d'oxydation sur les propriétés de différentes membranes.

Tableau 1-15. Différentes propriétés mesurées dans différentes études sur des phospholipides ou membranes oxydées

Mode d'oxydation.	Étude	Membrane	Produits d'oxydation	Ordre	Aire/Lipide	Épaisseur	Perméabilité	Lyse	Réf.
N.P.	RPE	VML, PLPC	PLPC-OOH, PLPC-OH	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	NON	(Megli <i>et al.</i> , 2009)
N.P.	RPE	BC, PLPC	PLPC-OOH, HPSAPC	↘	N.P.	N.P.	N.P.	NON	(Megli et Russo, 2008)
Lipoxydase/NaB H ₄	RPE	VML/BC PLPC	PoxnoPC POVPC	↘↘	N.P.	N.P.	N.P.	OUI Micelle>BC	(Megli <i>et al.</i> , 2010)
N.P.	Fluorimétrie/P-C6-NBD-PS, MD	POPC, POPS	PoxnoPC	N.P.			↗	N.P.	(Volinsky <i>et al.</i> , 2011)
Plasma	DM, DMR, Fluorimétrie/laurdan	DOPC	OX2	↗	↘	↗	N.P.	N.P.	(Yusupov <i>et al.</i> , 2017)
Plasma	DM, DMR, Fluorimétrie/laurdan	DOPC	ALD	↘	↗	↘	N.P.	N.P.	(Yusupov <i>et al.</i> , 2017)
¹ O ₂ , PS(MB)	microscopie, TS	VGU, DOPC	AC-C9	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	OUI à [MB]>25μM	(Caetano <i>et al.</i> , 2007)
N.P.	DM	BC, POPC	POPC-OOH POxNoPC	↘	↗	↘	Pore à haut degré d'oxydation	N.P.	(van der Paal <i>et al.</i> , 2016)

Notes : N.P. : Non précisé, C.A.P : Cold Atmospheric Plasma (Plasma Froid), DM(R) : Dynamique Moléculaire (Réactive), VGU : Vésicule géante unilamellaire, BC : Bicouche, VML : Vésicule multilamellaire ; PS(MB) : Photosensibilisation par le Bleu de Méthylène ; HPSAPC : Hydroperoxyde de SAPC ; RPE : résonance paramagnétique électronique, TS : Tensiométrie

1.6.i. Modélisation moléculaire de phospholipides oxydés.

Tel qu'indiqué dans le paragraphe précédent, un grand nombre d'études s'appuie sur la modélisation moléculaire pour comprendre la structure et les propriétés physiques des membranes et bicouches phospholipidiques. Parmi celles-ci, certaines concernent des phospholipides oxydés. Jurkiewicz *et al.* ont réalisé une revue recensant bon nombre d'entre elles (Jurkiewicz *et al.*, 2012). Quelques-unes sont rassemblées ici avec d'autres trouvées plus récemment (Tableau 1-16). Il est cependant nécessaire de détailler les différents types de modèles utilisés.

Modèles *Ab-Initio*

Sans aller dans les détails de la physique quantique, il faut cependant comprendre que les lois de la physique classique s'adaptent mal à l'infiniment petit. La connaissance précise des propriétés d'un atome ou d'une molécule dépend fortement de l'énergie et la répartition des électrons qui les composent. Ces électrons ne peuvent prendre que certaines énergies, quantifiées. La connaissance de ces dernières n'est possible qu'avec un grand nombre de calculs itératifs dont la complexité dépend du modèle et du nombre d'éléments pris en compte (électrons, noyaux). Ces calculs prennent généralement pour base la résolution de l'équation de Schrödinger qui, en considérant une approche ondulatoire, permet de parfaitement décrire un système.

$$\hat{H}\Psi = E\Psi$$

\hat{H} est l'opérateur mathématique (Hamiltonien), Ψ est la fonction d'onde.

Les opérations qui permettent de résoudre cette équation sont d'une complexité qui croît selon une loi de puissance avec le nombre d'éléments à décrire. Ainsi, il est évident que la représentation d'une molécule de plus de 50 atomes ne peut se faire sans un grand nombre d'approximations. Ainsi, tout en restant dans le formalisme quantique, les approximations les plus courantes sont :

- Approximation de Born-Oppenheimer : Le mouvement des électrons est indépendant de celui du noyau, beaucoup plus lent.
- Approximation orbitale ou d'Hartree-Fock : Les électrons peuvent être considérés de manière indépendante. Un terme d'interaction coulombienne peut être considéré entre

un électron et la distribution moyenne des électrons mais aucun effet de corrélation n'est pris en compte entre les mouvements des électrons. Du fait d'une répulsion électronique généralement mal paramétrée, les énergies calculées peuvent différer de façon importante de la réalité expérimentale.

- Approximation LCAO : Les orbitales moléculaires sont exprimées comme une combinaison linéaire d'orbitales atomiques (Linear Combination of Atomic Orbitals), lesquelles sont représentées avec plus ou moins d'approximations par un set de base :

- $\phi = \sum_{i=1}^n a_i \varphi_i$ où

ϕ est l'estimation de la fonction d'onde, a_i est le coefficient d'expansion orbitalaire associé à une fonction φ_i . Plus le nombre N de ces fonctions est important (le set de base), plus le calcul sera complexe. Il est alors possible, sans avoir une résolution parfaite de l'équation de Schrödinger, de choisir des approximations permettant une bonne corrélation entre la théorie et des valeurs expérimentales (géométries, spectres UV, IR, RMN, conductivité...).

Modèles DFT (théorie de la fonctionnelle de la densité)

Citons rapidement les modèles DFT qui forment aujourd'hui l'essentiel de ceux utilisés dans les calculs quantiques. Dans ce cas, la fonction d'onde n'est plus utilisée mais plutôt la densité électronique. Ces modèles ne font pas appel aux approximations de Hartree-Fock mais plusieurs théorèmes en ont fourni la base (Hohenberg et Kohn, 1964; Kohn et Sham, 1965). Comme précédemment, le choix d'un set de base pour la LCAO est important. La modélisation en DFT nécessite toujours un temps de calcul important, la complexité du système augmentant comme N^3 selon le nombre de fonctions de bases N. Elle est donc déjà coûteuse en puissance de calcul pour un simple phospholipide. Cependant, quelques études existent, notamment celle de Krishnamurty *et al.* qui ont étudié plus en détail la conformation d'une molécule de DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine) (Krishnamurty *et al.*, 2008a). Quelques années après, avec une puissance de calcul supérieure, ce même Krishnamurty a participé à une étude DFT pour comprendre l'orientation de molécules d'eau autour des têtes polaires des phospholipides (Mishra *et al.*, 2013).

Modèles semi-empiriques

Le grand nombre d'approximations physiques et mathématiques à apporter à la résolution de l'équation de Schrödinger pour un phospholipide peut nécessiter, afin de limiter

le temps de calcul, de passer par une résolution encore plus simplifiée de cette équation. Certaines intégrales de l'hamiltonien sont ignorées et seuls les électrons de valence sont pris en compte. De même, un set de base simplifié est utilisé, cela permettant de fortement réduire le nombre N de fonctions. Les autres intégrales sont paramétrées en fonction d'un grand nombre de propriétés expérimentales obtenues pour diverses molécules. Cela ne permet pas de rendre compte d'autres propriétés que celles qui ont servi à construire le modèle. La complexité dans les modèles semi-empiriques fait augmenter le temps de calcul de N^2 à N^4 . Actuellement, les modèles les plus employés sont issus du logiciel MOPAC (Stewart, 2016) et utilisent une amélioration d'un ancien modèle (NDDO) de Dewar et Thiel (Dewar et Thiel, 1977). Le dernier hamiltonien développé, PM7, permet une bonne corrélation avec l'expérience, comparable à certaines méthodes DFT et généralement supérieure aux méthodes Hartree Fock concernant plusieurs propriétés comme le potentiel électrochimique (Giesecking *et al.*, 2018), le pKa (Jensen *et al.*, 2017) la structure de réseaux métal-organique (MOF) (Daniel *et al.*, 2015).

Mécanique moléculaire

A partir d'un certain nombre d'atomes ou lorsque des calculs doivent être réalisés pour de nombreux candidats, il est numériquement impossible de conserver une résolution quantique du système. La mécanique classique est alors à nouveau utilisée (en association ou pas avec la mécanique quantique). Les atomes peuvent alors être considérés comme des objets uniques (boules) et les liaisons qu'ils font avec d'autres atomes peuvent être considérées comme des ressorts. Il s'agit alors de définir les forces auxquelles les atomes sont soumis. Ici encore, des données expérimentales sont utiles pour définir des longueurs, des angles et des forces de liaisons (champ de force) ou des calculs DFT sont effectués sur une molécule lorsque ces données sont manquantes. La résolution du système est alors simplifiée, sa complexité n'augmentant alors qu'avec le nombre d'atomes et les électrons n'étant pas ou peu pris en compte. C'est en général une méthode intéressante pour déterminer la géométrie d'une molécule. Si l'énergie trouvée en mécanique moléculaire n'a pas un sens physique absolu, elle est utile pour des études comparatives, l'énergie de plusieurs conformères pouvant être rapidement calculée pour trouver celui qui possède l'énergie la plus basse. De même, utilisée en dynamique moléculaire, il est possible d'évaluer plus facilement l'évolution d'un système moléculaire dans le temps, selon la température et la pression appliquées, en effectuant des calculs d'énergie avec un pas de l'ordre de la femtoseconde.

Modélisation Gros-Grains

Lorsqu'un système d'une taille de plusieurs nanomètres doit être modélisé, le nombre d'atomes devient important, comme dans la représentation d'une organisation de phospholipides (plusieurs dizaines de phospholipides et plusieurs centaines de molécules d'eau). La résolution du système peut alors demander des ressources ou un temps indisponibles. La modélisation peut alors ne plus considérer les atomes seuls mais des groupes d'atomes appelés grains. En général 3 à 6 atomes « lourds » (C, O, N...) sont associés dans un ensemble auquel sont attribuées des propriétés uniques (charge, masse, polarisabilité). Plusieurs méthodes de définition et de traitement de ces grains existent en modélisation gros grains. Citons notamment les systèmes ELBA et MARTINI (Marrink *et al.*, 2004; Siani *et al.*, 2016), ce dernier étant assez développé et implémenté déjà dans plusieurs logiciels comme NAMD (Hudiyanti *et al.*, 2014). Il attribue quatre classes aux grains (polaire P, non polaire N, apolaire C et chargé Q), chacune avec des variations selon le degré de polarité (P1, P2...) et en fonction de capacités à accepter (« a ») ou à donner (« d ») un hydrogène (N_a , N_d , Q_{da}). Par exemple, 4 molécules d'eau sont représentées par un seul grain de type P_4 , un phosphate PO_4^{4-} est représenté par un type Q_a , le butane est représenté par un grain C_1 et l'octane par deux grains C_1 passant ainsi d'une représentation de 26 atomes à deux grains, soit une simplification d'environ un ordre de grandeur. Cela permet ainsi de calculer dans des temps équivalents un système avec environ 10 fois plus d'atomes ou de l'explorer sur une durée 10 fois plus longue. Cette modélisation gros grains est de plus en plus utilisée pour les assemblages de phospholipides même si la dynamique moléculaire simple (« tout atome ») est encore principalement utilisée.

Modélisation avec atomes unifiés

Dans cette modélisation, la simplification est moindre que pour la modélisation gros grains. Ici, chaque groupe hydrocarboné CH_3 , CH_2 et CH est considéré comme une simple particule. Ainsi, une molécule de DOPC, avec 138 atomes ne contient plus que 54 particules. Plusieurs champs de force correspondent à ce modèle, le plus employé ayant été mis au point par Berger *et al.* (Berger *et al.*, 1997).

Avec le panel d'outils et méthodes disponibles, le choix se fait en fonction d'un compromis entre la précision souhaitée, la puissance de calcul et le temps disponibles.

Tableau 1-16. Principales études de modélisation moléculaire sur des phospholipides oxydés

Références	Nombre/ type de Phospholipides	Produits formés	Mode	Logiciel	P, T, Electrost.	Champ de force	Temps (ns)	Propriétés mesurées
(de Souza <i>et al.</i> , 2017)	CL	Hydroperoxydes	DFT/ DM	NAMD/VMD	PME, Langevin, N-H	CHARMM36 (Klauda <i>et al.</i> , 2010)	140	A/L, Ordre, densité massique, liaisons H
(Yusupov <i>et al.</i> , 2017)	8 DOPC (DFT) , 128 DOPC (DM)	Aldéhydes et oxydation de la tête polaire.	UAM, DFT	GROMACS		GROMOS43A1S3 (Chiu <i>et al.</i> , 2009)		A/L, Ep., Ordre
(Guo <i>et al.</i> , 2016)	512 POPC, DOPC	Hydroperoxydes	CGM			MARTINI		Angles de torsion, stabilité, A/L
(Neto et Cordeiro, 2016)	128 POPC	Hydroperoxydes	DFT/ UAM	GROMACS /VMD	(N-H ; P-R)	GROMOS53A6 (Oostenbrink <i>et al.</i> , 2004)	300	Ordre, A/L, Ep., liaisons H
(Hermetter <i>et al.</i> , 2013)	128 POPC	Aldéhydes, lipide SCH	DFT/ UAM	GROMACS /VMD	Berendsen, PME	(Berger <i>et al.</i> , 1997)		
(Khabiri <i>et al.</i> , 2012)	128 DOPC	Aldéhydes	UAM	GROMACS /VMD	PME, (N-H ; P-R)	(Berger <i>et al.</i> , 1997)	50	A/L, densités atomiques
(Volinsky <i>et al.</i> , 2011)	64 POPC	PoxnoPC	UAM	GROMACS	PME, (N-H ; P-R)	Berger, Tieleman (Tieleman et Marrink, 2006)	20	Flip-Flop

(Lis <i>et al.</i> , 2011)	128 DOPC	Aldéhydes	UAM	GROMACS	PME, (N-H ; P-R)SETTLE	(Berger <i>et al.</i> , 1997)	>100	A/L, Ep., Perméabilité
(Beranova <i>et al.</i> , 2010)	128 POPC	Aldéhydes, Carboxyliques	UAM	GROMACS	PME, (N-H ; P-R)	(Berger <i>et al.</i> , 1997)	100	Niveau d'hydratation, densité électronique
(Cwiklik et Jungwirth, 2010)	128 DOPC +128 Pdts Ox	Aldéhydes	UAM	GROMACS	PME, (N-H ; P-R)	(Berger <i>et al.</i> , 1997)	100	Structure, mobilité, A/L ; densité électronique ; Pores
(Khandelia et Mouritsen, 2009)	128 POPC	PAZEPC PoxnoPC	DM, UAM	GROMACS /VMD	NPT, Langevin, PME	Berger, CHARMM27 (Feller <i>et al.</i> , 1997)	>100	Structure, mobilité, A/L, Ep
(Wong-ekkabut <i>et al.</i> , 2007)	72 PLPC	Hydroperoxydes, Aldéhydes	UAM	GROMACS /VMD	PME	Berger, Bachar (Bachar <i>et al.</i> , 2004)	180	Structure, mobilité

PazePC 1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

PGPC 1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphocholine

PoxnoPC 1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine

POVPC 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine

lipide SCH : Base de schiff provenant de la condensation entre POVPC et POPE

UAM : dynamique moléculaire avec atomes unifiés

CGM : dynamique moléculaire avec modélisation gros grains

P, T, Electrostat. : Mode de prise en charge de la pression, température et interactions électrostatiques

N-H : Nosé-Hoover thermostat algorithm (Braga et Travis, 2005)

P-R : Parrinello-Rahman thermostat algorithm (Parrinello et Rahman, 1981, 1980)

A/L : Aire par lipide

Ep : Epaisseur de la membrane

Selon le logiciel utilisé, les algorithmes permettant le contrôle des paramètres (température, pression, interactions électrostatiques, liaisons hydrogènes...) ne sont pas identiques. De même, si plusieurs champs de force peuvent servir de base à l'étude des produits oxydés, très peu d'études utilisent des champs de forces « tout atome ». Sous GROMACS, ce sont principalement des champs de forces à atomes unifiés tandis que sous NAMD, c'est le champ de force gros grains MARTINI qui est utilisé. Notons le travail d'une équipe qui a effectué tout un travail de paramétrage pour des hydroperoxydes (de Souza *et al.*, 2017). Un grand nombre d'études s'intéresse particulièrement aux produits issus d'une scission oxydative. Elles procèdent toutes par une étape d'équilibration du système plus ou moins longue, c'est-à-dire une évolution du système jusqu'à stabilisation de l'énergie avant l'application de conditions de pression et températures permettant une évolution du système dans un temps plus long. Plusieurs niveaux de complexité se trouvent dans ces études, certaines faisant appel à la DFT pour permettre une analyse d'une molécule ou d'un petit nombre d'entre elles avant d'utiliser ces calculs pour une étude à plus grande échelle. La puissance de calcul est rarement mentionnée cependant dans ces études.

1.7. Conclusion sur la partie bibliographique

Ce point bibliographique montre à quel point les phospholipides, composants essentiels des êtres vivants, sont étudiés dans leur diversité de composition, structure, propriété, réactivité. Ce sont des molécules qui régissent les organes vitaux dans le règne des plantes supérieures comme chez ceux des animaux supérieurs (poumons, cerveau, cœur...). Ils associent des intérêts multiples dans les domaines de l'émulsification, de l'encapsulation et plus généralement dans la compréhension de nombreux mécanismes cellulaires, comme le montrent les très nombreuses études qui leur sont consacrées. La modélisation permet de montrer la complémentarité de certaines hypothèses (parfois vieilles de plus d'un siècle) qui paraissaient au demeurant contradictoires, pour peu à peu éclaircir le rôle membranaire de ces molécules. Si le mucilage est l'objet d'un nombre bien moindre d'études, il allie une large gamme de compositions qu'il conviendrait de valoriser au-delà des simples actions épaississantes que ses propriétés viscoélastiques autorisent. Constitué d'une complexité de sucres, protéines et minéraux, c'est une couche énergétique à la surface des graines des plantes oléoprotéagineuses à mucilage. L'alliance de ces deux objets dans ce chapitre, si elle se comprend au vu des travaux exposés par la suite, permet de refléter aussi la richesse des graines oléo-protéagineuses à mucilage, qui associent la diversité et la polyfonctionnalité des corps lipidiques à celles des corps glucidiques, tous deux éléments pouvant satisfaire plusieurs besoins essentiels à l'homme et qui sont pourtant bio-sourcés, renouvelables et biodégradables.

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

Les méthodes et techniques qui vont être présentées ont pu bénéficier de la « plateforme technologique de transformation des lipides végétaux » au sein du Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle. Celle-ci est dédiée à la production et à la transformation des lipides des plantes oléoprotéagineuses (colza, tournesol, lin...) en agromolécules pour différents usages. Elle comprend donc des moyens analytiques divers pour l'identification des constituants majeurs et mineurs des plantes (CPG-FID, HPLC-UV, HPLC-MS, HPLC-DDL, IR...), des outils de caractérisation physico-chimiques (rhéométrie, tensiométrie, DSC, granulométrie, microscopie optique...), et différentes techniques de traitement mécanique/chimique (réacteur hydrothermal, réacteur film mince, homogénéisateur haute pression, broyeur colloïdal...). Elle bénéficie également de partenariats internes à l'INRA à travers des thématiques transversales mais aussi français et étrangers au travers d'organismes de recherche publics, privés mais aussi de TPE/PME, instituts et centres techniques. Elle a comme objectif d'élargir son champ applicatif en augmentant et améliorant ses moyens techniques et méthodologiques. Ainsi, le projet de recherche présenté ici a eu pour ambition de s'inscrire dans cette optique en exploitant mais surtout en essayant de faire évoluer cette plateforme, notamment par des technologies ultrasonores et des outils *in silico*.

2.1. Méthodes d'extraction du mucilage

2.1.i. Sonde à ultrasons

Les sondes à ultrasons utilisées dans le cadre de ces travaux de recherche sont reliées à un générateur d'ultrasons SONICS VIBRACELL – 500 qui agit à une fréquence de 20 kHz et dont la puissance peut atteindre 500W. Deux sondes en Titane (Ti-6Al-4V) sont utilisées en fonction du volume traité : une sonde d'un diamètre de 13mm avec une amplitude maximale de 114µm qui peut traiter des volumes de 50 à 250mL et une sonde d'un diamètre de 3mm et une amplitude de 160µm pour traiter des volumes de 0,5 à 10 mL. Les ultrasons sont réglés en mode pulsé, en général de 5s d'activité suivis de 10 à 20s de repos. L'amplitude peut être réglée de 10% à 100% de l'amplitude maximale pour la sonde de 13mm et de 10% à 30% pour la sonde de 3mm.

2.1.ii. Colonne à ultrasons

La colonne à ultrasons utilisée est le modèle LIXEA FORMULATOR C80-500-PI, de la marque SINAPTEC. Elle a été conçue expressément pour l'application demandée. Elle est constituée d'un cylindre de section DN80 et d'une longueur de 50cm pour un volume de 3,1 L. Elle comporte 4 générateurs d'ultrasons de 500W chacun, disposés à intervalles réguliers autour du cylindre, ce qui fait une puissance volumique d'environ 650W/L. Chaque générateur fournit les

ultrasons par 8 transducteurs à 22kHz. La puissance peut être réglée indépendamment pour chaque générateur, au travers du logiciel de contrôle NEXTGEN 2001. Les générateurs sont refroidis par un flux d'air comprimé, ce qui permet d'opérer à des températures allant jusqu'à 80°C. Sur cette colonne, un module électrique de coupure (Temporisateur asymétrique 1RT) M1ARM a été ajouté pour pouvoir travailler en mode pulsé.

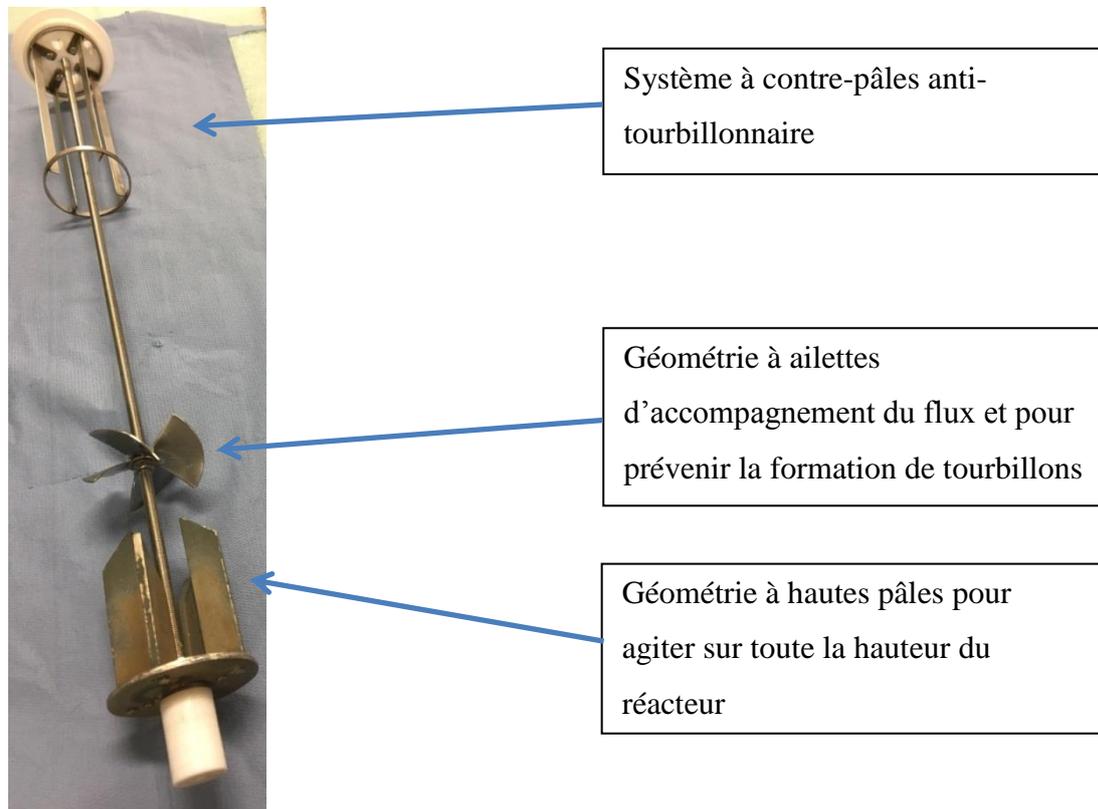


Figure 2-1. Module utilisé pour l'agitation des graines dans la canalisation à ultrasons

Une sortie a été usinée pour pouvoir travailler en mode circulatoire et une pale a été usinée pour pouvoir agiter le milieu en mode batch. De même, un système contre-pâle - module anti-tourbillon a été mis au point pour pouvoir immerger des sondes in situ (Figure 2-1). En mode circulatoire, une pompe Grundfos CR4-60 travaillant à un débit nominal de 100 L/min a été utilisée. En mode batch, un moteur d'agitation IKA Eurostar 100 control, avec interface RS232/USB, a été acquis pour permettre une connexion RS232 ou USB à l'ordinateur et un couple suffisant pour des milieux fortement mucilagineux. L'interfaçage en mode RS232 a été réalisé avec un module de connexion RS232 National Instruments et en utilisant le logiciel de communication gratuit Comtools v2.4.4.0, lequel permet de générer l'envoi de commandes à intervalles réguliers pour récupérer sur l'ordinateur les données issues de la sonde de température et du moteur d'agitation. De même, un appareil pH-mètre/conductimètre Mettler Toledo Seven Excellence a été installé pour fonctionner avec une sonde pH métrique inlab Routine Pro et une

sonde conductimétrique inlab 741 placées en haut du réacteur ou dans un circuit déporté. Un réfractomètre Bellingham-Stanley RFM300 a également été installé pour mesurer l'indice de réfraction en mode continu ou discontinu avec une résolution pouvant aller jusqu'à 10^{-6} (Figure 2-2).



Figure 2-2. Montage de la colonne à ultrasons en mode batch avec la circulation du liquide au sein des différents instruments de mesure.

Au final, la température, le couple d'agitation, le pH, la conductivité et l'indice de réfraction peuvent être suivis en cours d'extraction.

Sous mode batch, l'extraction du mucilage se fait par un premier remplissage de la colonne par environ 1,5L d'eau distillée. Les graines sont ensuite ajoutées sèches ou déjà mélangées à un certain volume d'eau distillée. La colonne est ensuite complétée à 3,1 L et refermée. Le programme d'extraction (vitesse d'agitation, amplitude des ultrasons, temps, modes de pulsation) est ensuite appliqué. A la fin de ce programme, la colonne est vidée par le robinet de vidange. Le milieu est alors filtré sur des tamis métalliques de mailles 1mm puis 0,5mm posés sur une cuve « Troposphère VI » usinée à façon (Figure 2-3).



Figure 2-3. Système de filtration du mucilage

2.2. Appareils de conditionnement du mucilage

2.2.i. Lyophilisateur

Le mucilage, de même que les graines dé mucilaginé es, peuvent être séchés par lyophilisation. Un appareil CRYO-RIVOIRE d'un volume de 80 L est utilisé en ce sens. Il permet de sécher l'échantillon par l'application d'un vide poussé (jusqu'à 0,2 mBar) et d'une faible température (-40°C). Pour la lyophilisation du mucilage, 1 litre d'extrait mucilagineux est placé dans une plaque en inox de façon à ne pas dépasser 1 cm d'épaisseur. 6 plaques peuvent être utilisées en même temps et donc 6 litres de mucilage peuvent être lyophilisés dans une même session. Après mise de 3 thermocouples au fond des liquides, le lyophilisateur est démarré avec le programme suivant (mucilage.prg) :

- Refroidissement de l'échantillon à 0,5 °C/minute jusqu'à 5°C
- Refroidissement de l'échantillon à 0.1°C/minute jusqu'à -20°C
- Refroidissement de l'échantillon à 0.5°C/minute jusqu'à -40°C

Une fois la température de consigne atteinte, les plateaux se remettent progressivement à la température ambiante (-40 à -7.5°C à 0.1°C/minute ; jusqu'à 10°C à 0,2°C/min ; jusqu'à 20°C à 0,5°C/min)

2.2.ii. Etuves – Matière Sèche

Pour la détermination des matières sèches ou le séchage des échantillons, des étuves de différents volumes et températures de consigne sont utilisées. Pour la détermination de la matière sèche, une étuve régulée à 103°C est utilisée. Trois prélèvements de l'échantillon sont pesés et mis à sécher à l'étuve. Après un minimum de 4 heures, ils sont retirés, refroidis sous dessiccateur et pesés. La matière sèche (MS) de chaque prélèvement est calculée comme :

$$MS = m_{\text{sec}} \times 100 / m_{\text{humide}}$$

2.3. Appareils/Méthodes d'analyse du mucilage

2.3.i. Chromatographie ionique

De façon à analyser les monosaccharides constituant les carbohydrates du mucilage, la chromatographie ionique a été utilisée. Un appareil HPIC DIONEX ICS 3000 DC-EG est relié à une colonne Carbo-PAC PA1, une post-colonne avec NaOH 300mM et un passeur d'échantillons AS3000. L'ensemble est géré par le logiciel Chromeleon (Chromeleon (c) Dionex 1996-2006 Version 6.80 SR15 Build 4656). La détection se fait par une cellule électrochimique à base de chlorure d'argent. L'échantillon est tout d'abord hydrolysé avec 1,25mL d'une solution d'acide sulfurique à 72% (m/m) puis 13,5mL d'eau sont ajoutés et l'ensemble est chauffé à 100°C dans des tubes à hydrolyse fermés pour différentes durées. La fin de l'hydrolyse est provoquée par l'ajout de 3,6 mL de NaOH 32% (m/m) et l'échantillon est dilué 50 fois avec de l'eau ultra-pure avant analyse.

Tableau 2-1. Caractéristiques des calibrations effectuées sur différents monosaccharides (MonoS). Le 2-deoxy-d-galactose sert d'étalon interne.

Temps de rétention (min)	Composé	Points	R ² %	AIRE=a[MonoS] ² +b[MonoS]+c		
				c	b	a
5,87	Fucose	7	99,6988	0,0000	2,5070	-0,0112
7,90	2-deoxy-d-galactose	12	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
13,05	Arabinose	5	99,6182	0,0000	2,5383	-0,0037
16,33	Galactose	6	99,5545	0,0000	3,3595	-0,0056
19,30	Glucose	6	99,8318	0,0000	3,5420	0,0022
23,03	Xylose	6	99,1091	0,0000	4,0523	-0,0052
24,65	Mannose	6	99,3084	0,0000	2,2920	-0,0099
28,50	Fructose	6	99,8254	0,0000	2,5954	-0,0049

La concentration de chaque monosaccharide est déterminée pour chaque temps d'hydrolyse et la valeur maximale est retenue, certains monosaccharides nécessitant plus de temps que d'autre pour être libérés et certains pouvant se dégrader au cours du temps. Les caractéristiques des courbes de calibration pour chaque monosaccharide sont rassemblées sur le Tableau 2-1 et un exemple de chromatogramme est donné (Figure 2-4). Des détails supplémentaires sont disponibles en annexe (ANNEXE 1).

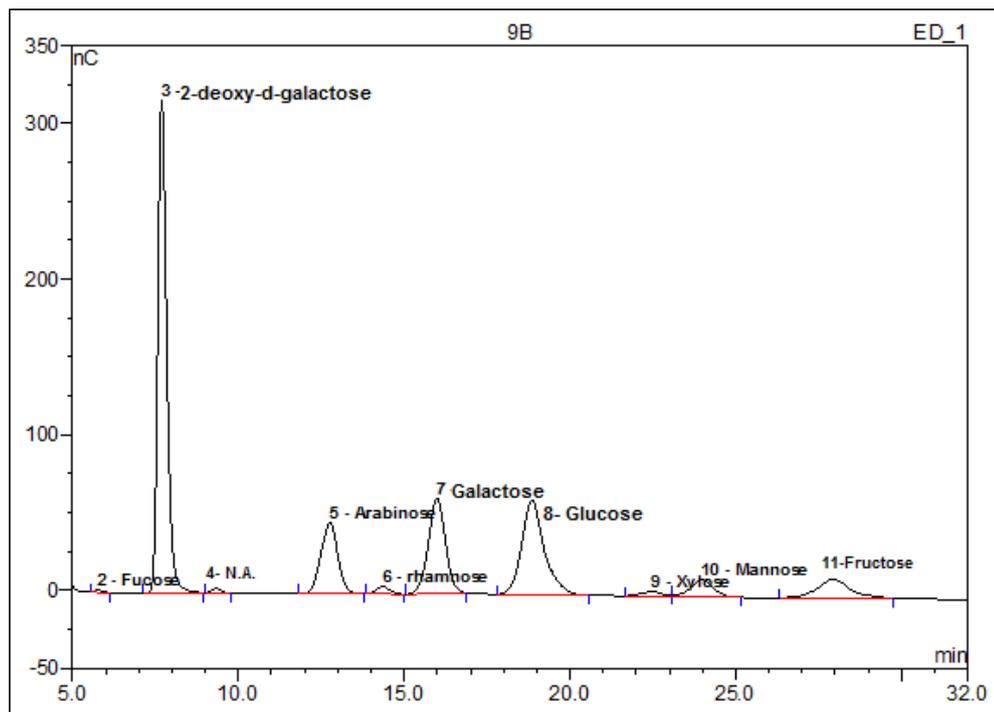


Figure 2-4. Exemple de chromatogramme d'un mucilage de caméline

2.3.ii. Analyse de la teneur en protéines

a. Dosage de l'azote Kjeldahl

La teneur en azote total des mucilages a été déterminée par le procédé Kjeldahl. Il s'agit tout d'abord de minéraliser à 400°C l'échantillon dans de l'acide sulfurique concentré avec un catalyseur à base de cuivre (Kjeltabs) pendant environ 1h30 sous forte (5 minutes) puis faible aspiration. Une fois l'azote organique converti en azote minéral sous la forme $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, l'échantillon est placé dans un système automatisé d'ajout d'eau et soude puis chauffé de façon à transformer l'ammonium en ammoniac (NH_3). Les vapeurs d'ammoniac sont condensées et recueillies dans une solution d'acide borique additionnée de vert de bromocrésol et rouge de méthyle de façon à former un complexe bleu. De l'acide chlorhydrique à 0,1M est ajouté automatiquement jusqu'à disparition du complexe et de la coloration. Ainsi, la quantité d'acide

ajoutée est équivalente à la quantité d'azote présente dans l'échantillon. Si l'azote dosé correspond uniquement à de l'azote protéique, il est possible d'utiliser un coefficient de conversion %Azote->%Protéines. Celui-ci dépend de la nature des protéines. Une valeur de 6,25, utilisée communément par la FAO (MacLean *et al.*, 2003) pour les plantes oléoprotéagineuses constitue déjà une bonne évaluation mais l'analyse des acides aminés des protéines permet de corriger cette valeur.

b. Méthode de Lowry (Lowry et al., 1951)

Cette méthode s'appuie sur la formation d'un complexe coloré avec les protéines. Le sulfate de cuivre (II) est tout d'abord réduit par les liaisons peptidiques en milieu alcalin pour produire Cu^+ et le complexe protéine- Cu^+ réagit ensuite avec un réactif de Folin-Ciocalteu (à base de phénol) pour obtenir un chromophore. Un complexe phosphomolybdotungstate est en fait réduit en un complexe bleu hétéropolymolybdate à travers l'oxydation des acides aminés aromatiques, notamment tyrosine et tryptophane. La forte couleur bleue obtenue alors est détectée par spectrophotométrie entre 500 et 800 nm avec un maximum à 750 nm. Cette méthode a été réalisée avec des microplaques de 96 puits à l'aide d'un kit de dosage « Pierce Modified Lowry Protein Assay Kit » provenant de Sigma-Aldrich. Ce kit contient une solution de sulfate de cuivre en milieu alcalin avec de l'iodure de potassium et du tartrate de sodium dans un tampon carbonate, des ampoules d'une solution standard de BSA (albumine de sérum bovin) à une concentration de 2mg/mL et un réactif de Folin-Ciocalteu.

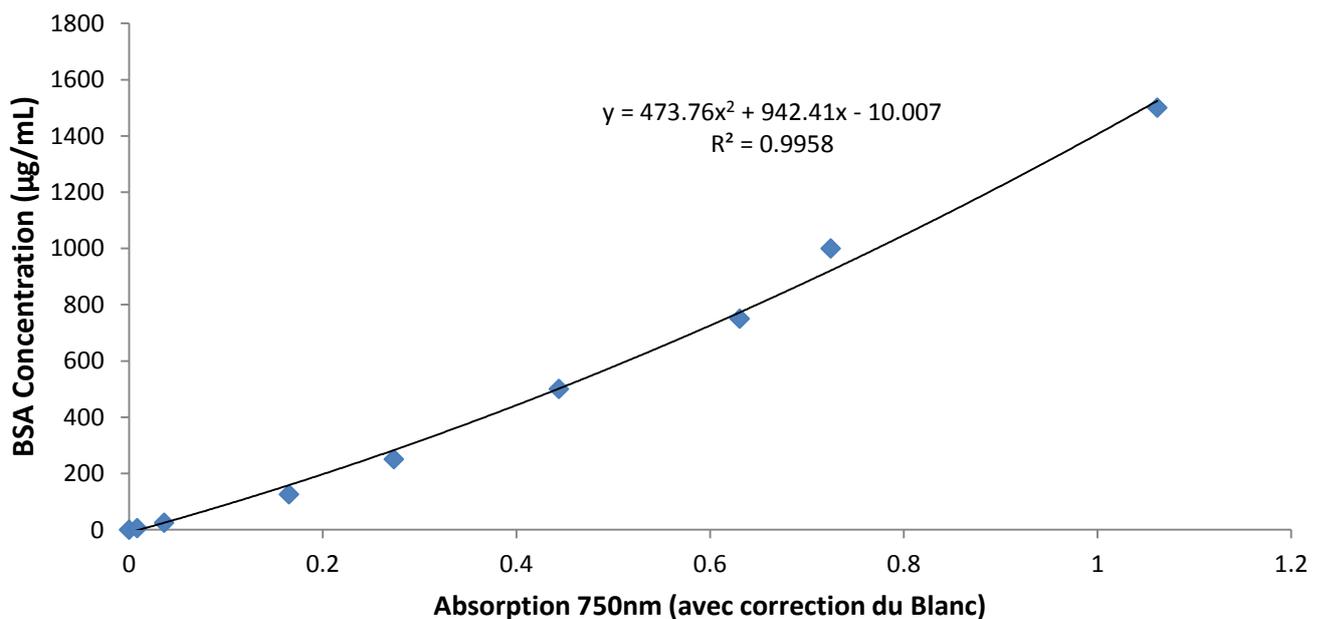


Figure 2-5. Courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination de la teneur protéique en équiv. BSA selon Lowry

La microplaque est remplie de plusieurs étalons de BSA dans l'eau distillée et des échantillons. La procédure détaillée est disponible en annexe (ANNEXE 2). Une courbe de calibration est réalisée avec une solution de BSA avec 10 concentrations (1 ; 5 ; 25 ; 125 ; 250 ; 500 ; 750 ; 1000 ; 1500 $\mu\text{g/mL}$) et un blanc (Figure 2-5).

2.3.iii. Analyse des acides aminés

La distribution moyenne des acides aminés de l'échantillon est analysée par chromatographie liquide avec un appareil BIOCHROME en utilisant une colonne remplie d'une résine échangeuse de cations fonctionnalisée sous forme sodium et un ensemble de solutions tampons servant d'éluants.

Un passeur d'échantillons réfrigéré est utilisé. Tout d'abord, une solution standard d'acides aminés (concentrés chacun à 2,5nmol/mL sauf la cystine à 1,25nmol/mL) est injectée selon cinq différents volumes (10, 20, 40, 70 et 90 μL) puis les différents échantillons sont injectés (volume de 10 à 80 μL) dans la colonne. Les différents tampons de pHs croissants vont entraîner petit à petit les acides aminés en fonction notamment du pKa de ces derniers, les échantillons acides éluant en premier. En sortie de colonne, ils sont mis à réagir à 135°C avec de la ninhydrine de façon à former un complexe coloré détecté par une cellule photométrique à deux longueurs d'onde (720 et 414 nm). Un protocole détaillé est disponible en annexe (ANNEXE 3). Mis à part pour l'arginine qui montre une courbe de calibration quadratique, les autres acides aminés sont calibrés par des fonctions affines ou linéaires. Les coefficients de régression sont supérieurs à 0,99. La quantification des différents acides aminés d'un hydrolysate permet ensuite de calculer la quantité de protéines dont il est issu et de déterminer le facteur de conversion azote/protéines. Si l'échantillon a été totalement hydrolysé, la quantité de protéines de l'échantillon peut de même être calculée.

2.3.iv. Analyse de la teneur en sucre

Comme pour les acides aminés, la teneur en sucre peut être déterminée par une analyse chromatographique quantifiant tous les monosaccharides obtenus par hydrolyse du mucilage ou par des méthodes spectrophotométriques. Dans ce dernier cas, la méthode au phénol/acide sulfurique plus connue sous le nom de méthode de Dubois (DuBois *et al.*, 1956) permet de doser le sucre en formant tout d'abord un furfural ou hydroxyfurfural à partir des monosaccharides. Un réactif à base de phénol réagit alors avec ces composés pour former un complexe coloré. Ainsi, un dosage spectrophotométrique permet de connaître la concentration en sucre du milieu en utilisant

une droite d'étalonnage réalisée à partir de solutions de glucose. La teneur obtenue est donc en équivalent glucose. Ce protocole peut être adapté à une mesure en microplaque (en quartz) avec le « Total Carbohydrate Assay Kit » de Sigma-Aldrich comportant un tampon, un réactif à base de phénol et d'acide sulfurique et une solution standard de glucose à 2mg/mL (ANNEXE 4). Le mode microplaque permet une meilleure gestion de la cinétique de coloration des échantillons, les standards et les échantillons étant mesurés quasiment en même temps. 5 étalons sont préparés (4, 8, 12, 16 et 20 μg de glucose) et un blanc. Les différentes courbes de calibration utilisées sont présentées ci-dessous (Figure 2-6 & Figure 2-7).

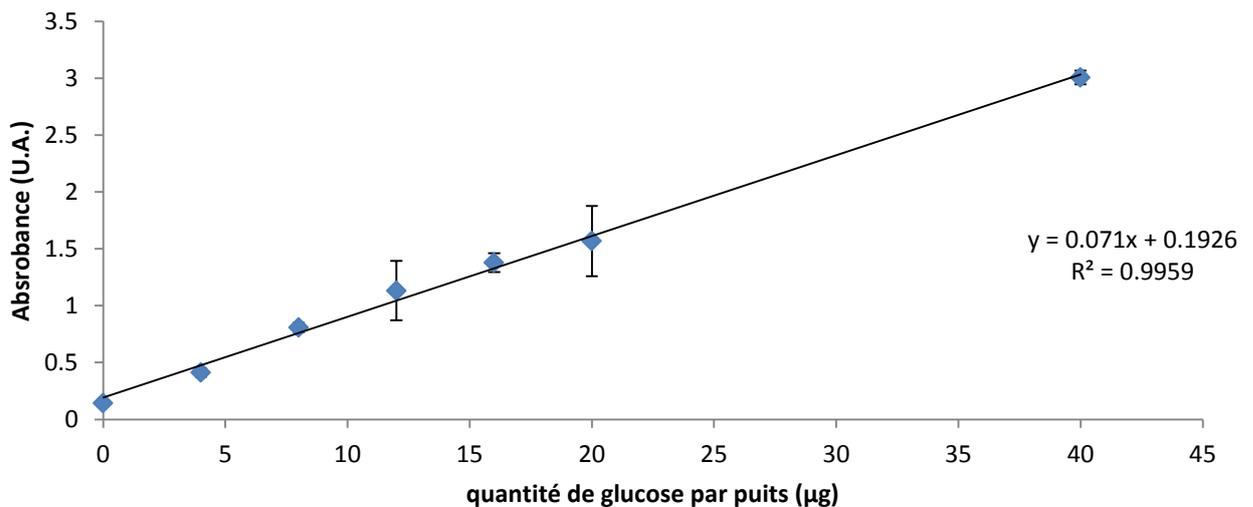


Figure 2-6. Droite d'étalonnage obtenue lors de la détermination de la teneur en sucres de coques et broyats de cameline

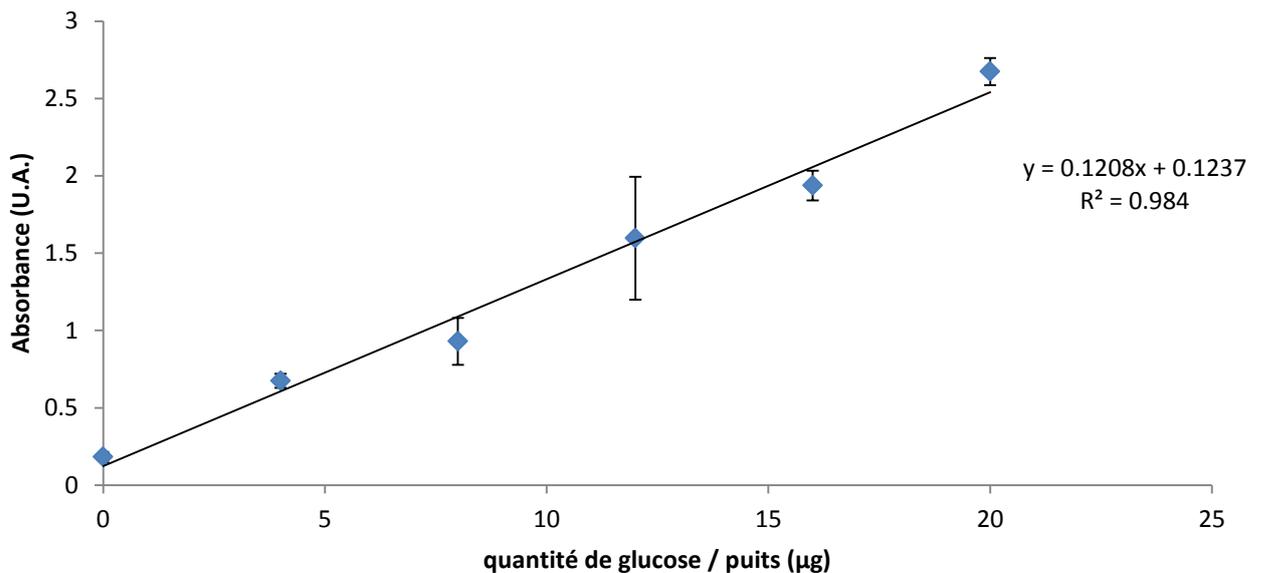


Figure 2-7. Droite d'étalonnage obtenue lors de la détermination de la teneur en sucres d'échantillons de mucilage lyophilisé.

2.3.v. Analyse de la teneur en acides uroniques

Les acides uroniques sont dosés en équivalents « acide galacturonique » par la méthode de Blumenkrantz (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973), soit en mode cuve ou adaptée en mode microplaque. Dans le mode classique, les échantillons sont hydrolysés à 100°C avec une solution de tétraborate de sodium dans de l'acide sulfurique. Après refroidissement des échantillons, une solution basique de metahydroxybiphényl est ajoutée. Il se produit alors une complexation détectée à 520-540 nm.

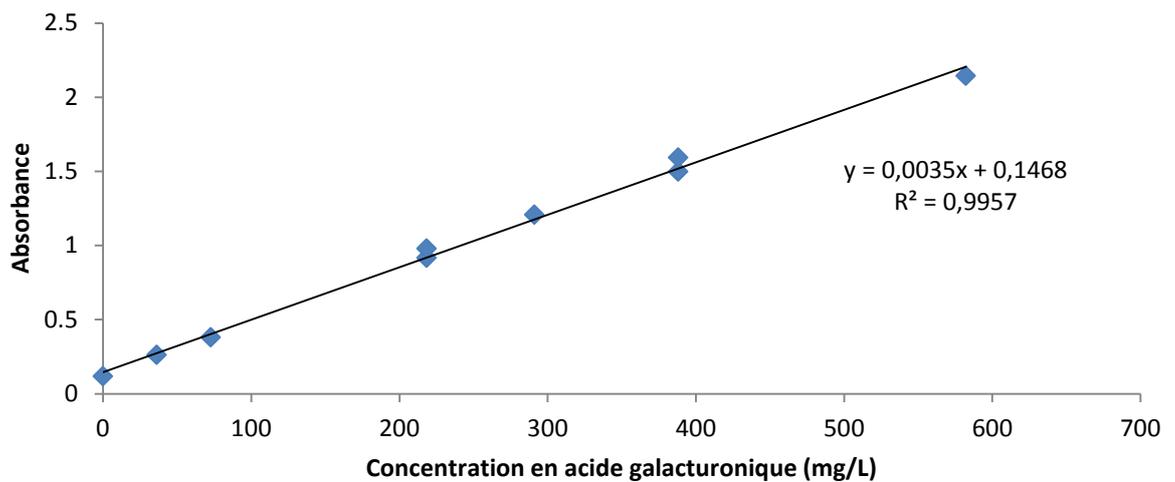


Figure 2-8. Courbe de calibration utilisée pour le dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz en microplaque.

La concentration est obtenue par une calibration avec différents standards d'acide galacturonique. Dans le mode microplaque, la méthode est un peu modifiée en s'inspirant de la littérature (Luzio, 2004; van den Hoogen *et al.*, 1998), donnant une courbe de calibration satisfaisante (Figure 2-8). Le détail est disponible en annexe (ANNEXE 5).

2.3.vi. Analyse rhéométrique

La viscosité cinématique du mucilage est déterminée à 40°C avec des tubes capillaires en U, de type Cannon Fenske et en mesurant le temps mis par le fluide pour parcourir deux distances successives (t_1 et t_2) dans ces tubes. Ce temps de parcours est directement proportionnel à la viscosité.

$$\eta = [(k_1 \cdot t_1) + (k_2 \cdot t_2)]/2$$

Avec η : viscosité en cSt (mm^2/s) ; k_i : constante dépendant de la température et de la taille du capillaire (elle est donnée à 40°C) ; t_i : temps nécessaire, en secondes pour parcourir la distance i .

Le profil rhéologique du mucilage est déterminé avec un rhéomètre ANTON-PAAR MCR-302, équipé d'une géométrie cône-plan (cône de 5 cm de diamètre et d'angle de 2° avec un entrefer de 0,214mm). Un volume d'environ 1,4mL peut prendre place au sein de cet entrefer, formant une couche mince de liquide. Le cône positionné au-dessus de l'échantillon va se mettre en rotation à une certaine vitesse (convertie en gradient de cisaillement). Plus la viscosité de l'échantillon est importante, plus le couple d'agitation (converti en contrainte de cisaillement) devra être important pour maintenir cette vitesse. Le rapport Contrainte/Gradient donne la viscosité dynamique de l'échantillon. Si ce dernier est Newtonien, ce rapport restera constant, quel que soit le gradient de cisaillement. La viscosité dynamique peut alors être comparée à la viscosité cinématique avec la formule :

$$\eta_{\text{cin}} = \eta_{\text{dyn}} \times \rho \text{ (où } \rho \text{ est la masse volumique du fluide)}$$

La contrainte peut sinon obéir à une fonction affine du gradient de cisaillement si le fluide a un seuil d'écoulement. Ainsi, une contrainte minimale doit être produite pour mettre le fluide en mouvement. Enfin, le fluide peut s'écouler plus facilement ou moins facilement à mesure que la contrainte augmente (comportement rhéofluidifiant ou rhéoépaississant). Il existe de nombreux modèles rhéologiques pour décrire le comportement d'un fluide en mode rotationnel. Pour déterminer plus précisément la stabilité et les performances « mécaniques » de l'échantillon, il est nécessaire d'effectuer des mesures en mode oscillatoire. Dans ce cas, en tournant le cône avec une certaine amplitude et fréquence, l'appareil peut déterminer le comportement viscoélastique de l'échantillon. Il peut déterminer ainsi s'il se comporte plutôt comme un solide (la déformation imposée en surface est transmise à tout l'échantillon avec aucun ou peu de déphasage) ou un liquide (la déformation au sein de l'échantillon est fortement déphasée par rapport à la déformation imposée).

L'étude est d'abord réalisée en mode rotationnel en faisant varier le gradient de cisaillement et en mesurant la contrainte nécessaire pour obtenir ce gradient à 25°C . La régression de la courbe contrainte = f (cisaillement) permet de déterminer quel modèle rhéologique représente le mieux le produit étudié. Une caractérisation est ensuite menée en mode oscillatoire pour déterminer les modules élastiques et visqueux du produit selon différentes amplitudes et fréquences de déformation. Un balayage en amplitude de déformation de l'échantillon est tout d'abord réalisé à une fréquence fixe de 1 Hz. Une amplitude est alors choisie dans la zone d'évolution linéaire du module élastique pour effectuer un balayage en fréquence.

2.4. Appareils/Méthodes d'analyse des phospholipides

2.4.i. Extraction des lipides par la méthode de Folch

L'échantillon est tout d'abord broyé à sec (moulin à café ou broyeur à couteaux) puis il est mélangé à du méthanol dans un rapport 1/10 (m/V). L'ensemble est homogénéisé une minute avec un broyeur Ultraturrax. Du chloroforme est ajouté pour être dans un rapport Solide/Solvant 1/30 (m/V) et l'ensemble est encore homogénéisé 2 minutes. L'ensemble est centrifugé et le surnageant est filtré puis conservé tandis que le résidu est repris dans le même volume d'une solution de chloroforme/méthanol (2/1 v/v) et homogénéisé 3 minutes. Le résidu est ainsi traité 3 fois. Les phases surnageantes sont rassemblées et représentent un volume V. L'ensemble est additionné d'une solution de KCl à 8,8g/L dans l'eau (m/V) d'un volume de V/4. Le mélange est agité vigoureusement puis laissé à décanter. La phase supérieure est éliminée. La phase inférieure d'un volume V' est additionnée d'un volume V'/4 d'une solution méthanol/KCl 8,8g/L (1/1 v/v). Après agitation et décantation, la phase inférieure est filtrée et séchée au travers de sulfate de sodium anhydre, puis le solvant est évaporé sous un flux d'azote.

2.4.ii. Extraction phase solide (SPE)

Pour séparer les lipides précédemment extraits entre molécules polaires et non polaires, une méthode d'extraction en phase solide a été utilisée. Une colonne est préparée avec un gel de silice (Mills et Goldhaber, 2010) ou une cartouche Supelclean LC-Si SPE 500mg /6mL (Supelco) est utilisée. Elle est alors conditionnée en y faisant percoler 5mL de méthanol et 5mL de chloroforme. 100mg d'extrait lipidique dans 200 μ L de chloroforme sont déposés sur la cartouche SPE. Après dépôt de l'échantillon, celui-ci va éluer avec 5mL de chloroforme pour éluer les lipides non polaires. Une fois la fraction récupérée, l'élution continue avec 10mL d'acétone pour éluer les glycolipides, et une fois la deuxième fraction obtenue, avec 10mL de méthanol. C'est la fraction obtenue par cette dernière élution qui contient les phospholipides. Le méthanol est alors évaporé sous courant d'azote et les phospholipides sont analysés en chromatographie HPLC/ELSD.

2.4.iii. Chromatographie HPLC/ELSD

Après évaporation du méthanol, l'extrait obtenu par SPE est repris dans 1mL de chloroforme puis éventuellement dilué suivant la teneur en phospholipides et injecté (volume d'injection de 20 μ L) dans un appareil de chromatographie liquide relié à un détecteur par diffusion de lumière ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) selon la procédure détaillée dans la littérature

(Silversand et Haux, 1997). La colonne utilisée est de type Lichrospher 100 diol (5 μ) 150 x 3mm. Le four est réglé à une température de 40°C et le détecteur (Alltech 3300) fonctionne à une température de 35°C avec une arrivée d'air à 4 bars et un débit de 1,6L/h. Deux éluants sont préparés (Tableau 2-2) : ils sont mélangés avec un gradient de concentration dans le temps (Tableau 2-3).

Tableau 2-2. Détail des éluants utilisés pour l'analyse chromatographique des phospholipides

Eluant A		Eluant B	
Isooctane	82%	Isopropanol	85%
Isopropanol	17%	Eau	14%
Acide acétique	1%	Acide acétique	1%
Triéthylamine	0,08%	Triéthylamine	0,08%

Tableau 2-3. Gradient d'élution au sein de la chromatographie HPLC/ELSD

	Temps					
	0	24'	25'	32'	33'	40'
% A	95	60			95	95
% B	5	40	100	100	5	5

Les différents phospholipides sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de standards commerciaux. La quantification est effectuée par étalonnage externe.

2.4.iv. Chromatographie CG/DIF

Le profil d'acides gras des phospholipides est déterminé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Les phospholipides sont tout d'abord hydrolysés et dérivés par trans-méthylation avec une solution de 0,2M de triméthylsulfonium hydroxyde dans le méthanol selon la norme AFNOR EN ISO 152966-3. Les esters méthyliques d'acides gras sont ensuite analysés avec une chromatographie gazeuse équipée avec une colonne CP-Select CB (50m de long, 0,32 mm de diamètre interne et une épaisseur de film de 0,50 μ m). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur, à un débit de 1,2 mL/min ; l'injecteur et le détecteur FID sont maintenus à 250°C. La température initiale du four est fixée à 185°C pendant 40 minutes puis est élevée à 250°C à une vitesse de 15°C/min pour être maintenue à cette valeur pendant 10 minutes.

2.4.v. Analyse RMN des phospholipides

Les analyses RMN ont été réalisées à l'Université Paul Sabatier, au service RMN géré par M. Marc Vedrenne. Un spectromètre Bruker AVANCE III HD NMR a été utilisé. Il opère à 500,13 MHz et est équipé d'une cryosonde BBFO ATMA Prodigy de 5mm. Les mesures ont été réalisées à 298K avec la séquence zgig30. Le nombre de scans a été fixé à 16 et le logiciel Topspin 3.2 a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des expériences. Le logiciel Mestrenova a ensuite été employé pour l'intégration des pics. Des mesures ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{31}P RMN de même que COSY ^1H - ^1H , HSQC ^{13}C - ^1H et HMBC ^{13}C - ^1H ont été réalisées.

2.4.vi. Spectrophotométrie UV/Visible

Deux spectrophotomètres ont été utilisés :

- Un spectrophotomètre Shimadzu UV1800 qui permet d'enregistrer un spectre par balayage progressif des longueurs d'onde et peut mesurer l'absorbance à une longueur d'onde précise. Il est adapté à la mesure d'échantillons placés dans des cuvettes en plastique ou quartz. Cet appareil a été relié à un ordinateur de façon à pouvoir enregistrer et traiter les spectres de façon plus rapide. Le schéma de fonctionnement de cet appareil est présenté ci-dessous (Figure 2-9).

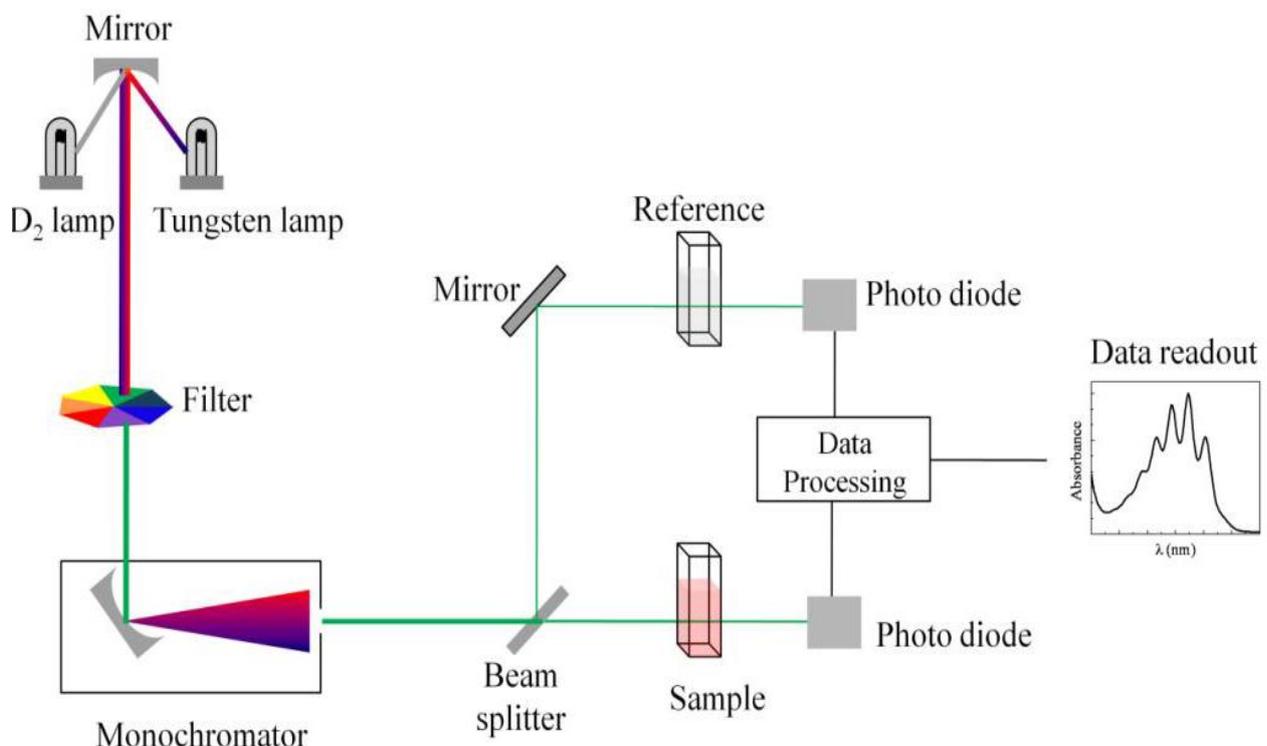


Figure 2-9. Schéma simplifié du parcours lumineux au sein d'un spectrophotomètre à deux cuvettes et deux lampes.

- Un spectrophotomètre BMG Labtech Spectrostar NANO (avec le logiciel éponyme de version V2.12), qui permet de réguler la température de 25°C (température ambiante) à 45°C.

Il peut analyser à la fois des échantillons dans des microplaques ou des cuves. Il procède par une illumination de l'échantillon par tout le spectre sous forme d'un nombre déterminé de flashes lumineux. Le spectre de la lumière récupérée après traversée de l'échantillon est alors analysé pour donner un spectre d'absorption. Au contraire du spectrophotomètre précédent, la référence est enregistrée préalablement dans l'appareil et non comparée en simultané (sauf en mode microplaque). La précision de la mesure est de $Abs \pm 0,02$. Le coefficient d'extinction d'un échantillon à une longueur d'onde λ (ϵ_λ) est déterminé en mesurant son absorbance à différentes concentrations (C) et en appliquant la loi de Beer-Lambert avec : $Abs_\lambda = \epsilon_\lambda.C.l$ où l est le trajet optique de la lumière dans l'échantillon. Ce trajet est de 1 cm avec les cuves standards et correspond à la hauteur de l'échantillon dans les puits des microplaques.

2.4.vii. Spectroscopie Infrarouge

Un spectromètre **Tensor 27** de la marque **Bruker** a été utilisé pour les caractérisations infrarouges des extraits de phospholipides. Pour effectuer des mesures quantitatives grâce à la spectroscopie infrarouge, une cellule liquide Crystal Laboratories SL-3 à base d'un cristal ZnSe a été utilisée.

2.4.viii. Dosage du phosphore

Le phosphore a été déterminé sur les échantillons en utilisant la norme AOCS Ca12-55. Elle consiste à transformer tout le phosphore organique en phosphore minéral par utilisation d'acide nitrique et calcination à 400°C en présence d'oxyde de zinc. Ensuite, ce phosphore est complexé par un mélange de molybdate de sodium et d'hydrazine. La quantité de complexe formé est déterminée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 420nm et en la comparant à une droite de calibration effectuée avec différentes solutions de phosphate de potassium. Le pourcentage de phosphore obtenu, s'il provient exclusivement de composés organiques, peut permettre de déterminer la concentration en phospholipides en utilisant un facteur de conversion. Ce facteur a une valeur de 30 dans la norme utilisée. Cependant, comme cela a déjà été remarqué avec les protéines, il peut dépendre de la nature des phospholipides présents. Ici, il considère de l'huile de soja.

2.5. Appareils/Méthodes d'analyse des vésicules

2.5.i. Granulométrie Laser par DLS

La taille des vésicules formées par les phospholipides a été mesurée avec l'aide d'un granulomètre MALVERN Zetasizer Nano ZS.

Celui-ci permet de mesurer la taille moyenne d'un échantillon dans la gamme 0,6 nm – 6 µm et une distribution de taille lorsque celle-ci est gaussienne ou que deux populations sont présentes. Il procède en récupérant la lumière diffusée par les particules soumises au mouvement brownien, à un angle de 173° permettant la rétrodiffusion et/ou 3°. La rétrodiffusion permet de mesurer des échantillons non totalement transparents et donc plus concentrés et de minimiser la diffusion multiple. La position du laser de même que sa puissance peuvent être réglées manuellement ou automatiquement de façon à optimiser le rapport signal/bruit. La mesure est donnée sous la forme d'une distribution granulométrique en intensité. Ainsi, la taille est pondérée en fonction de sa contribution à l'intensité lumineuse détectée. A partir de l'indice de réfraction et de la viscosité du milieu, cette valeur peut être convertie en distribution granulométrique en volume, la taille étant alors pondérée en fonction de sa contribution au volume. Les particules les plus fines ne sont pas visibles dans cette distribution si elles ne représentent pas un volume suffisant. Les particules les plus grosses sont, au contraire, particulièrement représentées. Enfin, si un signal a été détecté pour de faibles particules, une distribution en nombre est accessible, le logiciel calculant combien de particules sont nécessaires pour obtenir un signal d'une intensité donnée. Ainsi, la distribution en nombre, si elle est plus proche de la valeur qu'on pourrait obtenir en mesurant les particules une à une au microscope n'est valide que dans le cas où ces particules ne sont pas mélangées à des particules bien plus grosses qui peuvent diffuser toute la lumière. Une petite erreur d'acquisition se transforme alors en une importante erreur en distribution en nombre. Par conséquent, les différentes données Z_{average} (valeur moyenne harmonique en intensité) et D_V (valeur moyenne en volume) sont relevées et D_N (valeur moyenne en nombre) est donnée à titre purement informatif.

2.5.i. Zétamétrie

L'appareil précédent s'utilise aussi comme Zétamètre pour déterminer le potentiel Zêta des particules ou macromolécules. Le potentiel Zêta d'un échantillon peut se comprendre comme la charge des particules en solution (Figure 2-10).

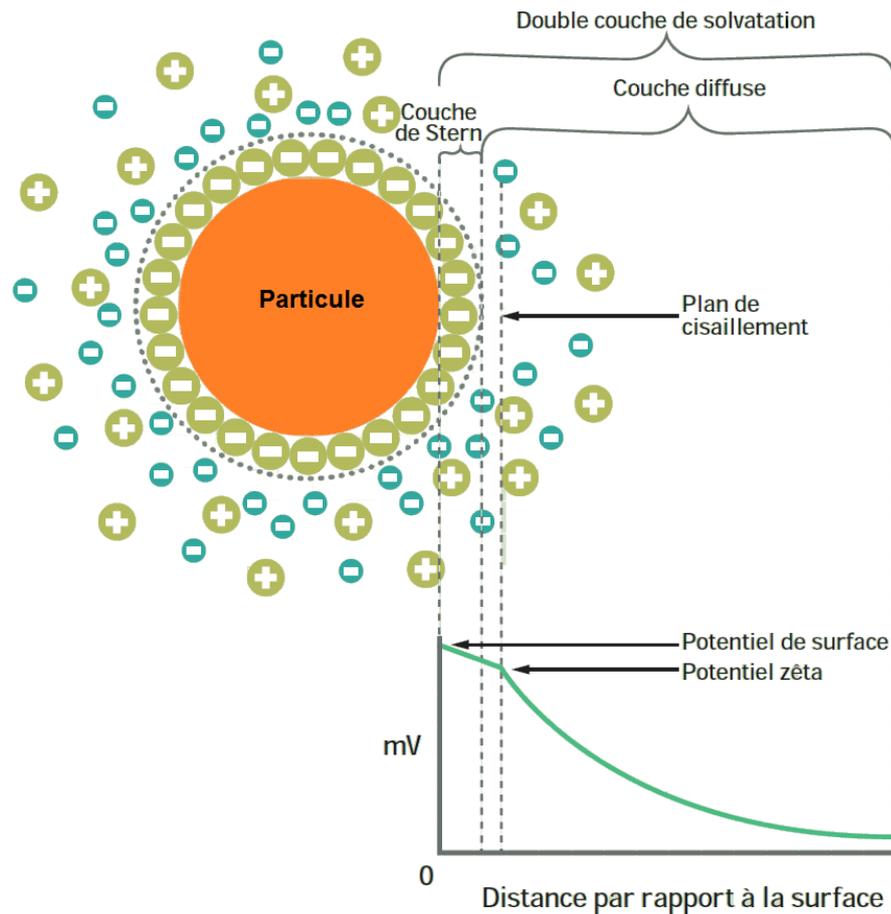


Figure 2-10. Illustration du potentiel Zêta (adaptée du site <https://www.malvernpanalytical.com>)

Il est calculé en le corrélant à la mobilité de la particule soumise à un champ électrique connu. En effet, la particule va être attirée par l'électrode de charge opposée à la sienne. Elle va se déplacer à une certaine vitesse en fonction de ce champ.

$$V = \mu \times E$$

V : vitesse en $\mu\text{m/s}$

E : champ électrique en V/cm

μ : mobilité électrophorétique en $\mu\text{m.cm/V.s}$

$$\mu = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta}$$

Avec ε , constante diélectrique ; η , viscosité cinématique du milieu ; ζ , potentiel Zêta et $f(\kappa a)$, fonction de Henry qui dépend de a, le rayon de la particule et du paramètre de Debye $\kappa=1/e$ avec e, épaisseur de la double couche ionique. Si les particules sont suffisamment grosses ($>20\text{nm}$), alors deux approximations sont valables pour calculer la fonction de Henry. Dans un milieu

polaire ou contenant une concentration élevée en sel, la double couche est comprimée. Ainsi, $\kappa=1/e$ est élevé et $\kappa a \gg 1$. Dans ce cas, selon l'approximation de Smoluchowski, $f(\kappa a)$ tend vers 1,5.

Au contraire, lorsque le milieu est non polaire, la double couche est étendue et $\kappa a < 1$. Dans ce cas, selon l'approximation de Huckel $f(\kappa a)$ tend vers 1.

Ainsi, dans un milieu aqueux, le potentiel Zeta peut s'écrire :

$$\zeta = \frac{3\eta\mu}{2.\varepsilon.(1,5)} = \frac{\eta\mu}{\varepsilon}$$

Connaissant la constante diélectrique de l'eau et sa viscosité, nous pouvons écrire $\zeta = 11,23\mu$

La mesure de la mobilité s'effectue dans une cellule constituée d'un tube en U d'un volume de 1mL comprenant une électrode à chaque extrémité. La mobilité des particules est mesurée par effet Doppler. Une particule se déplaçant va diffracter la lumière du laser et l'onde diffusée aura alors une fréquence supérieure à celle du laser incident avec une phase décalée, ce décalage étant fonction de la vitesse des particules. En combinant le signal de référence et le signal diffracté, on obtient un signal d'interférences d'une fréquence fonction du déphasage. Le champ électrique va être régulièrement inversé selon une fréquence lente (SFR : small field reversal) et rapide FFR (fast field reversal). La fréquence lente permettra de différencier plusieurs mobilités, les particules de potentiel Zêta supérieur se déplaçant plus vite. Une distribution de mobilité et donc de potentiel Zêta seront alors données et le potentiel Zeta sera indiqué avec une bonne résolution. Cependant, cette faible fréquence, si elle augmente la résolution, laisse le temps à un phénomène d'électroosmose de s'installer (mouvement du milieu qui prend le dessus sur l'électrophorèse : mouvement des particules) et la valeur mesurée est décalée par rapport à la valeur réelle. La fréquence rapide, si elle ne permet pas de séparer les mobilités entre elles, permet de corriger l'effet électroosmotique. Ainsi, la fréquence rapide donne une valeur vraie du potentiel Zêta mais avec une mauvaise résolution tandis que la fréquence lente permet d'obtenir une meilleure résolution et distribution du signal qu'il suffit de replacer à sa valeur moyenne «vraie». Un milieu d'une conductivité trop importante ne pourra généralement pas permettre d'effectuer une fréquence faible et seule une moyenne de potentiel Zêta sera indiquée.

2.5.ii. Cryo-MEB

Les observations en cryo-microscopie à balayage ont été réalisées au sein de la plate-forme GENOTOUL, au CMEAB avec l'aide de Dominique Goudounèche et Bruno Payré. L'appareil

utilisé est un MEB Quanta 250 FEG FEI avec un module de cryo-préparation Quorum PP3000T. Deux méthodes de préparation des échantillons ont été utilisées pour refroidir l'échantillon. La première méthode a été une cryo-fixation à haute pression par un appareil LEICA EM ICE. Cette méthode permet de figer l'eau immédiatement à l'état solide en minimisant les modifications de l'échantillon. Une autre méthode a été un refroidissement à l'azote pâteux ($T=-210^{\circ}\text{C}$) qui permet de minimiser la cristallisation de l'eau. Une fois refroidi, l'échantillon est sublimé pendant un temps défini de façon à éliminer l'eau déposée à la surface de l'échantillon (qui peut provenir d'une condensation au moment du refroidissement). Après cette sublimation, l'échantillon est fracturé avec un mini-scalpel (cryo-fracture) et métallisé. Il peut alors être observé.

La microscopie électronique à balayage est une technique qui permet d'observer la surface d'un échantillon en fonction de l'interaction de cette dernière avec un faisceau d'électrons. Elle permet un grossissement et une profondeur de champ bien plus importants que la microscopie optique avec des objets de l'ordre de la dizaine de nanomètres qui peuvent alors être observés. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite un échantillon conducteur et un vide poussé pour obtenir une bonne résolution. Dans ces conditions, un échantillon se déshydrate très vite et il ne peut être observé que sous sa forme sèche. Pour pallier ce problème, il est possible de travailler à basse température pour observer un échantillon où l'eau serait conservée sous forme solide ou de substituer l'eau par une résine. Dans le premier cas, plusieurs méthodes sont envisageables comme un refroidissement à l'azote liquide, pâteux ou à l'éthane liquide. L'azote pâteux permet d'obtenir une eau à l'état amorphe. L'éthane liquide permet un refroidissement plus immédiat de l'échantillon qu'avec l'azote, figeant l'échantillon dans son état natif, l'eau se trouvant ici aussi sous forme amorphe.

2.6. Extraction de l'huile

2.6.i. Presse Monovis

L'extraction de l'huile à partir de graines de caméline a été réalisée par une presse monovis de type ANTON FRIES P500R. Cette presse peut traiter de 12 à 30kg de graines par heure avec une vis de compression dont la vitesse peut aller de 5 à 95 t/min. La trémie comporte un agitateur et un ruban chauffant est utilisable pour chauffer le cylindre de presse. Une fois introduites dans la trémie, les graines sont acheminées dans la vis de compression. Le pressage et la libération de l'huile se font en fin de parcours (Figure 2-11).



Figure 2-11. Illustration de la vis de compression et du cylindre d'extraction avec la zone de libération d'huile (images provenant du site du constructeur).

2.7. Modélisation moléculaire

La modélisation s'est effectuée en utilisant une station de calcul HP Z820 possédant 32 Go de RAM (ECC DDR3 SDRAM), 2 processeurs quadricoeurs Intel XEON CPU E5-2609 0 à 2.4 GHz, deux cartes graphiques nVIDIA GF108. Le système d'exploitation est Windows 7 64 bits.

2.7.i. Optimisation de la géométrie moléculaire

Pour déterminer la meilleure géométrie d'une molécule, celle-ci est tout d'abord dessinée en 2D avec le logiciel CHEMAXON Marvin Sketch 5.11.5. Une fois enregistrée au format MDL molfile (.mol), elle est importée dans le logiciel Fujitsu Siemens SCIGRESS version FJ 2.4. La molécule est alors transposée en 3D en corrigeant sa valence, hybridation et géométrie. Les différents angles de torsion sont ensuite identifiés et une plage et un pas de variation de ces angles sont définis. En utilisant le champ de force MM3 et la procédure CONFLEX, une liste de tous les conformères de basse énergie va être générée. Le conformère de plus basse énergie est enregistré, sa géométrie est optimisée avec le champ de force MM3 en augmentant la distance de prise en compte des interactions électrostatiques. Ensuite, les coordonnées de cette molécule sont enregistrées au format mopac (.mop) et une ligne de commande est ajoutée pour effectuer une optimisation de sa géométrie avec le logiciel gratuit MOPAC2012 en utilisant une solvation implicite avec le modèle COSMO. Celui-ci permet de considérer la molécule comme incluse dans une cavité entourée d'un continuum diélectrique. Exemple de ligne de commande :

```
PM7 EPS=78.4 CHARGE=-1 FLEPO PDBOUT
```

Ici, PM7 est l'algorithme semi-empirique utilisé, EPS=78.4 indique la constante diélectrique du milieu et donc que la modélisation COSMO sera employée (avec l'eau dans ce cas),

CHARGE=-1 indique la charge de la molécule, FLEPO signifie que l'optimiseur employé sera celui de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno, plus adapté aux larges systèmes et que toutes les valeurs de l'optimisation sont enregistrées. PDBOUT signifie que la géométrie optimisée sera enregistrée au format PDB.

2.7.ii. Dynamique moléculaire

a. Le fichier psf

En premier lieu, la molécule au format pdb est ouverte dans le logiciel gratuit VEGA ZZ 3.0.5.12 et ses différents atomes sont renommés et/ou renumérotés pour correspondre aux dénominations atomiques des fichiers topologiques où cette molécule est déjà paramétrée. Si VEGA ZZ ne peut identifier tous les atomes avec les fichiers topologiques à sa disposition, la molécule est ouverte dans le logiciel VMD. Un fichier de paramétrage psf va être créé en utilisant un plus grand choix de fichiers topologiques. Si ces derniers ne comportent cependant toujours pas la molécule ou tout du moins les liaisons qu'elle contient, il sera nécessaire de créer un fichier topologique en indiquant l'ensemble des atomes et liaisons de la molécule. Enfin, un fichier psf peut être créé.

b. Fichier de configuration

Il s'agit ensuite de déterminer le champ de force qui va être utilisé et les conditions de la modélisation. Concernant les phospholipides, le champ de force CHARMM36 – lipids contient déjà les paramètres nécessaires pour une large gamme de phospholipides. Les fichiers psf, pdb et le fichier du champ de force ayant été défini (voir ANNEXE 6), il est nécessaire de programmer la dynamique moléculaire qui va être employée dans le langage correspondant au logiciel employé. Ici, le logiciel gratuit NAMD a été utilisé. Ce dernier comporte de nombreux paramètres de configuration permettant de gérer le traitement des interactions non liantes, notamment avec les forces électrostatiques/Van Der Waals, la gestion du contrôle de la température et de la pression, le traitement de la périodicité du système étudié, la durée d'un pas de calcul en femtosecondes, les intervalles de minimisation ou d'enregistrement des données (coordonnées, énergie, temps, vitesses des atomes...). Deux exemples de configuration sont donnés en annexe (ANNEXE 7 & ANNEXE 8), correspondant l'un au processus d'équilibration d'une bicouche de phospholipides et l'autre à une étape de production hors équilibre. Ils sont issus du site Charmm-Gui (www.charmm-gui.org) où des chercheurs ont mis au point des fichiers de configuration adaptés à la simulation de membranes/bicouches phospholipidiques. Six étapes d'équilibration : 2 étapes

NVT (nombre de molécules, volume et température constants) et 4 étapes NPT (nombre de molécules, pression et température constants) sont alors recommandées avant une étape de production NPT (Jo *et al.*, 2009, 2008, 2007; Lee *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014).

c. Construction d'une bicouche, membrane ou vésicule

Pour construire une bicouche, il est possible d'utiliser le « Membrane/Bilayer Builder » du site Charmm-Gui (www.charmm-gui.org). Cependant c'est principalement le logiciel packmol (Martínez *et al.*, 2009) qui a été utilisé. Ce dernier permet de placer la quantité souhaitée de molécules choisies dans un espace délimité en essayant de respecter une distance suffisante entre elles. Le fichier PDB obtenu est alors directement utilisable pour la dynamique moléculaire. Il est utilisable ainsi pour réaliser des bicouches ou même des liposomes. Des fichiers de configuration utilisés se trouvent en annexe (ANNEXE 9).

2.8. Modélisation Gros-Grains

Le module MARTINI TUTORIAL (Gamini et Chandler, s. d.) a d'abord été téléchargé⁴ et a servi de guide pour la mise en place de cette modélisation. En premier lieu, la molécule de phospholipide est découpée en différents fragments, chaque fragment étant identifié par un nom et associé aux divers atomes qu'il contient. L'ensemble est écrit dans un fichier (.cgc).

```

CGBEGIN
POPC PO4 0
POPC P1 0
POPC O11 0
POPC O12 0
POPC O13 0
POPC O14 0
POPC C1 0
POPC HA 0
POPC HB 0
CGEND

```

Figure 2-12. Extrait d'un fichier .cgc définissant un fragment ou grain de la modélisation gros grains

Dans cet exemple (Figure 2-12), dans la molécule nommée POPC (1-palmitoyl, 2-oleoylphosphatidylcholine), le fragment qui s'appellera PO4 est défini. Il sera constitué du groupement PO4-CH₂, ce qui comprend les atomes P1, O11 - O14, C1, HA et HB.

Un fichier topologique (.top) est créé en indiquant les liaisons entre les fragments et la polarité/type de chaque fragment (C₁, Q_d...) selon la dénomination de MARTINI.

⁴ <https://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/spectop-index.html> (accès en septembre 2018)

Dans le fichier topologique mis en exemple (Figure 2-13), sur le résidu (molécule) POPC, chaque fragment défini précédemment (comme le fragment PO4) est considéré ici comme un atome, son type et sa charge étant ensuite notés. Enfin, les liaisons et les angles à prendre en compte sont indiqués. De 134 atomes initiaux, seulement 13 fragments sont définis. La dénomination C3C du fragment D3B comprend la double liaison de l'acide oléique. Le premier C indique que c'est un groupement apolaire, le numéro 3 qu'il s'agit d'une affinité polaire plus importante (La double liaison implique une plus forte polarité) et le troisième C que la liaison est Cis. Les autres types sont : Q0 pour le fragment « choline » : chargé mais sans liaison hydrogène, Qa pour le fragment phosphate : chargé avec accepteur d'hydrogène ; Na pour les groupements « glycériques » : Non polaire et accepteur d'hydrogène.

```

RESI POPC 0.0 ! CHO
ATOM CHO Q0 1.0 ! |
ATOM PO4 QaL -1.0 ! PO4
ATOM GL1 NaL 0.0 ! |
ATOM GL2 NaL 0.0 ! GL1
ATOM C1B C1 0.0 ! | \
ATOM C2B C1 0.0 ! C1B GL2
ATOM D3B C3C 0.0 ! | |
ATOM C4B C1 0.0 ! C2B C1A
ATOM C5B C1 0.0 ! | |
ATOM C1A C1 0.0 ! D3B C2A
ATOM C2A C1 0.0 ! | |
ATOM C3A C1 0.0 ! C4B C3A
ATOM C4A C1 0.0 ! | |
! C5B C4A

BOND CHO PO4 PO4 GL1 GL1 GL2
BOND GL2 C1A C1A C2A C2A C3A C3A C4A
BOND GL1 C1B C1B C2B C2B D3B D3B C4B C4B C5B
ANGLE PO4 GL1 GL2 PO4 GL1 C1B GL1 C1B C2B
ANGLE C1B C2B D3B C2B D3B C4B D3B C4B C5B
ANGLE GL2 C1A C2A C1A C2A C3A C2A C3A C4A
!Ces angles ne sont pas définis dans MARTINI:
!ANGLE CHO PO4 GL1 GL1 GL2 C1A C1B GL1 GL2

```

Figure 2-13. Fichier topologique définissant les polarités et les liaisons des différents grains de la molécule.

Le logiciel packmol est alors utilisé pour créer l'ensemble de molécules à modéliser. Au sein du logiciel VMD, l'ensemble est alors mis sous forme de gros grains avec le module « CG-Builder » qui fera appel au fichier topologique et de découpage. Ensuite, le système sera additionné de molécules d'eau (« Add solvation Box ») en les ajoutant selon la modélisation gros-grains. Le système, caractérisé alors par un fichier solvate.pdb et solvate.psf sera ionisé avec KCl en mettant dans le panneau de commandes de VMD l'instruction suivante (Figure 2-14) :

```

> source cg-ionize.tcl
> autoionize -psf solvate.psf -pdb solvate.pdb -cation K -sc 0.1 -o ionize

```

Figure 2-14. Code utilisé pour ajouter des molécules de KCl à une concentration de 0,1M au système

L'instruction `-cation K` indique que le sel utilisé sera du KCl et non le sel par défaut (NaCl) ; `-sc 0.1` signifie que le système sera neutralisé et que la concentration en sel sera fixée à 0,1 M. Deux fichiers sont alors obtenus : `ionize.pdb` et `ionize.psf`. La dynamique moléculaire peut être alors effectuée avec quelques modifications du fichier de configuration, notamment un pas plus important (20 fs au lieu de 1 ou 2fs pour les modélisations avec tous les atomes), la plus grande taille des grains par rapport aux atomes induisant une vitesse plus faible et moins de mouvement dans les laps de temps courts. Des exemples de fichiers se trouvent en annexe (ANNEXE 10, ANNEXE 11 & ANNEXE 12).

2.9. Exploitation des données *in silico*

Au sein de VMD, un module d'analyse des membranes a été ajouté⁵. Il permet de mesurer l'aire par lipide, l'épaisseur de la bicouche et des coefficients de diffusion. Le détail de ces calculs peut se retrouver en annexe (ANNEXE 13). Sinon, plusieurs ensembles d'instructions ont été développés pour analyser les autres organisations moléculaires obtenues (notamment les vésicules obtenues en modélisation gros grain), en se servant du langage de programmation de VMD basé sur Python. Ainsi, des instructions ont été utilisées pour :

- suivre l'évolution du rayon de giration avec le temps
- suivre l'évolution de la distance entre les deux chaînes (grain à grain) des phospholipides
- suivre l'évolution de la distance entre les phospholipides les plus proches en considérant les groupements PO4
- compter le nombre d'atomes se situant dans une zone définie de la cellule (centre de la vésicule, phase aqueuse...)

Ces instructions se trouvent en annexe (ANNEXE 14).

2.10. Traitement statistique des données

2.10.i. Traitement général

De façon à minimiser les incertitudes des mesures, selon les méthodes utilisées, les échantillons ont été préparés au minimum deux fois et/ou leur analyse a été répétée au moins une fois. L'incertitude a ensuite été exprimée selon la formule :

⁵ <https://sourceforge.net/p/membplugin/wiki/Home/> (accès en septembre 2018)

$$X = \bar{x} \pm t \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Où σ est l'écart-type des mesures, n est le nombre de mesures et t est le coefficient de student utilisé (l'intervalle de confiance est de 68% par défaut ou précisé lorsque qu'il est différent).

2.10.ii. Traitement par plan d'expériences

Pour déterminer la façon dont une variable mesurée dépend de certains paramètres, il est utile de mettre au point les expériences selon une stratégie optimisée. Il s'agit en effet d'obtenir le plus d'informations possibles avec le minimum d'expériences. Ainsi, il existe plusieurs méthodes mathématiques pour mettre au point un ensemble d'expériences selon que l'on souhaite juste déterminer quels sont les paramètres importants ou comprendre leur influence, leurs interactions entre eux. Une fois les expériences réalisées selon le plan préétabli, les réponses sont analysées avec des outils statistiques de façon à construire une loi polynomiale de la forme :

$$Y_k = b_0 + \sum_i b_i X_{i,k} + \sum_i b_{ii} X_{i,k}^2 + \sum_i \sum_{j \neq i} b_{ij} X_{i,k} X_{j,k}$$

Où Y_k est la réponse calculée dans l'expérience k , $X_{i,k}$ est la variable i pour l'expérience k , b_0 est le terme d'intersection, b_i est le coefficient correspondant à la variable X_i , b_{ii} est le coefficient de la variable X_i^2 et b_{ij} est le terme d'interaction. La pertinence du modèle est alors vérifiée par le test statistique de Fisher-Snedecor en comparant les variances du modèle et des résidus (différences entre les valeurs calculées et expérimentales). La probabilité que le modèle ne représente pas les données expérimentales (P_1) devant être la plus faible possible, une valeur de 5 indiquant qu'il y a 95% de chances que le modèle soit pertinent. Sa validité est déterminée en comparant la variance expérimentale et la variance des résidus. La variance expérimentale est déterminée en comparant plusieurs expériences répétées. Si ces expériences répétées montrent une variance supérieure à celle des résidus alors le modèle est suffisamment précis (il y a peu de chance que le décalage entre les valeurs prédites et calculées ne soit pas dû à l'erreur expérimentale). On utilise ainsi la valeur P_2 qui doit être la plus élevée possible. Si le modèle semble pertinent et valide pour décrire les expériences effectuées, il est possible de vérifier s'il est capable de prédire la valeur qui sera obtenue pour une nouvelle expérience. Des expériences tests peuvent alors être conduites pour vérifier l'applicabilité du modèle dans toute la zone explorée. Le logiciel NEMRODOW 2000 (Mathieu *et al.*, 2000) a été utilisé pour mettre au point et analyser le plan d'expériences.

***Chapitre 3. Extraction du mucilage
de caméline***

La première étape du schéma intégré de « bioextraction/biotransformation » envisagé concerne la libération du mucilage de graines de Caméline, ce qui passe tout d'abord par une caractérisation des graines de façon à pouvoir ensuite utiliser les outils de traitement adaptés et en interpréter les résultats d'exploitation.

3.1. Caractérisation des graines

Les graines utilisées sont de la variété Céline, une des deux variétés cultivées en France, l'autre étant Epona. Elles proviennent de plusieurs récoltes centralisées au sein de l'INRA. Les graines sont stockées en fût métallique dans une chambre froide à 6°C.

a. Matière sèche

Six mesures de matière sèche (MS) des graines sont effectuées, donnant :

MS = $93,46 \pm 0,019$ % (intervalle de confiance IC = 95%)

b. Masse

L'évolution de la masse d'un ensemble de graines a été déterminé à mesure que des individus sont ajoutés (Figure 3-1).

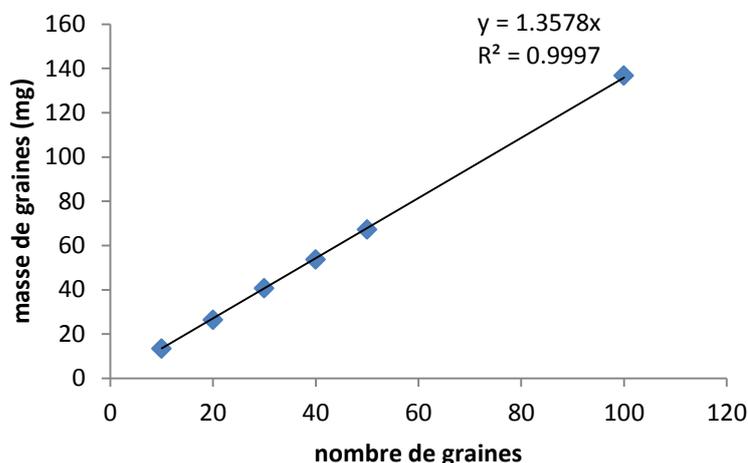


Figure 3-1. Evolution de la masse d'un ensemble de graines selon le nombre d'individus

Ainsi, la masse moyenne d'une graine de Caméline est : $m=1,36$ mg. En considérant l'ensemble des points mesurés, la masse d'une graine varie entre 1,3 et 1,4mg (IC=95%, N=6). En décortiquant des graines et en pesant également les coques de façon additionnelle (sur 15 coques),

nous obtenons une masse moyenne de coques de 0,37 mg et une variation entre 0,31 et 0,43 mg (IC=95%), soit une coque représentant environ un quart de la masse de la graine.

c. Volume

Une graine de caméline peut s'apparenter à un ellipsoïde avec une longueur d'environ 2mm et une largeur et hauteur d'environ 1mm, ce qui donnerait un volume approximatif de 1 mm³. En utilisant une éprouvette graduée tous les 0,1mL, il est possible de mesurer l'augmentation de volume que provoque l'ajout d'une masse connue (5g) de graines de caméline sur un volume fixé d'éthanol (5mL) (solvant de faible tension de surface et d'interaction négligeable avec les graines entières). Le volume massique des graines étant alors déterminé, connaissant la masse d'une graine, on en déduit son volume. En effectuant 9 mesures, une valeur moyenne peut être obtenue :

$$V_{\text{graine}} = 1,20 \pm 0,02 \text{ mm}^3 \text{ (IC=95\%)}$$

Cette valeur reste proche de l'estimation grossière effectuée précédemment. Si cette augmentation de volume est mesurée dans l'eau, une valeur moyenne similaire ou légèrement supérieure est trouvée avec $V_{\text{graine}} = 1,24 \pm 0,05 \text{ mm}^3$. Cependant, dans ce cas, si les graines hydratées ne font que peu augmenter le volume global par rapport aux graines non hydratées, chaque graine, avec le déploiement de son mucilage, occupe un volume plus important dans la solution aqueuse, la couche mucilagineuse augmentant la distance entre les graines (Figure 3-2).



Graines de caméline dans l'éthanol



Graines de caméline dans l'eau

Figure 3-2. Photographies de l'empilement de graines de caméline dans l'éthanol et dans l'eau

Ainsi, à l'équilibre, on compte environ 100 graines par millilitre dans l'eau au lieu de 500 graines par millilitre dans l'éthanol.

d. Aspect

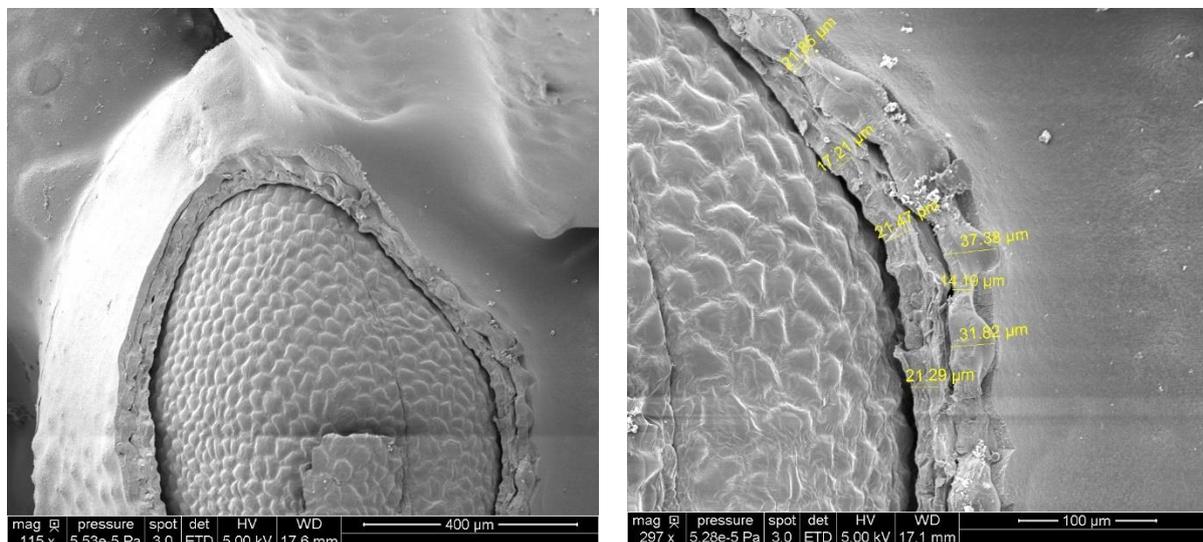


Figure 3-3. Vue d'une coupe de la coque et de la surface de l'endosperme (a. Grossissement G=115X, b. G=297X)

Comme peuvent le montrer ces images en cryo-microscopie électronique à balayage (Figure 3-3), la couche mucilagineuse autour des graines de caméline fait plusieurs microns d'épaisseur (20-40 μm), à la surface de la coque (20 μm environ d'épaisseur hors mucilage), elle-même non liée à l'endosperme. Ces cellules mucilagineuses ont des formes arrondies.

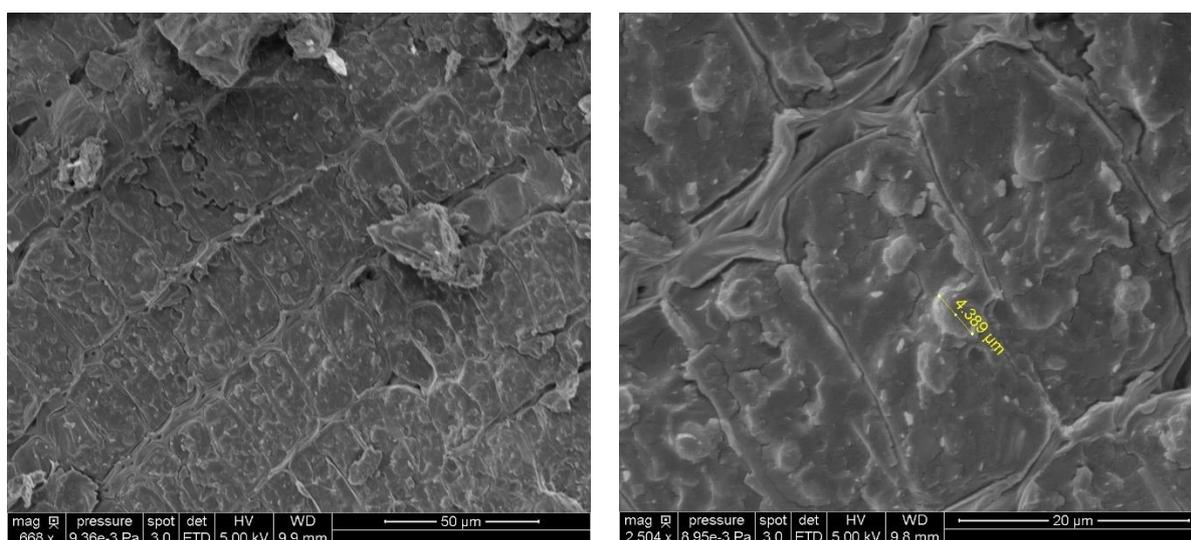


Figure 3-4. Image de cellules de l'endosperme à plusieurs grossissements (a. G=668X, b. G=2504X)

La coupe observée au niveau de l'endosperme (Figure 3-4) permet de distinguer des organelles de forme sphérique, sans doute les oléosomes (ou corps lipidiques). Cette image permet d'observer une forte polydispersité de ces gouttelettes avec une taille qui peut être supérieure à 4 μm .

e. Taux de cendres

Par calcination de graines broyées, il est possible de déterminer le taux de cendres. Celui-ci s'élève à $3,42 \pm 0,03$ % sur masse sèche (IC=95%). Même si la combustion peut entraîner la formation d'oxydes et de carbonates, cette teneur en cendres est une approximation de la teneur en matières minérales des graines.

f. Teneur en huile

Une fois les graines broyées au moulin à café, leur teneur en huile est mesurée par extraction de Folch ou par Soxhlet au cyclohexane. Une valeur de 40,5% est obtenue par extraction de Folch et de 41.9% par extraction Soxhlet.

g. Teneur en protéines

La teneur en protéines dérive de la teneur en azote obtenue par dosage Kjeldahl. Selon cette méthode, les graines ont une concentration d'azote de $4,18 \pm 0,19$ % (IC=95%). Avec le facteur de conversion recommandé par la FAO (6,25), cela donne un pourcentage de $26,12 \pm 1,19$ %

h. Teneur en sucre

La méthode Dubois (DuBois *et al.*, 1956) a été adaptée à un dosage par microplaque de façon à pouvoir doser de faibles quantités de sucre (Masuko *et al.*, 2005). Des coques de caméline sont traitées plusieurs minutes sous sonde ultrasonore dans un eppendorff de 1mL, ce qui permet d'obtenir une puissance de 500 000 W/L. Un tel traitement est susceptible d'extraire totalement les polysaccharides de la coque de caméline. Obtenant une teneur en sucre équivalent glucose de 13,3% dans la coque, il peut se déduire un pourcentage de 3,6% de la masse de la graine en sucre équivalent glucose provenant de la coque. Evidemment, cette valeur ne prend pas en compte la teneur réelle en polysaccharides. La même extraction effectuée sur une graine entière broyée préalablement au moulin à café donne une teneur de 19% de sucre équivalent glucose. Ainsi, si la coque représente environ un quart de la masse de la graine et contient le mucilage, un extrait qui comporterait plus de 4% des sucres de la graine comporterait à la fois des sucres mucilagineux et internes. Cette méthode de Dubois est cependant très sujette à caution, autant par la faible reproductibilité observée que par une valeur en équivalent glucose qu'il est difficile de ramener à une teneur réelle en polysaccharides. Il est possible aussi d'obtenir une approximation de la teneur (t) en sucres solubles de la graine entière par différence en considérant le calcul suivant :

$$t_{\text{sucres}} = 100 - t_{\text{minéraux}} - t_{\text{protéines}} - t_{\text{lipides}} - t_{\text{lignine}} - t_{\text{cellulose}} - t_{\text{hemicellulose}}$$

Une analyse ADF/NDF des graines de caméline ayant été réalisée par ailleurs (CRITT-CATAR, Toulouse, France) donne $t_{\text{cellulose}}=7,6\%$, $t_{\text{hémicellulose}}=4,3\%$, $t_{\text{lignine}}=5,1\%$. Ainsi :

$$t_{\text{sucres_solubles}} \cong 100-3,4-26,1-41,9-5,1-7,6-4,3 \cong 12 \%$$

i. Teneur en pectines

En réalisant un dosage de Blumenkrantz sur les graines de Caméline sèches, une valeur de $2,7 \pm 0,6 \%$ ($I=95\%$) est trouvée en équivalent acide galacturonique. Cette faible valeur incite à considérer que l'essentiel des acides uroniques provient de la coque des graines.

3.2. Utilisation d'une sonde à ultrasons

En général, la diffusion des composés internes des graines va dépendre de plusieurs coefficients de diffusion en fonction des couches traversées. Concernant la diffusion de l'eau, les coefficients de diffusion les plus limitants sont dans la coque qui comporte une « porosité plus faible ». Ainsi, dans le riz par exemple (Engels *et al.*, 1986), le coefficient de diffusion de l'eau dans l'endosperme est 3 fois supérieur à celui trouvé dans le testa à 30°C et ces coefficients s'équilibrent à plus haute température. Il sera ainsi plus difficile d'éviter l'extraction de composés internes dans des graines à coque fine. Avec une épaisseur d'environ 20µm, la coque de la caméline se rapproche de celle d'*Arabidopsis* (Gardarin *et al.*, 2010). Ces deux graines offrent une barrière plus mince que d'autres graines à mucilage comme la moutarde avec une épaisseur de 90 µm environ (I.R. Siddiqui *et al.*, 1986) et le lin avec une épaisseur d'environ 200 µm (Mahdi Kadivar, 2001).

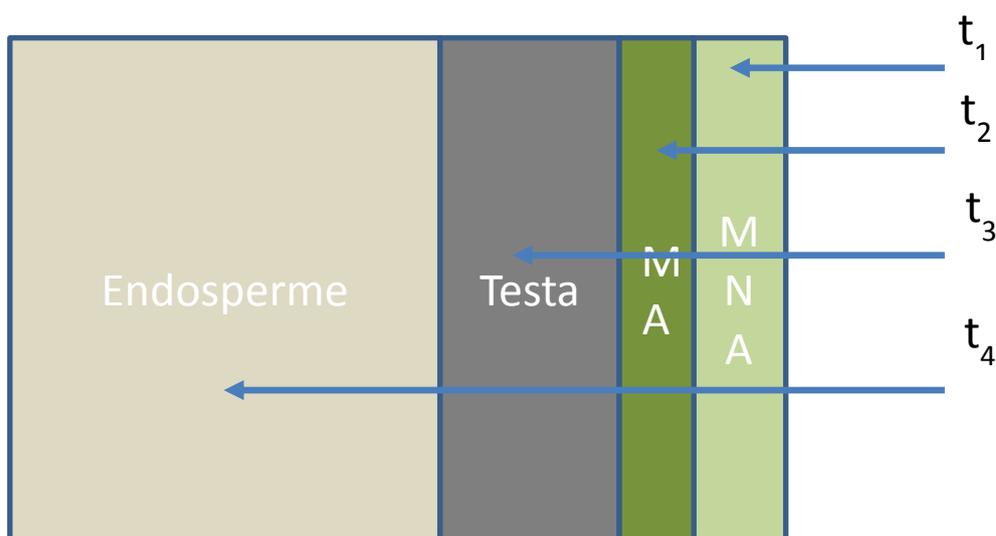


Figure 3-5. Représentation de plusieurs couches de la graine avec le temps mis par l'eau pour accéder à chacune des zones. (MA : Mucilage adhérent ; MNA : Mucilage non-adhérent)

Si les différentes couches de la graine pouvant intervenir lors d'une diffusion en milieu aqueux sont représentées (Figure 3-5), il apparaît que les différents composés hydrosolubles ne pourront être extraits dans le milieu d'extraction qu'à partir de l'hydratation de ces couches. Ainsi, il est possible de considérer un temps t_1 correspondant au temps mis pour que l'eau pénètre la couche du mucilage non adhérent ($t_1 = X_1 / (K_1 \cdot D_1)$) avec X_1 , l'épaisseur de la couche 1, D_1 : le coefficient de diffusion de l'eau dans la couche 1 et K_1 : une constante) un temps t_2 ($t_2 = X_1 / (K_1 \cdot D_1) + X_2 / (K_2 \cdot D_2)$) correspondant au mucilage adhérent, t_3 correspondant au Testa ($t_3 = X_1 / (K_1 \cdot D_1) + X_2 / (K_2 \cdot D_2) + X_3 / (K_3 \cdot D_3)$) et t_4 correspondant à l'endosperme. Une fois les différentes couches hydratées, les composés seront extraits selon leurs propres coefficients de diffusion, étant assez évident que la coque exercera toujours une fonction de zone barrière. Une extraction du mucilage sélective nécessite t_1 et $t_2 \ll t_3$ et t_4 pour qu'avec le temps d'extraction, les composés internes soient très faiblement extraits. Il est donc nécessaire, à moins d'avoir un testa très épais et très peu poreux d'avoir des coefficients de diffusion élevés des polysaccharides du mucilage. Une augmentation de la température augmente ces coefficients de diffusion mais aussi ceux des autres composés de la graine. Une simple action d'agitation aura pour conséquence une meilleure homogénéité des concentrations des composés et ainsi permettra un plus fort gradient de concentration des composés entre l'intérieur de la graine et l'extérieur immédiat mais ne favorisera pas forcément les coefficients de diffusion du mucilage. Il est donc nécessaire d'utiliser une action cisailante qui permet d'exercer des contraintes importantes à la surface des graines de façon à augmenter la diffusion des composés surfaciques.

Les ultrasons ont cette capacité à exercer une action cisailante importante et peuvent même, du fait de l'explosion des bulles de cavitation, provoquer des points chauds ou des jets de liquide à proximité des graines. Ils pourraient ainsi fournir une énergie supérieure à l'énergie d'activation de la rupture des liaisons chimiques entre le mucilage et la coque, augmentant considérablement la diffusion du mucilage adhérent. Cependant, ils peuvent aussi avoir une action destructurante sur le testa et donc diminuer l'épaisseur de ce dernier jusqu'à provoquer sa rupture. Il s'agit donc d'une technologie de choix mais qu'il convient de maîtriser pour éviter des échauffements trop importants et une action mécanique trop puissante. S'inspirant de travaux effectués sur le lin (Fabre *et al.*, 2015b), il est possible d'effectuer des essais d'extraction du mucilage avec une sonde à ultrasons. La puissance maximale autorisée par l'appareil (500W) peut se concentrer sur une faible surface (embout de la sonde) et un faible volume, permettant ainsi une action très fortement cisailante. Celle-ci permet, notamment sur le lin, d'extraire quantitativement le mucilage au bout de 30 minutes d'immersion sans extraire notablement les composés internes de la graine. Dans ce cas, il est à souligner une épaisseur importante de la coque, un temps effectif d'ultrasons court (5

minutes avec une pulsation de 1s/5s) et une augmentation limitée de la température (celle-ci se maintenant à 50°C). Deux pulsations différentes vont être utilisées sur la caméline. 5g de graines de caméline sont versées dans 95g d'eau distillée et l'ensemble est traité à 50°C pendant 30 minutes sous ultrasons avec une sonde de 13mm de diamètre travaillant à 60% de son amplitude maximale. Une pulsation de 5s ON/10s OFF est d'abord utilisée. A l'issue de ces 30 minutes, le milieu est filtré et la matière sèche de la phase aqueuse est mesurée. Un rendement d'extraction de $10,05 \pm 0,05$ % est ainsi obtenu par rapport à la masse de graines introduites. Un nouvel essai est réalisé avec une pulsation de 1s ON/5s OFF. Un rendement d'extraction de $5,60 \pm 0,09$ % est alors obtenu, soit un peu plus de la moitié du rendement précédent. Ce rendement se rapproche de celui obtenu selon les mêmes paramètres sur des graines de lin ($6,44 \pm 0,97\%$). Ainsi, la durée effective de traitement ultrasonore a un impact important sur le rendement d'extraction.

3.3. Utilisation d'une colonne à ultrasons

La colonne à ultrasons utilisée peut fonctionner en mode batch, de recirculation ou continu selon sa configuration. Seul le mode continu ne sera pas exploré ici (Figure 3-6). Dans le mode batch, 3,1L de milieu peuvent être traités lorsque les mesures sont réalisées au sein de la canalisation, 3,3L lorsqu'une boucle de dérivation est ajoutée pour effectuer les mesures de manière déportée alors qu'avec un mode en recirculation, 6 L sont mis en œuvre. Cependant, il faut veiller dans ce dernier cas à introduire le moins d'air possible au sein du milieu de façon à ne pas induire de cavitation au sein de la pompe. Si ce phénomène de cavitation est recherché au niveau des ultrasons, il peut également endommager la pompe, gêner son amorçage et/ou en diminuer l'efficacité. Il importe également de préciser que le tuyau de recirculation est adapté au diamètre d'entrée/sortie de la pompe mais qu'un changement important de diamètre se trouve en entrée de la canalisation à ultrasons (de 28 à 83 mm) et un rétrécissement en sortie (de 83 à 28 mm), ce qui peut avoir une influence sur l'écoulement du milieu. Dans le mode batch, le traitement ultrasonore exercé en continu provoque un échauffement trop important du milieu, une température de 80°C pouvant être atteinte, ce qui peut être dommageable pour la conservation de l'intégrité des protéines et autres composés valorisables des graines (lipides polyinsaturés, stérols...). Ainsi, l'extraction est réalisée en mode pulsé. Les ultrasons, d'une puissance volumique moindre par rapport à ceux de la sonde, ne suffisent pas à créer une agitation suffisante pour éviter la sédimentation des graines dans les modes a et b. Reliant la vitesse de sédimentation à l'inverse de la viscosité selon la loi de Stokes, un premier moyen de remédier à ce problème est une augmentation de la concentration en graines mucilagineuses. Celle-ci est portée à 10%.

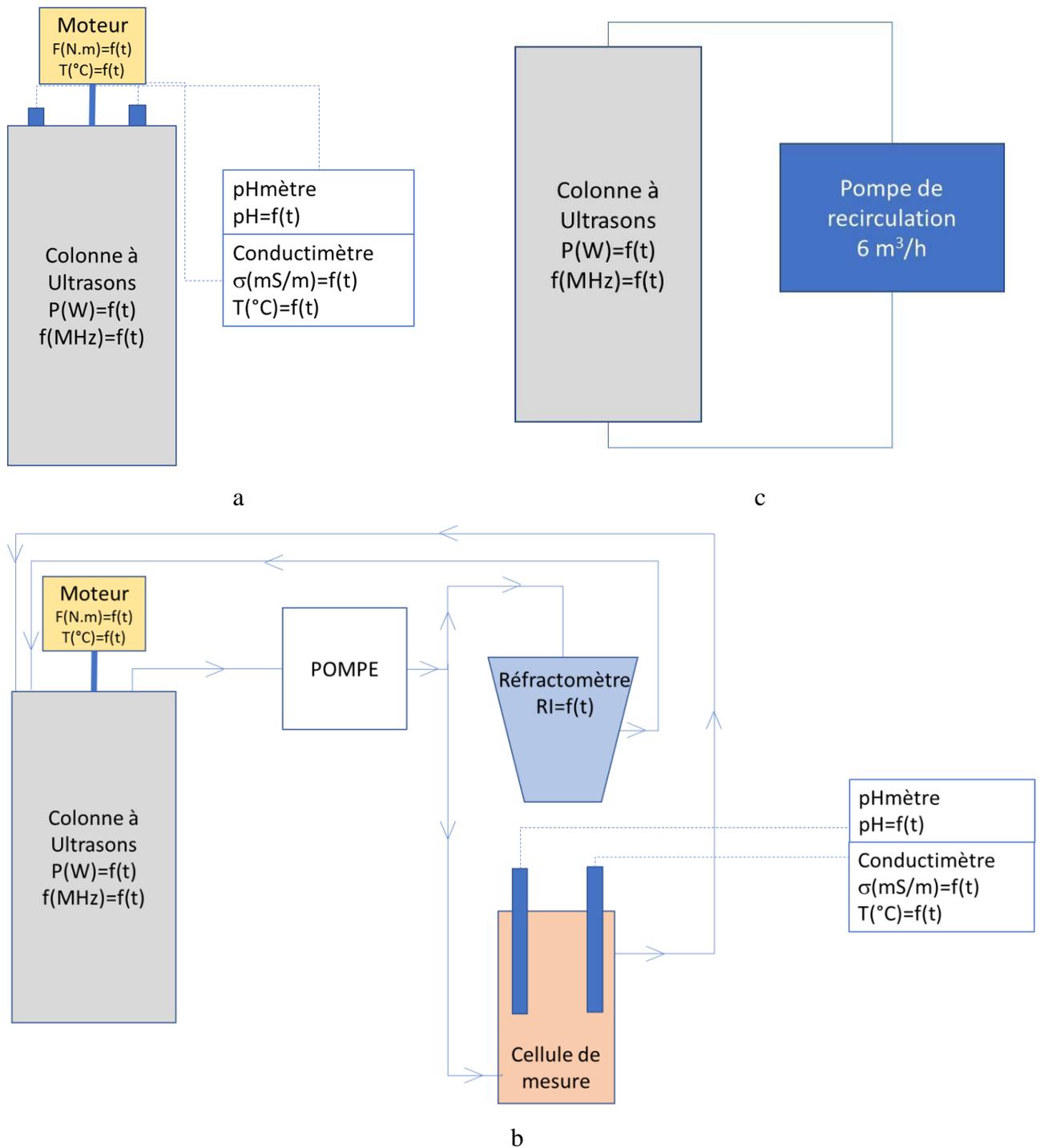


Figure 3-6. Schémas des systèmes d'extraction du mucilage avec une canalisation à ultrasons. A) Analyse du pH et de la conductivité in situ. B) Analyse du pH, de la conductivité et de l'indice de réfraction au travers d'une boucle de dérivation. C) Mode de recirculation

Cependant, même avec une concentration supérieure en graines, la viscosité ne peut suffire à empêcher la sédimentation pendant toute la durée du traitement, d'autant plus que cette viscosité peut diminuer avec le traitement. Augmenter encore la concentration en graines empêcherait une bonne récupération du milieu et diminuerait l'efficacité des ultrasons. Malgré une pulsation

portant la durée effective d'ultrasons à 20min, il apparait que l'absence d'agitation ne permet qu'un rendement assez faible de 4,9% (Tableau 3-1). Une agitation manuelle du milieu permet presque de doubler ce rendement. Il est donc important de relier cette colonne à un système d'agitation.

Tableau 3-1. Conditions d'extraction du mucilage avec une colonne à ultrasons selon différents modes d'agitation

<i>Pulsation ON/OFF</i>	<i>Durée</i>	<i>Agitation</i>	<i>Rendement(%)</i>
<i>10s/20s</i>	<i>1h</i>	<i>Aucune</i>	<i>4,9</i>
<i>10s/20s</i>	<i>1h</i>	<i>Légère agitation manuelle</i>	<i>6,7</i>
<i>10s/20s</i>	<i>1h</i>	<i>Agitation manuelle constante</i>	<i>9,26</i>

3.3.i. Agitation avec moteur, mesure in situ/prélèvements

a. Suivi de l'extraction au cours du temps

Plusieurs indicateurs comme le couple moteur, l'indice de réfraction, le pH et la conductivité peuvent permettre de suivre l'extraction du mucilage au cours du temps.

Couple moteur et température

Un moteur d'agitation avec enregistrement du couple est utilisé. Il est ainsi possible d'observer l'évolution du couple lors d'une mise en présence des graines dans l'eau avec une agitation modérée de 500tpm (Figure 3-7). Comme la viscosité s'exprime comme le ratio de la contrainte imposée (Force/Surface : $N.m^{-2}$) sur le gradient de cisaillement (s^{-1}), à surface de contact et gradient constants, l'évolution du couple peut être considérée comme linéairement liée à l'évolution de la viscosité. Après une phase de latence nécessaire à l'hydratation des graines (environ 10 minutes), la viscosité du milieu commence à augmenter fortement avant de se stabiliser et d'augmenter à nouveau fortement jusqu'à nécessiter le couple maximal du moteur. La mise en route des ultrasons à partir de 55 minutes provoque une diminution de la viscosité en même temps qu'une augmentation de la température. Cependant, au vu d'un essai prolongé dans le temps (Figure 3-8), il apparaît qu'à l'arrêt des ultrasons, la viscosité retrouve sa valeur initiale, ce qui démontre une thixotropie du milieu. Un essai d'ajout de pectinase (0,42g d'une enzyme d'activité 452 U/g sachant qu'on table sur 188,52 unités d'enzyme nécessaire pour la libération d'environ 1,1g d'acide galacturonique) n'a pas donné d'effet, l'action de cette enzyme étant sans doute insuffisante à l'échelle de temps observée et à la température du milieu. Ainsi, à un tel stade d'extraction, les ultrasons ont un effet cisailant peu dénaturant.

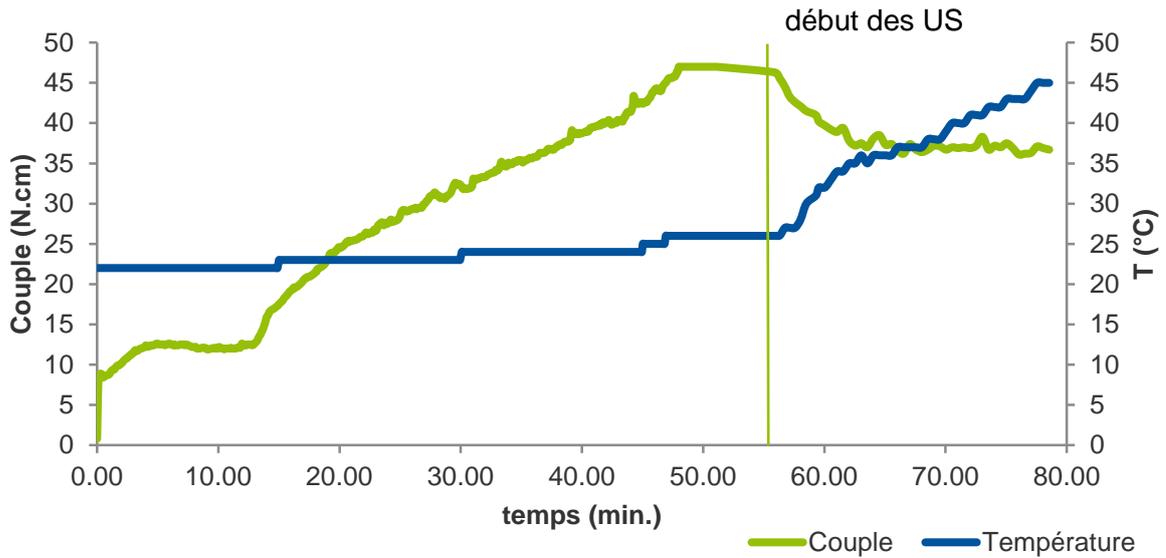


Figure 3-7. Evolution du couple et de la température au cours du temps lors de la démulcination de graines de caméline pendant 80 minutes avec début du traitement ultrasonore à partir de 55 minutes.

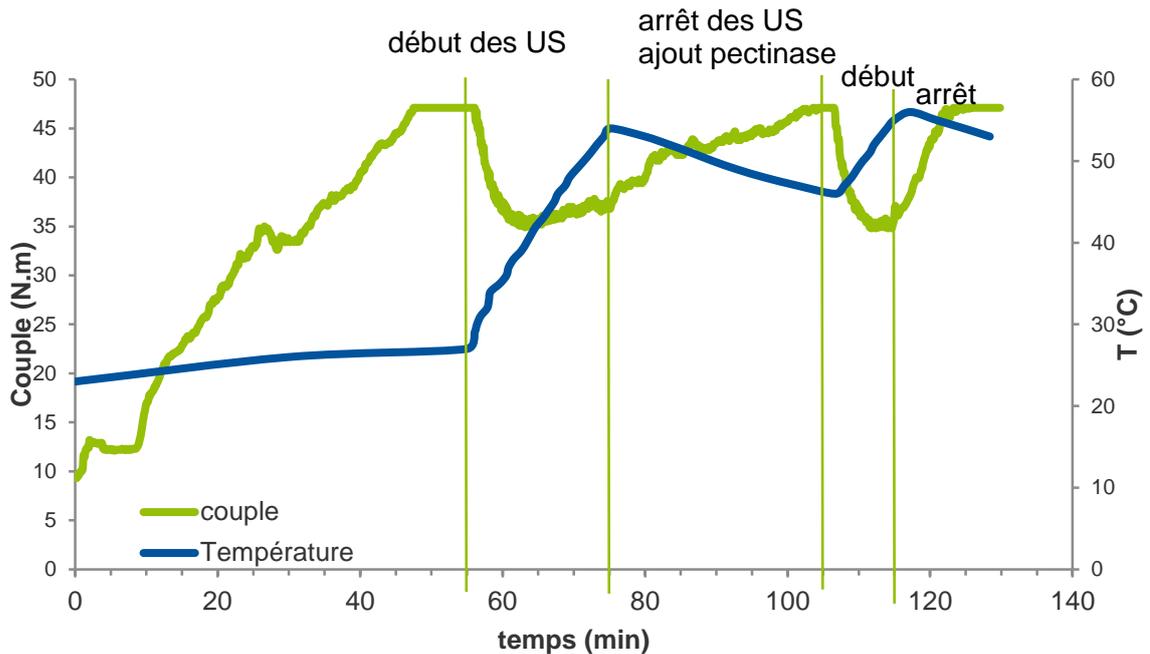


Figure 3-8. Evolution du couple et de la température au cours du temps lors de la démulcination de graines de caméline avec début des ultrasons à 55 minutes, arrêt à 75 minutes avec ajout de pectinase, reprise à 105 minutes et arrêt à 115 minutes.

Il est important de souligner que la viscosité joue un rôle important dans l'efficacité des ultrasons. Un milieu hautement visqueux tel que celui observé après 55 minutes d'extraction ralentit la diffusion et l'amplitude des ondes sonores et diminue ainsi l'efficacité du traitement. Si les ultrasons sont activés dès le début du traitement des graines, le couple moteur reste limité

(Figure 3-9), et les ultrasons commencent à diminuer le couple et donc la viscosité du milieu au bout d'un certain temps d'activation, le couple augmentant et diminuant à mesure que le mucilage s'extrait et que les ultrasons exercent leur action cisailante (environ 15 minutes). Ensuite, le couple diminue de façon plus linéaire. Le milieu obtenu en fin de traitement est ainsi bien plus facilement filtré.

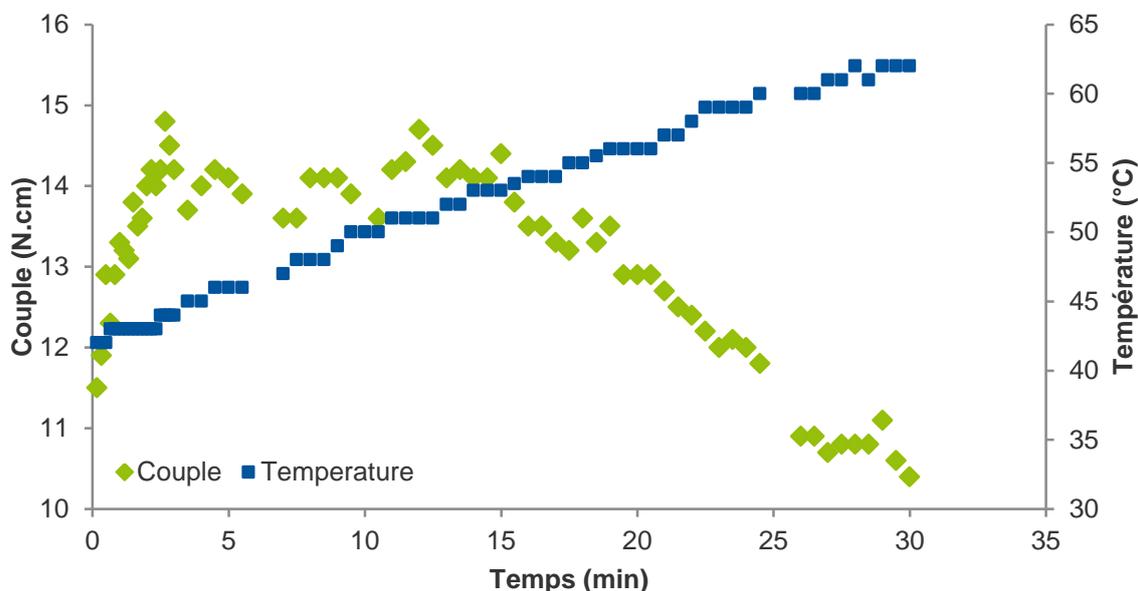


Figure 3-9. Evolution du couple et de la température au cours du temps lors de la démulélagination de graines de caméline avec mise en route des ultrasons dès le début du traitement.

En fin de traitement ultrasonore, le couple ne remonte plus. La déstructuration semble ainsi définitive.

Indice de réfraction

La mesure de l'indice de réfraction « n » est souvent utilisée pour déterminer la teneur en sucre de produits alimentaires en se servant de tables de corrélation. Par exemple, l'utilisation du degré BRIX permet de quantifier la fraction de saccharose dans un liquide. Dans une eau sucrée, cette valeur est égale à la matière sèche soluble. On peut en effet relier la variation de l'indice de réfraction « dn » à la variation de concentration « dc » de plusieurs matières. Concernant les protéines, de nombreuses valeurs de dn/dc peuvent se retrouver dans la littérature. Il est même possible d'estimer ce coefficient selon la composition en acides aminés (Zhao *et al.*, 2011). Globalement, selon la littérature, notamment une revue (Theisen, 2000) et le Handbook of Chemistry and Physics (David R. Lide, 2005a), en prenant les valeurs de concentrations de 0 à 10%, les coefficients dn/dc dans l'eau de divers acides aminés et protéines, sucres et monosaccharides, sels... peuvent être rassemblés (Tableau 3-2).

Tableau 3-2. Valeurs de dn/dc pour plusieurs composés dans l'eau.

Substrat	dn/dc moyen
Protéines humaines	0,189 ±0,003 (Zhao <i>et al.</i> , 2011)
Légumine (globulines 11S de graines végétales)	0,198 (Theisen, 2000)
Albumine de sérum bovin (BSA)	0,190 ±0,002 (Tumolo <i>et al.</i> , 2004)
Béta-Caséine	0,181 (Theisen, 2000)
Guanidine	0,220 ±0,001 (Tumolo <i>et al.</i> , 2004)
Alanine	0,192 ±0,001 (Tumolo <i>et al.</i> , 2004)
Sucrose	0,147 ±0,001 (Tumolo <i>et al.</i> , 2004)
D-Glucose	0,148 (David R. Lide, 2005a) à 20°C
D-Fructose	0,146 (David R. Lide, 2005a) à 20°C
Lactose	0,153±0,003 (Tumolo <i>et al.</i> , 2004)
Maltose	0,152±0,003 (Tumolo <i>et al.</i> , 2004)
Cellulose	0,111 (Theisen, 2000)
Dextrane	0,152 (Theisen, 2000)
Gomme arabique	0,145 (Theisen, 2000)
Pectine de citrus	0,146 (Theisen, 2000)
Pectine de betterave	0,131 (Qi <i>et al.</i> , 2014)
Polysaccharides de lyciet commun	0,148 à 35°C (Wu <i>et al.</i> , 2016a)
Alginate de sodium	0,158 (Theisen, 2000)
Béta-Glucane	0,151 (Theisen, 2000)
Amylopectine	0,152 (Theisen, 2000)
Carraghénane	0,155 (Theisen, 2000)
Acide polygalacturonique	0,176 dans NH ₄ Cl à 0,35M (Theisen, 2000)
Amidon	0,151 (Theisen, 2000)
Xanthane	0,155 dans NH ₄ NO ₃ (Theisen, 2000)
Lécithine	0,1245 (Theisen, 2000) à 20°C
Chlorure d'ammonium	0,188 à 20°C (David R. Lide, 2005a)
Chlorure de calcium	0,245 à 20°C (David R. Lide, 2005a)
Chlorure de magnésium	0,256 à 20°C (David R. Lide, 2005a)
Chlorure de potassium	0,136 à 20°C (David R. Lide, 2005a)
Chlorure de sodium	0,175 à 20°C (David R. Lide, 2005a)
Sulfate de magnésium	0,202 à 20°C (David R. Lide, 2005a)
Hydroxyde de potassium	0,190 à 20°C (David R. Lide, 2005a)

Le Tableau 3-2 montre une certaine hétérogénéité des dn/dc selon les substrats analysés. Cependant, il apparaît que les protéines se situent plutôt dans la zone 0,180-0,190. avec une valeur communément admise pour les protéines globulaires de 0,185 (Zhao *et al.*, 2011) et les polysaccharides sont plutôt autour de 0,150 avec une exception pour la cellulose. Enfin, notons le plus faible coefficient correspondant à la lécithine.

Avant d'utiliser le système d'analyse par dérivation, une extraction du mucilage est effectuée en réalisant des prélèvements à différents temps. L'indice de réfraction des différents prélèvements est alors mesuré avec les graines ou sans les graines (rapidement sédimentées par centrifugation). Les variations de l'indice de réfraction et de la matière sèche peuvent être alors mesurées selon le temps d'extraction (Figure 3-10). En reliant les deux mesures, la courbe de variation de l'indice de réfraction selon le taux de matière sèche peut être tracée (Figure 3-11).

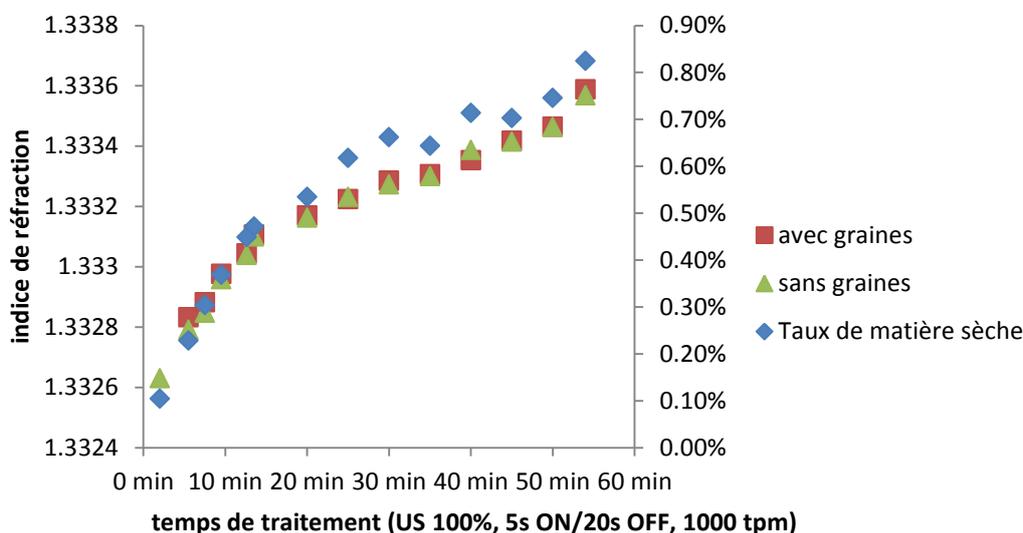


Figure 3-10. Evolution de l'indice de réfraction et du taux de matière sèche selon le temps de traitement

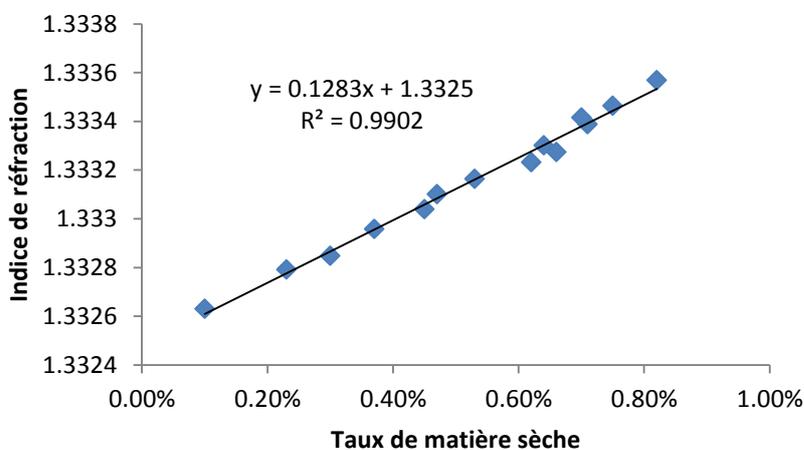


Figure 3-11. Variation de l'indice de réfraction en fonction du taux de matière sèche.

La Figure 3-10 montre une quasi-superposition des valeurs de l'indice de réfraction mesurées avec des graines et mesurées sans ces dernières, indiquant que la présence de particules solides au-dessus du prisme de mesure n'a pas une influence importante sur la valeur mesurée. Ce résultat encourage l'utilisation de la pompe pour mesurer l'indice de réfraction du milieu en continu. Il apparaît que le taux de matière sèche suit visiblement deux phases. Une phase d'extraction assez rapide jusqu'à environ 15 minutes et une phase plus lente de 15 minutes à la fin du traitement, ce qui peut être lié à l'extraction de deux types de mucilage (non adhérent et adhérent). Cette variation de la matière sèche suit de façon assez étroite l'indice de réfraction et la relation entre les deux peut être tracée (cf. Figure 3-11). La variation de l'indice de réfraction semble suivre une relation linéaire avec le taux de matière sèche, le coefficient de corrélation de la régression étant supérieur à 0,99. Ainsi, la nature des extraits ne varie pas suffisamment selon le temps d'extraction pour provoquer un changement significatif du coefficient dn/dc . L'application de ce dernier, d'une valeur de 0,1283 permet donc d'utiliser la variation de l'indice de réfraction pour suivre l'évolution de la matière sèche du milieu avec le temps. Cette valeur est plus basse que celles trouvées dans la littérature pour des polysaccharides communs et se retrouve assez proche de celle de la pectine de betterave (Tableau 3-2). Si le mucilage récupéré n'était pas composé entièrement de produits solubles, le coefficient pourrait être sous-estimé, la matière sèche soluble étant inférieure à celle mesurée. Cependant, il est plus probable que cette valeur reflète une composition particulière des polysaccharides extraits. Notons justement une étude effectuée avec une contribution de groupes pour la prédiction des indices de réfraction des composés organiques qui donne, par exemple, une contribution très faible des groupements acides à l'indice de réfraction (Gharagheizi *et al.*, 2014).

L'observation de l'évolution de la matière sèche avec le temps peut permettre d'établir un modèle cinétique. L'extraction du mucilage de lin avec des ultrasons d'une plus forte puissance volumique suivait un modèle d'ordre 2 dans les 30 premières minutes d'extraction (Fabre *et al.*, 2015b). En suivant un tel modèle, il est possible d'écrire la relation suivante :

$$\frac{dC}{dt} = k(C_{eq} - C)^2$$

Avec k : constante d'extraction du second ordre ($m^3 \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$) ; C : concentration en matière sèche (kg/m^3) et C_{eq} : concentration en matière sèche à l'équilibre. L'ensemble se simplifie comme (Peleg, 1988):

$$\frac{t}{C} = A + B \cdot t$$

$$\text{Avec } A = \frac{1}{k \cdot C_{eq}^2} \text{ et } B = \frac{1}{C_{eq}}$$

L'évolution semble connaître un ralentissement vers 40-50 minutes avec, ensuite, une nouvelle accélération. Si t/C est tracé en fonction de t (de 0 à 50 minutes), un coefficient de détermination de $R^2=0,990$ est obtenu. Ainsi, $k=0,0063 \text{ m}^3.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ et $C_{\text{eq}}=9,84 \text{ g/L}$. L'exemple du lin concernait une extraction à 5% de graines alors qu'ici, 10% de graines sont utilisées, ce qui explique une concentration à l'équilibre plus élevée (9,84g/L contre 5,3g/L pour le lin). Cependant, la plus faible puissance ultrasonore mise en jeu dans la colonne à ultrasons par rapport à une sonde pourrait expliquer un coefficient plus faible (0,0063 contre 0,031 $\text{m}^3.\text{kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

pH

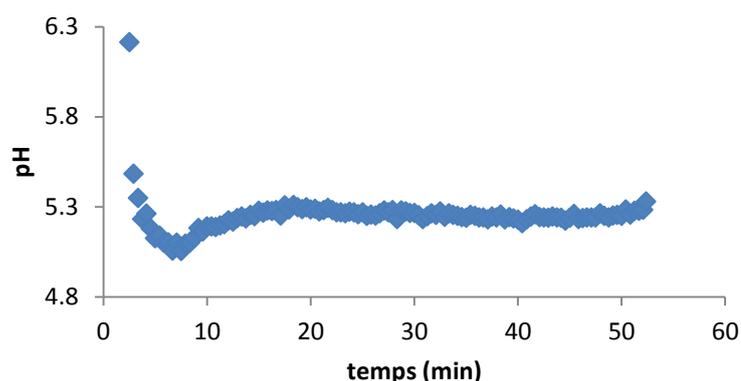
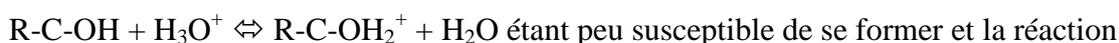


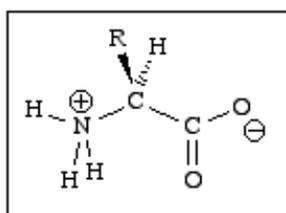
Figure 3-12. Evolution du pH avec le temps lors de la démucilagination de graines de caméline selon la Figure 3-6b

Avec la sonde pH directement immergée dans le réacteur, il est possible de mesurer le pH à des temps courts. Partant d'eau distillée, l'hydratation des graines provoque une rapide chute du pH indiquant une rapide augmentation de la concentration d'espèces acides dans le milieu. Cependant, le pH remonte ensuite assez rapidement et va peu à peu se stabiliser, profitant certainement de l'effet tampon des protéines et polysaccharides neutres qui sont de plus en plus extraits (Figure 3-12). Si les pKa de différents monosaccharides sont consultés, il apparaît que les acides uroniques présents dans les polysaccharides acides peuvent expliquer cette baisse de pH. Ces derniers sont susceptibles de s'extraire en premier, comme pour le lin (Fabre *et al.*, 2015b). La remontée bien plus lente du pH implique l'ajout continu d'espèces légèrement accepteuses de protons. Les monosaccharides constituant les polysaccharides neutres ne possèdent, dans leur forme cyclique, que des fonctions alcools et éthers peu ionisables et peu susceptibles d'accepter des protons, la réaction



$\text{R-C-O}^- + \text{H}_3\text{O}^+ \rightleftharpoons \text{R-C-OH} + \text{H}_2\text{O}$ étant très peu favorisée du fait de la faible quantité de groupes R-C-O^- à des pHs sensiblement inférieurs aux pKas correspondants (**Tableau 3-3**). Les polysaccharides peuvent former des liaisons hydrogènes à partir des fonctions alcools qui peuvent

modifier la force de la liaison OH et contribuer ainsi à un caractère plus basique (au sens de Brönsted) des polysaccharides. Cependant, l'extraction des protéines est bien plus susceptible de mettre en solution des composés ionisés pouvant exercer un caractère basique. Un pH compris entre 5 et 6 se situe bien au-dessus du pKa des couples COOH/COO⁻ des principaux acides aminés constitutifs des protéines et en dessous du pKa des couples NH₃⁺/NH₂ (Tableau 3-4). Ainsi, les protéines sont majoritairement de la forme :



Cependant, si le pH est proche des points isoélectriques des protéines (Tableau 3-5), il reste cependant supérieur à ce dernier, notamment en ce qui concerne la caméline. Ainsi, les protéines extraites à ce pH sont principalement chargées négativement avec une prédominance de groupements carboxylates sur les groupements amines protonés. Elles peuvent donc exercer une légère action basique pouvant expliquer la remontée du pH. Ensuite, selon la nature des protéines extraites (plus ou moins basiques selon la teneur et les expositions relatives des acides aminés plus basiques : arginine, lysine et plus acides : acide aspartique, thréonine, sérine), le pH peut varier à nouveau. Ainsi, d'après la Figure 3-12, l'hydratation des graines provoque tout d'abord l'extraction de polysaccharides acides, celle-ci étant ensuite contrebalancée par l'extraction de protéines au comportement majoritairement basique. Un équilibre se ferait ensuite lentement entre polysaccharides acides et protéines.

Tableau 3-3. pKa de quelques monosaccharides

Monosaccharides acides	pKa (COOH/COO ⁻)
Acide galacturonique	3,48 (Bhattacharyya et Rohrer, 2012)
Acide glucuronique	3,20 (Bhattacharyya et Rohrer, 2012)
Monosaccharides neutres	pKa (OH/O ⁻)
Galactose	12,39 (Bhattacharyya et Rohrer, 2012)
Glucose	12,28 (Bhattacharyya et Rohrer, 2012)
Xylose	12,15 (Bhattacharyya et Rohrer, 2012)
Mannose	12,08 (Bhattacharyya et Rohrer, 2012)
Fructose	12,03 (Bhattacharyya et Rohrer, 2012)

Tableau 3-4. Valeurs des pKa et des pI des principaux acides aminés des protéines végétales

Espèces	pKa COOH/COO ⁻	pKa NH ₃ ⁺ /NH ₂	pKa Chaîne latérale	pI (David R. Lide, 2005b)
Acide aspartique	1,95	9,66	3,71	2,77
Acide glutamique	2,16	9,58	4,15	3,22
Alanine	2,33	9,71		6,00
Arginine	2,03	9,00	12,10	10,76
Cystéine	1,91	10,28	8,14	5,07
Glycine	2,34	9,58		5,97
Histidine	1,70	9,09	6,04	7,59
Isoleucine	2,26	9,60		6,02
Leucine	2,32	9,74		5,98
Lysine	2,15	9,16	10,67	9,74
Méthionine	2,16	9,08		5,74
Phénylalanine	2,18	9,09		5,48
Proline	1,95	10,47		6,30
Serine	2,13	9,05		5,68
Thréonine	2,20	8,96		5,60
Tyrosine	2,24	9,04	10,10	5,66
Valine	2,27	9,52		5,96

Tableau 3-5. Points isoélectriques de différentes protéines

Espèces	pI
Concentrat de protéines de colza	6,3 (Von Der Haar <i>et al.</i> , 2014)
Protéines de soja	4,6 (Jaramillo <i>et al.</i> , 2011)
Protéines de tournesol	4,3 (Yust <i>et al.</i> , 2003)
Protéines de lin	4,5 (Oomah et Mazza, 1993)
Protéines de chia	3,0 (Timilsena <i>et al.</i> , 2016a)
Protéines de caméline	4,5 (Sarv, 2017)
Fraction albumine de caméline	2,5-3 (minimum de solubilité) (Li <i>et al.</i> , 2014)
Fraction glutéline de caméline	4-5 (minimum de solubilité) (Li <i>et al.</i> , 2014)
Fraction globuline de caméline	2-4 (minimum de solubilité) (Li <i>et al.</i> , 2014)

Conductivité

La conductivité est directement reliée à la nature et la concentration des espèces ioniques en solution. Elle s'exprime comme :

$$\chi = \sum_i c_i \cdot z_i \cdot \mu_i \cdot F$$

Avec χ : la conductivité (exprimée en $S.m^{-1}$ ou $\Omega^{-1}.m^{-1}$, c_i : concentration de l'espèce i ($mol.m^{-3}$), z_i : nombre de charges de l'espèce i et μ_i : mobilité ionique ($m^2.s^{-1}.V^{-1}$), F est la constante de Faraday ($96485 C/mol$ ou $A.s.mol^{-1}$). La mobilité ionique peut s'exprimer comme $\mu = ez / (6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r)$ où r est le rayon ionique et η la viscosité du milieu. Ainsi la mobilité sera d'autant plus importante qu'un ion aura un faible rayon, sera dans un milieu peu visqueux et sera chargé.

Tableau 3-6. Mobilités ioniques de différentes espèces

Espèce	Mobilité ionique ($10^{-8}.m^2.s^{-1}.V^{-1}$) à dilution infinie
Proton (H^+)	36,23 (Atkins et De Paula, 2010)
Hydroxyde (OH^-)	20,64 (Atkins et De Paula, 2010)
Potassium (K^+)	7,62 (Atkins et De Paula, 2010)
Ammonium (NH_4^+)	7,60 (Harned et Owen, 1963)
Sodium (Na^+)	5,19 (Atkins et De Paula, 2010)
Chlorure (Cl^-)	7,92 (Atkins et De Paula, 2010)
Fluorure (F^-)	5,70 (Harned et Owen, 1963)
Iodure (I^-)	7,95 (Harned et Owen, 1963)
Sulfate	8,29 (Atkins et De Paula, 2010)
Magnésium (Mg^{2+})	5,50 (Barry et Lynch, 1991)
Bromure (Br^-)	8,13 (Harned et Owen, 1963)
Soufre (SO_4^{2-})	8,25 (Harned et Owen, 1963)
Calcium (Ca^{2+})	6,16 (Harned et Owen, 1963)
Zinc (Zn^{2+})	5,47 (Atkins et De Paula, 2010)
Carbonate (CO_3^{2-})	7,46 (Harned et Owen, 1963)
Hydrogénocarbonate (HCO_3^-)	4,61 (Harned et Owen, 1963)
Dihydrogénophosphate ($H_2PO_4^-$)	3,43 (Dean et Lange, 1999)
Hydrogénophosphate (HPO_4^{2-})	2,97 (Dean et Lange, 1999)

Ainsi, la conductivité ne dépendra que très peu de la mobilité de macromolécules comme les protéines mais beaucoup plus fortement des acides aminés libres, des minéraux présents, des hydroxydes (OH^-) et des protons H^+ . La concentration de ces derniers peut être directement déduite du pH. Les mobilités présentées dans le Tableau 3-6, mises à part celles des protons et hydroxydes sont toutes dans le même ordre de grandeur. Ainsi, les valeurs de conductivité mesurées permettent d'évaluer l'évolution de la concentration des espèces minérales en solution. La géométrie de la sonde de conductivité, avec une sonde de température incorporée, impose une immersion importante du milieu. De même, les graines de caméline peuvent se retrouver coincées au sein de la cellule, perturbant les mesures. Il n'est ainsi pas toujours évident d'avoir une mesure fiable de ce paramètre. Plusieurs remarques peuvent cependant être faites après la consultation des résultats des mesures (Figure 3-13). Au cours des deux minutes de pré-agitation du milieu, la température n'augmente pas car les ultrasons ne sont pas encore activés mais la conductivité augmente rapidement jusqu'à $500\mu\text{S}/\text{cm}$ après 2 minutes. Cela montre une conductivité déjà importante du milieu, une part importante des minéraux ayant déjà été extraite avec une concentration ionique qui peut être grossièrement estimée autour de $0,005\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Cette conductivité évoluera jusqu'à se stabiliser autour de $850\mu\text{S}/\text{cm}$ malgré l'augmentation de température. A partir de 40 minutes d'extraction, la conductivité va à nouveau augmenter rapidement jusqu'à doubler de valeur, alors que le pH reste stable. Ce profil semble suivre celui de l'indice de réfraction (Figure 3-10) et de la matière sèche.

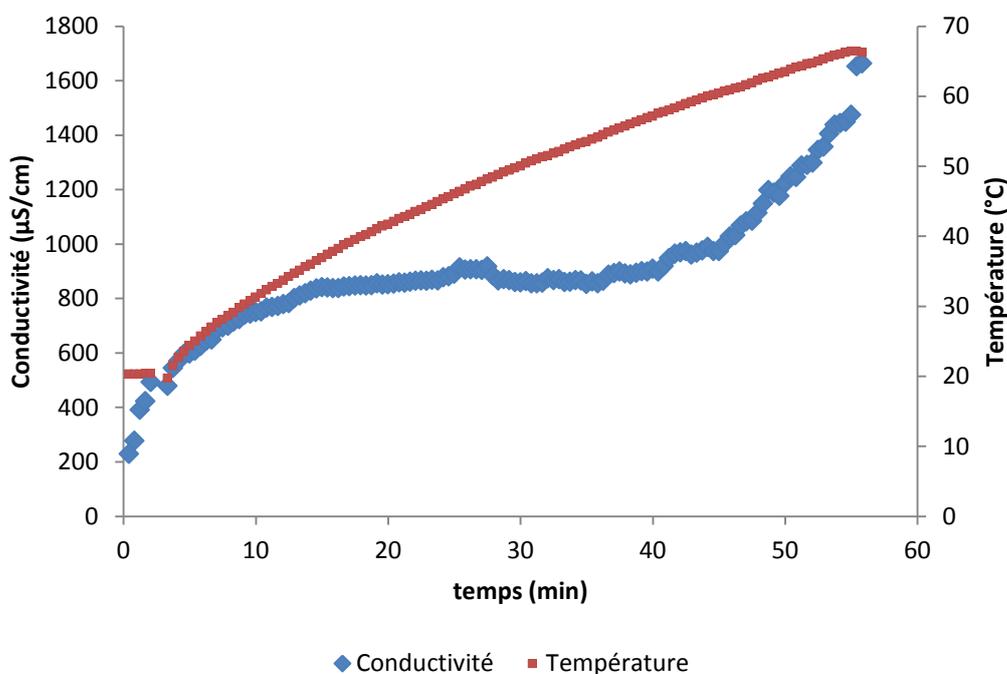


Figure 3-13. Mesure de la conductivité du milieu au cours de l'extraction du mucilage de graines de Caméline

3.3.ii. Agitation avec moteur, mesure déportée

Dans ce cas, les sondes de pH-métrie et de conductivité sont placées dans une cellule de circulation de façon à être protégées des turbulences de l'agitation du moteur et des ultrasons. Ainsi, selon la Figure 3-6c, une pompe permet d'amener le milieu au sein de la cellule de circulation et du réfractomètre. Au débit maximal de la pompe, le contenu de la cellule est renouvelé en moins de 10 secondes tandis qu'à peine plus d'une seconde sont nécessaires pour terminer la boucle alimentant le réfractomètre. Cependant, ce débit entraîne un effet de cisaillement supplémentaire sur les graines, celui-ci s'exerçant d'autant plus fortement que des différences de vitesse se retrouvent dans des couches adjacentes du flux. Dans un écoulement laminaire de Poiseuille, si on considère ce dernier hautement cisailant, lorsque les graines sont pompées au sein de passages de diamètres proches de la section transversale des graines, ces différences peuvent devenir importantes (Figure 3-14).

$\sigma = \eta \frac{dv}{dz}$ relie la contrainte visqueuse à la viscosité du milieu et la différence de vitesse v entre deux couches séparées d'une distance z .

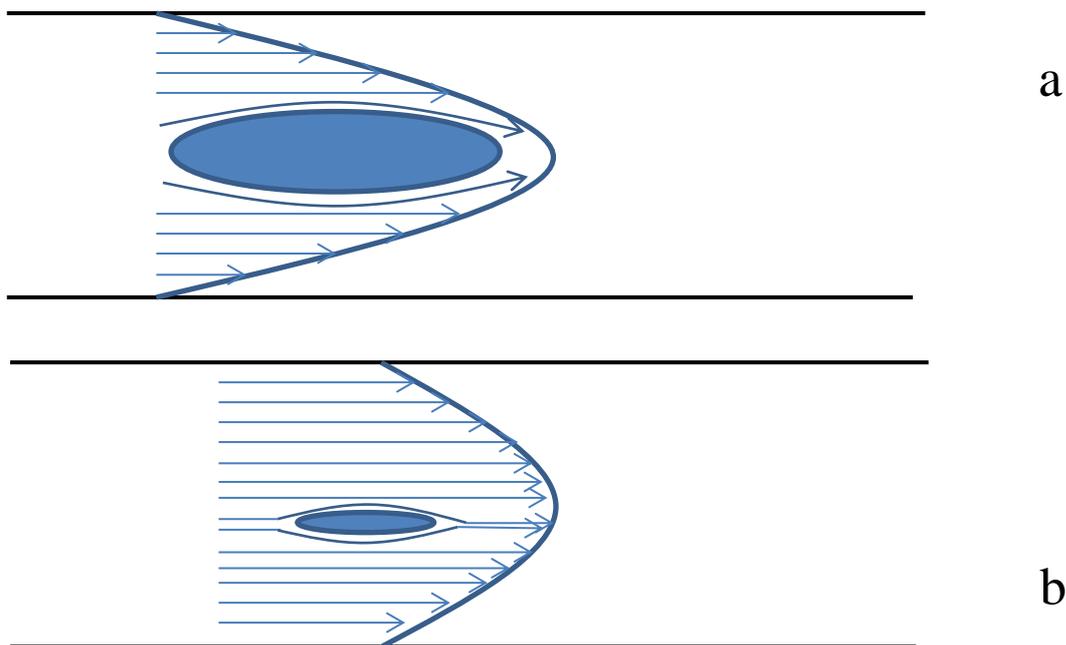


Figure 3-14. Représentation possible du gradient de vitesse de l'écoulement laminaire dans a : un tuyau de diamètre légèrement supérieur à la taille d'une graine b : un tuyau d'un diamètre largement supérieur à la taille d'une graine

Le diamètre des ouvertures de la pompe de circulation est à peine supérieur à la section d'une graine de caméline. A mesure que la graine est hydratée, sa taille augmente mais le mucilage peut permettre une lubrification de sa surface. Lorsqu'elle est démucilaginée, ce phénomène disparaît et la graine peut de plus s'agréger à d'autres graines, bloquant ainsi la pompe. Ce blocage

intervient autour de 20 minutes de fonctionnement. Au vu du débit de la pompe, en 20 minutes de traitement, les 3,3L de milieu seront passés environ 4 fois dans le système d'analyse. Ainsi, dans le but d'avoir un système d'analyse le plus neutre possible par rapport au système de traitement, une comparaison peut être effectuée entre le rendement obtenu dans le système de mesure *in situ* et le système de mesure déporté pour déterminer si les forces de cisaillement exercées par le système déporté ont une influence significative. La Figure 3-15 montre que l'extraction du mucilage suit des évolutions similaires au cours du temps d'analyse selon que le système soit additionné d'une boucle de dérivation ou pas. Cependant, des temps plus longs pourraient peut-être augmenter le rendement. Si ce système de pompe ne peut être utilisé pour la graine de caméline, il pourrait être adapté à des graines plus fines, comme les graines de Chia.

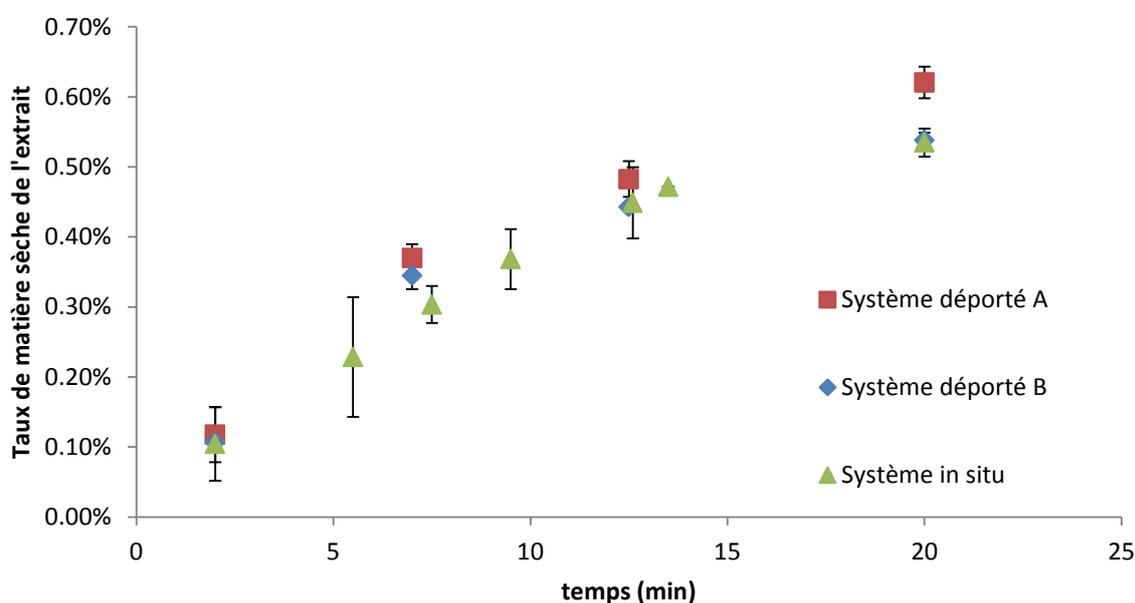


Figure 3-15. Comparaison des matières sèches des extraits aqueux selon le système d'analyse utilisé lors du procédé

3.3.iii. Agitation avec une pompe en mode de recirculation

Au vu du chapitre précédent, il apparaît qu'un fort débit de circulation des graines pourrait exercer sur ces dernières des contraintes suffisantes pour provoquer une démulcination au cours du temps. Dans le but de comparer l'efficacité de la cavitation ultrasonore avec les différentes forces exercées sur les particules par un écoulement laminaire ou localement turbulent, une pompe à haut débit, de 6m^3 par heure, a été utilisée. Elle permet au contenu de la colonne et de la boucle de circulation (volume totale de 6L) d'être renouvelé en moins de 6 secondes, ce qui empêche les graines de sédimenter.

Ainsi, plusieurs essais de différentes durées ont été réalisés, toujours avec une concentration en graines de 10% (m/m), cela avec des amplitudes et pulsations différentes des ultrasons. Un plan

d'expérience est réalisé pour essayer de discriminer l'influence respective de la cavitation ultrasonore et du cisaillement par écoulement dans l'extraction du mucilage de caméline (Tableau 3-7). Certains paramètres, au vu de l'installation, sont invariables :

- Le débit de la pompe à recirculation
- Le volume de la canalisation

De même, la température résultant de l'agitation du milieu et de l'action des ultrasons n'est pas directement contrôlable. Les paramètres techniques modifiables sont :

- Le temps de traitement
- L'amplitude des ultrasons
- La pulsation des ultrasons

L'influence du temps de traitement sera évaluée sur 1 heure, l'amplitude des ultrasons sera évaluée de 10% à 70% de l'amplitude maximale et la pulsation ($p=t_{\text{off}}/t_{\text{on}}$) des ultrasons sera évaluée de $p=2$ à $p=6$ (avec $t_{\text{on}} = 5$ secondes).

Tableau 3-7. Différentes expériences de démulagination en mode de recirculation selon un plan de Doehlert

EXP.	Temps (min)	Amplitude (%)	$T_{\text{off}}/$ T_{on}	Temps Valeur codée X1	Amplitude Valeur codée X2	$T_{\text{off}}/T_{\text{on}}$ Valeur codée X3
1	55	40	4	1	0	0
2	5	40	4	-1	0	0
3	42,5	70,3	4	0.5	0.866	0
4	17,5	9,7	4	-0.5	-0.866	0
5	42,5	9,7	4	0.5	-0.866	0
6	17,5	70,3	4	-0.5	0.866	0
7	42,5	50,1	6	0.5	0.288	0.817
8	17,5	29,9	2	-0.5	-0.288	-0.817
9	42,5	29,9	2	0.5	-0.288	-0.817
10	30	60,2	2	0	0.577	-0.817
11	17,5	50,1	6	-0.5	0.288	0.817
12	30	19,8	6	0	-0.577	0.817
13	30	40	4	0	0	0
14	30	40	4	0	0	0
15	30	40	4	0	0	0

Température du milieu

La première observation est l'augmentation de la température résultant de l'agitation du milieu dans les différents cas (Figure 3-16). Les ultrasons exercent une augmentation de température par création de points chauds et cisaillement tandis que la pompe exerce un échauffement dû principalement à la dissipation, par frottements, de l'énergie mécanique du fluide entraîné par la pompe.

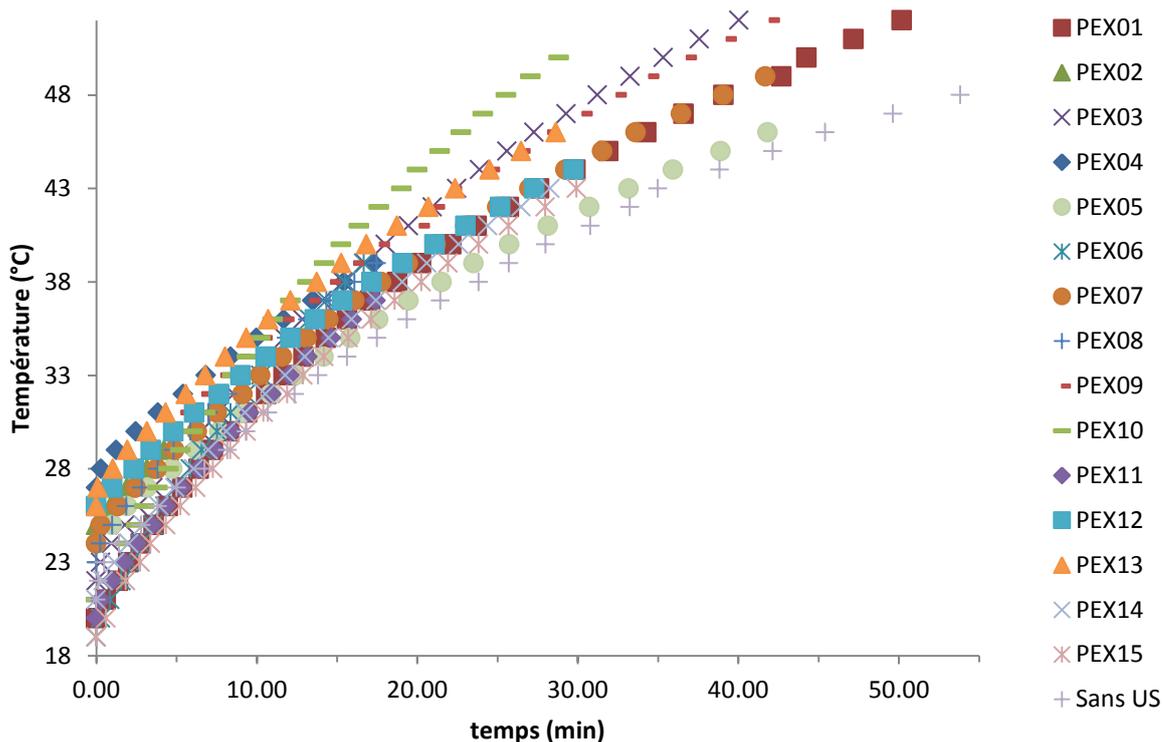


Figure 3-16. Evolution de la température du milieu avec le temps d'extraction

L'augmentation de la température suit une loi polynomiale d'ordre 2. Sans ultrasons (essai additionnel), la température augmente quand même jusqu'à environ 50°C au bout de 55 minutes, même si l'effet est légèrement moindre. Même si les températures initiales ne sont pas identiques pour toutes les expériences, ces résultats indiquent une forte contribution du mouvement de recirculation sur l'augmentation de la température.

Rendement d'extraction (matière sèche extraite sur matière sèche des graines)

Si les rendements des différentes expériences sont comparés (Figure 3-17), il apparaît tout de suite un résultat très différent entre les expériences 1 et 2, une équivalence entre les expériences 10 et 12 à 15 et entre les expériences 4, 6, 8 et 11. Cela correspond aux différents temps de traitement. En reportant ce rendement d'extraction par rapport au temps de traitement, la courbe

suivante (Figure 3-18) peut être obtenue. L'évolution du rendement selon le temps d'extraction peut être modélisée par une régression linéaire avec un coefficient de détermination important. Ainsi, 30 minutes de traitement du milieu sans ultrasons (premier point orange) permettent une extraction du mucilage peu différente de celle obtenue avec. Pour des temps de traitement plus longs (55 minutes), cependant, l'action des ultrasons semble permettre un rendement significativement supérieur.

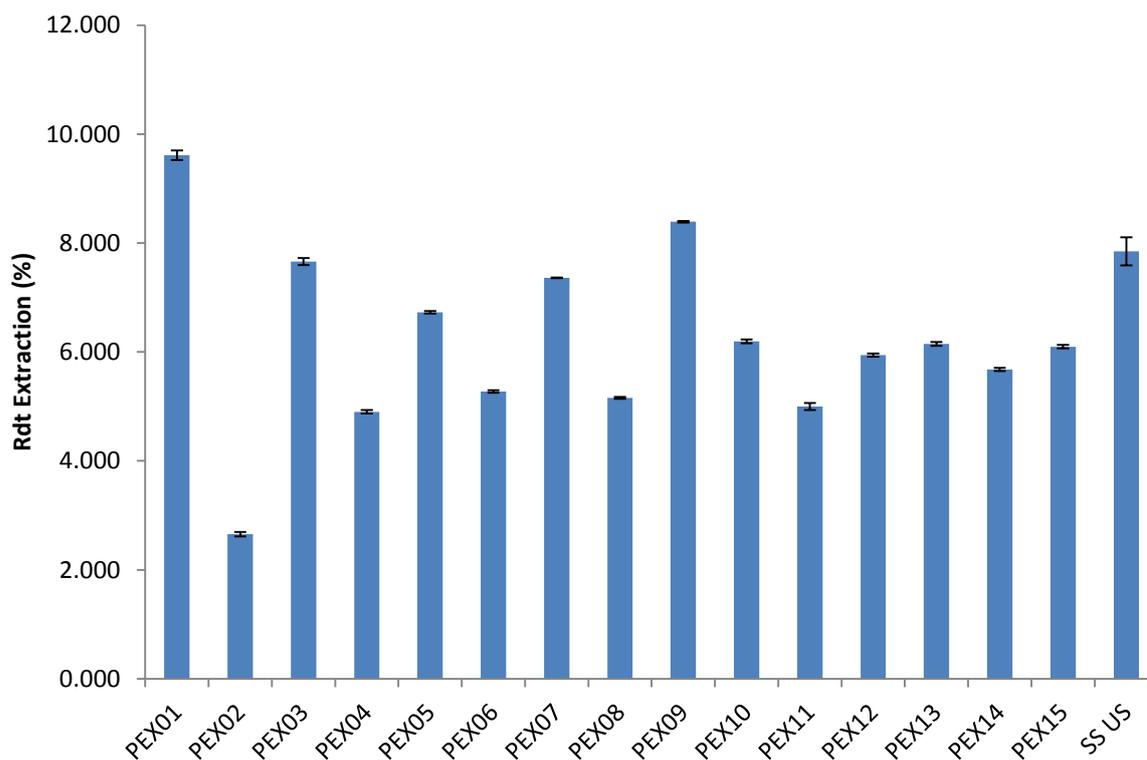


Figure 3-17. Rendements d'extraction des différentes expériences effectuées

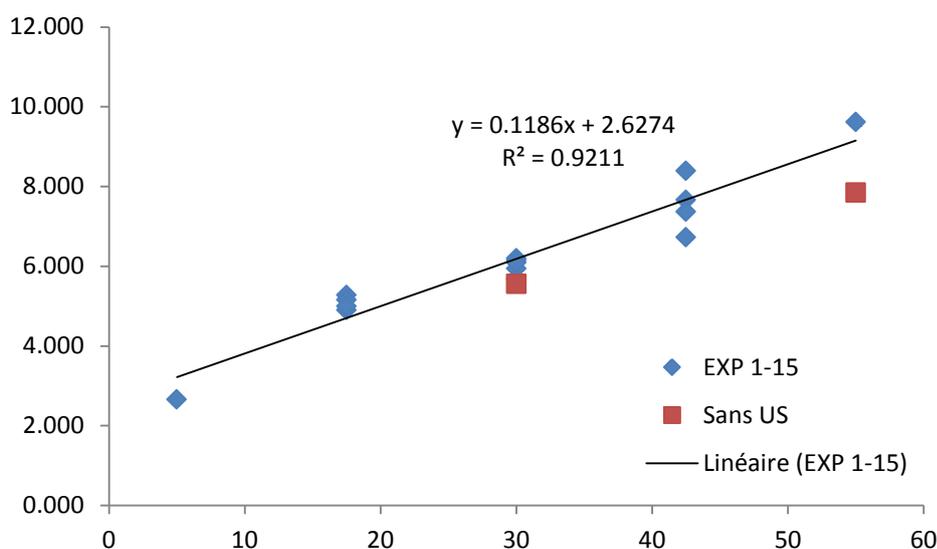


Figure 3-18. Evolution du rendement d'extraction selon le temps d'extraction

La réponse du rendement d'extraction peut être correctement décrite selon le plan d'expériences avec l'équation suivante :

$$Y=5,977+2,966t+0,232A-0,294P+0,153t^2+0,167A^2+0,465p^2+0,323tA-0,647tP+0,588Ap$$

L'analyse de la variance du modèle indique une faible probabilité que celui-ci ne décrive pas correctement les valeurs expérimentales ($P_1 = 0,667$). Ainsi, la régression est significative et l'équation ci-dessus peut être utilisée. La comparaison des expériences répétées montre une erreur expérimentale qui ne permet pas d'englober totalement les différences trouvées entre le modèle et l'expérience (Validité de $P_2=11,7$). Ainsi, l'équation est plus descriptive que prédictive.

Les coefficients les plus significatifs sont :

- le coefficient d'intersection : 5,977 avec une valeur hautement significative ($P<0,01\%$),
- le premier coefficient du premier ordre sur le temps de traitement : 2,966 ($P<0,0151\%$).

Tous les autres coefficients sont non significatifs selon l'analyse statistique (voir détails en ANNEXE 15). Enfin, la courbe d'isoreponse selon l'amplitude et le temps d'extraction (pulsation fixée) montre également une évolution quasi-exclusivement basée sur le temps d'extraction (Figure 3-19).

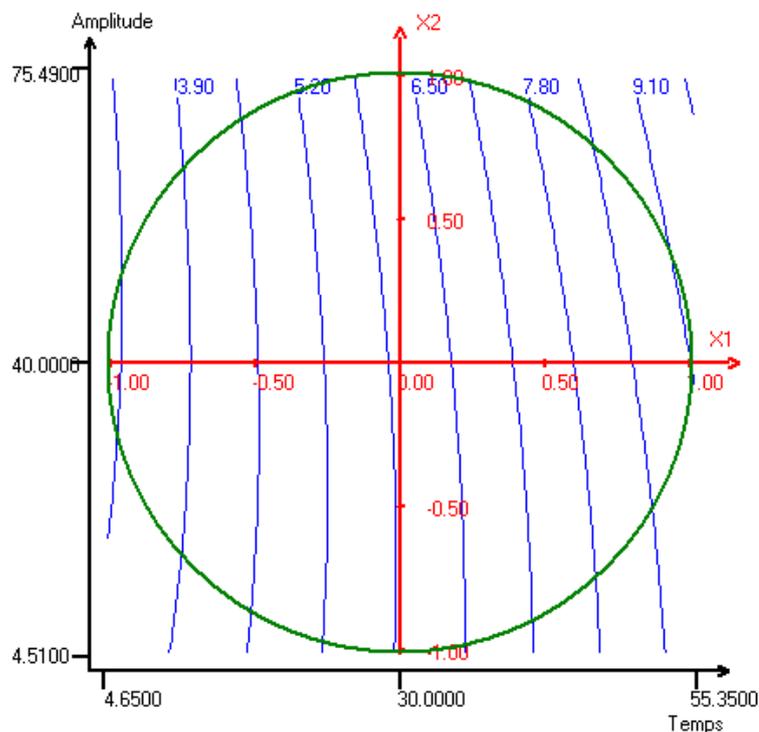


Figure 3-19. Courbe d'isoreponse du rendement d'extraction du mucilage selon le temps d'extraction et l'amplitude des ultrasons.

Ainsi, malgré les fortes différences d'amplitude et de pulsation des ultrasons entre les différentes expériences, le rendement est principalement déterminé par le temps d'extraction.

Teneur en protéines équivalent BSA

Le taux de protéines équivalent BSA donne une idée de la composition en protéines en effectuant un dosage spectrophotométrique calibré sur la réponse d'albumine de sérum bovin (BSA). C'est donc d'abord une mesure de la quantité de protéines hydrosolubles du milieu. Dans le cas du mucilage, cette valeur devrait être proche de la valeur réelle et peut être utilisée à des fins comparatives (Figure 3-20).

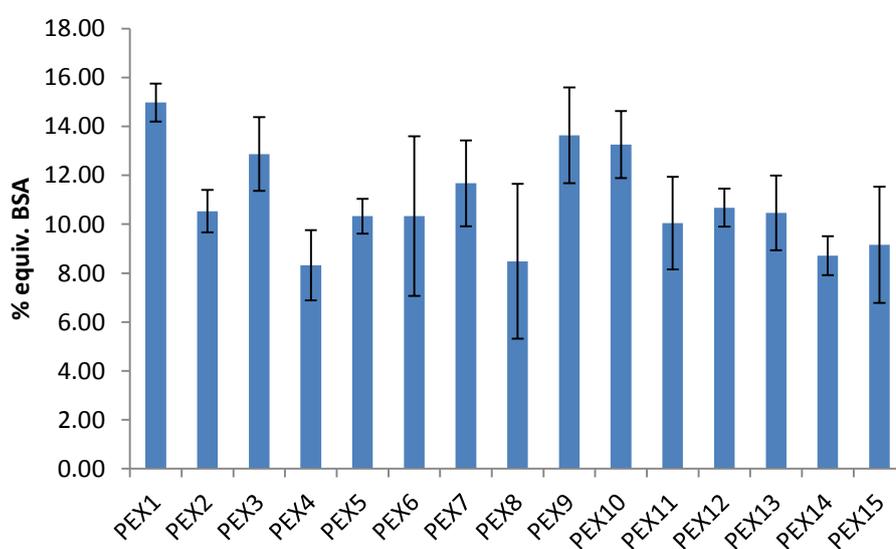


Figure 3-20. Comparaison des teneurs en protéines telles qu'estimées par un dosage des protéines selon la méthode de Lowry.

Si la teneur en protéines équivalentes BSA est analysée de façon statistique, le plan est valide selon la régression avec un paramètre $P_1=0,815\%$. L'équation suivante peut ainsi être écrite :

$$Y=9,447+2,526t+1,329A-0,608P+3,303t^2+0,253A^2+1,881P^2+0,306tA-2,276tP-2,492Ap$$

Les coefficients significatifs concernent les trois paramètres avec le coefficient d'intersection 9,447 (<0,01%), le premier coefficient du premier ordre 2,526 (0,0972%), le deuxième coefficient du premier ordre 1,329 (1.5%), le premier coefficient du second ordre 3,303 (0,428%), le troisième coefficient du second ordre 1,881(3,11%) et le troisième coefficient d'interaction -2,492 (4,59%). La courbe d'isoréponse (Figure 3-21) indique une influence de l'amplitude prédominante aux temps d'extraction courts qui devient ensuite de moins en moins importante. Cette forte influence semble contredire les résultats observés sur le rendement d'extraction global. Cependant, une forte amplitude ultrasonore, par une action hydrolysante des longues chaînes

polymériques, peut permettre de favoriser la solubilisation des extraits protéiques et donc d'augmenter la teneur en protéines hydrosolubles.

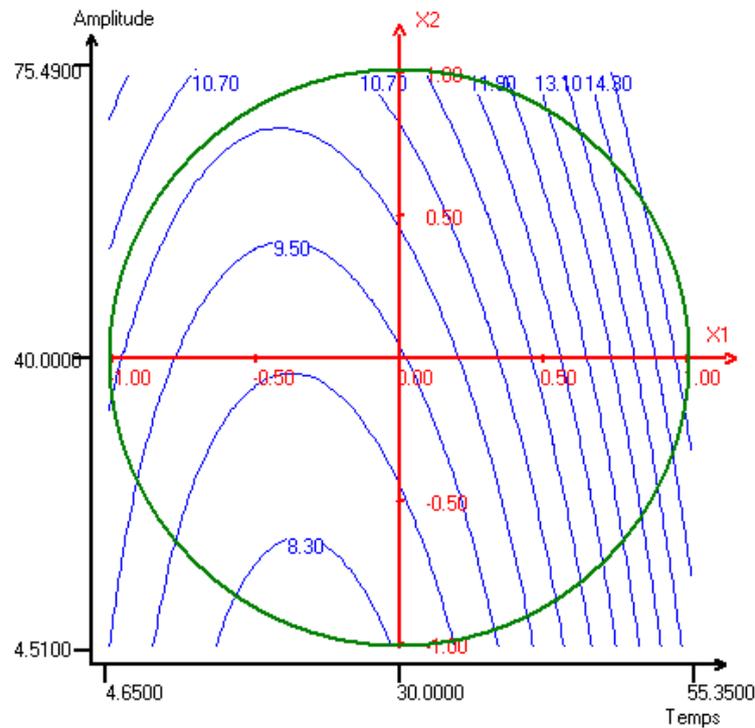


Figure 3-21. Courbe d'isoréponse de la teneur en protéines équivalent BSA selon le temps d'extraction et l'amplitude des ultrasons.

Comportement rhéologique à 1% de dilution.

A 1% de dilution dans l'eau, le mucilage est soumis à des tests rhéologiques en mode rotationnel et oscillatoire. D'après les courbes d'écoulement obtenues en mode rotationnel (Figure 3-22), il apparaît que l'ensemble des échantillons répond à un comportement non newtonien, rhéofluidifiant. Plusieurs modèles rhéologiques permettent de rendre compte du comportement observé avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,99. Dans ces derniers, le plus simple est celui de Sisko avec un coefficient de détermination moyen supérieur à 0,999 :

$$\sigma = a \cdot \dot{\gamma} + b \cdot \dot{\gamma}^p \text{ avec}$$

σ : contrainte (mPa.s), $\dot{\gamma}$: gradient de cisaillement (s^{-1}), a, b, p : constantes

Sur la Figure 3-22, sont annotées les courbes correspondant au temps de traitement le plus court (PEX2), le plus long (PEX1), le moins sujet aux ultrasons (PEX 4) et le plus sujet à ces derniers (PEX10). Le mucilage correspondant au temps de traitement le plus long est celui de plus

faible viscosité mais c'est celui le moins sujet aux ultrasons qui a la viscosité la plus importante, malgré une durée de traitement supérieure au PEX2. Ainsi, il est clair qu'à la fois les ultrasons et le temps de traitement ont une influence sur la viscosité du milieu. Si la viscosité mesurée à un gradient de cisaillement de $50s^{-1}$ est analysée comme réponse, il est possible de la modéliser par l'équation suivante :

$$Y=78,270-41,914t-10,585A+1,445p-5,045t^2+54,288A^2-5,828p^2-12,373tA+5,673tp+30,298Ap$$

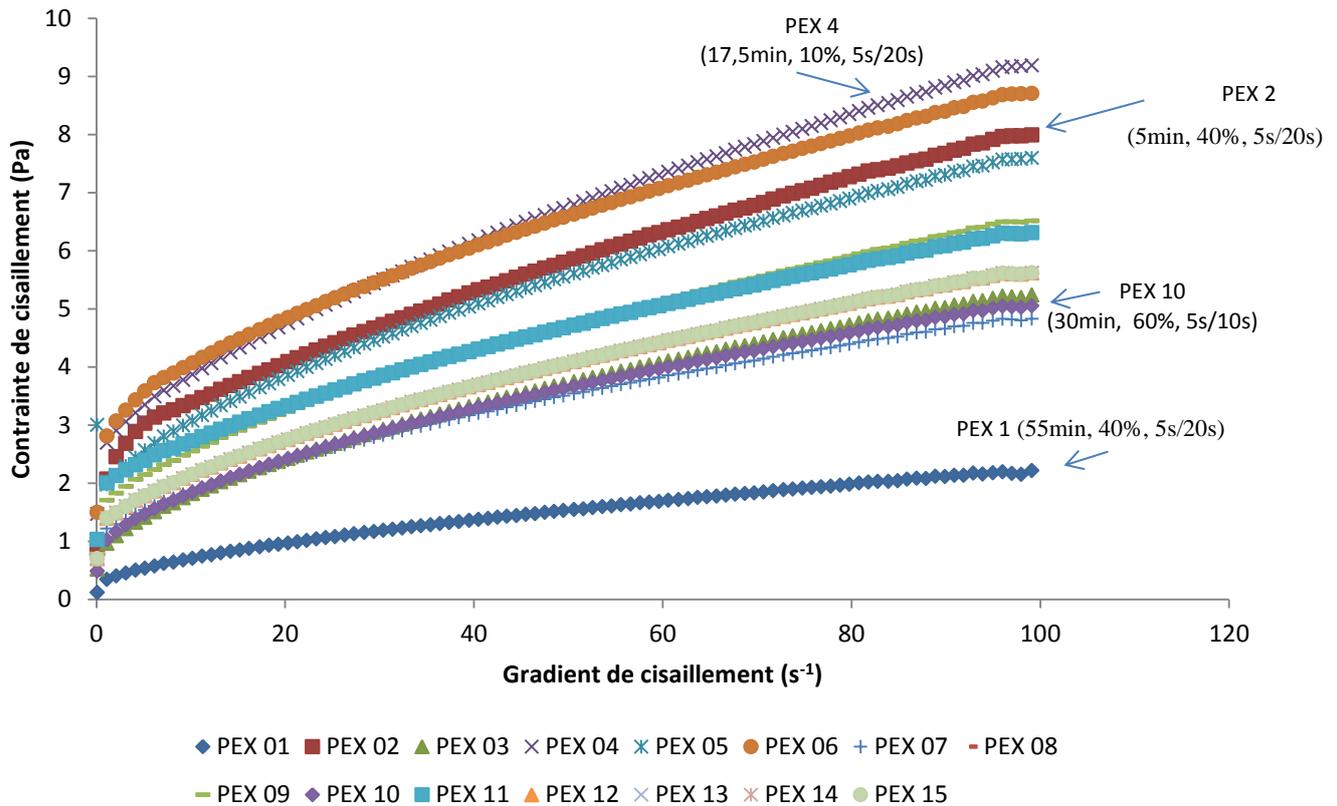


Figure 3-22. Courbes d'écoulement des différents mucilages à une concentration de 0,1%

Le plan est alors descriptif selon la régression avec un facteur de significativité de $P_1 = 1,71$ mais aussi prédictif avec une validité de $P_2=79,2$ (des points tests devraient cependant être effectués pour s'en assurer). Les coefficients les plus significatifs sont le coefficient d'intersection 78,270 (0,0137%), le coefficient du premier ordre -41,914 (0,131%) et le deuxième coefficient du second ordre 54,288 (0,588%). Ainsi, la viscosité mesurée à un gradient de cisaillement de $50s^{-1}$ dépend du temps d'extraction mais aussi de l'amplitude. L'effet au deuxième degré de ce paramètre indique qu'à la fois une basse et une forte amplitude ultrasonore induisent une augmentation de la viscosité du mucilage (Figure 3-23), ce comportement étant d'autant plus remarquable aux temps d'extraction courts. La dichotomie de cette influence pourrait provenir de l'action à la fois

hydrolysante et solubilisante des ultrasons. Concernant le caractère visco-élastique du mucilage, un balayage en amplitude de déformation, à une fréquence de 1 Hz, montre un comportement à dominante élastique jusqu'à 30 à 90% de déformation, indiquant la bonne stabilité de la solution mucilagineuse. Cependant, ce pourcentage limite n'est corrélable à aucun des paramètres expérimentaux. Dans la zone d'amplitude où la dominante élastique reste linéaire (zone LVE), en se plaçant à 0,5% de déformation, un balayage en fréquence est réalisé de 0,01 à 100 Hz. Une chute du module élastique intervient à des fréquences à partir de 1Hz, certainement à cause de phénomènes de glissement du cône de la géométrie de mesure sur l'échantillon.

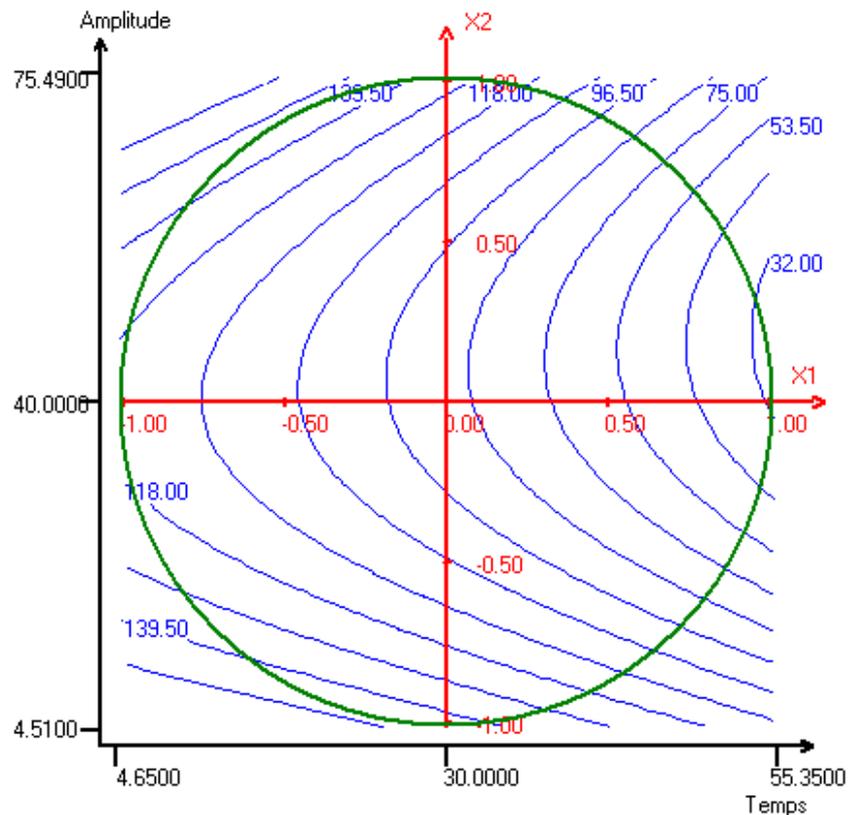


Figure 3-23. Courbe d'isoréponse de la viscosité mesurée à un gradient de cisaillement de $50s^{-1}$ selon l'amplitude des ultrasons et le temps d'extraction.

La valeur du facteur de perte (rapport du module visqueux G'' sur le module élastique G') dans la zone entre 0,01 et 1 Hz peut être modélisée selon l'équation suivante :

$$Y=0,447+0,067t+0,023A-0,014p+0,033t^2+0,027A^2-0,023p^2+0,058tA-0,045tp+0,033Ap$$

Le plan est alors valide avec un facteur de significativité de 1,23% et une validité de 85,8%. Les coefficients les plus significatifs sont le coefficient d'intersection 0,447 (<0,01%), et le premier coefficient du premier ordre 0,067 (0,078%). Ensuite, l'amplitude reste légèrement significative

(5,6%) de même que l'interaction temps et amplitude (4,4%). Aucun paramètre n'a un facteur de significativité supérieur à 30%. Ainsi, il apparaît que le temps de traitement plus que l'amplitude des ultrasons est responsable de la perte d'élasticité du milieu (**Figure 3-24**). Logiquement, la pulsation a une influence négative car plus elle est élevée, moins le milieu est soumis aux ultrasons donc perd moins en élasticité.

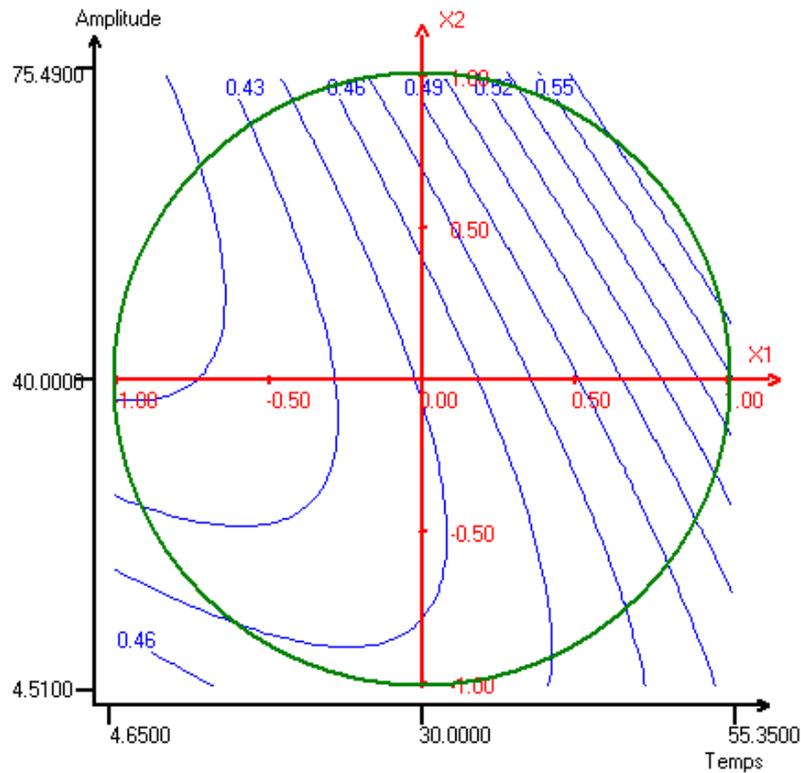


Figure 3-24. Courbe d'isoréponse du facteur de perte du mucilage entre 0,01 et 1Hz pour une déformation de 0,5% selon le temps d'extraction et l'amplitude ultrasonore.

Bilan du plan d'expériences

Selon les différentes réponses analysées, il apparaît que le temps de traitement, sous l'hydrodynamique du système de recirculation, a une influence prépondérante sur l'extraction du mucilage, l'application des ultrasons permettant cependant d'augmenter le rendement et la teneur en protéines hydrosolubles. En ce qui concerne la rhéologie du mucilage, les contraintes imposées par la recirculation semblent avoir une influence comparable à celle des ultrasons dans la gamme d'amplitude testée. Les deux contraintes permettent ainsi une déstructuration partielle des chaînes de polysaccharides. Dans les deux cas, ce sont des forces qui s'exercent à la surface des particules. Si l'augmentation de la température mesurée sans ultrasons indique que l'énergie globale fournie au système par la recirculation est d'une valeur comparable à celle fournie par les ultrasons, il est cependant nécessaire d'évaluer grossièrement les forces subies par les particules au sein de

l'écoulement. En effet, l'agitation du milieu par recirculation a des conséquences au niveau de l'augmentation de la température et du rendement d'extraction bien au-delà de ce qui se passe avec une agitation du milieu avec une pale d'agitation. Dans un premier temps, si le cisaillement et la cavitation au sein de la pompe utilisée (pompe centrifuge multicellulaire) ne sont pas pris en compte, il est possible de considérer que l'essentiel des forces exercées sur les particules dans l'écoulement dépend du nombre de Reynolds des particules (Re_p) et de l'écoulement (Re_L), ce dernier pouvant s'exprimer comme :

$$Re_L = \rho \frac{V\phi}{\eta}$$

Il dépend du diamètre du tuyau ϕ (m), de la vitesse du fluide V (m/s), de sa masse volumique ρ (kg/m³) et de sa viscosité dynamique η (Pa.s ou kg.m⁻¹.s⁻¹). En considérant la viscosité dynamique du milieu (voir ANNEXE 16), un diamètre des tuyaux de 28 mm et une vitesse de l'écoulement de 2,7m.s⁻¹, un nombre de Reynolds de l'écoulement compris entre 2000 et 6000 est obtenu. Ainsi, il reste à des valeurs importantes ($Re > 2000$) bien que largement inférieures à un écoulement d'eau dans les mêmes conditions ($Re > 75000$) du fait d'une viscosité toujours assez importante du milieu. Ainsi, le régime peut être considéré comme transitoire entre laminaire et turbulent et turbulent pour les cas extrêmes. Autour de la particule, le nombre de Reynolds particulaire s'écrit :

$Re_p = \rho \frac{U \cdot d_p}{\eta}$ où U est la différence de vitesse entre la particule et le fluide et d_p est une dimension caractéristique de la particule.

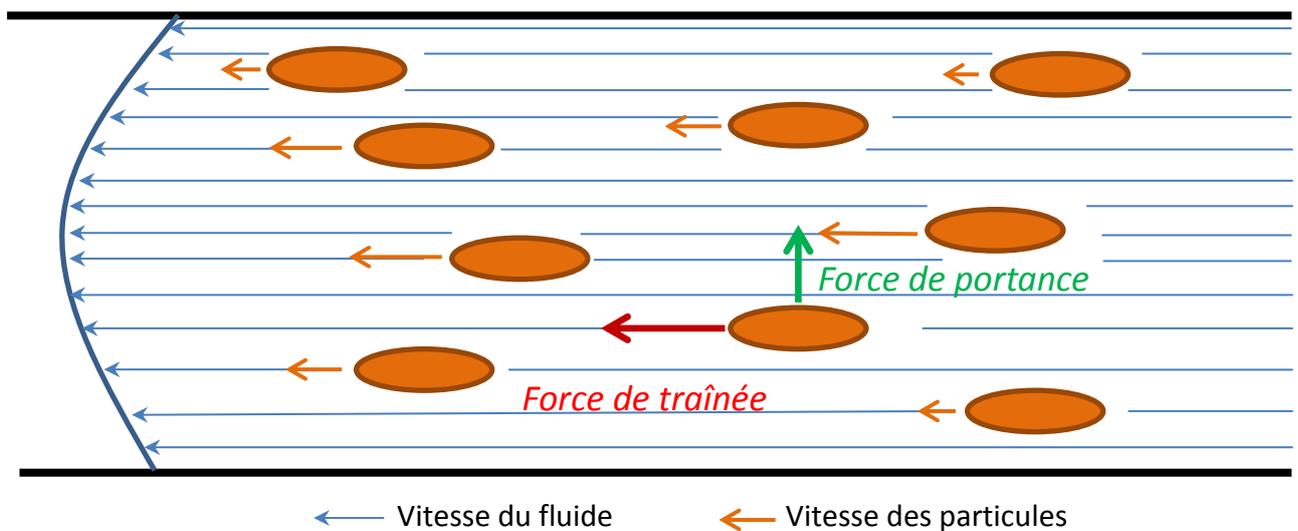


Figure 3-25. Représentation de l'écoulement du milieu d'extraction (graines + fluide rhéofluidifiant) en mode de recirculation.

Toujours selon la viscosité importante du milieu et la taille millimétrique des particules, ce nombre reste ici très inférieur à 1000. De nombreuses forces s'exercent sur une particule isolée dont bien évidemment la pesanteur mais aussi des forces de frottement visqueux, de portance, centrifuges... Les forces principales sont généralement la force de frottement ou de traînée qui est dirigée dans la direction de l'écoulement et la force de portance dirigée perpendiculairement à l'écoulement et qu'exerce le liquide sur la particule en translation (Figure 3-25). En ce qui concerne la force de traînée, elle s'écrit comme :

$$F_T = C_T \cdot \left(\frac{\rho \cdot U^2}{2} \right) \cdot S_p$$

Où C_T est le coefficient de traînée, et S_p est la section de la particule frontale à l'écoulement.

Le coefficient de traînée s'exprime différemment selon le type d'écoulement. Il peut être approximé, dans le cas d'un écoulement de Stokes ($Re_p < 1$) et en considérant le cas simple d'une sphère par :

$$C_T = \frac{24}{Re_p} \text{ et } F_T = 3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot U \cdot d_p$$

Et dans le cas d'un écoulement de Van Allen ($1 < Re_p < 1000$) par

$$C_T = \frac{18,5}{Re_p^{0,6}} \text{ et } F_T = 18,5 \rho^{0,4} \cdot U^{1,4} \cdot S_p^{0,4} \cdot \eta^{0,6}$$

La graine ayant plutôt une forme ellipsoïdale, il est possible d'utiliser un coefficient de traînée de $C_T = 0,3$ correspondant à une particule ellipsoïdale à nombre de Reynolds ($Re < 200000$) avec longueur sur diamètre = 2 (Çengel *et al.*, 2017). Il est délicat de connaître précisément la différence de vitesse entre la particule et le fluide. Cependant, au sein de tourbillons ou au sein de couches limites, la particule peut voir sa vitesse fortement diminuer. Dans le cas extrême où elle est considérée comme immobile et subissant l'écoulement du fluide à son débit maximal, cette force peut atteindre des valeurs de l'ordre de grandeur de 10^{-3} N. L'épaisseur de la couche limite ne peut pas se calculer aisément au sein de la canalisation à ultrasons où un régime permanent ne peut vraiment se produire mais où des tourbillons peuvent se créer au niveau des deux changements de section assez proches (élargissement en amont et rétrécissement en aval). Justement, dans les zones hautement cisailantes ou au sein de tourbillons, il importe également de considérer la force latérale ou force de portance :

$$F_L = C_L \cdot \left(\frac{\rho \cdot U^2}{2} \right) \cdot S_p$$

C_L est le coefficient de portance et S_p est la section supérieure de la particule soumise à la force de portance. La section soumise à cette force est environ double de celle soumise à la force de traînée (longueur des graines par rapport à épaisseur). La force de portance est plus complexe à calculer et est généralement déterminée selon différents cas particuliers (d'après la taille des particules, leur nombre de Reynolds, leur proximité de la paroi...), résultant de différents effets. Citons l'effet Magnus pour une particule en rotation et l'effet Saffman pour de petites particules dans un écoulement cisailé. La force de Saffman ne se calcule que pour une sphère avec un faible nombre de Reynolds particulaire.

$$F_L = 1,615 \cdot \sqrt{\rho \cdot \eta \cdot \dot{\gamma}} \cdot S_p^2 \cdot U$$

$\dot{\gamma}$ est le gradient de cisaillement (s⁻¹). Une valeur moyenne de $2 \cdot 10^{-3}$ N est trouvée.

La force de Magnus s'applique si la particule est en rotation (notamment dans un tourbillon) et s'exprime comme :

$$F_L = \frac{\pi}{16} \cdot \rho \cdot S_p^3 \cdot U \cdot \dot{\gamma}$$

Une valeur moyenne de $3 \cdot 10^{-3}$ N est trouvée.

Au niveau de la canalisation à ultrasons, zone où l'influence de la paroi et des tourbillons est sans doute la plus importante, le nombre de Reynolds particulaire reste faible (<10) et la force de portance est peu élevée. Ainsi, les principales forces subies par une particule ont lieu au sein du tuyau de recirculation avec des valeurs maximales de l'ordre de 10^{-3} N. Cette valeur n'est pas négligeable (particule d'environ 1mg soumise à une force équivalente à celle d'un poids de 100mg soit 100 fois son poids) mais n'est peut-être pas suffisante pour expliquer l'extraction du mucilage. Si la couche mucilagineuse est considérée, le volume occupé par une particule et son mucilage en l'absence de contraintes mécaniques est d'environ 10 mm^3 (voir 3.1.c), soit 10 fois celui d'une graine non hydratée. En reportant cette nouvelle dimension au calcul des forces, celles-ci sont d'un ordre de grandeur de 10^{-1} N. Même si les particules ne sont plus alors rigides mais devraient être considérées comme ayant une certaine déformabilité, les forces exercées sont alors bien plus importantes. Si les contraintes subies par les graines au sein de la pompe sont considérées, des forces centrifuges s'ajoutent aux forces de portance et de traînée.

$F_C = m \cdot R \cdot \omega^2$ avec m : masse d'une graine, R , distance d'une graine par rapport à l'axe de rotation (5 cm au maximum) et ω : vitesse angulaire en rad/s. Même si l'hydratation d'une graine peut augmenter légèrement sa masse, avec une vitesse angulaire nominale de 291 rad/s (données

constructeur), cette force est au maximum d'environ 6.10^{-2} N, valeur plus faible que pour les forces maximales de portance et de traînée.

Concernant l'évolution des forces subies par les particules au cours de l'extraction, il importe de remarquer que plus le milieu se chargera en particules solubles, plus la masse volumique augmentera de même que la viscosité et ainsi la force de frottement visqueux. Cependant, ces phénomènes sont contrebalancés par l'augmentation de la température. De même, l'extraction du mucilage, en diminuant la dimension des particules en mouvement, réduit d'autant la force exercée sur ces dernières. L'efficacité d'extraction est ainsi certainement moindre avec le temps. De même, la dissolution du mucilage provoque un comportement rhéologique dont la composante élastique augmente peu à peu, diminuant le déphasage entre le mouvement du liquide et celui des particules. Par conséquent, la vitesse relative des particules (comparée à la vitesse du fluide environnant) aurait tendance à diminuer à mesure que le mucilage est extrait. Les équations gouvernant les forces hydrodynamiques d'un ensemble de particules non indépendantes sont complexes mais il est possible de considérer que ce réseau mucilagineux, de par son élasticité propre, est capable de transférer au moins partiellement les forces exercées sur une particule à celles environnantes, notamment aux environs des parois ou zones de turbulence. Il est ainsi prévisible que l'extraction du mucilage puisse procéder de sa nature élastique même.

3.4. Composition en monosaccharides

Par HPLC, la composition en monosaccharides a pu être déterminée pour différents mucilages (Figure 3-26). L'un a été obtenu par simple agitation à 750 tpm de graines dans l'eau à 40°C pendant 30 minutes, un autre correspond à l'expérience n°2 (PEX 02) du plan d'expériences où les graines ont subi 5 minutes de traitement en recirculation avec les ultrasons (40% d'amplitude et 5s ON/20s OFF, Température max = 29°C) et un autre à l'expérience n°9 (PEX 09) où les graines ont subi 42,5 minutes de traitement en recirculation avec les ultrasons (30% d'amplitude, 5s ON, 10s OFF, Température max = 52°C). Si les compositions relatives sont comparées, il apparaît que le mucilage extrait avec le temps de recirculation et de traitement ultrasonore le plus long se détache des deux autres par une teneur en glucose plus importante. Les mucilages extraits avec des conditions plus douces ont des compositions relatives proches. Ils ont également des rendements proches ($3,64\% \pm 0,05$ pour le mucilage « PEX 02 » et $4,21\% \pm 0,07$ pour le mucilage obtenu par agitation des graines à 750tpm). Le faible pourcentage en rhamnose est étonnant au vu de données bibliographiques. Cette faible valeur pourrait résulter de conditions d'hydrolyse excessives ou insuffisantes dans la méthode d'analyse.

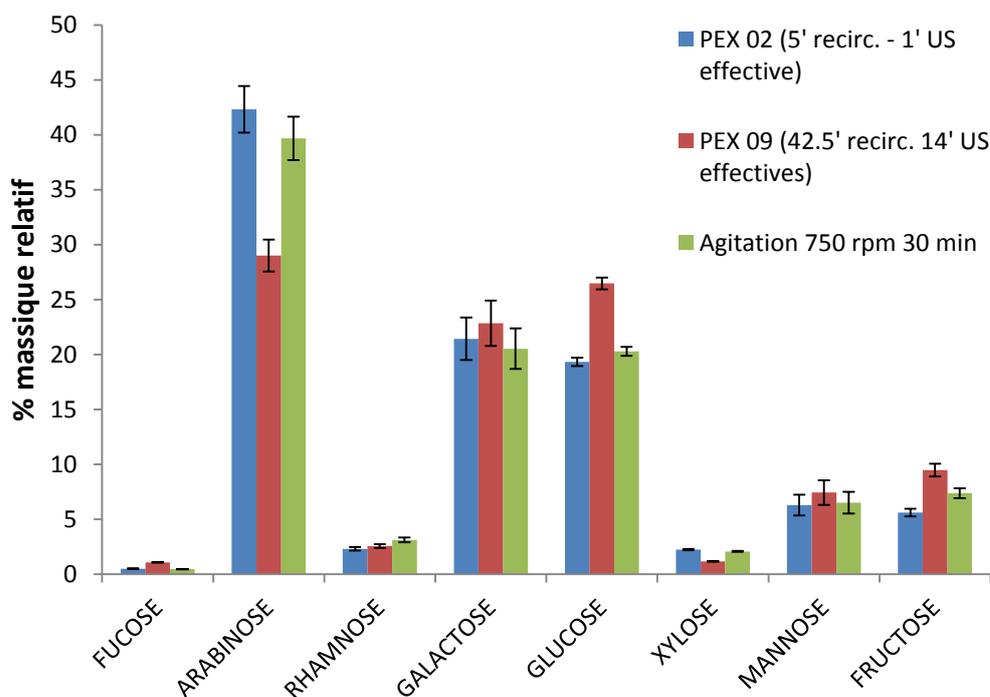


Figure 3-26. Comparaison des distributions en monosaccharides des polysaccharides de différents mucilages. (L'incertitude correspond à la celle observée à p=68% pour un mucilage représentatif).

Etant donné que l'hydrolyse acide des polysaccharides est certainement plus ou moins efficace selon l'état du mucilage, un essai d'analyse des monosaccharides est réalisé sur le mucilage possédant la viscosité la plus faible en solution, soit celui issu du premier essai du plan d'expériences (« PEX01 »). Il apparaît alors une diminution plus importante de l'arabinose toujours au profit du glucose mais une concentration en rhamnose bien plus importante (concentration en rhamnose autour de 10%) qui peut être due à une condition d'hydrolyse plus poussée (Tableau 3-8).

Tableau 3-8. Ratio Glucose/Arabinose et Glucose/Rhamnose pour plusieurs mucilages

Mucilages issus de	Glucose/Arabinose	Glucose/Rhamnose	Hexoses/Pentoses
PEX 01	4,30	2,76	5,7
PEX 02	0,45	8,40	1.2
PEX 09	0,91	10,40	2.3
Agitation 750 tpm, 50min	0,51	6,50	1.4

Ces résultats peuvent indiquer des différences de composition des polysaccharides de ces différents mucilages mais aussi différentes résistances à l'hydrolyse acide préalable à leur analyse. En effet, lors de l'hydrolyse acide de mucilage de lin, le rhamnose nécessiterait plus de temps pour être libéré (Emaga *et al.*, 2012). Dans tous les cas, l'augmentation de la quantité de glucose avec

le temps de traitement peut provenir d'une extraction de cellulose. Ce polysaccharide est en effet noté dans la graine d'*arabidopsis* comme pouvant être le trait d'union entre le mucilage et la coque des graines. Cette extraction de glucose augmente d'autant le ratio des hexoses (glucose, rhamnose, galactose, mannose, fructose et fucose) sur les pentoses (arabinose, xylose).

3.5. Composition en acides aminés

Considérant une forte solubilité du mucilage, ce dernier peut être facilement hydrolysé pour obtenir la conversion des protéines sous la forme de leurs acides aminés constitutifs. Une analyse de la composition de ces acides aminés permet ainsi de retrouver la quantité d'azote de l'hydrolysate. Si un dosage de l'azote Kjeldahl (qui effectue une minéralisation totale du milieu) donne une valeur identique, cela indique que l'hydrolyse des protéines a été totale. Dans ce cas, l'analyse quantitative des acides aminés permet donc de déterminer la teneur d'azote des protéines et de calculer le facteur de conversion azote-protéines. Cette composition a ainsi été déterminée pour quelques expériences significatives (Figure 3-27).

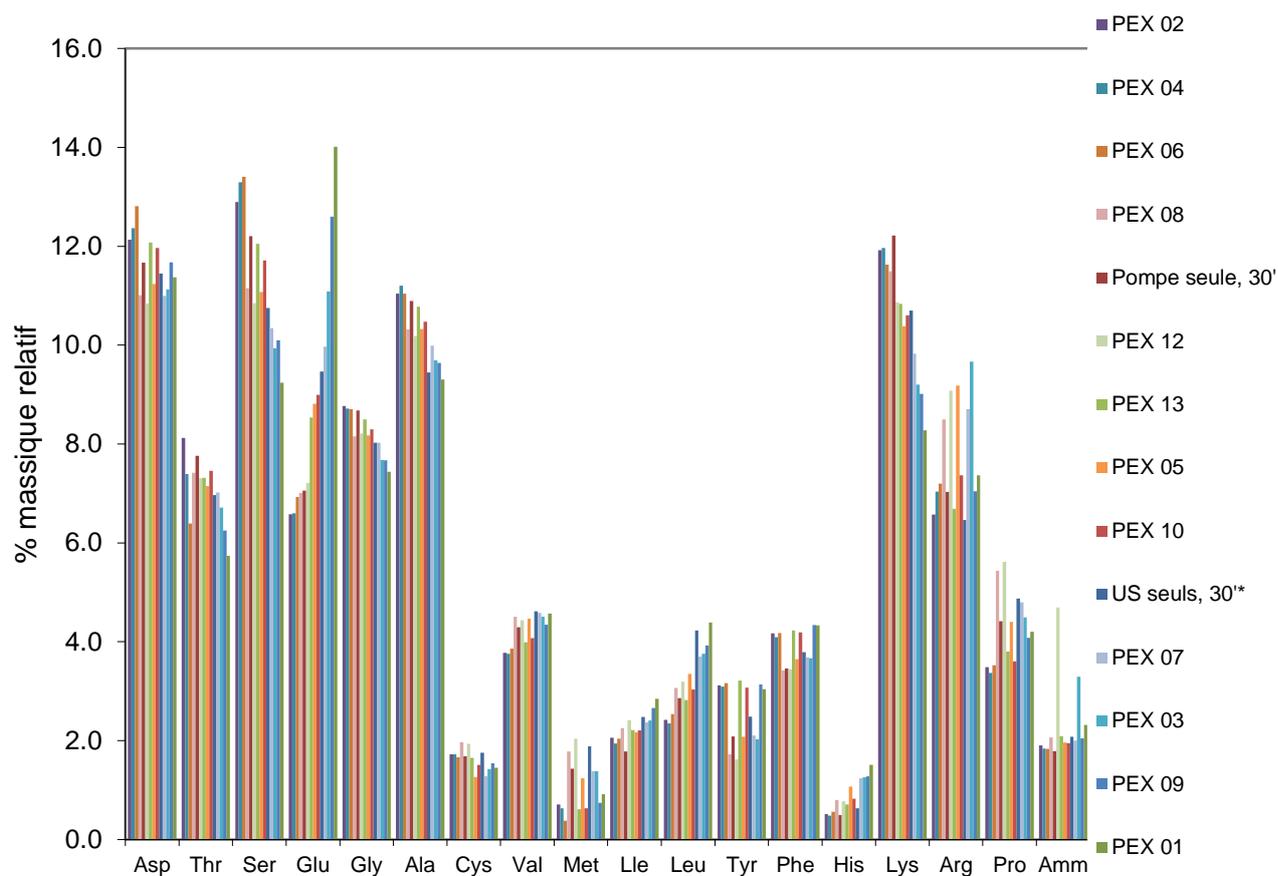


Figure 3-27. Composition en acides aminés des protéines de mucilages extraits selon plusieurs expériences classées selon la teneur en acide glutamique (Glu).* : essai effectué avec les ultrasons (A=40%, p=4, t=30') avec une agitation manuelle.

La composition en acides aminés a été déterminée pour les mucilages issus de diverses expériences. Les compositions des mucilages issus des expériences de plus courtes durées (2, 4 et 6) sont très proches malgré des amplitudes ultrasonores très différentes entre les expériences 4 et 6. Ceux issus des expériences 10 et 13 sont également semblables malgré une forte amplitude ultrasonore pour l'expérience 10, révélant encore une fois l'influence prépondérante du temps de traitement sur les ultrasons et des profils de mucilage semblables selon un traitement par cavitation ultrasonore ou cisaillement par pompe à recirculation. Les longs temps de traitement (expériences 01, 09, 07 et 03) donnent une composition plus riche en acide glutamique, comme cela avait déjà pu être constaté pour le lin mais aussi en leucine et histidine. Les temps plus courts donnent une composition plus riche en thréonine, sérine, glycine, alanine et lysine. D'ailleurs, il est possible de relier la composition en acide glutamique avec le temps de traitement (Figure 3-28).

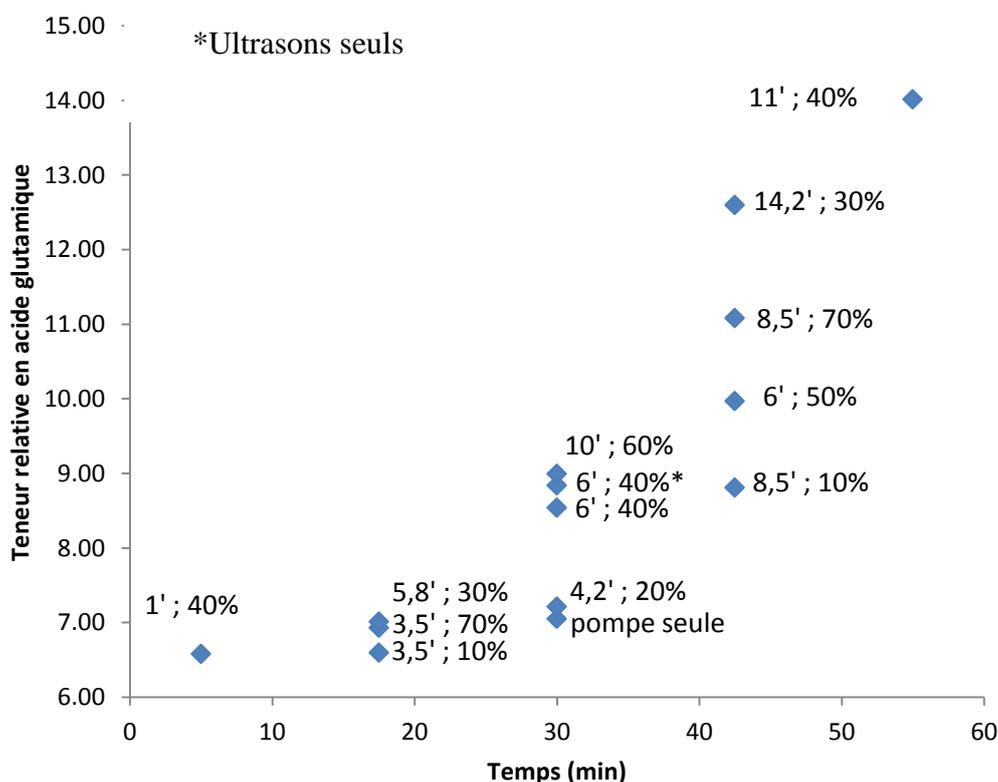


Figure 3-28. Evolution de la teneur relative en acide glutamique selon le temps de traitement. Le temps effectif d'action des ultrasons et leur amplitude sont précisés.

D'après la Figure 3-28, il apparaît que le temps de traitement a une influence importante sur la teneur en acide glutamique des protéines extraites. Cependant, ce paramètre est modéré en fonction de l'amplitude des ultrasons et de leur durée effective (calculée selon la pulsation ON/OFF utilisée). En effet, pour 30 minutes d'extraction, la teneur en acide glutamique augmente avec les ultrasons. Par contre, l'utilisation des ultrasons sans la pompe donne une teneur en acide

glutamique dans le mucilage presque identique à celle obtenue avec un essai avec pompe. Les compositions en acides aminés permettent d'évaluer le facteur de conversion %Azote \rightarrow % Protéines selon la méthode de Siriperm (Siriperm *et al.*, 2011). La valeur moyenne obtenue est $f=5,12 \pm 0,13$ (IC=95%, N=14). Notons la valeur minimale pour le mucilage obtenu avec l'expérience PEX 12 ($f=4,5$). Ce faible taux pourrait s'expliquer en partie par une forte teneur en ammoniacque de l'hydrolysate protéique. De même, la valeur maximale pour le mucilage obtenu avec l'expérience PEX 09 ($f=5,31$) profite d'une teneur élevée en acide glutamique (rapport $M_{\text{acide glutamique}}/M_{\text{azote}}= 10,5$).

La comparaison de la teneur en azote déterminée ici sur les hydrolysats avec la teneur en azote déterminée par dosage Kjeldahl sur l'échantillon permet de vérifier le degré d'hydrolyse des protéines. Le facteur de récupération de l'azote calculé pour l'hydrolysate du mucilage obtenu avec le plus long temps de traitement (expérience PEX1) est de 100% ce qui indique une hydrolyse totale tandis que le facteur de récupération correspondant à la plus courte expérience (PEX 2), est de 85%. Ainsi, les protéines extraites avec un temps plus court sont plus résistantes à l'hydrolyse acide. Cette résistance provient certainement d'une viscosité et/ou taille moléculaire plus importante. En effet, cet échantillon a été moins exposé aux actions combinées d'un fort cisaillement, de l'ultrasonication et de l'augmentation de la température.

Une comparaison des teneurs en protéines obtenues par les trois différentes méthodes montre des valeurs proches entre la méthode Kjeldahl et HPIC (Figure 3-29).

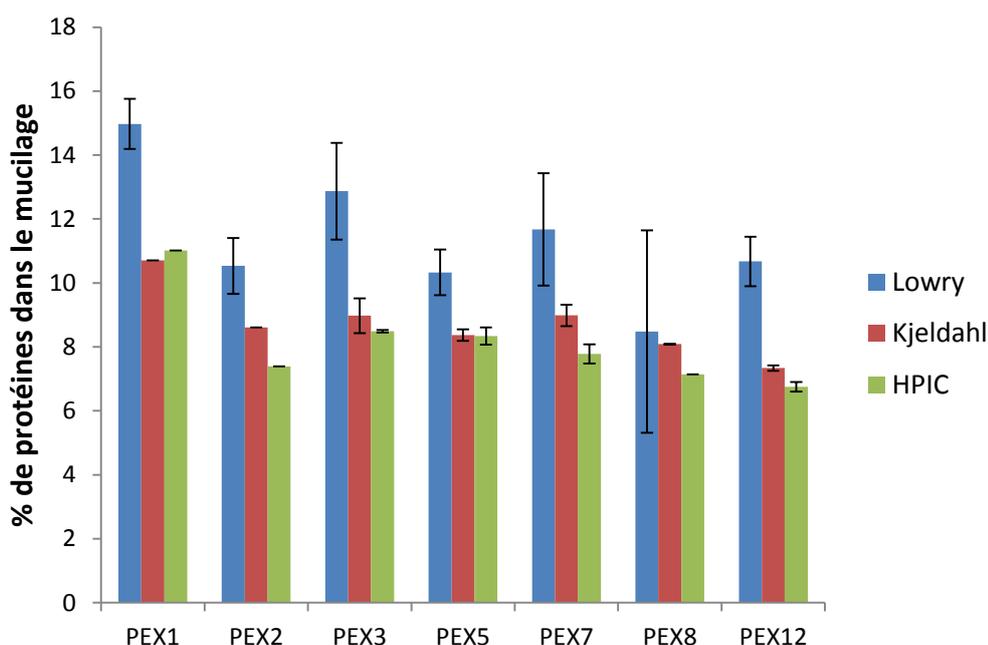


Figure 3-29. Comparaison des teneurs en protéines déterminées par dosage de l'azote selon Kjeldahl, par la méthode de Lowry et par HPIC.

Les teneurs calculées avec le dosage de l'azote Kjeldahl s'appuient sur le facteur de conversion calculé par HPIC. Ainsi, les teneurs protéiques calculées avec cette dernière méthode sont égales ou inférieures aux teneurs obtenues par Kjeldahl du fait d'une hydrolyse pas toujours complète des échantillons. Notons justement la plus faible valeur obtenue pour le PEX2, avec un taux de récupération de l'azote plus faible. Les teneurs mesurées avec la méthode de Lowry sont supérieures dans tous les cas. La réponse de l'albumine de sérum bovin peut être légèrement inférieure à celle des protéines de caméline mais le dosage spectrophotométrique de Lowry peut être sujet aux interférences avec les saccharides, notamment le glucose (Walker, 1994). La contribution de ces composés au dosage spectrophotométrique de Lowry n'est donc certainement pas négligeable.

3.6. Teneur en cendres

La teneur en cendres du mucilage est un paramètre important pour une utilisation de ce dernier en formulation agronomique ou nutraceutique. Cette teneur a été mesurée pour certaines expériences (Figure 3-30). Il apparaît que l'extraction la plus courte (5') correspondant à la deuxième expérience du plan donne un mucilage plus concentré tandis que l'expérience la plus longue (PEX 1) donne un des taux les plus bas. Cela indique que les minéraux sont favorablement extraits en début de traitement et qu'ils entrent ensuite davantage en compétition avec les polysaccharides et les protéines. Cela rejoint les observations faites sur la conductivité (Figure 3-13). Au final, jusqu'à 20% des minéraux (equiv. cendres) des graines peuvent être extraits dans le mucilage.

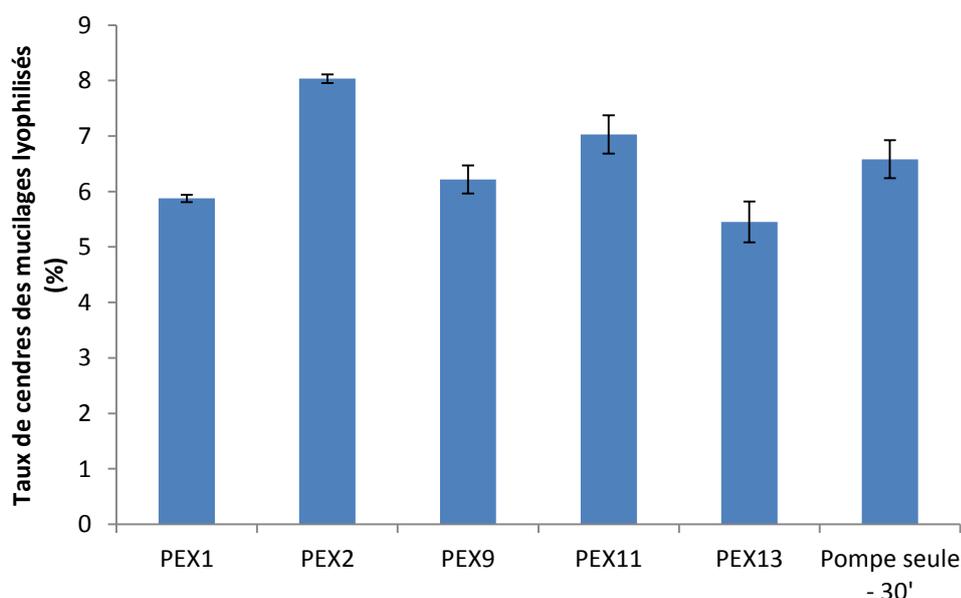


Figure 3-30. Taux de cendres de différents mucilages obtenus.

Si le rendement d'extraction des cendres des graines est maintenant calculé, il apparaît également comme fortement lié au temps d'extraction (Figure 3-31). Cependant, pour un temps donné, des variations assez importantes de rendement apparaissent selon le traitement ultrasonore.

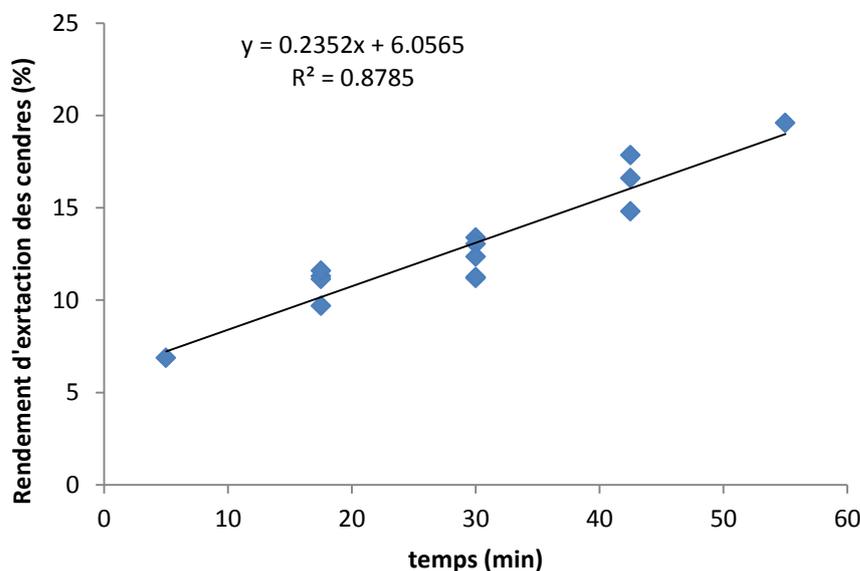


Figure 3-31. Evolution du rendement d'extraction des cendres en fonction du temps.

3.7. Conclusion sur l'extraction du mucilage

Une colonne à ultrasons a pu être développée et accessoirisée pour la faire fonctionner selon divers modes avec différents capteurs pour suivre l'évolution de l'extraction du mucilage de graines végétales. Il apparaît ainsi que l'évolution de l'indice de réfraction permet de connaître en continu le taux de matière sèche de l'extrait mucilagineux et montre une extraction non linéaire de ce dernier, celle-ci semblant se réaliser par étapes. Le pH et la conductivité permettent de suivre l'extraction de polysaccharides acides et de minéraux. Les composés aisément ionisables sont extraits en premier mais se retrouvent à nouveau en fin de traitement, lorsque certaines couches externes de la graine ont été arasées par le traitement ultrasonore. Enfin, le suivi du couple moteur a permis de confirmer que l'action ultrasonore est moins efficace quand elle intervient sur un milieu déjà concentré et visqueux. Par contre, son action cisailante entraîne une déstructuration irréversible du mucilage lorsqu'elle est mise en route tout au long du traitement des graines. Les ultrasons permettent non seulement d'accélérer l'extraction du mucilage mais de limiter l'évolution de la viscosité du milieu inhérente à l'extraction de protéines et polysaccharides. Le rendement d'extraction du mucilage peut être encore augmenté lorsque les ultrasons sont associés avec l'action cisailante d'une recirculation du milieu à haute vitesse, le temps d'extraction devenant le paramètre prédominant concernant le taux d'extraction et la composition du mucilage.

Celle-ci est cependant modulée, de même que les propriétés rhéologiques, par le traitement ultrasonore. Le mucilage extrait, considérant son probable intérêt pharmaceutique (Prajapati *et al.*, 2013), peut notamment s'utiliser en tant qu'épaississant et agent texturant de par son comportement rhéologique, complément alimentaire par sa richesse en fibres et la composition en acides aminés essentiels de ses protéines et intermédiaire en synthèse chimique en exploitant ses fonctions hydroxyles/carboxyliques (sucroesters) et/ou sa composition en pentoses. Si le procédé de démucilagination a principalement été utilisé pour la caméline, graine pour laquelle le développement technologique semble à maturité : TRL5 (Validation de composants et/ou de maquettes en environnement représentatif), il fonctionne également de façon très similaire pour le traitement de graines de chia (résultats non présentés) et peut s'utiliser pour le lin. L'appauvrissement des graines en polysaccharides et protéines doit permettre non seulement de faciliter des procédés de traitements aqueux mais également l'extraction et la purification des lipides faisant appel à des solvants possédant une polarité importante. Enfin, la possible action lubrifiante du mucilage doit questionner l'influence de ce procédé sur des mécanismes de déstructuration physique des graines (pressage mono-vis, extrusion...).

***Chapitre 4. Extraction des
phospholipides***

Au sein du programme SMON-FERT, différentes organisations lipidiques ont été imaginées pour véhiculer des nutriments ou éliciteurs au sein des plantes. Si les lipides neutres, sous forme de triglycérides ou d'acides gras peuvent permettre le franchissement de couches hydrophobes, les phospholipides, à des degrés de polarité divers, pourraient permettre d'encapsuler et de transporter des substances au sein de milieux polaires et au travers de membranes cellulaires. Ainsi, l'extraction des lipides polaires des graines de caméline est un enjeu majeur. Tout d'abord, plusieurs méthodes de détermination de la quantité et de la composition de phospholipides dans une huile végétale ont été sollicitées dans un but de simplification des analyses.

4.1. Mise au point d'une méthode simplifiée d'analyse des phospholipides

4.1.i. Utilisation de la spectroscopie IR

Plusieurs auteurs ont revendiqué l'utilisation de la spectroscopie infrarouge, par la mesure de paramètres relatifs aux bandes caractéristiques des fonctions propres aux phospholipides. Ils ont utilisé des cellules liquides, diluant les huiles et phospholipides dans des solvants appropriés (Nzai et Proctor, 1999, 1998). En déterminant les teneurs en phospholipides par infrarouge, ils défendent une meilleure précision que les méthodes colorimétriques qui ne dosent en fait que le phosphore. Ainsi, leur méthode s'appuie sur l'analyse des bandes de vibration correspondant aux liaisons suivantes : C=O à 1762-1720 cm^{-1} , PO₂ à 1200-1145 cm^{-1} , P-O-C à 1145-970 cm^{-1} et (P-O-C + PO₂) à 1200-970 cm^{-1} . Leur meilleure corrélation entre la quantité de phospholipides et la hauteur des pics a été obtenue pour la bande C=O. D'autres auteurs ont uniquement utilisé la bande de PO₂ à 1243 cm^{-1} , ce qui leur a permis de doser les phospholipides totaux avec peu d'interférences avec les huiles raffinées de soja et de colza (Meng *et al.*, 2014).

Disposant d'une cellule liquide à base de ZnSe, des essais ont été réalisés pour l'application de la spectroscopie infrarouge au dosage des phospholipides. Dans un premier temps, un solvant transparent aux infrarouges dans les zones d'intérêt a été recherché. Selon la base de données NIST (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>), il est possible d'observer les zones de transparence de plusieurs solvants usuels aux infrarouges (Figure 4-1). Même si les bandes caractéristiques des phospholipides peuvent légèrement se décaler selon le solvant utilisé, il ressort d'après l'analyse de ce graphique que la zone 1700-1800 cm^{-1} correspondant aux bandes C=O ressortira bien dans tous les solvants sauf le DMF et le 1,4-dioxane. Concernant la bande à 1243 cm^{-1} correspondant à

l'élongation asymétrique PO_2^- , elle devrait bien ressortir dans l'acétonitrile, le 1,4-dioxane, le DMSO. Enfin, concernant les bandes à 1090, 1073, 1025 et 970 cm^{-1} correspondant respectivement à l'élongation symétrique PO_2^- , les élongations asymétriques et symétriques de la liaison C-O-P (de C-O- PO_2^-) et l'élongation symétrique du groupement choline $(\text{CH}_3)_3\text{-N}^+$, aucun solvant ne semble pouvoir toutes les exprimer, le méthanol et le DMSO semblant être les moins bons solvants dans ce cas.

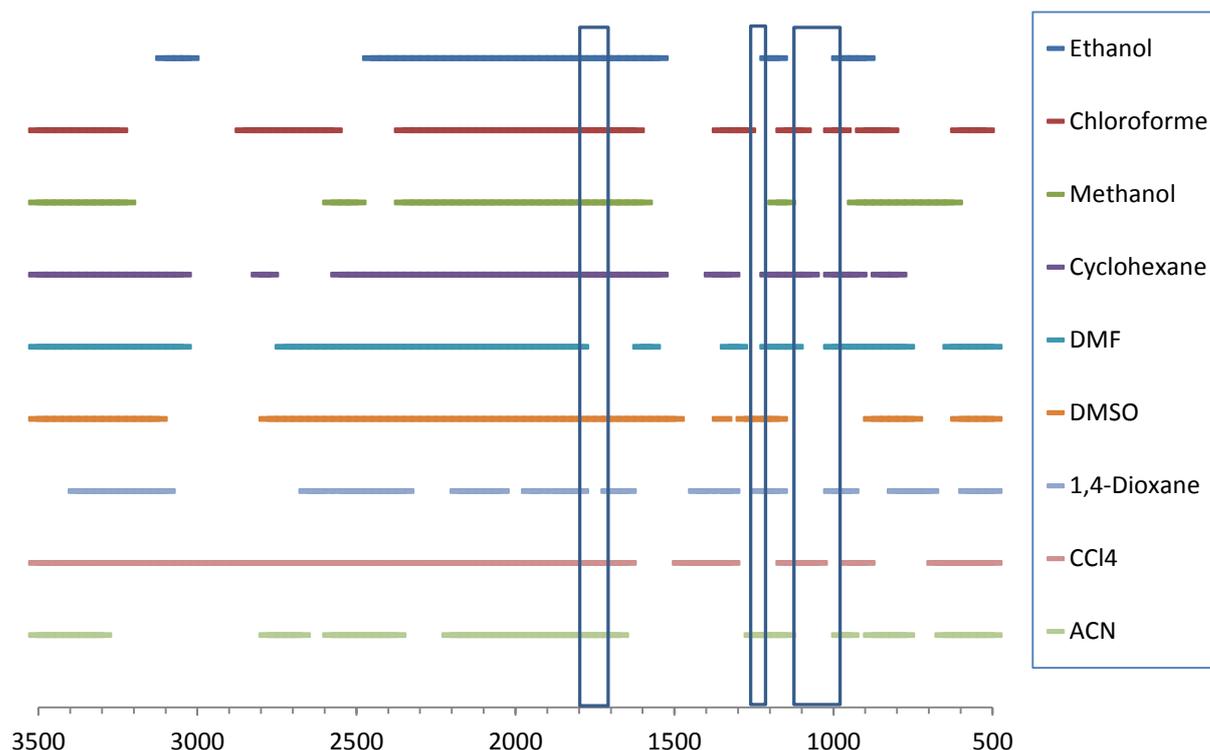


Figure 4-1. Zones de transparence de plusieurs solvants usuels (DMF : diméthylformamide, DMSO : diméthylsulfoxyde, ACN : acétonitrile) selon leurs spectres en phase gazeuse ou liquide, disponibles sur NIST (les zones d'absorbance spécifiques aux phospholipides sont encadrées)

Des essais préliminaires d'analyse de lécithine de soja ont été effectués dans l'éthanol anhydre et le DMSO. Cependant, ils n'ont pas permis d'obtenir une résolution suffisante aux longueurs d'onde explorées (1243 cm^{-1} et entre 1070 et 970 cm^{-1}). En effet, l'épaisseur de la cellule (0,5 mm) implique une longueur de faisceau trop importante. Ainsi, une absorbance même mineure du solvant à une longueur d'onde donnée induit un écrantage important de l'absorption du soluté. Le classement CMR du chloroforme, du tétrachlorure de carbone, du 1,4-dioxane et du DMF incitent à utiliser des solvants moins toxiques. Au vu d'une solubilité plus faible de la lécithine de soja dans l'acétonitrile, il est décidé d'utiliser le cyclohexane. Ce solvant permet d'exploiter les bandes

à 1065 cm⁻¹, 1090 cm⁻¹ et 1173 cm⁻¹ de même que les bandes correspondant aux carbonyles mais ne permet pas de visualiser la bande à 1243 cm⁻¹.

De la lécithine de soja (>90% de PC) est utilisée pour effectuer un essai d'étalonnage avec cette méthode. Quatre solutions étalons sont préparées, respectivement concentrées à 5, 10, 50 et 80mg/mL dans le cyclohexane. Six droites d'étalonnage peuvent ainsi être réalisées (Tableau 4-1).

Tableau 4-1. Principales longueurs d'onde caractéristiques de la phosphatidylcholine de soja.

Longueur d'onde (cm ⁻¹)		R ² (linéaire)
1740	Abs = 0,0551xC	0,9976
1173	Abs = 0,0231xC	0,9998
1090	Abs = 0,0419xC	0,9998 (3 points)
1065	Abs = 0,0412xC	0,9937
1025	Abs = 0,0219xC	0,9998
970	Abs = 0,0219xC	0,9998

Ainsi, les absorbances aux longueurs d'onde explorées sont bien proportionnelles à la concentration, le coefficient d'extinction étant le plus élevé pour 1740, 1090 et 1065cm⁻¹. Il s'agit maintenant de déterminer si ces absorbances peuvent être exploitées lorsque les phospholipides se trouvent dans de l'huile. L'huile de colza, de même que la trioléine (Figure 4-2), ont une absorption importante vers 1740 cm⁻¹, du fait des groupements (C=O) rendant l'utilisation de cette longueur d'onde délicate pour la détermination de la concentration en phospholipides. A 1173 cm⁻¹, l'huile de colza comporte un épaulement important de même qu'à 1090 et 1065 cm⁻¹. Un léger pic à 1025cm⁻¹ peut être remarqué de même qu'à 970cm⁻¹. En effet, le pic à 970 cm⁻¹ est aussi caractéristique des liaisons *cis* RCH=CHR tandis que les pics à 1173, 1090, 1065 et 1025cm⁻¹ peuvent être caractéristiques de l'élongation C-O d'esters.

Le problème peut être posé sous forme d'équations en utilisant la loi de Beer-Lambert (Absorbance = ε.[A,B].l avec ε : coefficient d'extinction molaire (L.mol⁻¹.cm⁻¹), [A, B] : Nombre de fonctions A/molécule de B × nombre de moles/L de B, l : chemin optique (cm) :

$$Abs_{1740}/l = \epsilon_{C=O,PL,Cyclo}[C = O, PL] + \epsilon_{C=O,TAG,Cyclo}[C = O, TAG]$$

$$Abs_{1173}/l = \epsilon_{COOa,PL,Cyclo}[Esters, PL] + \epsilon_{PO2a,PL,Cyclo}[Esters, PL] + \epsilon_{COOa,TAG,Cyclo}[Esters, TAG]$$

$$Abs_{1090}/l = \epsilon_{COOb,PL,Cyclo}[Esters, PL] + \epsilon_{PO2b,PL,Cyclo}[PL] + \epsilon_{COOb,TAG,Cyclo}[Esters, TAG]$$

$$Abs_{1065}/l = \epsilon_{COOc,PL,Cyclo}[Esters, PL] + \epsilon_{PO2c,PL,Cyclo}[PL] + \epsilon_{COOc,TAG,Cyclo}[Esters, TAG]$$

$$\text{Abs}_{1025}/l = \varepsilon_{\text{COO}d, \text{PL}, \text{Cyclo}}[\text{Esters}, \text{PL}] + \varepsilon_{\text{PO}2d, \text{PL}, \text{Cyclo}}[\text{PL}] + \varepsilon_{\text{COO}d, \text{TAG}, \text{Cyclo}}[\text{Esters}, \text{TAG}]$$

$$\text{Abs}_{970}/l = \varepsilon_{\text{C}=\text{C}, \text{PL}, \text{Cyclo}}[\text{C} = \text{C}, \text{PL}] + \varepsilon_{\text{PO}2e, \text{PL}, \text{Cyclo}}[\text{PL}] + \varepsilon_{\text{C}=\text{C}, \text{TAG}, \text{Cyclo}}[\text{C} = \text{C}, \text{TAG}]$$

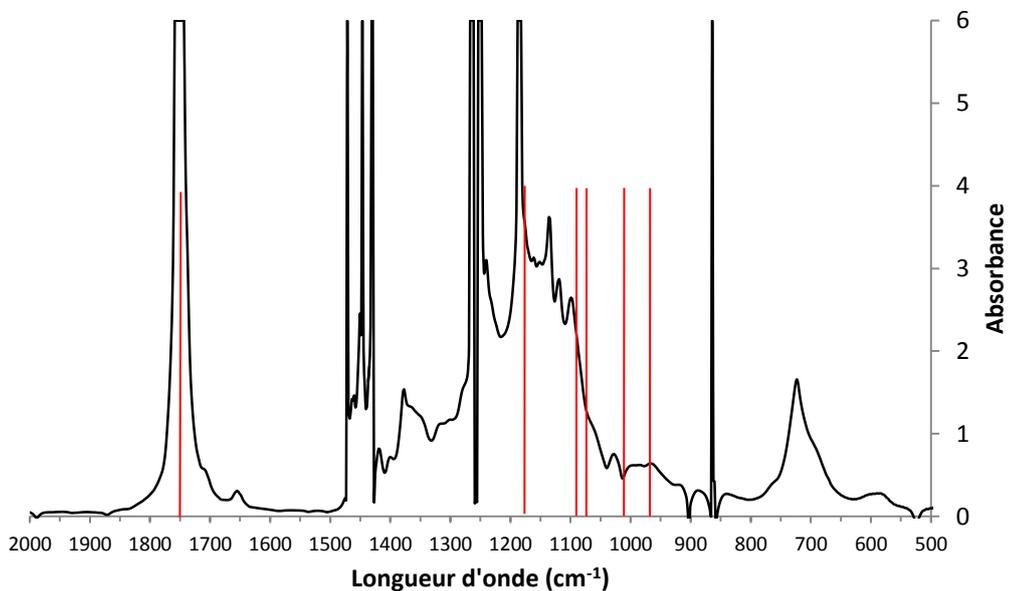
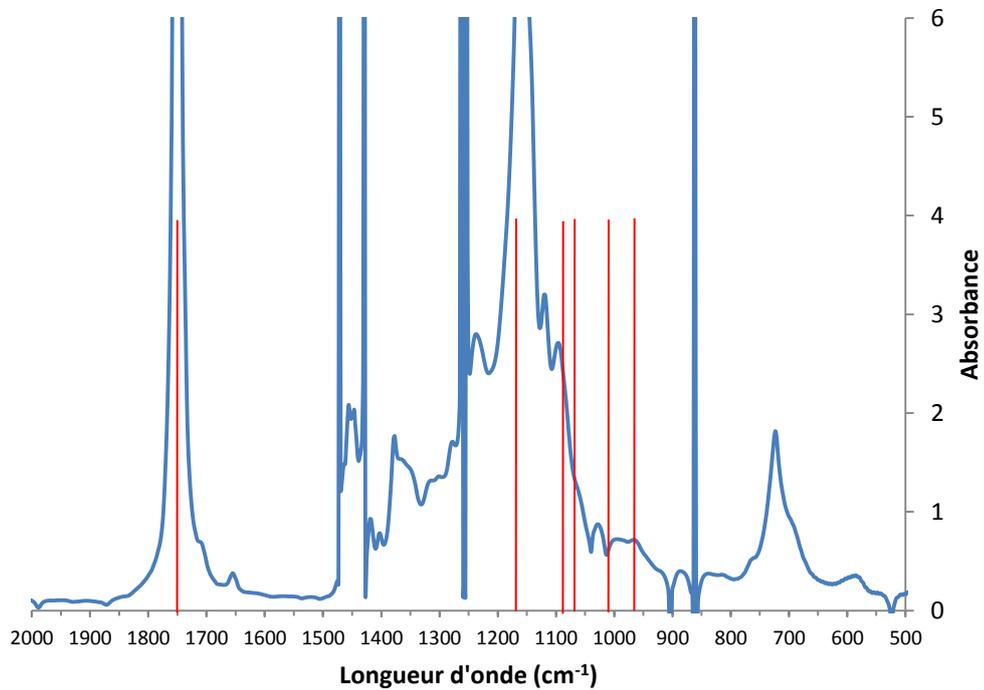


Figure 4-2. Spectre Infrarouge de la trioléine (a) et d'une huile de colza raffinée du commerce (b), diluées dans le cyclohexane. Les barres rouges représentent les longueurs d'onde caractéristiques des phospholipides.

Au vu des incertitudes de détermination des coefficients d'extinction correspondant à l'huile et de leur variabilité en fonction de l'huile utilisée, ce système ne peut être valable que dans le cas où la

contribution des phospholipides à l'absorbance est significativement supérieure à ces incertitudes, soit, par exemple, que :

$$\varepsilon_{C=O,PL,Cyclo}[C = O, PL] \gg \delta(\varepsilon_{C=O,TAG,Cyclo}[C = O, TAG])$$

$$\varepsilon_{COOa,PL,Cyclo}[Esters, PL] + \varepsilon_{PO2a,PL,Cyclo}[PL] \gg \delta(\varepsilon_{COOa,TAG,Cyclo}[Esters, TAG])$$

avec $\delta(A)$: incertitude sur la mesure de A .

Si une incertitude de 1% est considérée, il faut :

$$\varepsilon_{C=O,PL,Cyclo}[C = O, PL] \gg 0,01 \times (\varepsilon_{C=O,TAG,Cyclo}[C = O, TAG]).$$

Sachant que les phospholipides sont en général concentrés à des valeurs autour de 1% dans l'huile, il s'ensuit : $\varepsilon_{fonction,PL,cyclo} \gg \varepsilon_{fonction,TAG,Cyclo}$. Considérant l'exemple précédent, la similarité des fonctions et de leur environnement dans les deux cas implique une similarité des coefficients d'extinction. Les coefficients d'extinction globaux aux différentes longueurs d'onde peuvent être comparés, en considérant la masse molaire de DLPC pour les phospholipides et de la trioléine pour l'huile végétale (Tableau 4-2) :

Tableau 4-2. Rapport des coefficients d'extinction phospholipides/triglycérides à différentes longueurs d'onde

Rapport des coefficients d'extinction	
	$\varepsilon_{PL}/\varepsilon_{TAG}$
1740	1
1173	0,5
1090	1,5
1065	3
1025	2,5
970	3

Les coefficients d'extinction ont le même ordre de grandeur pour les différentes longueurs d'onde, seules les longueurs d'onde 1065, 1025 et 970 cm^{-1} donnant des coefficients d'extinction significativement supérieurs. Il est donc impossible de doser des phospholipides présents dans une

huile si ces derniers ne sont pas à une concentration élevée. Si c'est le cas, cette méthode peut être utilisée en réalisant plusieurs approximations. La première est que le coefficient d'extinction ne dépend pas de la concentration dans un état fortement dilué. La deuxième est que les acides gras libres sont négligeables, donnant :

$$[C = O - PL] = [Esters - PL] = 2[PL]$$

$$[C = O - TAG] = [Esters - PL] = 3[TAG]$$

Avec la calibration effectuée, les coefficients d'extinction d'une phosphatidylcholine de soja sont connus et peuvent être adaptés à d'autres phospholipides majoritairement à base de phosphatidylcholine :

$$2 \times \varepsilon_{COOa-PL-Cyclo} + \varepsilon_{PO2a-PL-Cyclo} = \varepsilon_a$$

$$2 \times \varepsilon_{COOb-PL-Cyclo} + \varepsilon_{PO2b-PL-Cyclo} = \varepsilon_b$$

$$2 \times \varepsilon_{COOc-PL-Cyclo} + \varepsilon_{PO2c-PL-Cyclo} = \varepsilon_c$$

$$2 \times \varepsilon_{COOd-PL-Cyclo} + \varepsilon_{PO2d-PL-Cyclo} = \varepsilon_d$$

Par contre, le pic à 970 cm^{-1} ne se révèle exploitable que dans le cas où les phospholipides à analyser ont une composition en acides gras insaturés similaire à celle des standards utilisés.

Ainsi :

$$\text{Abs}_{1740}/L = 3 \times (\varepsilon_{C=O-PL-Cyclo}[PL] + \varepsilon_{C=O-TAG-Cyclo}[TAG])$$

$$\text{Abs}_{1175}/L = \varepsilon_a[PL] + 3 \times \varepsilon_{COOa-TAG-Cyclo}[TAG]$$

$$\text{Abs}_{1090}/L = \varepsilon_{ab}[PL] + 3 \times \varepsilon_{COOb-TAG-Cyclo}[TAG]$$

$$\text{Abs}_{1065}/L = \varepsilon_c[PL] + 3 \times \varepsilon_{COOc-TAG-Cyclo}[TAG]$$

$$\text{Abs}_{1025}/L = \varepsilon_d[PL] + 3 \times \varepsilon_{COOd-TAG-Cyclo}[TAG]$$

$$\text{Abs}_{970}/L = \varepsilon_{C=C-PL-Cyclo}[C = C - PL] + \varepsilon_{PO2e-PL-Cyclo}[PL] + \varepsilon_{C=C-TAG-Cyclo}[C = C - TAG]$$

Les absorbances à 1065, 1025, 1175 et 1090 peuvent être alors utilisées pour obtenir une détermination de la concentration en phospholipides.

Pour déterminer la longueur d'onde à utiliser préférentiellement pour le dosage, des phospholipides de soja sont ajoutés à une huile de colza avec des concentrations importantes (5, 20 et 40%) et des changements d'absorbance sont observés (Figure 4-2). Seules les absorbances à 1065 et 970 cm^{-1} suivent une évolution linéaire avec l'ajout de phospholipides. Comme l'absorbance à 970 cm^{-1} dépend du nombre d'insaturations, l'absorbance à 1065 cm^{-1} sera utilisée.

$$\text{Abs}_{1065}/L = \varepsilon_c[PL] + 3 \times \varepsilon_{COO-C-TAG-cyclo}[TAG]$$

Et $[PL].M_{PL} + [TAG].M_{TAG} = d_{\text{huile}}$ avec d_{huile} : masse volumique de l'huile à analyser (g/L), et M : masse molaire (g/mole).

Ainsi, connaissant d_{huile} , il serait possible de remonter à la concentration approximative en phospholipides. Cette méthode peut donc s'utiliser pour déterminer la composition en phospholipides d'un concentrat.

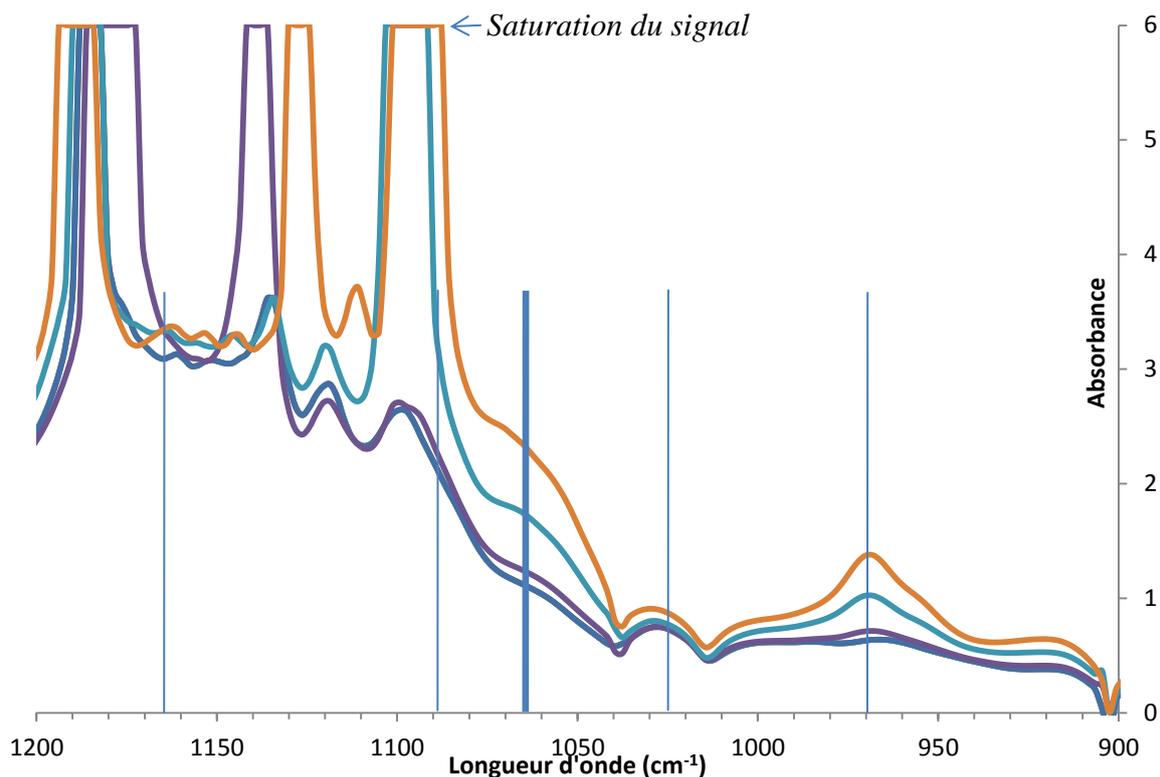


Figure 4-2. Spectre infrarouge d'une huile de colza avec différents ajouts de lécithine de soja (violet 5%, bleu 10%, orange 40%). Les longueurs d'onde d'intérêt sont signalées par des traits verticaux.

4.1.ii. Utilisation de la spectrophotométrie UV/Visible

La méthode précédente ne permet pas un dosage des phospholipides quand ces derniers sont mélangés à faible concentration dans de l'huile, au vu d'une faible différence des coefficients d'extinction aux longueurs d'onde caractéristiques. Pour augmenter le coefficient d'extinction des phospholipides à une longueur d'onde donnée, une possibilité est de lier ces derniers à un composé hautement absorbant. De nombreux chélatants du phosphore sont disponibles, notamment utilisés pour le dosage du phosphore mais ne permettent qu'un dosage contraignant et indirect des phospholipides. La partie bibliographique renseigne que l'oxydation par photosensibilisation des phospholipides fait couramment intervenir le bleu de méthylène (MB).

Considérant la polarité de ce colorant, il est envisagé que sa coloration puisse être liée à la présence de groupements polaires et ionisables. Ainsi, la coloration du bleu de méthylène pourrait être un indicateur de la quantité de ces groupements dans le milieu étudié. Considérant une huile végétale, les composés polaires ionisables sont majoritairement les phospholipides. Ainsi, en ajoutant des quantités croissantes de bleu de méthylène à des huiles additivées de phospholipides, il sera possible d'observer si des différences de coloration se produisent en fonction de la quantité de phospholipides.

Plusieurs solutions ont été préparées avec de l'huile de colza raffinée et de la lécithine de soja. Différentes quantités de cette lécithine ont été ajoutées dans 10mL d'huile de colza raffinée : 1mg, 6,5mg, 20,1mg et 52 mg pour faire des pourcentages volumiques de 0,01% à 0,5%. Après dissolution sous vortexage et bain US à 30°C, 50µL d'une solution de bleu de méthylène (MB) concentrée à 35mg/100mL dans l'éthanol sont ajoutés plusieurs fois. Les 50µL ne se dissolvent que sous agitation, donnant fugacement une couleur verte qui disparaît dans l'huile sans phospholipides. Les différents ajouts sont résumés ci-dessous (Tableau 4-3) :

Tableau 4-3. Changements de couleur observés immédiatement après addition de différentes quantités de lécithine de soja dans 10mL d'huile de colza selon le volume de solution de bleu de méthylène introduit.

Volume de MB	1mg	6,5mg	20,1mg	52mg
50 µL	Pas de changement	Pas de changement	Pas de changement	Pas de changement
+50 µL	Idem	Idem	Idem	Couleur verte éphémère
+50 µL	Idem	Idem	Vert éphémère	Vert transitoire
+50 µL	Idem	Idem	Vert transitoire	Vert permanent
+50 µL	Idem	Idem	Vert léger	Vert fort

Ainsi, plus l'huile contient de phospholipides, plus elle semble se colorer. Au total, 250µL de la solution de MB ont été ajoutés, soit 87,5µg de MB pour un minimum de 1mg de PC soit un ratio molaire PC/MB allant de 4 à plus de 200. Après une nuit à l'abri de la lumière, tous les flacons présentent une couleur verte importante avec un dégradé selon la teneur en phospholipides, indiquant des différences de cinétique de coloration. La coloration est dépendante de la quantité de bleu de méthylène ionisé, laquelle dépend ainsi de la concentration en phospholipides. En appliquant la loi de Beer-Lambert, il est possible de relier l'absorbance à la quantité de bleu de méthylène ionisé. L'ensemble des échantillons est ainsi observé en

spectrophotométrie. 1mL de chaque solution est dilué 10 fois dans de l'éthanol absolu. Cependant, la mauvaise solubilité dans ce solvant empêche les mesures. L'éthanol est alors remplacé par du cyclohexane. Trois zones sont identifiables, une vers 270 nm correspondant aux doubles liaisons de l'huile, une vers 450 nm correspondant à l'huile brute et une vers 650 nm correspondant à la contribution du bleu de méthylène. Les solutions sont ainsi analysées entre 500 et 800nm (Figure 4-3).

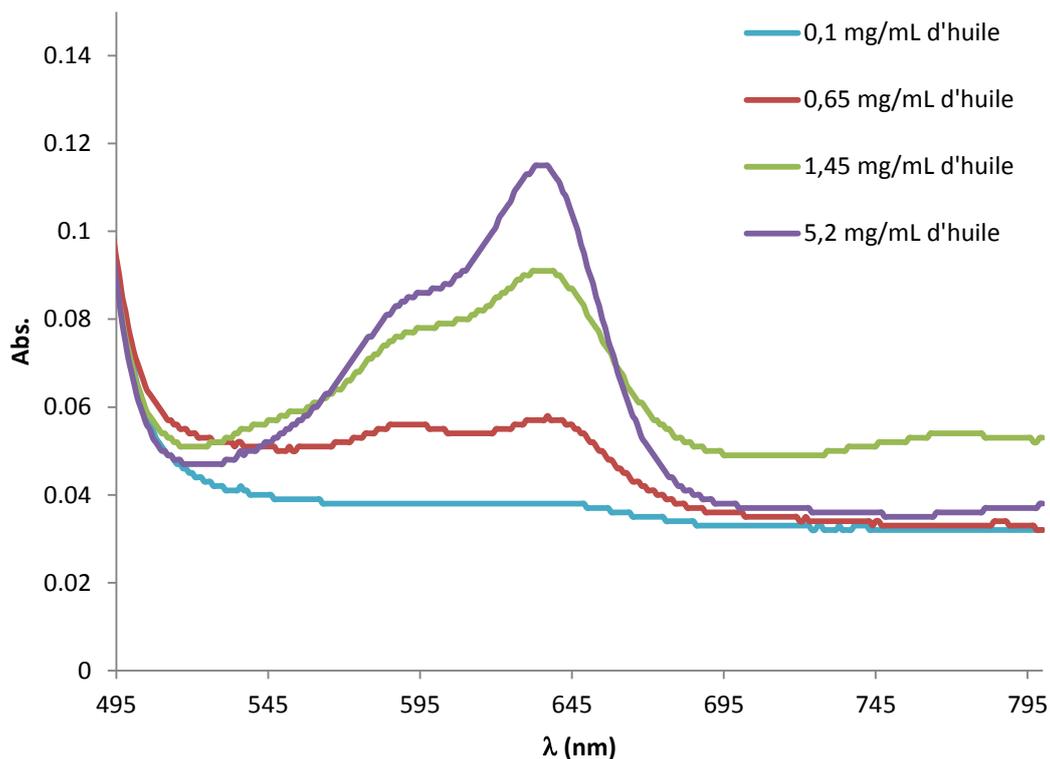


Figure 4-3. Spectre UV/Visible (de 495 à 795nm) d'une huile de colza à différentes concentrations de lécithine de soja, en présence de bleu de méthylène et après dilution 1/10 dans le cyclohexane.

Une évolution de l'absorbance est ici visible en fonction de la concentration en phospholipides. Si l'absorbance des 2 pics à 635 et 597nm est mesurée, elle peut se relier à la quantité de phospholipides. Aucune régression linéaire n'est cependant possible (Figure 4-4), au vu de la trop faible absorbance et précision du point à 0,1mg/mL. Ainsi, il est décidé de faire des mesures sans dilution. La référence prise est une huile sans bleu de méthylène (Figure 4-5). L'absorbance se mesure ici très bien même à une faible concentration de phospholipides. Cependant, le facteur cinétique n'est pas pris ici en compte. Il est ainsi intéressant de réaliser des mesures après différents temps écoulés depuis l'ajout du colorant. Pour diminuer l'influence de l'éthanol dans l'augmentation de la polarité du milieu, une solution de bleu de méthylène plus concentrée est réalisée avec 35mg de bleu de méthylène dissous dans 25mL d'éthanol. De façon à

améliorer la régression et l'analyse, celle-ci sera effectuée en microplaque en suivant de façon quasi-simultanée l'évolution de l'absorbance de plusieurs échantillons.

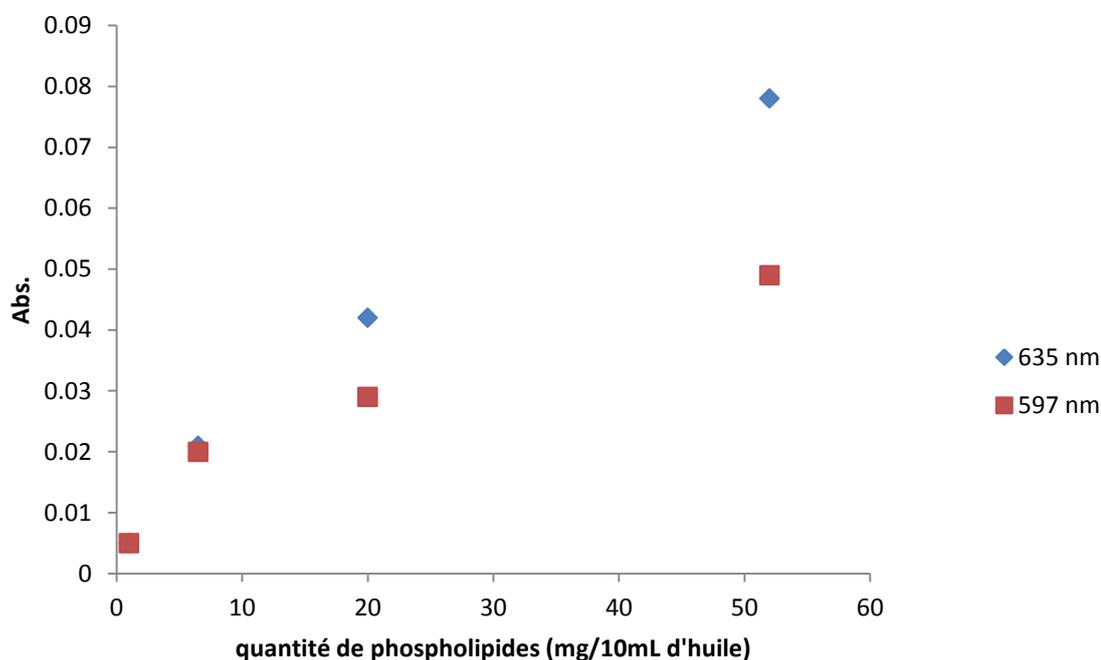


Figure 4-4. Evolution de l'absorbance à 635 et 597nm d'une huile diluée dans le cyclohexane en fonction de la quantité de phospholipides

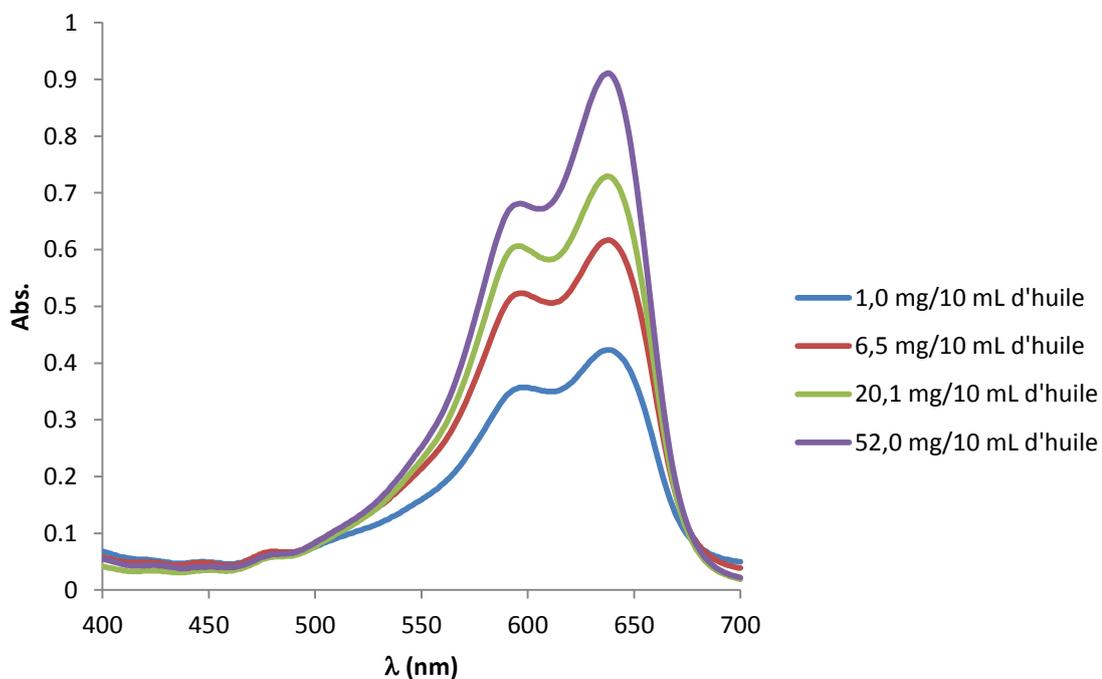


Figure 4-5. Evolution du spectre UV/Visible d'une huile additivée de phospholipides (référence : huile de colza)

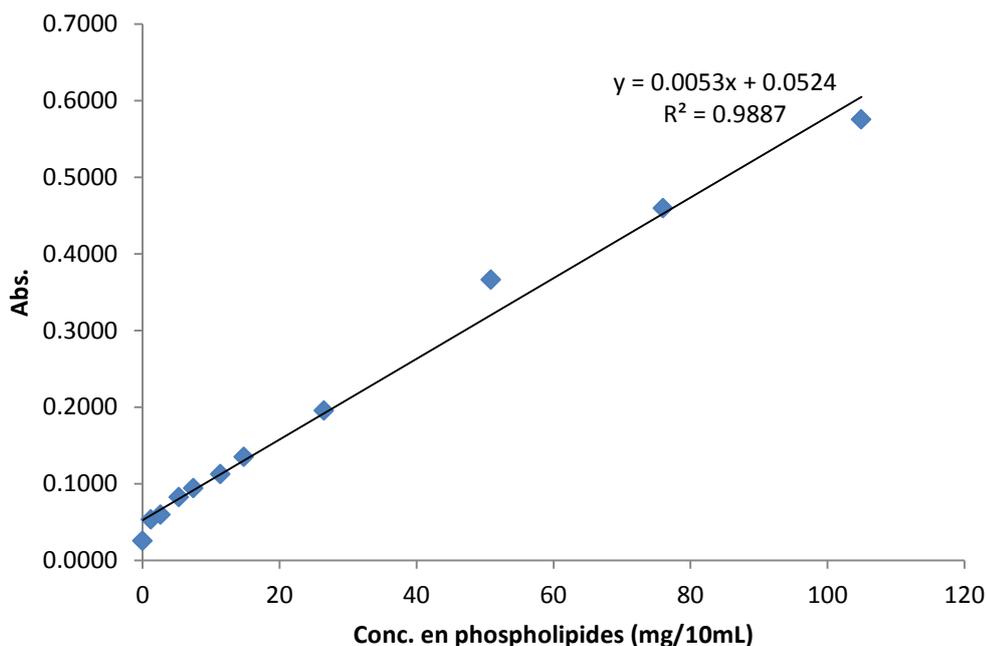


Figure 4-6 . Evolution de l'absorbance du bleu de méthylène (664 nm) dans une huile de colza selon la concentration en phospholipides

11 étalons sont ainsi préparés avec les pourcentages de phosphatidylcholine de soja suivants (en mg/10mL) : 0 ; 1,22 ; 2,63 ; 5,31 ; 7,43 ; 11,35 ; 14,79 ; 26,49 ; 50,88 ; 75,99 ; 104,95

50 μ L de la solution de bleu de méthylène sont ajoutés aux étalons. Ces derniers sont vigoureusement agités de façon à disperser le bleu de méthylène. 200 μ L de chaque solution sont ensuite versés en triplicat dans une microplaque. Cette plaque est alors analysée à 25°C et le spectre de chaque puits entre 500 et 800nm (résolution de 2nm) est enregistré toutes les 100 secondes pendant 250 minutes et le calcul $Abs(654nm) - Abs(800nm)$ est ensuite effectué pour soustraire la valeur de la ligne de base à l'absorbance correspondant au bleu de méthylène ionisé. L'ensemble des étalons montre une absorbance qui va globalement augmenter avec le temps d'analyse, peut-être du fait de la lente diffusion des composés dans un milieu assez visqueux. A des temps longs, la décomposition du bleu de méthylène doit être prise en compte. Il est ainsi possible de considérer la valeur d'absorbance maximale moyenne ou d'équilibre (lorsque $dAbs/dt=0$) atteinte par un échantillon durant le temps d'analyse. Une régression linéaire de la variation de l'absorbance avec la concentration en phospholipides est obtenue avec un coefficient de détermination $R^2=0,9887$ (Figure 4-6). Ainsi, cette droite peut être utilisée pour déterminer la teneur en phospholipides (équivalent PC de soja) d'échantillons mesurés dans les mêmes conditions, ce qui est facilement réalisable en microplaque. Il est intéressant de se demander si cette méthode pourrait aussi convenir si les composés polaires à doser sont d'une autre nature que

la lécithine de soja utilisée en étalonnage. Ainsi, d'autres solutions sont préparées en mélangeant, à chaque fois, 5mL d'huile de colza raffinée avec 5mg (environ 0,1%) de :

1,2 dioléoyl PE ($\geq 99\%$) – (DOPE) ;

1,2 dioléoyl PC – (DOPC) ;

1,2 distéaroyl PC – (DSPC) ;

1,2 dilinoléoyl PC – (DLPC) ;

Sphingomyéline de jaune d'œuf ;

L(alpha-lysoPC) de jaune d'œuf – (LPC) ; 64,4% de chaînes palmitiques et 32,5% de chaînes stéariques (mesure en CG);

1,2 diacylphosphatidylsérine de cerveau bovin – (PS) 49,2% de chaînes stéariques, 37,8% de chaînes oléiques (mesure en CG) ;

phosphatidylinositol de soja (50%) – (PI) ;

acide oléique – (AO) ;

L'ensemble des solutions est analysé en spectrophotométrie. Après ajout de 50 μ L de la solution de bleu de méthylène, 200 μ L de chaque solution sont versés en triplicats dans les puits d'une microplaque. PS et PI se colorent peu de même que DOPE et DSPC au contraire de DOPC et DLPC (Figure 4-7).

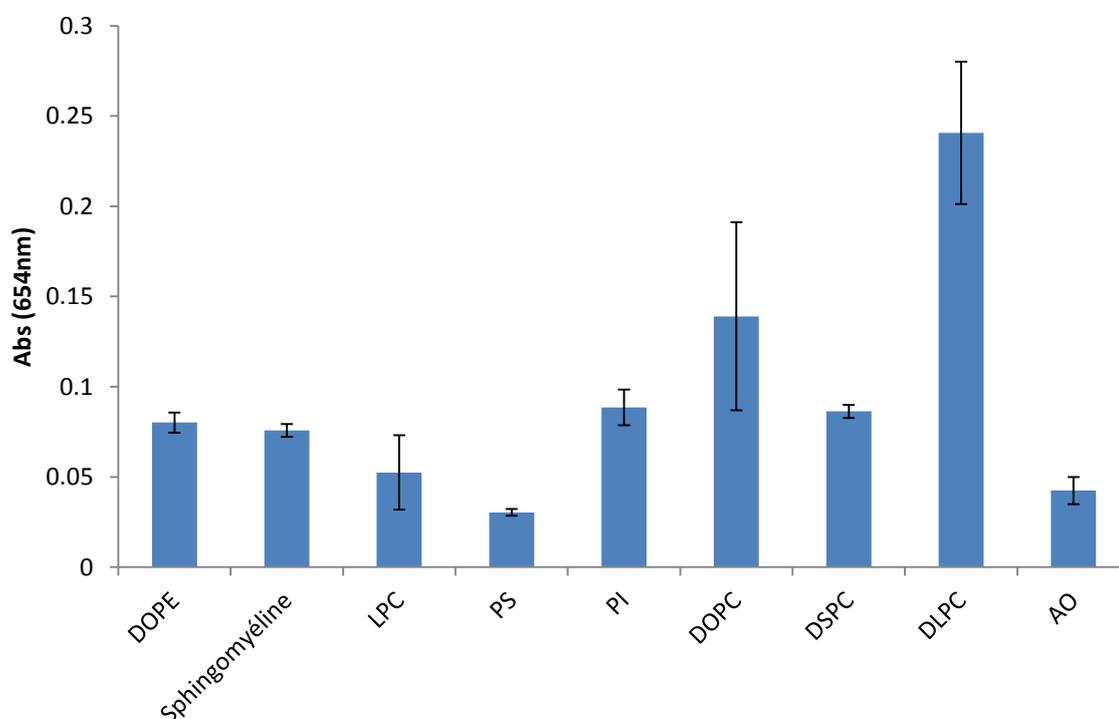


Figure 4-7. Représentation des absorbances maximales moyennes mesurées selon les composés analysés (les barres d'erreur représentent l'incertitude à 95% selon le nombre de puits mesurés).

Chaque échantillon X a été préparé 2 ou 3 fois (X_1 ; X_2 ; X_3) et chaque préparation a été mise dans trois puits ($X_{1,a}$; $X_{1,b}$; $X_{1,c}$). Chaque échantillon est ainsi représenté par 6 ou 9 puits. Le temps d'analyse n'ayant pas toujours permis d'atteindre une valeur d'équilibre, le maximum de chaque puits est mesuré selon le temps :

$\text{MAX}(X_{1,a, 0-240'})$ et la moyenne de cette valeur est calculée pour tous les puits concernant un échantillon X: $\text{MOY}(\text{MAX}(X_{i,j, 0-240'}))$ donnant les histogrammes de la Figure 4-7 .

Ainsi, il apparaît que le bleu de méthylène réagit différemment selon le composé présent. Il est très réactif pour le DLPC, un peu moins pour le DOPC et le DSPC, montrant ainsi l'importance des insaturations. Il est moins réactif pour DOPE que pour DOPC, peut-être parce que la charge positive peut s'exprimer plus facilement dans DOPE que pour DOPC (amine primaire contre amine tertiaire), alors que le bleu de méthylène, plutôt cationique, aura plus d'affinités avec un phospholipide plus anionique. Il est très peu réactif pour l'acide oléique et la phosphatidylsérine. L'acide oléique est beaucoup moins amphiphile que les phospholipides, avec une faible interaction polaire, ionique ou par liaison hydrogène avec le bleu de méthylène. Concernant la phosphatidylsérine, la même remarque peut être effectuée que pour DOPE. De plus, elle est principalement constituée de chaînes longues et peu insaturées. Le bleu de méthylène réagit aussi de façon assez faible pour la sphingomyéline et le LPC. La sphingomyéline a une tête polaire phosphocholine et sa faible réactivité peut provenir de la nature de la chaîne acyle et de la présence d'un azote supplémentaire. Enfin, la plus faible réactivité de la lysoPC, malgré une plus grande hydrophilie, ne s'explique sans doute pas uniquement par la nature de la chaîne grasse (chaînes presque exclusivement saturées) et nécessiterait une analyse plus approfondie des interactions avec le bleu de méthylène. Le nombre d'échantillons testés semble insuffisant (9 échantillons utilisables : PI est de composition trop imprécise et la trioléine est ajoutée avec une absorption nulle) pour déterminer précisément un modèle QSPR sachant qu'il faut en général un rapport (nombre d'échantillons/nombre de paramètres) supérieur à 6, ce qui ne permettrait de ne conserver qu'un seul paramètre. Cependant, des corrélations ont été recherchées entre les valeurs d'absorbance mesurées et des propriétés structurelles, chimiques, physiques ou électroniques propres aux échantillons. Celles-ci ont été calculées avec les logiciels SCIGRESS pour les propriétés électroniques principales et ADMEWORKS MODELBUILDER (voir ANNEXE 17) pour de nombreux autres descripteurs moléculaires (propriétés topologiques notamment). Etrangement, les propriétés reliées à la polarité (δ_p selon Hansen, $\log P$, polarisabilité, moment dipolaire...) n'ont pas apporté de corrélation importante, le facteur de corrélation le plus important étant à peine supérieur à 0,5 (pour la polarisabilité). Le descripteur le plus corrélé (facteur de 0,78)

est MDEC-13 (Molecular Distance Edge between all primary and tertiary Carbons : Distance moléculaire entre la limite de tous les carbones primaires et tertiaires (Liu *et al.*, 1998)). Pour ce descripteur, un carbone primaire est défini comme étant lié à trois hydrogènes et un carbone tertiaire comme étant lié à un seul hydrogène.

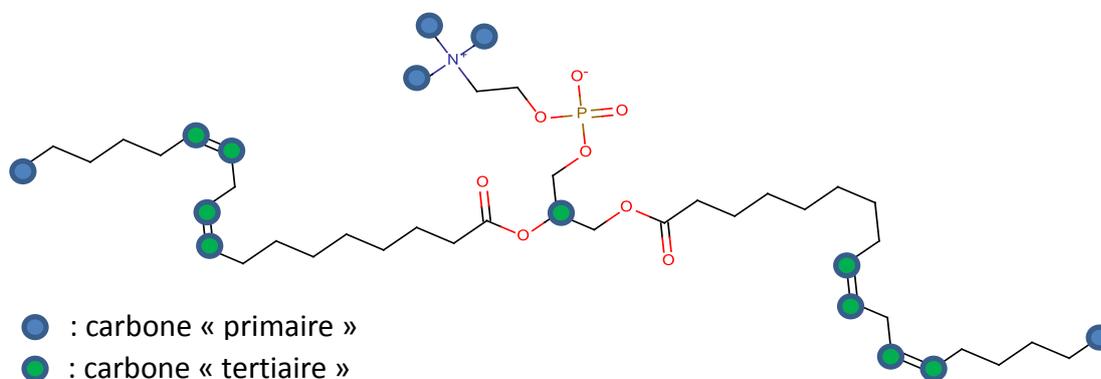


Figure 4-8. Représentation des carbones « primaires » et « tertiaires » dans DLPC

La Figure 4-8 montre bien comment ce descripteur prend en compte à la fois les différences de têtes polaires et les longueurs et insaturations des chaînes grasses. Cependant, à lui seul, il ne permet qu'un coefficient de détermination pour une fonction linéaire de l'absorbance de $R^2=0,62$. A titre d'information, si deux descripteurs sont considérés, il est possible d'obtenir un modèle avec un coefficient de détermination de 0,97.

$$\text{Abs} = 8,3 + 8,20 \cdot \text{FLXAR}_{\text{norm}} - 6,60 \cdot \text{MATS4e}_{\text{norm}}$$

Avec :

FLXAR : Masse moléculaire des atomes rigides (non flexibles)

MATS4e : Indice d'autocorrélation de Moran – moyenne sur 4 valeurs contiguës, pondéré par les volumes atomiques de Van der Waals (Moran, 1950).

Les paramètres sont normalisés : $\text{NORM}(A_i) = (A_i - \text{Moyenne}(A_i, \dots, A_n)) / \text{ECART-TYPE}(A_i, \dots, A_n)$. Si ce modèle était vérifié pour un grand nombre d'échantillons, il permettrait d'adapter cette méthode de dosage à l'ensemble des lipides polaires. Dans le cas du raffinage de l'huile, le dosage des phospholipides pourrait s'adapter au type d'huile analysé selon les compositions habituelles des phospholipides de la graine correspondante. Ces essais indiquent en tout cas que le bleu de méthylène ne réagit pas de la même façon selon le type de soluté présent. Concernant les phospholipides, la réponse dépend à la fois de la tête polaire et de la chaîne grasse. La méthode est donc un indicateur qualitatif de la présence de composés polaires dans une huile et quantitative lorsque la nature des composés polaires est connue.

4.1.iii. Spectroscopie RMN pour déterminer la composition en acides gras des phospholipides

La RMN est une technique qui peut permettre de déterminer à la fois les classes de phospholipides (^{31}P RMN) (Cansell *et al.*, 2017) et les composition des acides gras insaturés (^1H RMN). En effet, si la différenciation des acides gras saturés par RMN est délicate du fait d'une simple augmentation du signal correspondant aux hydrogènes des groupements $-\text{CH}_2-$, les acides gras insaturés induisent d'autres signaux qu'il est possible d'intégrer. Plusieurs articles décrivent une méthodologie pour déterminer la composition en acides gras par ^1H RMN d'huiles et de phospholipides (Kim *et al.*, 2013; Knothe et Kenar, 2004). En considérant une composition en acides gras insaturés comprenant uniquement les acides oléique, linoléique et linoléique, il est possible de différencier dans un premier temps l'acide linoléique de l'acide linoléique par un décalage du signal correspondant au CH_3 terminal de l'acide linoléique qui est déblindé par une double liaison proche par rapport aux acides oléique et linoléique. Les conditions d'analyse permettent de différencier les groupements CH_2 bis-allyliques $-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-$ de l'acide linoléique des groupements $-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-$ de l'acide linoléique, une différence non prise en compte dans les articles consultés. Ainsi, en intégrant ces différents signaux, il est possible d'estimer approximativement la nature des acides gras insaturés des phospholipides.

a. Application à la lécithine de soja

La lécithine de soja est analysée en RMN du proton après dilution dans du DMSO deutéré. Le spectre obtenu (Figure 4-9) révèle les différents déplacements chimiques correspondant aux chaînes grasses insaturées mais aussi au groupement phosphocholine. Pour une analyse de la composition en acides gras, l'ensemble de la zone des CH_3 est intégrée avec la valeur de référence 3. En simplifiant l'analyse par la considération des seuls acides oléique, linoléique et linoléique comme acides gras insaturés, soit L, la fraction d'acide linoléique, O, d'acide oléique, Ln, d'acide Linoléique et Sat, d'acides saturés.

$$3 \times (\text{L} + \text{O} + \text{Ln} + \text{Sat}) = 3$$

Le signal du CH_3 correspondant à l'acide linoléique, pris indépendamment, intègre à 0,27. Ainsi :

$3 \times \text{Ln} = 0,27$ et l'acide linoléique représente alors environ 9% de l'ensemble. Si les signaux des H oléfiniques sont intégrés, alors :

$$4 \times \text{L} + 2 \times \text{O} + 6 \times \text{Ln} = 3,11$$

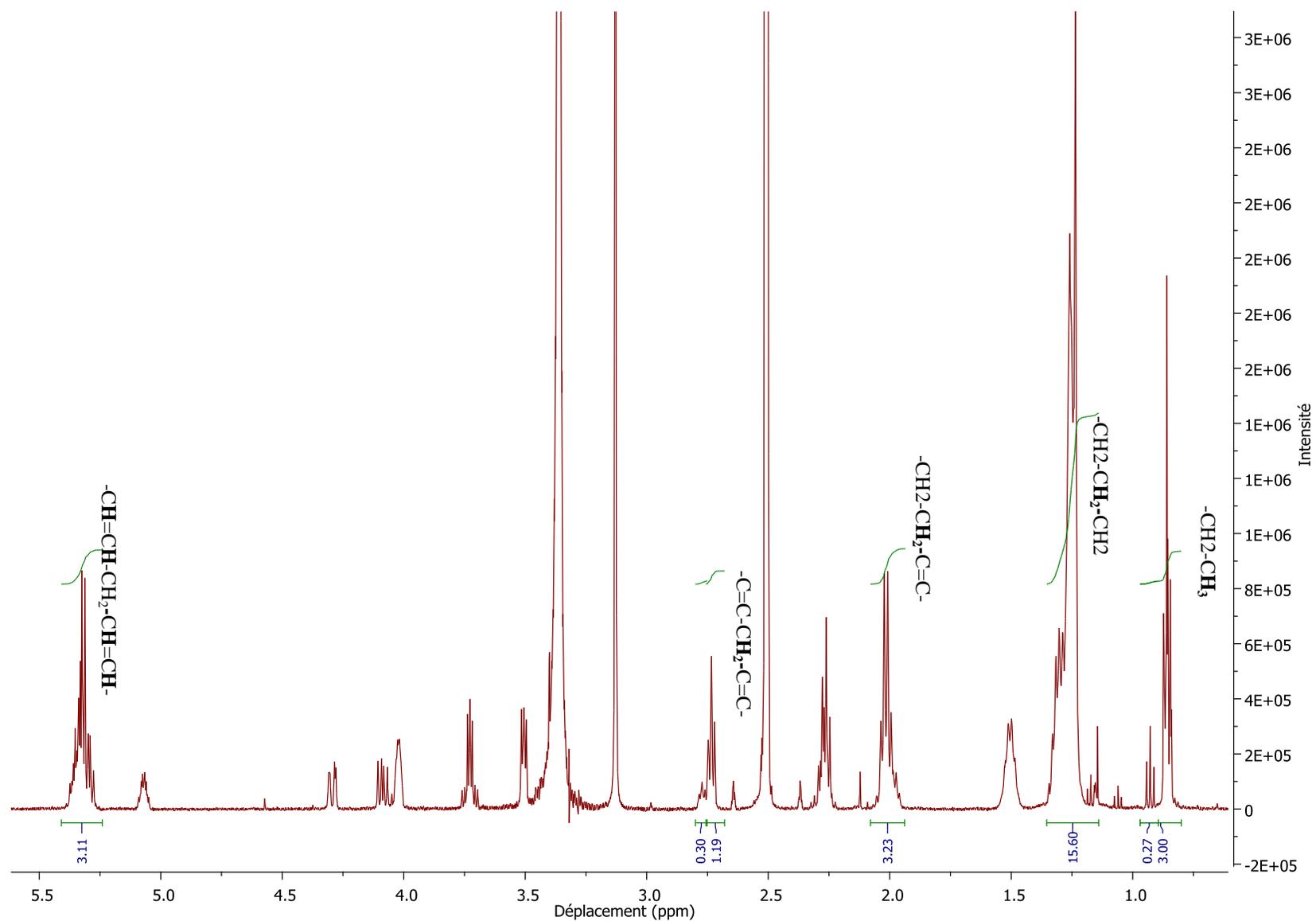


Figure 4-9. Spectre RMN ^1H de la lécithine de soja commerciale VWR (ca. 90% phosphatidylcholine) En gras, hydrogènes intégrés au déplacement chimique correspondant.

Le signal du CH₂ bis-allylique de l'acide linoléique intègre à :

$2 \times L = 1,19$, ce qui donne une concentration de l'acide linoléique d'environ 60%. Si le signal des CH₂ bis-allyliques de l'acide linoléique est considéré :

$4 \times L_n = 0,3$, ce qui donnerait ici plutôt un pourcentage de 7,5% pour l'acide linoléique. Si la même confiance est apportée à cette intégration qu'à celle du CH₃ terminal, la moyenne des deux peut être effectuée et une concentration de 8,25 % est trouvée.

Si les CH₂ allyliques sont maintenant considérés :

$$4O = 3,23 - 4 \times 0,6 - 4 \times 0,0825$$

Cela donne un pourcentage de 12,5% pour l'acide oléique. Cependant, si les hydrogènes oléfiniques sont considérés :

$2O = 3,11 - 4 \times 0,6 - 6 \times 0,0825$ Et un pourcentage de 10,75% est obtenu. La moyenne donne ainsi un pourcentage de 11,6 %. Au final, les acides gras insaturés sont fortement majoritaires avec un pourcentage d'environ 80%. La quantification précise des acides gras saturés est rendue difficile par l'intégration d'un grand nombre d'hydrogènes représentés par les groupements CH₂ équivalents, ce qui peut amener une erreur importante. Si les seuls acides stéarique (S) et palmitique (P) sont considérés, majoritaires dans les phospholipides de caméline (Cansell *et al.*, 2017), en intégrant les CH₂ équivalents :

$$24P + 28S + 14L + 8L_n + 20O = 15,6$$

$$\text{Soit : } 24P + 28S = 4,18$$

Si le total d'acides gras saturés est considéré :

$$P + S = 0,2065$$

Le système n'a alors pas de solution, l'intégration des CH₂ étant insuffisante pour considérer une telle concentration d'acides gras saturés. Même si seul l'acide le plus court (palmitique) est considéré, il faut que sa concentration descende à 17,4% pour que $24P = 4,18$. Ainsi, si la concentration en acides gras saturés est proche de 20%, au vu de la faible intégration des CH₂, les acides gras saturés sont majoritairement à moins de 18 carbones. Globalement, il ressort d'une comparaison des méthodes (Tableau 4-4) que si la méthode utilisée ici se rapproche davantage des résultats obtenus par CG, l'acide linoléique semble sous-estimé et l'acide oléique et surtout linoléique semblent être surestimés par la RMN par rapport à la CG, principalement par l'intégration des CH₃.

Tableau 4-4. Principaux acides gras constitutifs de la lécithine de soja tels que déterminés par RMN selon deux méthodes et par chromatographie en phase gazeuse (CG)

	Méthode RMN (Utilisée ici)	Méthode RMN (Kim <i>et al.</i> , 2013)	Méthode RMN (Knothe et Kenar, 2004)	CG
C18 :1	11,6	13,2	15,5	11,3
C18 :2	59,5	53,0	56,5	63,5
C18 :3	8,3	9,0	9,0	5,9
C16 :0				15,5
C18 :0	20,7	23,1	19,0	3,8

En considérant l'analyse CG et une simple statistique, les types de phospholipides suivants peuvent être estimés :

LL : 40,3%

LSat : 24,5% avec Sat comprenant un acide saturé, principalement palmitique.

LO : 14,4%

LLn : 7,5%

OSat : 4,4%

LnSat : 2,28%

OLn : 1,3%

OO : 1,3%

LnLn : 0,3%

Ainsi, les phospholipides majoritaires seraient DLPC et LPPC.

4.2. Extraction des phospholipides de l'huile

Les méthodes d'analyse précédemment présentées vont permettre de déterminer l'efficacité de plusieurs méthodes d'extraction de phospholipides de l'huile. Comme vu précédemment, les phospholipides sont généralement extraits avec l'aide de l'eau et/ou de différents solvants. La possibilité d'utiliser les ultrasons pour améliorer leur extraction en milieu aqueux a été testée. L'ajout d'eau dans une huile contenant des phospholipides va peu à peu entraîner l'hydratation de ces derniers, celle-ci étant plus ou moins favorisée selon le type de têtes polaires et chaînes apolaires rencontrées. Les phospholipides, une fois hydratés, vont préférer se mettre à une interface huile/eau plutôt que rester dispersés dans la phase huileuse. Il est donc important de favoriser le contact entre l'eau et les phospholipides. Pour cela, l'augmentation de la surface de contact entre l'huile et l'eau est l'objectif recherché. L'agitation doit permettre de disperser l'eau

dans l'huile sous forme de gouttelettes suffisamment petites pour que la surface de contact totale soit maximale. La force de cisaillement produite par des ultrasons permet d'obtenir rapidement une émulsion fine. Celle-ci sera d'autant plus stable qu'elle aura rencontré dans le milieu des molécules tensioactives. Les phospholipides peuvent donc participer à la stabilité de cette émulsion. Selon la concentration d'eau et de phospholipides, ces derniers pourront s'organiser de différentes façons (émulsion, micelles, vésicules...). Du fait de la présence d'eau dans l'organisation des phospholipides, ces derniers vont peu à peu décanter en fonction de la taille de leur structure. Une centrifugation peut donc être effectuée pour accélérer ce phénomène. En pied de solution, un concentrat de phospholipides, qui pourra contenir encore de l'eau et de l'huile, est ainsi récupéré. Plusieurs essais ont été effectués en solubilisant de la lécithine de soja dans de l'huile de colza raffinée. L'huile est ensuite additionnée d'eau (1%) et traitée aux ultrasons pour récupérer un précipité. 4 essais sont effectués avec 50mg de lécithine dans 10mL d'huile et 4 essais sont effectués avec 100mg de lécithine dans 10mL d'huile. Une fois les phospholipides solubilisés, 100 μ L d'eau distillée sont ajoutés. Le traitement ultrasonore des différents essais est effectué selon plusieurs paramètres (Tableau 4-5).

Tableau 4-5. Conditions de traitement ultrasonore utilisées pour extraire les phospholipides ajoutés à une huile de colza raffinée

Echantillons	Pulsation US ON/OFF	Amplitude	Energie et Température finale	Temps effectif
50-1	1s / 5s	30%	158J ; 31°C	1'
50-2	1s/ 5s	30%	241J ; 36°C	1'
50-3	1s/ 5s	30%	205J ; 34°C	1'
50-4	5s/ 10s	30%	999J ; 41°C	2'
50-5	5s/ 10s	30%	998J ; 39°C	2'
50-6	5s / 10s	30%	1008J ; 40°C	2'
100-1	5s/ 10s	30%	984J ; 41°C	2'
100-2	5s/ 10s	30%	976J ; 40°C	2'
100-3	5s / 10s	30%	965J ; 40°C	2'
Témoin – sans PLs	5s / 10s	30%	962J ; 39°C	2'

Une fois le traitement effectué, les différents échantillons sont laissés trois jours à 6°C. Ensuite, ils sont transvasés dans des tubes de centrifugation pour subir un cycle à 5000 x g pendant 10' à température ambiante. Le précipité est alors récupéré et mélangé à 2mL d'acétone froide. Après

centrifugation, un nouveau précipité est récupéré. Sa masse indique qu'il contient encore de l'huile et autres composés. L'ajout d'acétone est encore réalisé deux fois jusqu'à obtenir un dernier précipité. Ce dernier sera analysé en HPLC/ELSD. Ces quelques essais ne montrent pas de différence significative sur la pureté des extraits récupérés et sur le pourcentage de récupération (Tableau 4-6). Les résultats ont une faible reproductibilité du fait de tâches manuelles et non automatisées (récupération d'huile sur tube centrifugé par pipetage) effectuées sur de petites quantités de produits. De même, malgré l'utilisation de l'acétone, il apparaît un appauvrissement insuffisant du précipitat en lipides et eau. Le solvant semble ne pas réussir à pénétrer l'organisation des phospholipides.

Tableau 4-6. Bilan des essais de récupération des phospholipides

	Masse de précipité après trois purifications (mg)	Pureté HPLC	% de récupération
Essais 50 mg (1s/5s)	54 ± 8	52,6 ± 10,6	71,5 ± 10,7
Essais 50 mg (5s/10s)	72 ± 3	39,6 ± 1,7	57,3 ± 3,1
Essais 100mg (5s/10s)	245 ± 88	26,7 ± 15,6	62,9 ± 26,8

Ainsi, au vu de ces éléments, des essais d'extraction vont être menés sans utilisation de solvant organique et en appauvrissant le précipité en huile par des cycles de centrifugation. 4 essais sont effectués avec 100mg de lécithine de soja introduits dans 10mL d'huile raffinée de colza. Le traitement ultrasonore est effectué à une pulsation de 1s/5s, 30% d'amplitude pendant 1 minute effective avec une moyenne d'énergie apportée au système de $234J \pm 10J$ (valeur calculée automatiquement par le générateur d'ultrasons). La quantité d'eau ajoutée est de 1mL dans le premier tube pour déterminer si cela permet d'améliorer la récupération des phases et de 100 μ L pour les autres. Ici, une homogénéité plus importante des rendements d'extraction est obtenue (Tableau 4-7). Le premier essai, avec une quantité d'eau plus importante amène un décantat plus important. Ainsi, une partie de la phase aqueuse a été prélevée par pipetage, ce qui a certainement entraîné une perte de phospholipides. Le rendement d'extraction supérieur à 100% pourrait s'expliquer par une déviation des paramètres d'analyse HPLC avec le temps. La courbe d'étalonnage correspondant au PC est polynomiale d'ordre 2 avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0,98084$. L'incertitude de tous les points étalons (chaque point étalon ayant été mesuré trois fois, il est possible d'utiliser une incertitude à 95% d'intervalle de confiance de ces derniers pour construire les courbes limites) permet de revenir à des valeurs de rendement plus cohérentes.

Dans tous les cas, un procédé sans solvant permet une meilleure récupération des phospholipides mais est insuffisante, aux volumes utilisés, pour obtenir une haute pureté d'extrait.

Tableau 4-7. Bilan des essais de récupération des phospholipides sans solvant (pté : précipité)

Echantillons	Centrifugation		Bullage		Centrifugation		Centrifugation		HPLC/ELSD	
	Masse pté (mg)	Pureté max. (%)	%PC dans pté	% de récupération						
100-I	2249	4,48	>899,3	11,21	123	81,77	97,6	100	73,8	72±27
100-II	647	15,52	570	17,62	135	74,62	130,8	76,7	84,3	110±36
100-III	669	15,04	643	15,65	232	43,42	220,3	45,7	58,4	128±10
100-IV	805	12,45	772	13,00	200	50,25	187,1	53,6	63,9	119±27

4.3. Extraction de l'huile des graines de caméline

4.3.i. Composition lipidique de l'huile des graines

Les graines de caméline utilisées ont une composition en huile de 40,5% selon une extraction de Folch. La teneur en phospholipides et leur distribution peuvent être détaillées (Tableau 4-8). Les phospholipides de la graine de Caméline semblent être quasi-exclusivement composés de phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC) et phosphatidylinositol (PI), les autres classes n'ayant pas été détectées en chromatographie. En additionnant les teneurs de ces trois classes, une concentration de $0,92 \pm 0,11\%$ est obtenue dans la graine de caméline. En se référant à la bibliographie (Tableau 1-6), il est possible de comparer ces valeurs à celles d'autres graines et de constater que la teneur en phospholipides est proche de celles du tournesol et du lin mais semble inférieure à celles du colza.

Tableau 4-8. Distribution des classes de phospholipides dans la graine de caméline (IC= 68%).

	PE	PC	PI	TOTAL
Teneur en PL de l'huile (%)	$0,26 \pm 0,11$	$1,70 \pm 0,09$	$0,32 \pm 0,02$	$2,28 \pm 0,20$
Teneur en PL des graines (%)*	$0,10 \pm 0,05$	$0,69 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,08$
Composition relative (%)	$11,0 \pm 4,3$	$74,9 \pm 4,0$	$14,1 \pm 0,7$	100

*Note : La teneur en PL des graines est déduite de celle de l'huile extraite considérant le pourcentage d'huile (40,5%) des graines

De même, concernant les classes de phospholipides, la teneur en PC des phospholipides de la caméline en fait une des graines les plus concentrées en ce composé (voir Tableau 1-7). Mansour *et al.* avaient également déterminé une prédominance importante de PC+PI (79%) par rapport à PE (7%) dans les phospholipides de caméline mais avaient aussi détecté de l'acide phosphatidique (5%) et un peu de phosphatidylsérine (1%) (Mansour *et al.*, 2014). A titre comparatif, la teneur en phospholipides peut être déterminée pour des variétés obtenues auprès de fournisseurs français divers, comme des graines de chia, variété ORURO®, provenant de la société PANAM (Villemur sur Tarn, France), du colza Campus provenant de la société Momont (Mons-en-Pévèle, France) ou des amandes de tournesol très haut oléique provenant de ARTERRIS (Castelnaudary, France).

Tableau 4-9. Teneur en phospholipides de diverses graines et distribution relative (% rel.) des classes

	Teneur en PL (% des graines)	PA (% rel.)	PE (% rel.)	PC (% rel.)	PI (% rel.)
Caméline	0,92		11,0	74,9	14,1
Colza Momont	1,08		7,5	83,8	8,7
Tournesol THO (Amandes)	0,97	5,2	11,6	68,0	15,2
Chia Oruro	0,62		8,3	77,9	13,8

Le Tableau 4-9 montre que l'ensemble des graines étudiées possède une majorité de PC avec des pourcentages relatifs proches. Au niveau de la teneur en phospholipides des graines, seule la graine de chia semble se situer en dessous des autres. Concernant la distribution des acides gras de l'huile et des phospholipides de la graine de caméline, de fortes disparités peuvent s'observer (Tableau 4-10). En considérant les phospholipides de la graine de caméline, il apparaît que les acides gras majoritaires sont l'acide oléique, linoléique, palmitique et linoléique avec une majorité d'acides gras mono- ou polyinsaturés. Les principales différences avec les valeurs issues de la littérature (Cansell *et al.*, 2017) sont une plus faible quantité d'acides gras saturés et un acide oléique plus concentré. Concernant l'huile, peu de différences sont notables entre les deux études. Par rapport aux phospholipides, l'huile contient davantage d'acides gras mono- et polyinsaturés mais l'acide oléique est bien moins concentré tandis que l'acide gondoïque devient significatif. De même, l'acide linoléique augmente fortement au détriment de l'acide linoléique, un comportement similaire étant observé dans les résultats de Cansell *et al.* Il importe de signaler que les phospholipides, comme cela a pu être souvent observé, s'arrangent souvent avec l'association d'une chaîne saturée et d'une chaîne insaturée. Ils ont ainsi généralement une plus forte

concentration en acides gras saturés que les huiles correspondantes, phénomène accentué dans les valeurs issues de la littérature (Cansell *et al.*, 2017).

Tableau 4-10. Distribution des acides gras des lipides neutres et polaires de la graine de caméline (entre parenthèses, compositions déterminées sur un tourteau de Caméline par (Cansell *et al.*, 2017))

Acide gras	Acides gras de l'huile (%)	(Cansell <i>et al.</i> , 2017)	Acides gras des phospholipides (%)	(Cansell <i>et al.</i> , 2017)
Acide palmitique (C16 :0)	6,0 ± 0,0	(7,2)	15,8 ± 0,1	(18,4)
Acide stéarique (C18 :0)	2,8 ± 0,0	(2,1)	3,3 ± 0,2	(6,1)
Acide arachidique (C20 :0)	1,5 ± 0,0	(1,1)	0,0 ± 0,0	(0,1)
Acide béhénique (C22 :0)	0,3 ± 0,0	(ND)	0,3 ± 0,0	(ND)
TOTAL SATURÉS	10,6 ± 0,1	(12,2)	19,3 ± 0,3	(27,8)
Acide oléique (C18 :1)	14,2 ± 0,0	(13,8)	32 ± 0,5	(21,4)
Acide vaccénique (C18 :1 n-7c)	0,8 ± 0,0	(1,1)	1,6 ± 0,0	(0,7)
Acide gondoïque (C20 :1)	14,5 ± 0,1	(10,8)	1,6 ± 0,0	(1,5)
Acide érucique (C22 :1)	2,5 ± 0,0	(2,2)	0,0 ± 0,0	(ND)
TOTAL MONOINSATURÉS	32,0 ± 0,2	(29,7)	35,3 ± 0,5	(24,4)
Acide linoléique (C18 :2)	19 ± 0,0	(21,2)	29,7 ± 0,0	(26,1)
Acide linoléique (C18 :3)	34,8 ± 0,3	(33,3)	14,9 ± 0,2	(14,6)
Acide eicosadiénoïque (C20 :2)	2,2 ± 0,0	(ND)	0,5 ± 0,0	(ND)
Acide eicosatriénoïque (C20 :3)	1,4 ± 0,0	(ND)	0,2 ± 0,0	(ND)
TOTAL POLYINSATURÉS	57,3 ± 0,3	(56,2)	45,4 ± 0,2	41,8

4.3.ii. Graines natives

Plusieurs méthodes sont utilisables pour extraire l'huile des graines. L'utilisation d'un solvant sur des graines broyées comme l'hexane ou d'un mélange de solvants chloroforme/méthanol permet d'extraire à la fois les lipides polaires et apolaires. Un procédé intégré en milieu aqueux permet aussi de les extraire sous forme d'une émulsion d'oléosomes. Cependant, du fait de la libération des enzymes endogènes, notamment phospholipases, l'huile extraite est appauvrie en phospholipides et peut être enrichie en acides gras libres. Pour éviter l'utilisation de solvants aqueux ou organiques, seule une action thermomécanique est alors utilisable pour effectuer une extraction solide/liquide. Pour que celle-ci soit efficace, il faut donc que les produits à extraire

soient sous forme liquide et que leur écoulement soit facilité par une diminution des forces d'interaction solide-liquide et liquide-liquide (viscosité suffisamment faible). Le niveau de contraintes requis peut se retrouver dans une presse monovis.

Plusieurs essais de trituration des graines de caméline ont ainsi été effectués selon diverses conditions. Les phospholipides des graines de caméline sont principalement à base d'acides gras insaturés. Cependant, ils sont légèrement plus riches en acides gras saturés que les triglycérides. Il est ainsi prévisible que leur écoulement sera un peu moins aisé que celui de l'huile. De même, il faut considérer leur présence au sein d'organisations lamellaires ou bilamellaires dont la fluidité peut être insuffisante aux températures utilisées. En effet, les bicouches phospholipidiques peuvent passer d'un état « gel » à un état « fluide » à partir d'une certaine température. Si ces états définissent davantage une mobilité moléculaire (Krishnamurty *et al.*, 2008b) au sein de l'organisation, il peut tout de même être important de se situer au-dessus de cette température. La déshydratation du milieu joue également un rôle dans l'organisation des phospholipides et la température de transition. La nature des graines et de la monovis ne permettent pas une modularité de la température. En effet, à une température trop basse, le milieu ne peut s'écouler, principalement au niveau de la partie solide qui n'est pas suffisamment lubrifiée. Cela impose d'être à une température supérieure à 80°C. Cette température est bien au-dessus des températures de fusion des lipides, phospholipides (seuls ou en phases lamellaires). Il est donc inutile de l'augmenter davantage. Le taux d'humidité du milieu peut cependant être modifié. Les phospholipides contenus dans les graines de caméline ont une certaine solubilité à l'huile, étant principalement solubles dans cette phase. Cependant, lors du pressage des graines, ce sont surtout les corps lipidiques qui vont libérer leur contenu tandis que les phospholipides resteront dans des zones interfaciales. Augmenter ou diminuer le taux d'humidité des graines pourrait agir sur ces zones interfaciales et avoir pour conséquence une modification de l'extractabilité des phospholipides dans l'huile exprimée. Ainsi, trois lots de graines vont être testés.

1. Graines natives à 8,24 % \pm 0,06 d'humidité
2. Graines à 4% d'humidité (séchage à l'étuve à 50°C de graines natives jusqu'à obtention d'une masse correspondant à environ 4% d'humidité).
3. Graines à 15% d'humidité (ajout d'eau par pulvérisation sur les graines natives et stockage une journée en chambre à atmosphère contrôlée (25°C, 45% d'humidité) jusqu'à obtention d'une humidité de 15%.

Pour chaque lot de graines, un essai de trituration est mené en presse monovis en essayant de conserver une température élevée en sortie de fourreau. Cependant, le pressage ne se fait pas de façon similaire dans les trois cas, le taux d'humidité des graines ayant une forte influence sur l'extraction d'huile (Tableau 4-11).

Tableau 4-11. Conditions d'extraction de l'huile en presse monovis sur des graines de Caméline.

Taux d'humidité	Diamètre orifice (mm)	T° anneau chauffant	Rendement/Graine sèche -1° passage	Rendement total/Graine sèche
Native (8%)	8	50	23,9	29,3
4%	10	40	24,3	26,7
15%	8	50	22,9	

Au vu des difficultés de trituration, le plus haut taux d'humidité ne permet pas l'expression d'huile au premier passage. En augmentant la vitesse de rotation de la vis d'entraînement, le tourteau arrive tout de même à être entraîné mais il faut le passer au moins cinq ou six fois pour réussir à extraire une quantité significative d'huile. Au plus faible taux d'humidité, le passage du milieu impose un diamètre d'orifice plus grand, cela pouvant être lié à un manque de lubrification ou à une dureté plus importante du milieu. 5g de chaque huile récupérée sont, après centrifugation, additivés de 25 μ L d'une solution éthanolique de bleu de méthylène à 0,5mg/1mL. 200 μ L de chaque échantillon sont ensuite versés dans les puits d'une microplaque (en triplicat) et le spectre entre 400 et 800nm est enregistré toutes les 100 secondes pendant 4 heures. De même, 200 μ L d'huile non additivée de bleu de méthylène sont aussi ajoutés à titre de comparaison.

Concernant les graines au taux natif d'humidité (8%), le pressage monovis permet l'extraction d'une huile avec un rendement autour de 24% de la masse des graines. Cependant, cette huile ne permet pas l'expression de la coloration du bleu de méthylène, et elle ne contient certainement qu'une très faible quantité de phospholipides. Le pressage du tourteau permet d'augmenter un peu le rendement total d'extraction. L'huile extraite alors montre un pic à 664 nm mais ce dernier est aussi visible sans l'ajout de bleu de méthylène et n'est donc sans doute pas dû aux phospholipides mais à un autre composé absorbant à cette longueur d'onde (Figure 4-10). Il peut ainsi s'agir de la chlorophylle. Un dosage en CG des huiles obtenues ne permet pas de déceler la présence de phospholipides, ce qui rejoint les observations faites

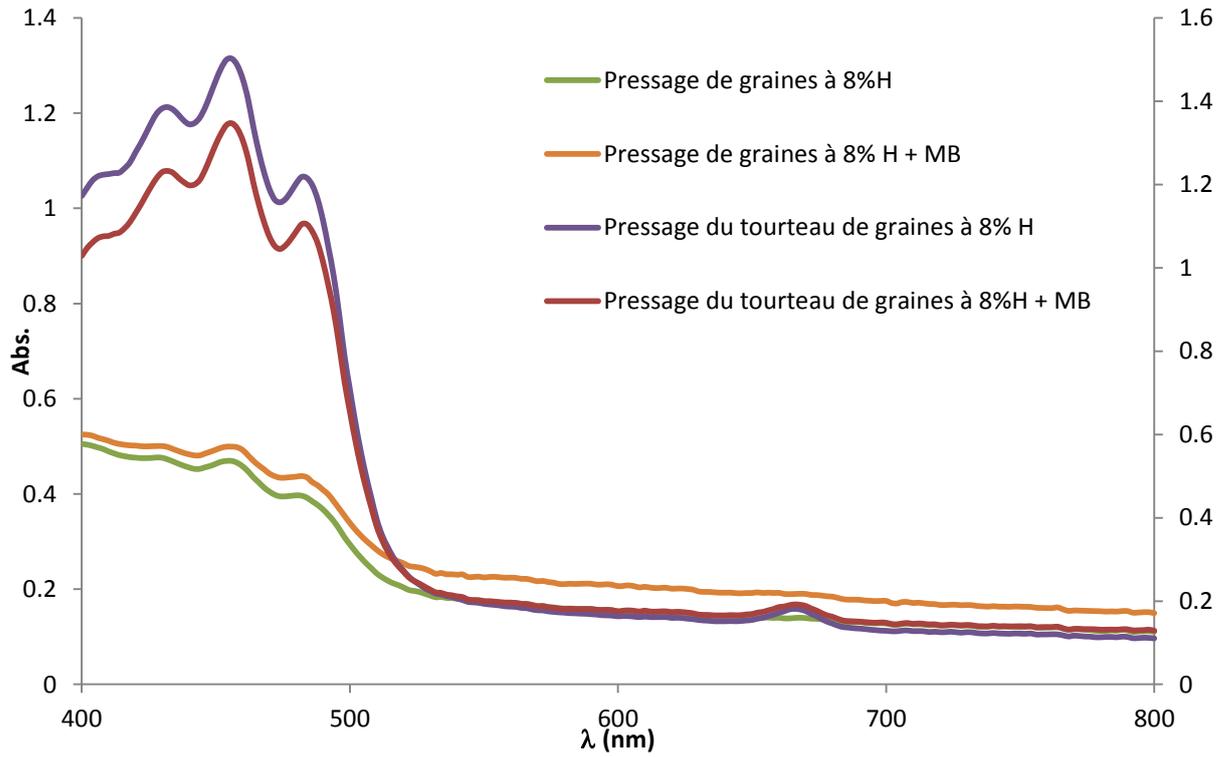


Figure 4-10. Spectres d'absorbance dans le visible des huiles extraites à partir de graines à 8% d'humidité (8% H)

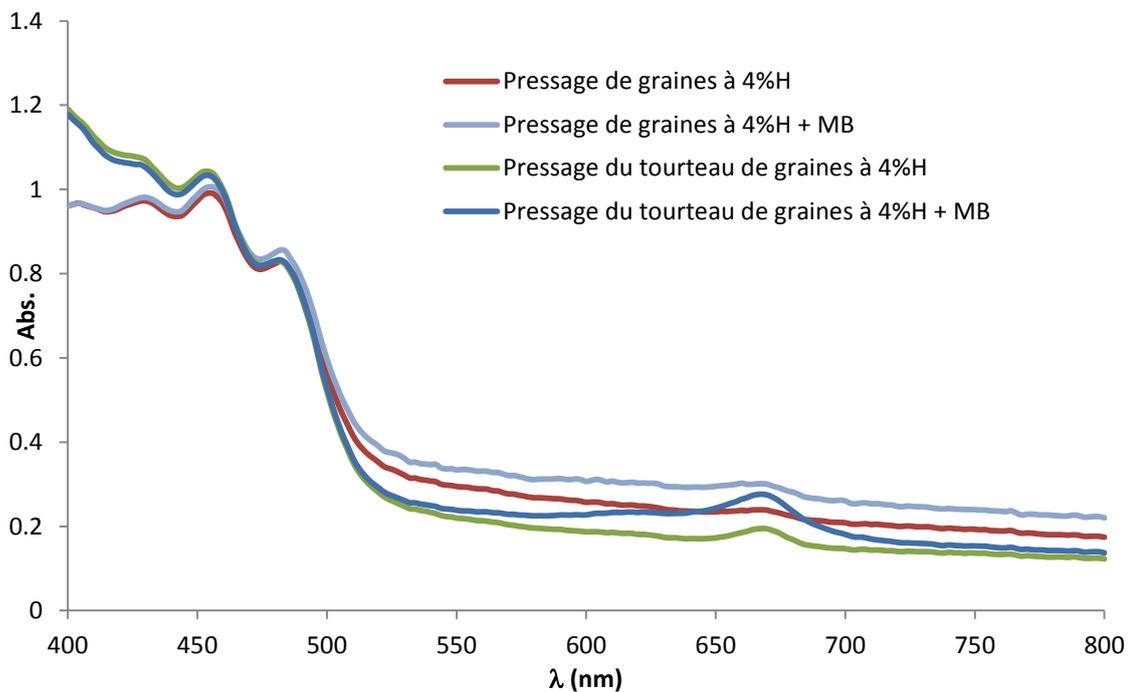


Figure 4-11. Spectres d'absorbance dans le visible des huiles extraites à partir de graines à 4% d'humidité

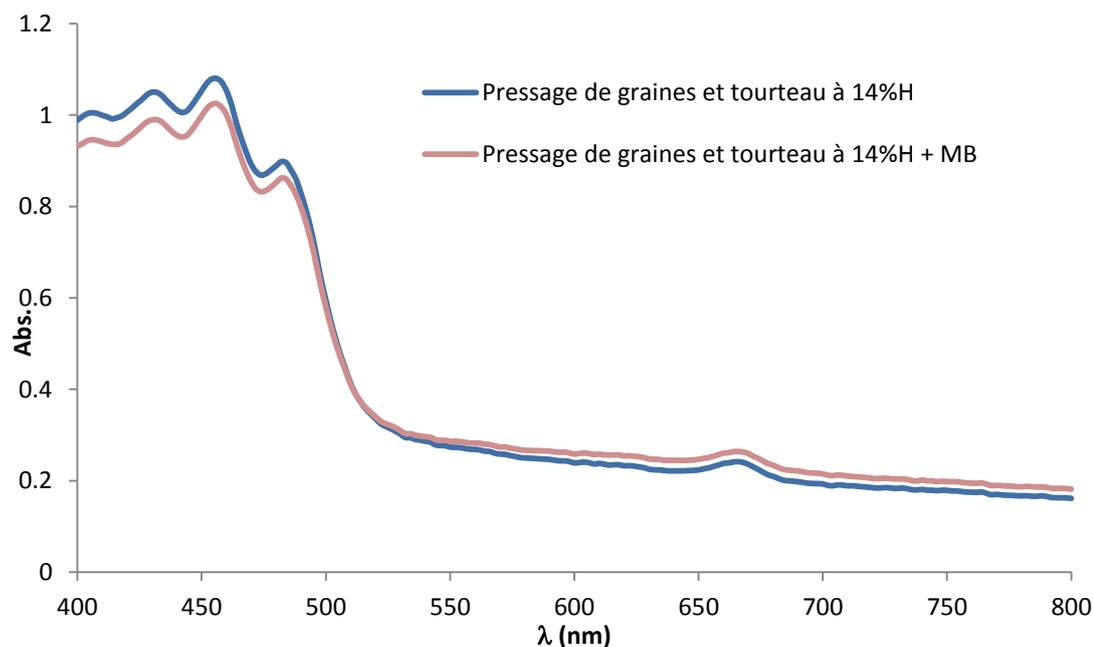


Figure 4-12. Spectres d'absorbance dans le visible des huiles extraites à partir de graines à 15% d'humidité

Dans le cas d'un pressage des graines à 4% d'humidité (Figure 4-11), le premier pressage montre déjà une légère bande d'absorption à 664 nm, légèrement agrandie par le bleu de méthylène, ce qui semble indiquer une présence de phospholipides. Lors du pressage du tourteau, le rendement semble plus faible qu'avec les graines à 8% d'humidité. Par contre, la bande à 664 nm est encore plus visible et se détache de celle sans bleu de méthylène, indiquant la possible présence de phospholipides dans cette huile. Dans le cas d'un taux d'humidité à 15% (Figure 4-12), l'huile extraite ne montre pas la présence de phospholipides mais a certainement permis l'extraction de chlorophylle. La partielle hydratation des phospholipides et de leur milieu environnant qui peut intervenir à des taux d'humidité élevés a pu augmenter les interactions polaires entre les protéines, glucides et les phospholipides du tourteau, diminuant l'extractabilité de ces derniers dans la phase liquide, cela malgré la température et les contraintes subies. De même, un fort taux d'humidité peut diminuer la probabilité de rencontre et donc de coalescence des oléosomes, conduisant à leur extraction. Ainsi, s'il semble que l'extraction des phospholipides est plutôt favorisée à un taux d'humidité faible, une diminution trop importante de ce dernier rend la trituration des graines plus compliquée. Il devient alors plus intéressant de travailler sur le tourteau enrichi en phospholipides.

4.3.iii. Graines de caméline démulcinées

Des graines ayant subi une démulcinage classique (traitement à 10% dans l'eau dans la canalisation à ultrasons sous moteur mécanique à 1000tpm, ultrasons à 100% d'amplitude 5s

ON/20s OFF, 55 minutes de traitement) ont été récupérées et chauffées à l'étuve à 30°C pendant 36 heures. Elles ont alors un taux d'humidité de $4,76 \pm 0,04$ (IC=95%). Au vu du chapitre précédent, ce taux d'humidité est trop faible pour une extraction correcte de l'huile. Ainsi, de l'eau distillée est vaporisée sur les graines. Celles-ci sont alors placées dans une chambre à atmosphère contrôlée (25°C, 45% d'humidité) pendant 4 heures. Elles sont à nouveau additionnées d'eau distillée et remises encore quatre heures en enceinte climatique. Au total, 1049g de graines de caméline dé mucilaginées sont ainsi obtenues avec un taux d'humidité final de 7,6%. Les mêmes conditions que pour des graines natives sont utilisées car les taux d'humidité sont équivalents (diamètre d'orifice 8mm, température au niveau de l'anneau chauffant de 50°C, 2 passages). L'extrait huileux est récupéré et centrifugé 10 minutes à 5000xg pour éliminer les résidus solides. Ainsi, 347,3g d'huile sont récupérés. Le rendement d'extraction sur graines sèches est ainsi de 35,8%, ce qui, ramené à la graine non dé mucilaginée donne une valeur de 30,8% valeur similaire ou légèrement supérieure aux valeurs obtenues sur graines natives (le maximum étant alors à 29,3%). Ainsi, l'élimination de la couche externe des graines, aux potentielles actions lubrifiantes, n'a pas eu d'effet négatif sur le pressage monovis. Au contraire, cela pourrait avoir permis une légère augmentation du rendement d'extraction, le milieu étant débarrassé de produits mucilagineux qui peuvent augmenter la résistance mécanique des structures et donc diminuer leur extractabilité.

4.4. Extraction de l'huile des tourteaux

4.4.i. Composition des tourteaux

Tableau 4-12. Classes des phospholipides de l'huile de tourteaux de caméline (IC=68%)

	% de lipides	Teneur en PL des lipides (%)	PE (% des PL)	PC (% des PL)	PI (% des PL)
Tourteau de graines dé mucilaginées	16,2	7,70±0,97	15,1±1,2	74,3±0,9	10,6±0,2
Tourteau de graines natives	19,2	6,52±1,19	7,0±3,2	78,9±5,1	14,4±2,0

Alors que les phospholipides ne représentent que 2,28% des lipides de la graine et moins de 1% de l'huile extraite par pressage, leur concentration augmente à environ 8% dans l'huile du

tourteau (Tableau 4-12). Ainsi, plus de 80% des phospholipides se retrouvent dans le tourteau. Si la teneur en phospholipides d'un tourteau issu de graines dé mucilaginées est similaire à celle d'un tourteau de graines non dé mucilaginées, la composition des phospholipides est différente, les graines dé mucilaginées comportant une plus grande quantité de phosphatidyléthanolamine (PE) et moins de phosphatidylcholine (PC) et phosphatidylinositol (PI) que des graines non traitées.

4.4.ii. Utilisation d'eau

Le tourteau de graines débarrassées de leur mucilage va pouvoir être plus facilement traité en milieu aqueux. De même, ainsi débarrassé d'une grande partie des lipides non polaires et des polysaccharides et protéines mucilagineux, il est davantage concentré en phospholipides. Le but est d'utiliser les propriétés interfaciales des phospholipides pour les concentrer au sein d'une dispersion d'oléosomes natifs ou de gouttelettes d'huile dans l'eau. Le milieu obtenu étant riche en lipides, débarrassé des composés lignocellulosiques et d'une grande partie des protéines, il nécessitera moins de solvants. Les interactions entre phospholipides, protéines membranaires (Deleu *et al.*, 2010) et non membranaires peuvent freiner l'extractabilité des lipides. Ainsi, des essais sont également effectués avec la présence de sels. En effet, selon la concentration en sels, des phénomènes de salting-in (solubilisation des protéines) ou salting-out (précipitation des protéines) peuvent se produire, tel que cela peut se voir pour l'exemple d'une protéine de cheval (Figure 4-13).

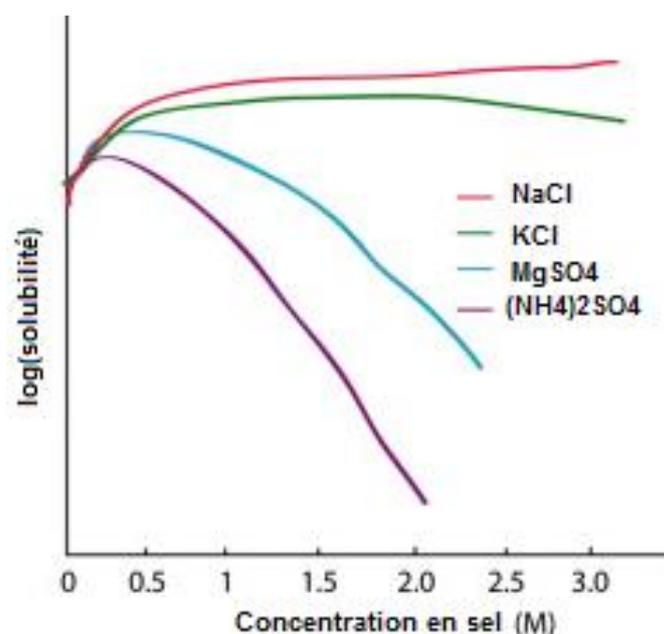


Figure 4-13. Evolution de la solubilité de la carboxyhémoglobine de cheval selon la concentration de plusieurs sels (figure extraite de la littérature (Duong-Ly et Gabelli, 2014; Green, 1932)).

A une concentration en sulfate d'ammonium de 5g/100mL, soit 0,38M, une bonne solubilisation devrait être obtenue. A une concentration en chlorure de sodium à 10g/100mL, soit 1,7M, la solubilisation des protéines devrait être encore supérieure permettant peut-être une meilleure libération des lipides.

Les solutions sont directement préparées dans des tubes de centrifugation. A chaque fois, 5g de tourteau, mis sous forme de poudre au moulin à café, sont suspendus dans 100 g de solution et agités par sonde ultrasonore à 30°C (sonde de 13mm utilisée pendant 4 cycles de 1 minute effective, à 60% d'amplitude et avec une pulsation de 5s ON/10s OFF). La température monte jusqu'à 50°C et, après agitation, les échantillons sont centrifugés à 5000xg pendant 10' à 20°C. La phase liquide est de nouveau centrifugée à 20000xg pendant 20', ce qui permet la récupération de plusieurs phases. L'extraction à l'eau distillée donne ainsi, après centrifugation, quatre phases séparables avec, de bas en haut : une couche résiduelle noirâtre (Res), une surcouche beige (S), une phase aqueuse et enfin une émulsion sous forme d'une crème peu cohésive (E). Cette dernière peut être facilement récupérée par pipetage de la phase aqueuse sous-jacente. Pour déterminer la présence de phospholipides dans les différentes phases, les résidus solides ou émulsionnés sont mélangés à 20mL d'un mélange de solvants chloroforme/méthanol (2/1). Toutes les solutions de chloroforme/méthanol sont agitées 60 secondes au vortex et centrifugées 10' à 10000xg à 20°C. Une phase haute (H) méthanolique et une phase basse chloroformique (B) sont alors récupérées et séchées sous bullage d'azote. La méthode spectrophotométrique au bleu de méthylène est alors utilisée sur les six phases obtenues, pour une estimation qualitative de la présence de phospholipides :

- E.H : extrait méthanolique de la crème concentrée par centrifugation
- E.B : extrait chloroformique de la crème concentrée par centrifugation
- S.H : extrait méthanolique de la surcouche concentrée par centrifugation
- S.B : extrait chloroformique de la surcouche concentrée par centrifugation
- Res.H : extrait méthanolique du résidu
- Res.B : extrait chloroformique du résidu

Les extraits sont additivés de 1,5 ou 3mL d'huile de colza raffinée selon la quantité de produit récupérée. L'ensemble est alors vortexé, passé dans un bain d'ultrasons 30 minutes à 30°C et filtré à 0,45µm. 5 µL d'une solution éthanolique de bleu de méthylène à 2mg/mL sont ajoutés aux échantillons filtrés. Après vortexage, 150µL de chaque préparation sont versés dans les différents puits d'une microplaque de 96 puits avec 2 répétitions dans la plupart des cas. Le balayage se fait

entre 500 et 800nm pour limiter le nombre de points. L'acquisition est réalisée pendant 4h avec une lecture toute les 100 secondes, et l'absorbance maximale à 664nm est enregistrée (corrigée avec celle à 800nm). Les extraits méthanoliques ne montrent pas de pic significatif entre 600 et 700 nm, les phospholipides se solubilisant préférentiellement dans le chloroforme. L'extrait E.B présente une absorbance comparable à celle de S.B. mais pour une dilution moitié moindre dans l'huile. Il contient donc certainement moins de phospholipides (Tableau 4-13). Une SPE et analyse chromatographique ont été effectuées sur l'échantillon S.B. présentant la plus forte absorbance. Il apparaît alors que cet extrait ne contient que 2 mg de phospholipides, ce qui représente environ 3,5% des phospholipides de la graine et est composé en majorité de PA (66%) et de PC (29%) avec une quasi absence de PE et de PI (respectivement 4,9 et 0,4%). Ainsi, l'extraction à l'eau distillée semble provoquer une forte expression des phospholipases entraînant la disparition d'une grande partie des phospholipides et la formation d'acide phosphatidique. Au final, si l'émulsion a permis de récupérer quelques phospholipides, certains phospholipides du tourteau ne semblent pas pouvoir être récupérés sans l'utilisation d'un solvant tiers.

Tableau 4-13. Evaluation de la récupération des phospholipides selon l'absorbance du milieu en présence de bleu de méthylène.

Phase	Quantité d'huile additivée	Max (Abs _{664nm} – Abs _{800nm})
E.H	1,5	0,04
E.B	1,5	0,15
Res.H	3	0,03
Res.B	3	0,12
S.H	1,5	0,03
S.B	3	0,17

L'utilisation des solutions salines n'a pas permis l'obtention d'une émulsion concentrée, une phase aqueuse trouble étant obtenue, même après centrifugation à haute vitesse (20000xg) du milieu. L'augmentation de la force ionique et de la solubilisation de protéines a certainement augmenté la répulsion électrostatique et stérique entre oléosomes, ces derniers ne flocculant pas et restant très dilués. Ainsi, l'extraction des lipides d'une telle suspension nécessiterait une grande quantité de solvants ou un traitement préalable pour diminuer la teneur en eau et/ou en protéines du milieu (ultrafiltration, augmentation de la concentration en sulfate d'ammonium, diminution du pH). Au vu de la dégradation des phospholipides observée dans l'eau distillée, cette voie n'a pas été poursuivie.

4.4.iii. Utilisation de solvants « verts »

Etant donné que l'eau ne permet pas une extraction suffisante des lipides et que les phospholipides se trouvent dégradés se pose la question d'une extraction des phospholipides par des solvants verts alternatifs. Une équipe de chercheurs (Breil *et al.*, 2017) a montré qu'un couple de solvants peu toxiques et à faible empreinte écologique (éthanol/acétate d'éthyle) permettait de se rapprocher des rendements d'extraction de lipides obtenus par le couple de solvants cancérigènes (chloroforme/méthanol). En construisant des diagrammes de phase (Ethanol/Acétate d'éthyle/Eau), ils ont montré qu'une extraction monophasique était préférable, un ajout d'eau et d'acétate d'éthyle sur l'extrait permettant ensuite de séparer une phase organique (Acétate d'éthyle) comprenant la quasi-totalité des lipides extraits et une phase hydroalcoolique (Eau/Ethanol) comprenant la quasi-totalité des sucres et protéines.

En s'inspirant de ces travaux, plusieurs essais sont réalisés sur un tourteau de caméline, avec à chaque fois 5g de broyat de tourteau issu d'un pressage monovis de graines de caméline démulcinées. Après mise en présence du broyat et de 100mL de solvant dans des tubes coniques, l'ensemble est vortexé 30 secondes. Certains échantillons sont soumis à un traitement ultrasonore (1min effective à 60% d'amplitude et avec une pulsation de 5s ON/10s OFF) :

A : Ethanol pur

B : Ethanol pur avec traitement ultrasonore

C : Acétate d'éthyle pur

D : Acétate d'éthyle avec traitement ultrasonore

E : Acétate d'éthyle/Ethanol 7/3

F : Acétate d'éthyle/Ethanol 7/3 avec traitement ultrasonore

G : Acétate d'éthyle/Ethanol/Eau 14/6/3 avec traitement ultrasonore

H : Chloroforme/Méthanol 2:1

Après agitation, les différents tubes sont centrifugés 10' à 5000xg à 20°C. Les phases surnageantes sont toutes monophasiques. Les tubes E, F, G sont donc additionnés de 4mL d'eau distillée et la référence H de 4mL d'eau à 0,6% de KCl. Ensuite, E, F, G sont additionnés de 4mL d'acétate d'éthyle et la référence de 4mL de chloroforme pour accentuer le déphasage. Celui-ci restant insuffisant pour une séparation efficace des phases, les phases surnageantes sont mises sous évaporation rotative pour éliminer les $\frac{3}{4}$ du solvant. Le résidu est ensuite rincé à l'éthanol (A

et B), l'acétate d'éthyle (C, D, E, F, G) ou le chloroforme (H). Une partie de l'extrait G (138mg) ne se dissout pas dans l'acétate d'éthyle et est dissoute dans le chloroforme (G'). Les produits récupérés montrent ainsi un déphasage dans les cas E-H avec une phase (hydro)alcoolique supérieure, une phase intermédiaire trouble et une phase organique inférieure. Les phases supérieures sont prélevées après centrifugation 10' à 5000xg. Elles sont alors mises à sécher sous flux d'azote. Les phases inférieures et intermédiaires sont mises sous bullage d'azote. Il est possible ainsi de déterminer le rendement d'extraction de chaque essai (Figure 4-14). Le tourteau ne contenant que 16,2% d'huile selon une extraction de Folch, des rendements supérieurs à cette valeur signifient que des composés non lipidiques ont également été extraits. Les essais effectués avec de l'éthanol ou de l'acétate d'éthyle purs ont des rendements similaires. Il semble cependant que l'utilisation des ultrasons permette d'augmenter ces derniers au vu des valeurs supérieures des essais B, D par rapport à A, C. Dans le cas du mélange d'éthanol avec l'acétate d'éthyle, les ultrasons augmentent également la quantité de produit dissoute dans l'acétate d'éthyle (E et F), le milieu devenant ainsi certainement plus riche en lipides.

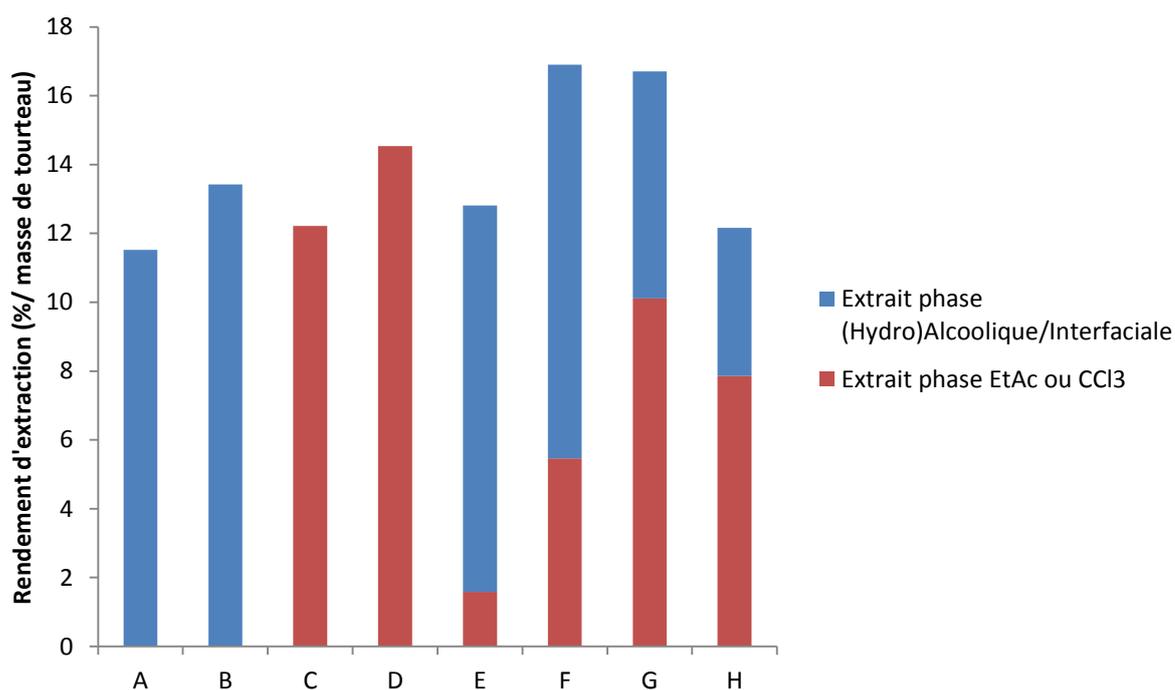


Figure 4-14. Rendement d'extraction de matière sèche/lipidique selon les solvants utilisés

Une fois séchés, les échantillons sont directement traités par SPE (G et H) ou subissent d'abord un prétraitement pour en extraire les lipides. Celui-ci consiste en une extraction au chloroforme/eau : l'extrait est mélangé avec 3mL d'une solution aqueuse de KCl (10%), 7 mL de chloroforme sont ajoutés et l'ensemble est centrifugé à 5000xg pendant 5 minutes. La phase

supérieure est éliminée et 4mL supplémentaires de KCl 10% sont ajoutés. Après centrifugation la phase supérieure est à nouveau éliminée. Suivant la limpidité de la phase inférieure, ce traitement est répété deux ou trois fois. Après séparation SPE, tous les extraits sont analysés en chromatographie liquide.

La comparaison des rendements d'extraction des phospholipides (Tableau 4-14 , Figure 4-15) montre que l'éthanol seul, au contraire de l'acétate d'éthyle, permet déjà d'obtenir un bon rendement d'extraction. L'utilisation des ultrasons permet d'ailleurs d'augmenter considérablement celui-ci. Les rendements obtenus avec l'association acétate d'éthyle/éthanol montrent l'action synergique de ces deux solvants, un rendement d'extraction proche de 70% étant obtenu lorsque les ultrasons sont utilisés (Extraits F). Dans ce cas, la quasi-totalité des phospholipides se retrouve alors dans la phase acétate d'éthyle (Tableau 4-14, Extraits E à G).

Tableau 4-14. Détails des essais d'extraction des phospholipides avec utilisation de solvants (IC=68%). rel : relatif

Extrait	Masse d'extrait (mg)	% lipides	PE %rel	PC %rel	PI %rel	PL %/lipides	PL %/extrait	Rendement total PLs/ %/PL totaux
A _{phase EtOH}	579	62	22±10	77±6	0-2	6,1±1,0	3,8±0,6	35,0±6,0
B _{phase EtOH}	678	75	19±9	76±0	5±1	6,0±0,6	4,5±0,5	48,5±4,9
C _{phase EtAc}	620	92	49±1	38±1	13±0	0,7±0,0	0,7±0,0	6,7±0,2
D _{phase EtAc}	727	85	50±11	38±4	12±2	1,0±0,2	0,8±0,1	9,4±1,6
E _{phaseEtAc}	80	77	5±2	95±1	0	19,7±0,7	15,1±0,5	19,2±0,6
E _{phaseEtOH}	561	68	24±6,0	76±6	0	1,4±0,2	0,9±0,1	8,4±1,0
F _{phase EtAc}	273	33	11±6,0	89±6	0	43,9±5,2	14,6±1,7	64,2±7,5
F _{phase EtOH}	572	74	28±1	71±3	1-2	0,8±0,0	0,6±0,0	5,7±0,3
G _{phase EtAc}	392	ND	30±1	56±4	14±1	5,5±0,3	5,5±0,2	34,2±1,8
G _{phase EtOH/Eau}	331	ND	49±3	50±4	0-2	0,1±0,0	0,1±0,0	0,3±0,0
H _{phase CCl3}	389	ND	24±4	69±3	7±0	ND	5,8±0,4	36,3±2,8
H _{phase MeOH/interf.}	145	ND	15±1	80±5	6±1	ND	8,4±0,4	19,4±1,1
TOURTEAU	5000	16	15	74	11	8	1	100* (FOLCH)

*Note : Il est considéré que la méthode de Folch extrait 100% des phospholipides et sert ainsi de base de calcul

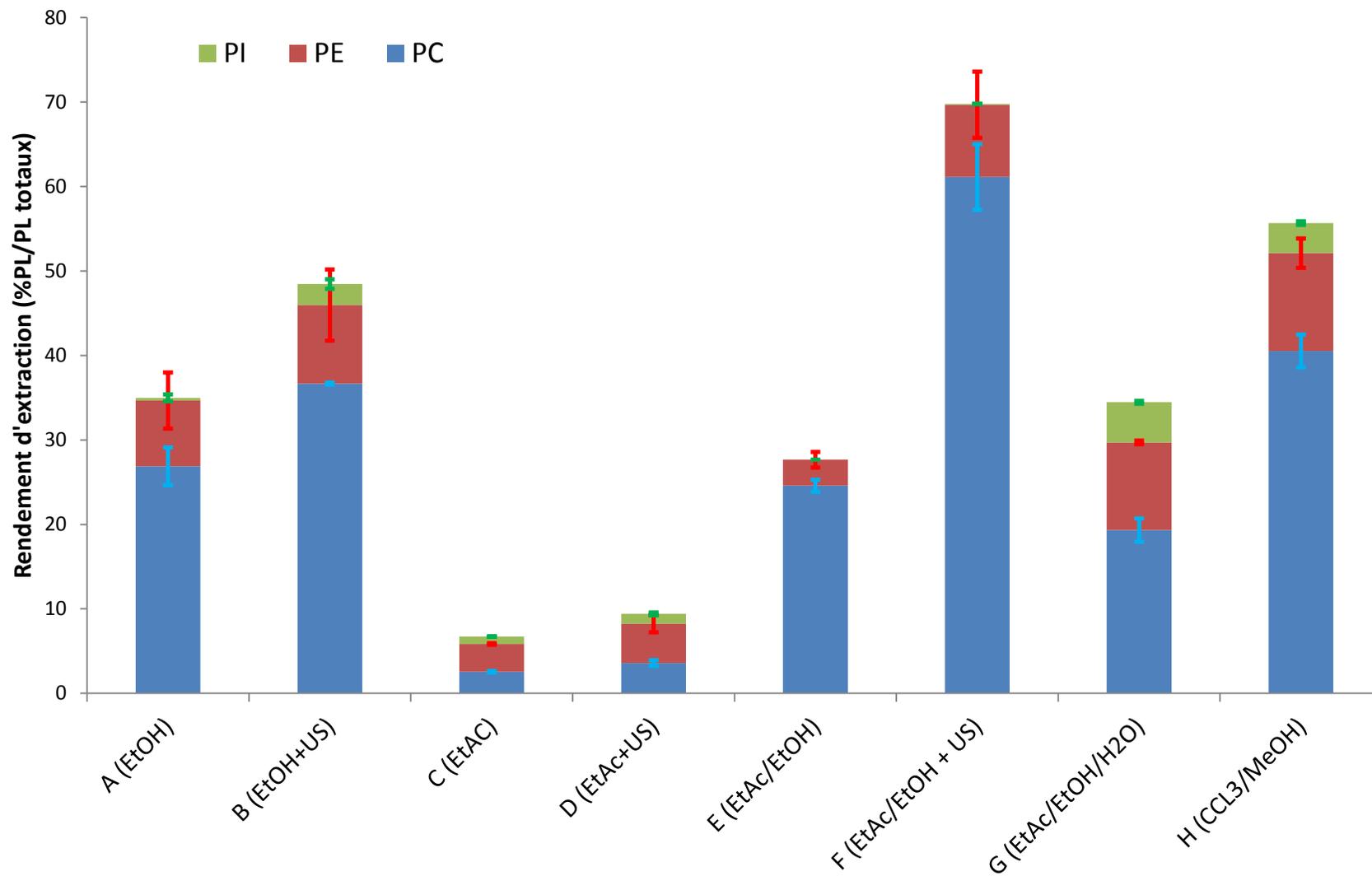


Figure 4-15. Comparaison des rendements d'extraction des phospholipides du tourteau de caméline démulcinée selon les différents essais

L'utilisation d'eau distillée au cours de l'extraction, si elle permet une masse d'extrait assez importante (G) amène un rendement d'extraction des phospholipides assez faible. Il est possible que l'eau introduite au cours de l'extraction ait eu un effet délétère sur les phospholipides au vu de la très faible quantité de phospholipides récupérés dans la phase $G_{\text{EtOH/Eau}}$. Cet effet délétère semble principalement concerner PC, la quantité de PE et PI restant importante. L'essai F est ainsi le plus concluant, avec l'extrait $F_{\text{phase EtAc}}$ comportant les plus grandes puretés et sélectivités (l'extrait contient environ 15% de phospholipides, ce qui représente 44% des lipides). Cet essai donne même des rendements supérieurs à ceux obtenus avec une extraction chloroforme/méthanol. Il pourrait être ainsi pertinent d'effectuer plus de cycles d'extraction avec ce mélange de solvant pour se rapprocher d'un rendement d'extraction tel qu'obtenu par la méthode de Folch. Concernant les classes des phospholipides extraits, il apparaît que ceux récupérés avec l'acétate d'éthyle (C et D) ont des concentrations relatives en PE et PI bien plus importantes que ceux extraits avec l'éthanol (A et B) ou avec un mélange éthanol/acétate d'éthyle (E et F). L'extrait G, avec l'addition d'eau, a un comportement intermédiaire (Tableau 4-14). L'éthanol est un solvant connu pour sa capacité à extraire PC mais il est moins adapté pour extraire simultanément PC et PE. En utilisant une association Ethanol/Chloroforme, des chercheurs ont pu augmenter le rendement d'extraction des phospholipides avec une composition relative de PE qui augmente avec la quantité de chloroforme ajouté (John *et al.*, 2015). La partie bibliographique renseigne d'une plus grande hydrophilie de PC que PE. Si le coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}) des différents solvants ou leurs paramètres de solubilité de HANSEN sont consultés (Tableau 4-15), la plus forte polarité (δ_p) et la capacité à créer des liaisons hydrogènes (δ_h) de l'éthanol apparaît par rapport au chloroforme et à l'acétate d'éthyle. Cela peut expliquer que ce solvant ait relativement moins d'affinité avec PE qu'avec PC.

Tableau 4-15. Paramètres de solubilité de Hansen (Interactions polaires δ_p et par liaisons hydrogène δ_h) et $\log K_{ow}$ de différents solvants de polarité décroissante

Solvants	δ_p	δ_h	Log K_{ow}
Méthanol	12,3	22,3	-0,71
Ethanol	8,8	19,4	-0,19
Acétate d'éthyle	5,3	7,2	0,80
Chloroforme	3,1	5,7	1,74
CCl3/MeOH (2/1)	6,2	11,2	
EtAc/EtOH (7/3)	6,4	10,9	

Concernant PI, sa concentration relative est faible dans les extraits A et B obtenus avec l'éthanol seul, élevée avec les extraits C et D obtenus avec l'acétate d'éthyle seul mais elle est minime voire nulle dans les extraits E et F obtenus avec les mélanges de solvants. Ce faible pourcentage de PI avec le couple Ethanol/Acétate d'éthyle n'est pas retrouvé dans l'article de Breil *et al.* avec une extraction sur micro-organismes (Breil *et al.*, 2017). Si des différences expérimentales au niveau du mode d'extraction et d'analyse ne peuvent être écartées, il peut aussi s'agir de différences au niveau des interactions du solvant avec la matrice. En effet, les paramètres de Hansen ne semblent pas pouvoir expliquer cette différence. Appliquant une loi de mélange pour calculer des paramètres δ_p , δ_h des couples de solvants (Tableau 4-15), des paramètres proches du couple chloroforme/méthanol sont obtenus, couple pour lequel le pourcentage relatif de PI reste significatif. Les paramètres de solubilité sont généralement moins adaptés aux solvants chlorés et aux interactions ioniques. Ainsi la solubilisation de PI dans les solvants étudiés mériterait une étude plus approfondie. Il apparaît en tout cas que le choix du solvant a non seulement une importance dans le rendement d'extraction des phospholipides mais également dans leur sélectivité. Le Tableau 4-15, s'il indique qu'une plus grande gamme de paramètres de solubilité peut être atteinte avec le mélange de méthanol et chloroforme, montre que l'éthanol peut être un bon candidat au remplacement du méthanol et l'acétate d'éthyle à celui du chloroforme.

4.5. Conclusion sur l'extraction des phospholipides

La mise au point de méthodes simples d'analyse des phospholipides, notamment spectrométriques, permet d'envisager des tests routiniers pour vérifier l'efficacité de l'extraction des phospholipides à partir de graines oléoprotéagineuses. L'utilisation d'une presse monovis conduit à l'obtention d'un tourteau riche en phospholipides à partir de graines dé mucilaginées. Si le taux d'hydratation des graines joue un rôle important dans l'extractibilité de l'huile, le mucilage ne semble pas avoir d'action lubrifiante au cours de la trituration, pouvant apparaître au contraire comme un frein à la libération des lipides.

L'extraction des phospholipides à partir de l'huile libérée ne semble pas viable du fait de leur trop faible concentration (< 1%). Se trouvant à des teneurs bien plus élevées (~8%) dans les lipides résiduels du tourteau, il est préférable d'utiliser ce substrat. L'expression des phospholipases dans l'eau a conduit à l'utilisation de conditions d'extraction non aqueuses. Le choix s'est porté vers des solvants biosourçables et peu toxiques comme l'éthanol et l'acétate d'éthyle, l'association des deux montrant une action synergique sur l'extraction des

phospholipides. Les rendements sont alors semblables à ceux obtenus avec le couple classique mais cancérigène méthanol/chloroforme, avec toutefois une sélectivité différente à la composition étudiée. Les solvants pourraient être réutilisés après évaporation/condensation (points d'ébullition largement inférieurs à ceux de l'huile). Les lipides polaires pourraient être récupérés par précipitation à partir de l'huile obtenue. Celle-ci se réalise facilement par adjonction d'eau avec le concours des ultrasons et de la centrifugation. Sinon, relativement riche en phospholipides et avec des triglycérides fortement polyinsaturés (notamment omega-3), l'huile pourrait être utilisée telle quelle pour des formulations alimentaires ou cosmétiques.

***Chapitre 5. Modification des
phospholipides***

Les phospholipides natifs offrent déjà un large éventail de configurations avec différentes combinaisons de têtes polaires et acides gras, ce qui laisse présager des bicouches lipidiques ou membranes diverses. Cependant, la phosphatidylcholine reste largement la classe la plus abondante au sein des graines végétales. De même, la prédominance des acides gras insaturés, notamment polyinsaturés au sein de la caméline mais aussi du soja, principale source de phospholipides, favorise des membranes ou bicouches plus désordonnées avec une compacité moindre par rapport aux phospholipides saturés. Il est possible d'augmenter cette compacité et/ou de généralement réduire la perméabilité aux molécules polaires et apolaires par l'insertion de cholestérol ou d'autres composés membranaires. Dans ce cas, un contrôle assez fin de la perméabilité peut être obtenu. A l'inverse, l'oxydation des phospholipides, à laquelle les chaînes polyinsaturées sont particulièrement sensibles, conduit généralement à une augmentation de cette perméabilité. Sans contrôle, l'oxydation conduit à la scission des chaînes grasses, réduisant drastiquement l'épaisseur de la bicouche phospholipidique et pouvant lui faire perdre toute fonction membranaire. L'étude des paramètres expérimentaux d'oxydation de même que l'utilisation de la modélisation moléculaire pourraient permettre de déterminer l'influence d'une oxydation contrôlée sur les propriétés membranaires des phospholipides au sein de bicouches ou vésicules. Au sein du projet SMONFERT, ces propriétés sont critiques pour la vectorisation de nutriments ou d'éliciteurs vers les plantes.

5.1. Etude *in vitro* de l'oxydation des phospholipides

5.1.i. Modification chimique de la lécithine de soja

L'étude qui a prévalu (Fabre *et al.*, 2018) consiste en une modification chimique des phospholipides par photosensibilisation à l'aide de bleu de méthylène. Comme indiqué dans la bibliographie, l'oxydation des phospholipides par photosensibilisation permet de produire des hydroperoxydes. Cependant, le contrôle de cette oxydation est essentiel pour éviter la rupture de chaînes et maîtriser les propriétés physico-chimiques des produits oxydés. Plusieurs paramètres interviennent dans la photosensibilisation, notamment la puissance d'illumination, la quantité de photosensibilisateur par rapport aux phospholipides, le solvant de ces derniers, la durée d'illumination et la quantité d'oxygène disponible. Si les phospholipides sont facilement solubles dans le chloroforme et le méthanol, le solvant choisi est l'éthanol en raison de sa biodisponibilité et faible toxicité. De plus, c'est un solvant permettant une bonne durée de vie de l'oxygène singulet et qui solubilise totalement la lécithine de soja. La puissance d'illumination dépend de la

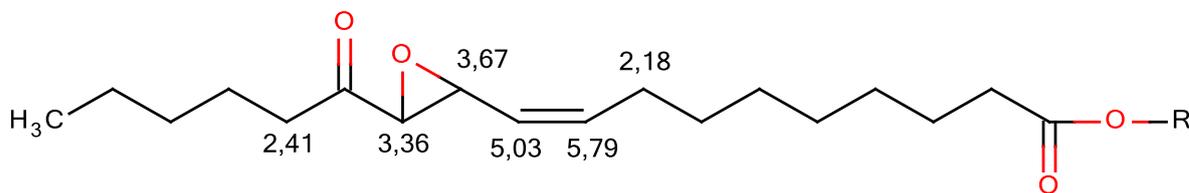
méthode d'illumination utilisée. Une exposition au soleil est trop instable et imprécise pour être utilisée. Ainsi, il a été préférable d'utiliser un « soleil artificiel » ATLAS SUNTEST CP+ composé d'une lampe au Xénon de puissance réglable, reproduisant le spectre solaire et d'un filtre anti-UV. Ainsi, le temps et la puissance d'illumination peuvent être réglés. Cependant, des tests préliminaires ont montré un contrôle difficile de ce dernier paramètre sur l'appareil. Ainsi, le choix s'est porté sur la puissance d'illumination maximale (750w/m^2). La quantité d'oxygène est un autre paramètre important. Cependant, dans un but de facilité de mise en œuvre et de changement d'échelle simplifié, il a été préféré l'utilisation d'air, considérant de faibles variations barométriques et hygrométriques au cours des expériences. Des tubes à essais en verre d'un diamètre de 15 mm et d'un volume de 20mL munis de capuchons noirs hermétiques ont été utilisés. Le ratio oxygène/phospholipides est ainsi directement contrôlé par le volume de la solution de phospholipides dans ces tubes.

a. Oxydation des acides gras

De façon à mieux comprendre l'oxydation de la lécithine de soja, une étude RMN est très appropriée, de par l'analyse des déplacements chimiques correspondant aux hydrogènes caractéristiques des hydroperoxydes ou des insaturations qui peuvent se conjuguer ou changer de conformation selon l'oxydation. Les acides gras et phospholipides sont souvent analysés dans le chloroforme deutéré. Les déplacements chimiques équivalents observés avec ce solvant ont été comparés avec ceux obtenus avec le DMSO deutéré sur la lécithine de soja oxydée. La base d'intégration est effectuée avec le pic du singlet correspondant au groupement choline avec 9 hydrogènes. Le chloroforme deutéré, s'il permet une meilleure résolution du pic correspondant à CH-OOH ne permet pas de différencier les bandes CH-OOH contrairement au DMSO (voir ANNEXE 18). Ce dernier solvant, qui offre en plus une plus grande stabilité dans le temps est donc préféré au chloroforme. Un modèle permet d'ailleurs d'évaluer les déplacements chimiques dans le DMSO en fonction de déplacements déjà observés dans le CdCl_3 (Abraham *et al.*, 2006).

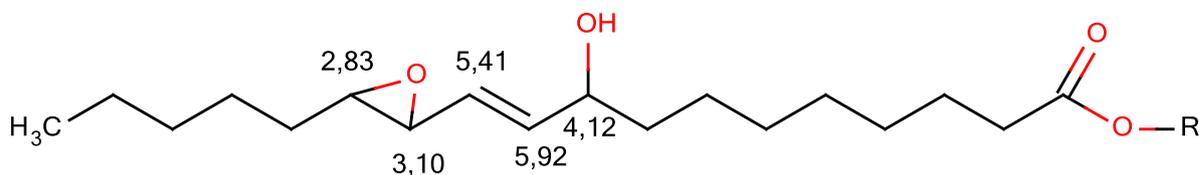
Pour différencier les signaux correspondant à l'oxydation des chaînes oléique, linoléique et linoléinique de la lécithine, une étude préliminaire a été réalisée sur l'oxydation de chacun de ses acides gras principaux. Après 8 heures d'illumination de solutions de 10mL concentrées à 20mg/mL dans l'éthanol absolu avec 3,5mg/100mL de bleu de méthylène, les produits ont été caractérisés par RMN. Si les hydroperoxydes sont les principaux produits d'oxydation attendus, d'autres produits d'oxydation des acides gras sont possibles. Il est ainsi important de considérer les signaux caractéristiques d'époxydes ou d'aldéhydes. La bibliographie permet d'identifier les

déplacements correspondants, même si le solvant deutéré utilisé est en général le chloroforme. Ainsi, concernant les époxydes, il est possible de représenter un exemple d'époxyde avec les déplacements chimiques correspondants (Gardner *et al.*, 1993) (Molécule 5-1).



Molécule 5-1. Exemple d'époxyde dérivé d'acide linoléique tel que caractérisé en ^1H RMN avec les déplacements chimiques (en ppm).

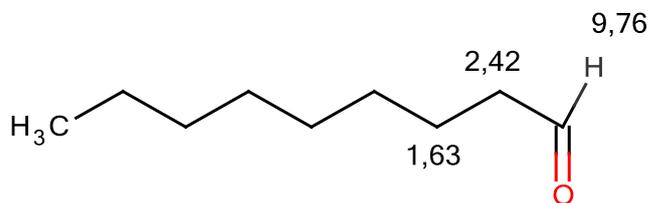
Une autre forme est aussi possible (Cornelis *et al.*, 1982) (Molécule 5-2).



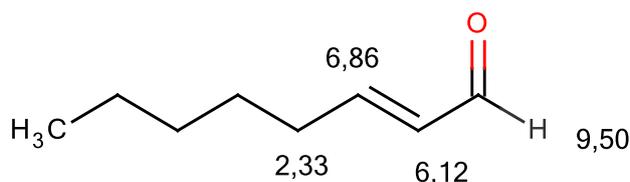
Molécule 5-2. Exemple d'époxyde tel que caractérisé par ^1H RMN.

Ainsi, le signal des hydrogènes caractéristiques des époxydes dérivés des acides insaturés se situe aux alentours de 2,8-3,5 ppm.

Concernant les aldéhydes résultant d'une scission oxydative, citons les molécules suivantes (Molécule 5-3, Molécule 5-4), dont les spectres sont disponibles sur la base de données de l'AIST (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (<https://sdb.sdb.aist.go.jp/>)) :



Molécule 5-3. Nonanal, caractérisé en ^1H RMN dans CdCl_3 , selon l'AIST

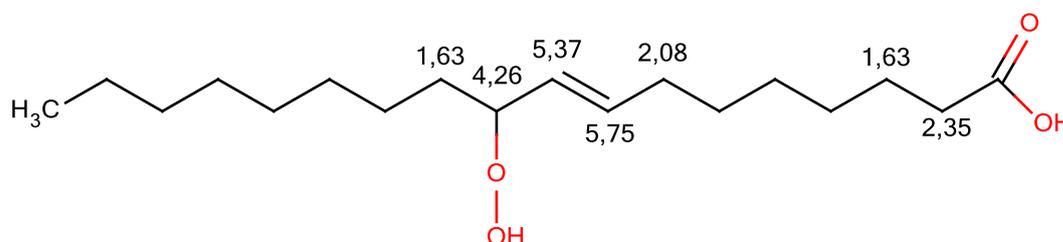


Molécule 5-4. Trans-2-octenal, dans CdCl_3 , selon l'AIST

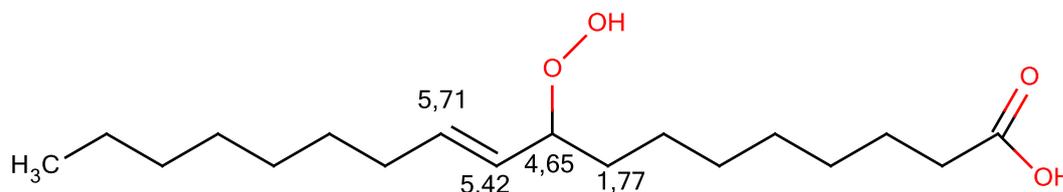
Acide oléique

Après 8 heures d'illumination de l'acide oléique à 20mg/mL dans 10mL d'éthanol et 14 cm³ d'air, le produit obtenu est caractérisé en RMN ¹H (Figure 5-1). Sur l'échantillon oxydé de l'acide oléique, de nouveaux pics peuvent être remarqués. A la fois une étude bibliographique (Guerrero *et al.*, 1997), une analyse COSY ¹H-¹H et l'utilisation du simulateur de spectres du site <http://www.nmrdb.org> (Molécule 5-5, Molécule 5-6) permettent d'attribuer chacun des nouveaux pics.

Ainsi, le pic centré sur 11,2 ppm correspond à l'hydrogène de l'hydroperoxyde (CH-OOH), un situé vers 5,6 ppm correspond à l'hydrogène oléfinique CHOOH-CH=CH- et un situé à 4,08 ppm correspond à CH-OOH.



Molécule 5-5. Acide oléique hydroperoxydé en position 10 avec les attributions selon le site NMRdb.org



Molécule 5-6. Acide oléique hydroperoxydé en position 9 avec les attributions selon le site NMRdb.org

Plus en détail, pour la Molécule 5-6, les déplacements caractéristiques théoriques sont $\delta = 4,65$ (1H, dt, $J=7,5 ; 6,7$ Hz), $5,42$ (1H, dd, $J=15,7 ; 7,5$ Hz), $5,71$ (1H, dt, $J=15,7 ; 6,9$ Hz). Dans une configuration *cis*, les déplacements théoriques sont $\delta = 4,65$ (1H, dt, $J=9,7 ; 6,7$ Hz), $5,56$ (1H, dd, $J=10,7 ; 9,7$ Hz), $5,69$ (1H, dt, $J=10,7 ; 7,6$ Hz).

Il est plus délicat de déterminer les constantes de couplage sur la molécule réelle. Le doublet de triplet est cependant retrouvé centré sur 5,6ppm tandis qu'un ensemble plus complexe est trouvé vers 4,09 ppm semblant indiquer la présence de plusieurs isomères de position et de configuration.

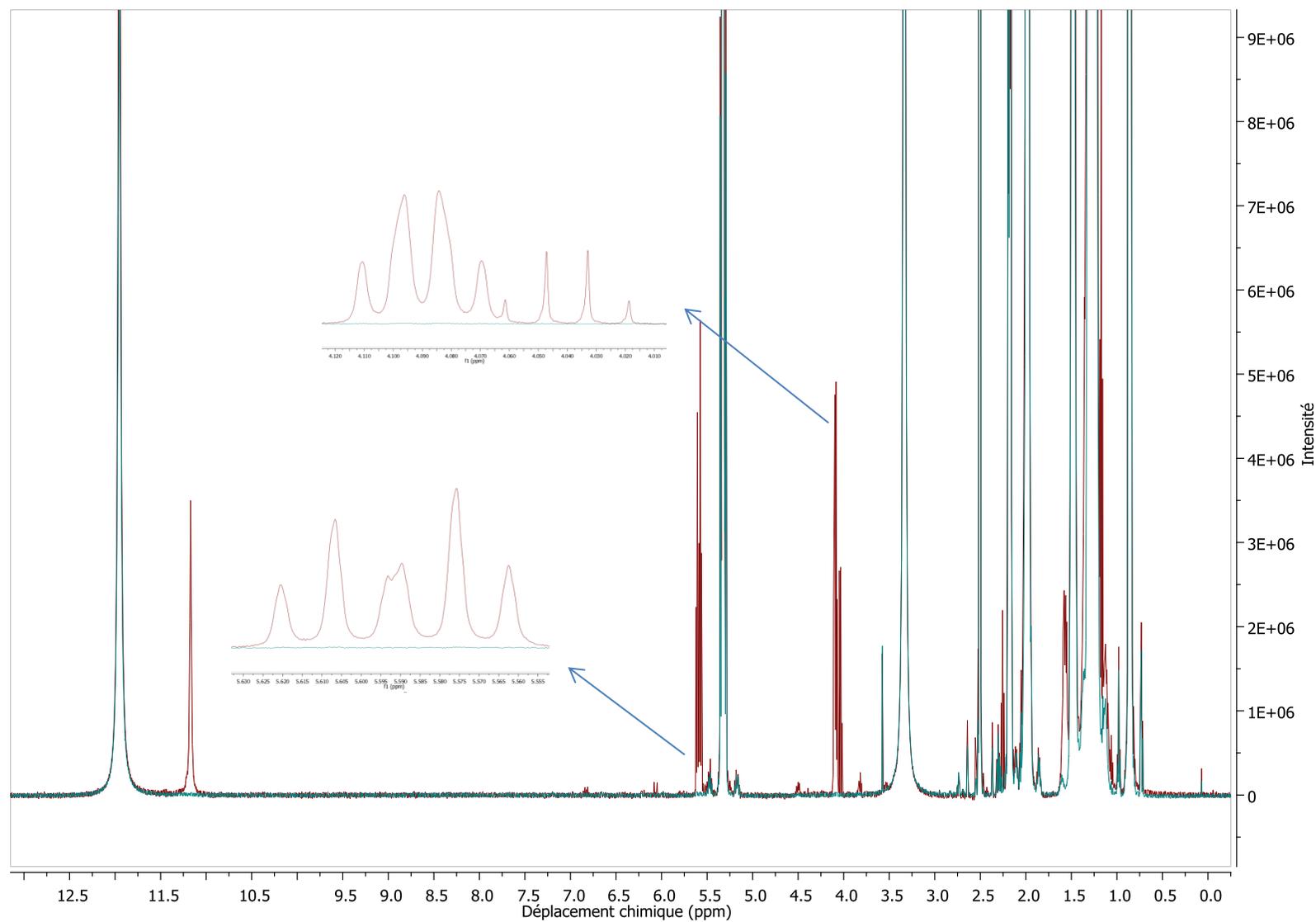


Figure 5-1. Superposition des spectres RMN de l'acide oléique (bleu) et de l'acide oléique oxydé (rouge) par photosensibilisation. Détails du doublet de triplets (dt) centré à 5,6ppm et de deux multiplets (potentiellement dd) à 4,04 et 4,09 ppm).

La RMN 2D cosy ^1H - ^1H (Figure 5-2) montre bien le couplage entre l'hydrogène à 4,09ppm et celui de l'hydrogène vicinal à 5,3ppm de même qu'avec l'hydrogène à 1,59ppm. Le signal à 5,3 ppm est partagé par les formes oxydée et naturelle de l'acide oléique.

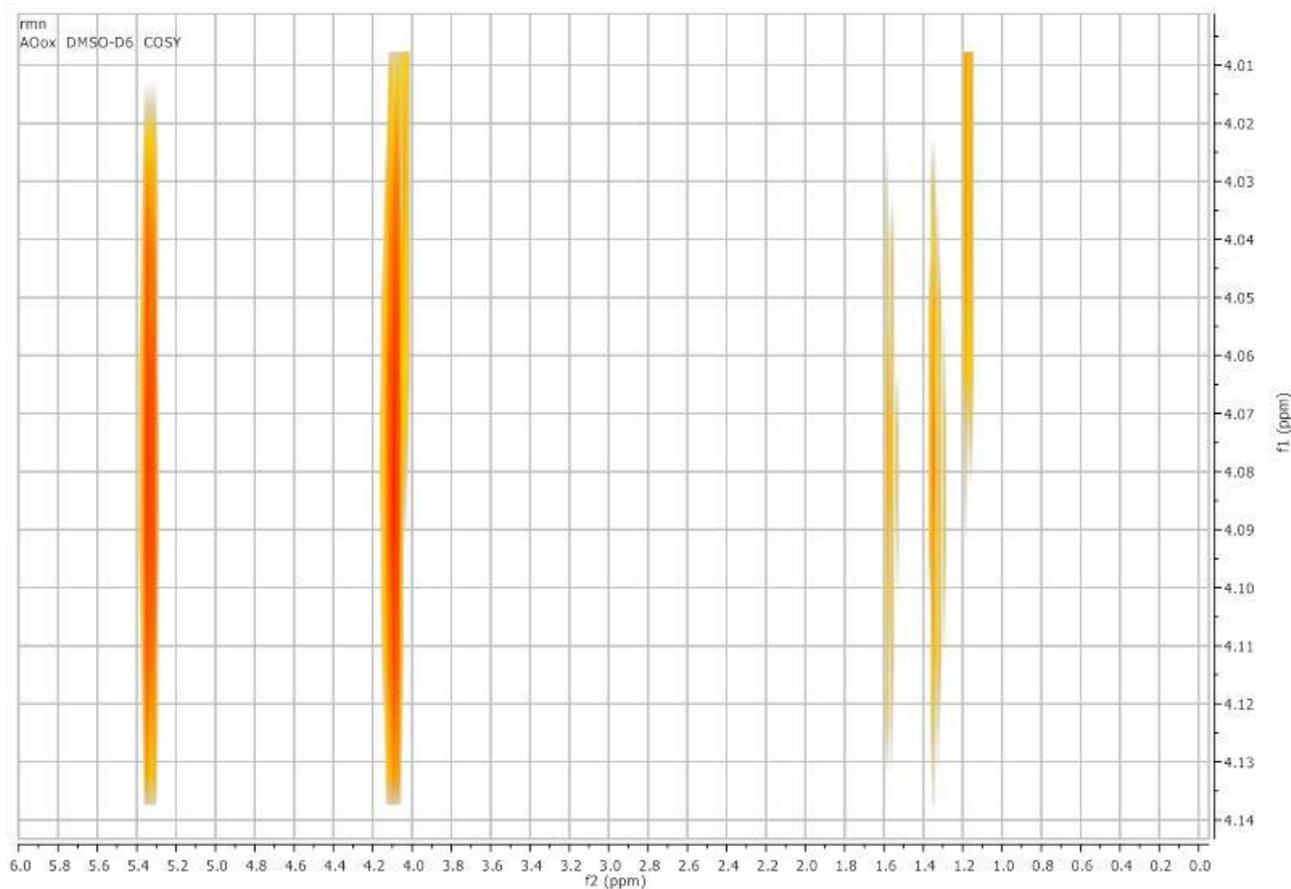


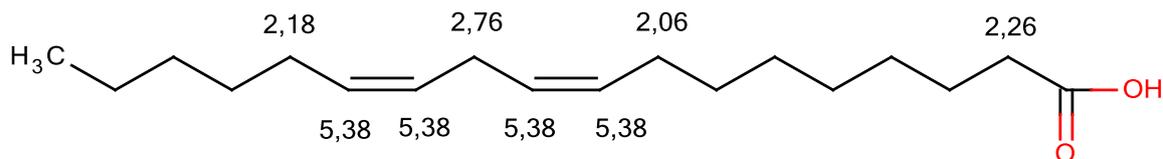
Figure 5-2. Diagramme 2D en cosy ^1H - ^1H d'un acide oléique hydroperoxydé

L'intégration des signaux (4,09 ppm; 11,2 ppm) en prenant pour base les trois hydrogènes pour le CH_3 terminal montrerait ainsi une valeur de 0,14, ce qui signifie un rendement de 14% d'hydroperoxydes en position 9 ou 10-OOH.

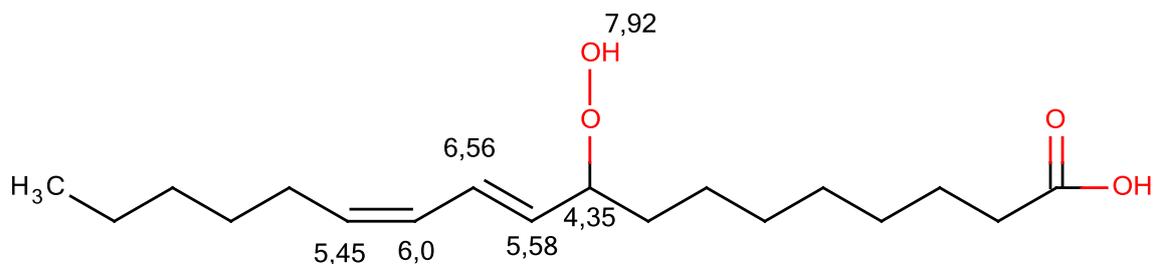
Acide linoléique.

Cet acide (Molécule 5-7) est l'acide gras principal de la lécithine. Il est donc intéressant d'observer plusieurs produits d'oxydation possibles (Molécule 5-8, Molécule 5-9, Molécule 5-10). Par commodité, les molécules sont toutes représentées sous forme linéaire.

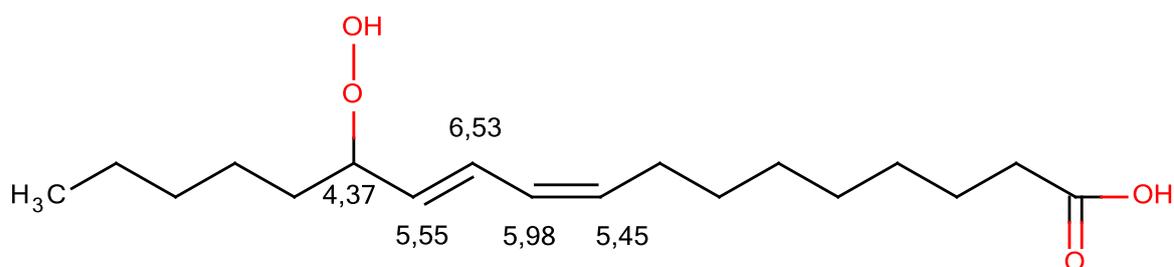
- Dans le CdCl_3 , selon la littérature.



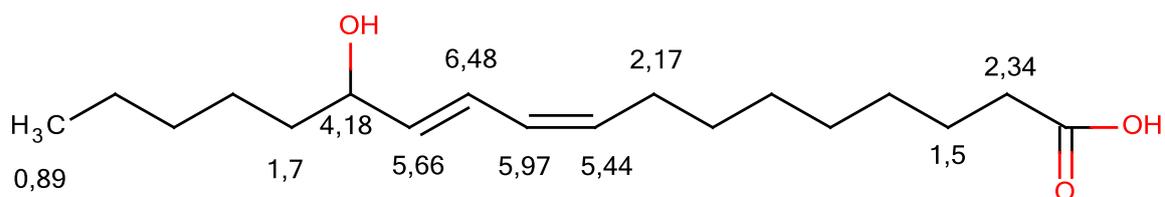
Molécule 5-7. Acide linoléique avec attributions des déplacements chimiques (ppm) en ^1H RMN (Neff *et al.*, 1990).



Molécule 5-8. Acide linoléique hydroperoxydé avec attributions en ^1H RMN (Neff *et al.*, 1990).



Molécule 5-9. Acide linoléique hydroperoxydé avec attributions ^1H RMN selon (Gardner et Weisleder, 1972).



Molécule 5-10. Acide linoléique hydroxylé avec attributions ^1H RMN selon (Iacazio *et al.*, 1990).

La molécule obtenue ici, analysée dans le DMSO deutéré (Figure 5-3), fait apparaître de nouveaux signaux centrés à 4,13 et 4,22 ppm (CH-OOH). Il semble s'agir ici encore de doublets de doublets mais le grand nombre d'isomères possibles rend l'interprétation délicate. Notons la présence du signal de l'hydrogène de l'hydroperoxyde, toujours vers 11,2 ppm (CH-OOH). De même, plusieurs signaux apparaissent à des déplacements chimiques compris entre 5,4 et 6,8 ppm. Ils correspondent aux hydrogènes des diènes conjugués, déblindés par rapport à ceux des molécules non conjuguées dont les signaux se situent entre 5,3 et 5,4 ppm.

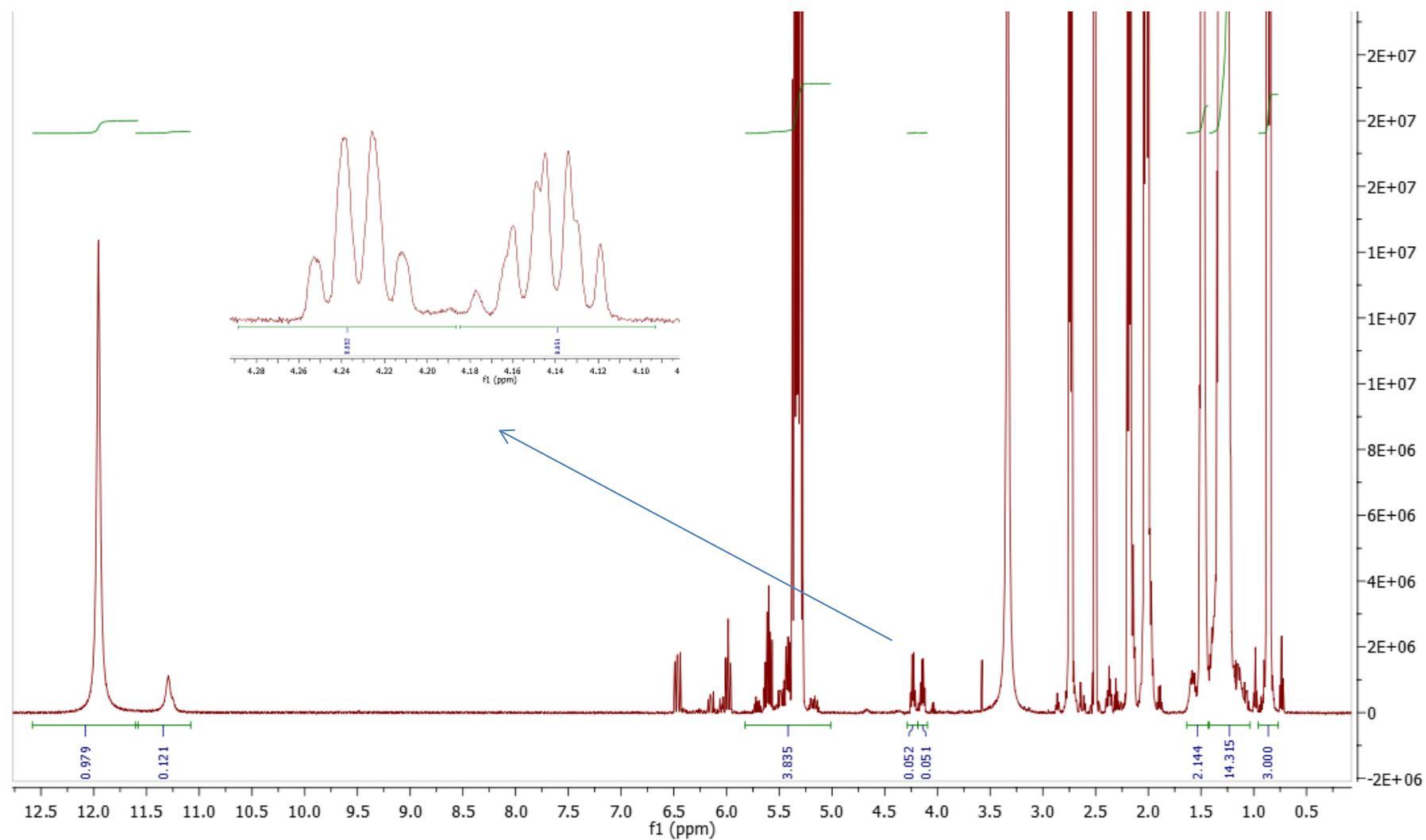


Figure 5-3. Analyse en ^1H RMN d'un acide linoléique hydroperoxydé (spectre zoomé en intensité pour distinguer les pics de faible intensité)

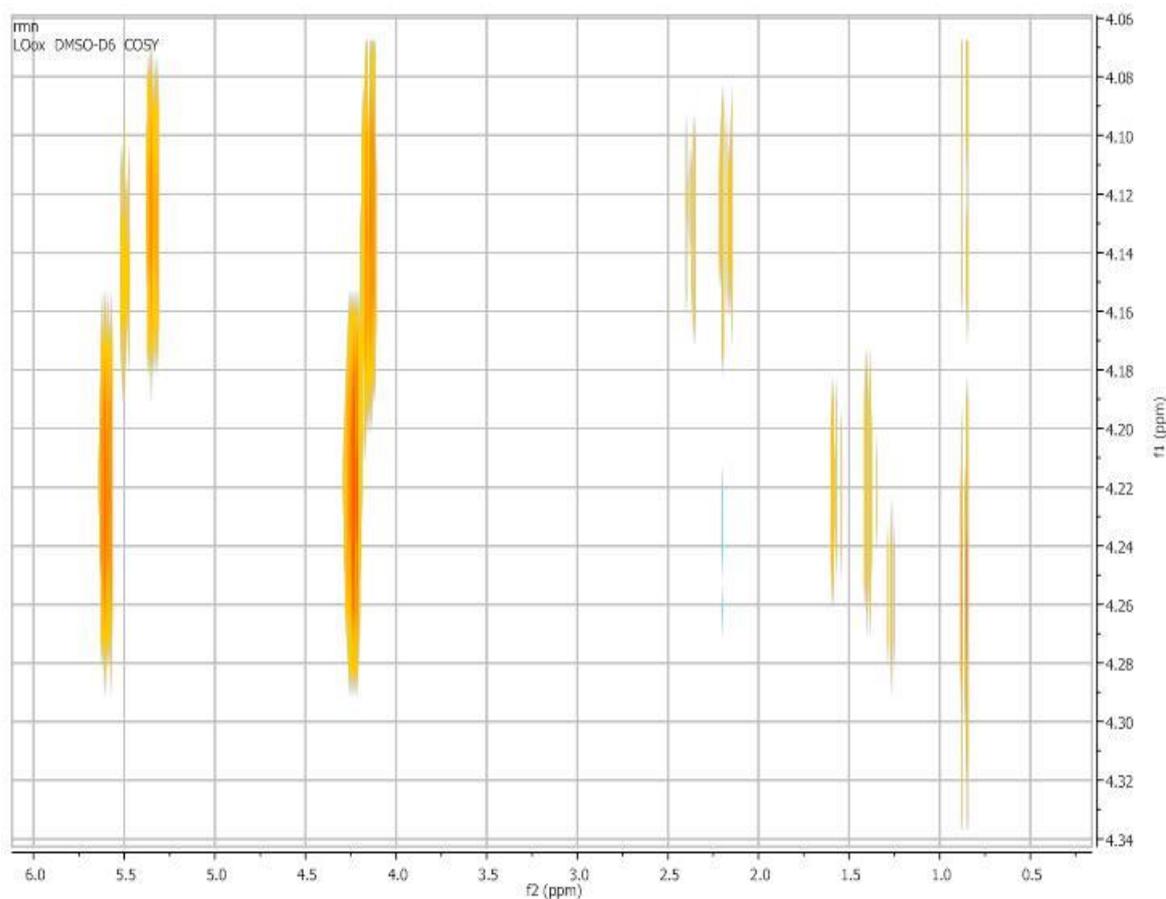
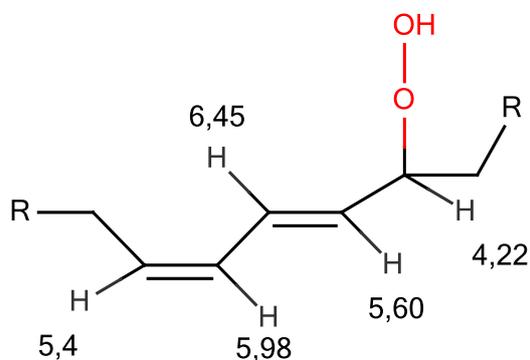


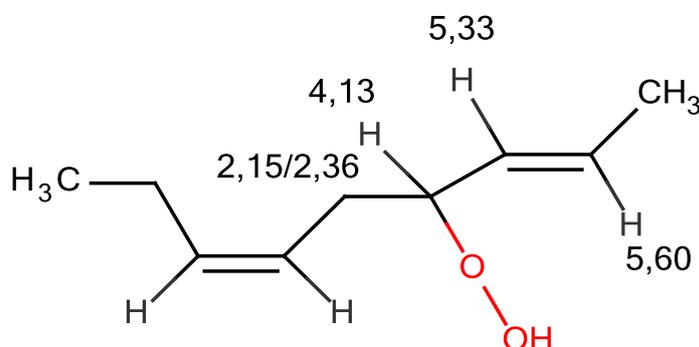
Figure 5-4. Analyses en COSY ^1H - ^1H d'un acide linoléique hydroperoxydé

Une étude en ^1H RMN et COSY ^1H - ^1H (Figure 5-3, Figure 5-4) montre un couplage du signal à 4,13 ppm avec le signal à 5,36 ppm et plus faiblement avec 2,16 ppm et 2,36 ppm alors que le signal à 4,22 ppm est couplé avec celui à 5,62 ppm et plus faiblement avec 1,4 ppm et 1,59 ppm (Figure 5-4).



Molécule 5-11. Attribution ^1H RMN correspondant à la zone des doubles liaisons et de l'hydroperoxyde en position 9 ou 13

Ce dernier signal correspond bien à la forme 13-OOH telle que montrée plus haut (Molécule 5-11), laquelle est semblable à la forme 09-OOH. Si, par contre, un hydroperoxyde en position 10, 11 ou 12 est considéré, les déplacements chimiques sont différents (Molécule 5-12) :



Molécule 5-12. Attribution ^1H RMN correspondant à la zone des doubles liaisons et de l'hydroperoxyde en position 10 ou 11

Ainsi, l'intégration de l'hydrogène en 4,13 ou 4,22 permet de différencier deux formes oxydées de l'acide linoléique.

Il est possible d'aller plus loin en considérant l'oxydation de DLPC (dilinoleylphosphatidylcholine) effectuée avec des conditions oxydantes plus poussées (2mL de solution) – (Figure 5-5).

Avec DLPC, les mêmes couplages en COSY sont retrouvés indiquant que l'oxydation de l'acide linoléique dans sa forme libre ou au sein d'un phospholipide procède de façon similaire. Cependant, le pic à 11,2 ppm correspondant à CH-OOH est moins net, peut-être à cause de liaisons hydrogènes intramoléculaires et un pic à 10,23 ppm apparaît. Cet hydrogène n'est couplé à aucun carbone entre 0 et 160 ppm selon l'HSBC et couplé à aucun carbone entre 0 et 210ppm en ^2J ou plus tel que vu en HMBC. Il est ainsi certainement relié à un oxygène et il peut s'agir d'un hydrogène relié à une fonction hydroxyle et/ou d'un hydrogène impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire. En effet, concernant une fonction acide, l'hydrogène $-\text{COOH}$ de l'acide linoléique se trouve plutôt vers 12 ppm. Notons de même l'absence de signal en RMN du carbone caractéristique d'aldéhydes ou cétones (^{13}C $\delta = 190 - 200\text{ppm}$) et un signal à 172ppm correspondant aux deux carbonyles de DLPC avec aucun carbone qui pourrait indiquer une fonction acide. Dans tous les cas, ce signal ne semble pas être la résultante d'une scission de chaînes grasses. Ici, l'intégration de CHOOH en ^1H RMN donne 0,12 soit 12% de rendement, une valeur proche de celle observée pour l'acide oléique.

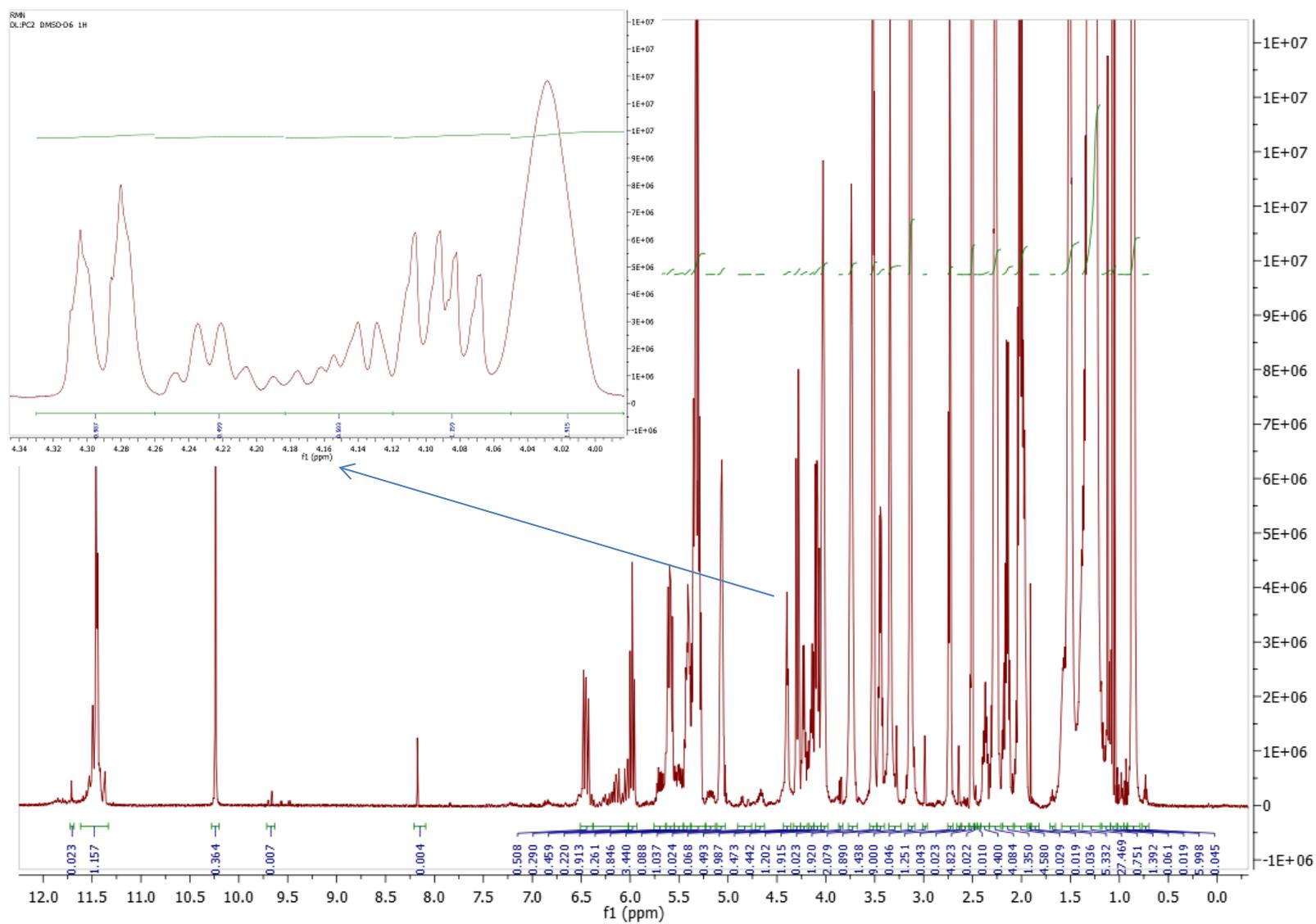
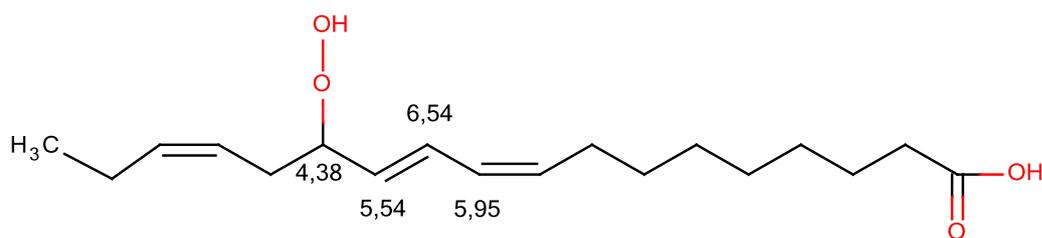


Figure 5-5. Spectre ^1H RMN correspondant au DLPC oxydé.

Acide linoléique**Molécule 5-13. Attribution ^1H RMN correspondant à un hydroperoxyde de l'acide linoléique en position 13.**

Dans le cas de l'acide 13-hydroperoxy-linolenique (Molécule 5-13), le déplacement chimique du proton du carbone portant l'hydroperoxyde se situe autour de 4,4 ppm (Gardner et Weisleder, 1972). Concernant cet acide, le nombre de positions possibles de l'hydroperoxyde est plus important et il est plus difficile de différencier tous les signaux correspondant à CH-OOH . Ils se situent entre 4,03 et 4,30 ppm. Ici encore, le rendement est de 14%

a. Oxydation des phospholipides

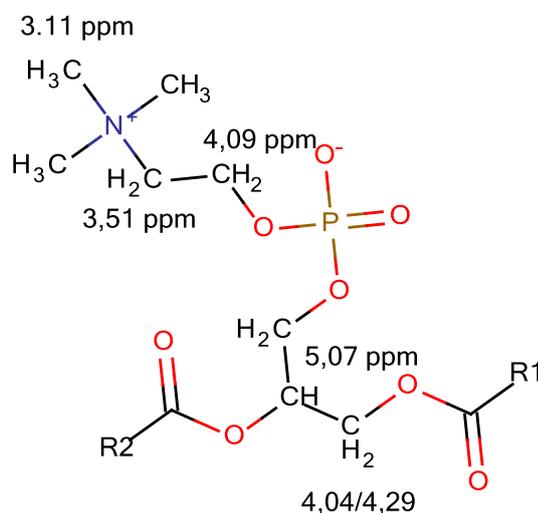
Considérant la lécithine de soja (ca. 90% de phosphatidylcholine) oxydée par illumination, l'étude RMN peut être affinée avec des mesures 2D HSQC ^{13}C - ^1H pour permettre les attributions suivantes (Tableau 5-1).

Tableau 5-1. Attribution des pics en RMN du carbone et couplages selon la RMN HSQC ^{13}C - ^1H

Déplacement ^{13}C (ppm)	Attribution	Déplacement couplé ^1H (ppm)
14,37	ω - CH_3	Relié à 0,85
22,41, 22,56	CH_2 - CH_3	Relié à 1,29
24,87, 24,95	b- CH_2	Relié à 1,5
25,67	= CH-CH_2 - CH=	Relié à 2,75
27,07	$\text{CH}_2\text{CH=CHCH}_2$	Relié à 2
28,88, 28,91, 29,01-29,56	$(\text{CH}_2)_n$	Relié à 1,29
31,37	$(\text{CH}_2)_n$	Relié à 1,29
31,77	$(\text{CH}_2)_n$	Relié à 1,25
32	CH_2 - C=C	Relié à 2
33,86, 34,06	CH_2 - CH_2 - COO	Relié à 2,26
53,57	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	Relié à 3,12
58,72, 58,76	CH_2O (choline)	Relié à 4,02

62,89, 62,93	CH ₂ O(glycérol), PO ₃ CH ₂	Relié à 3,72, 4,07 et 4,30
65,97	CH ₂ N	Relié à 3,5
71,05	CHO	Relié à 5,07
85,02	CHOOH	Relié à 4,13 et 4,22
127,8	C=C conjugués	Relié à 6,45
128,18, 128,23	C=C non conjugués	Relié à 5,25 à 5,35
128,6	C=C conjugués	Relié à 5,98
130,10, 130,18	HC=CHCH ₂ CH=	Relié à 5,30 à 5,38
131,94	C=C conjugués	Relié à 5,39
132,5	C=C conjugués	Relié à 5,42
134,36	C=C conjugués	Relié à 5,60
173,01	C=O	

L'ensemble des analyses RMN confirme que les déplacements chimiques à 4,13 et 4,22ppm correspondent bien à l'hydrogène du carbone portant l'hydroperoxyde – CHOOH-. Ces déplacements correspondent aux chaînes linoléiques, les signaux des hydroperoxydes des autres chaînes se superposant à des signaux propres à la tête polaire de la phosphatidylcholine (Molécule 5-14). Ainsi, le rendement en hydroperoxydes est plutôt calculé selon l'intégration des signaux entre 11,1 et 11,4 ppm (Tableau 5-2).



Molécule 5-14. Tête polaire de la phosphatidylcholine avec déplacements chimiques en RMN ¹H

Le Tableau 5-2 montre un rendement plus important en hydroperoxydes pour la lécithine de soja que pour les acides gras qui la constituent. Sachant que la formation d'hydroperoxydes s'accompagne dans le cas des acides linoléiques et linoléiques par l'apparition de diènes et/ou

triènes conjugués, une étude en UV des différents échantillons à plusieurs dilutions permet de calculer les coefficients d'extinction des différents produits à 233nm et 270nm (Tableau 5-3). Pour transformer le coefficient d'extinction massique en son pendant molaire, une masse molaire de 775 g.mol⁻¹ a été considérée pour la lécithine, considérant sa composition en acides gras.

Tableau 5-2. Rendements en hydroperoxydes des différents substrats.

Substrat oxydé	<u>CH</u> -OOH		<u>CH</u> -OO <u>H</u>		Rendement*
	Déplacements chimiques (ppm)	Intégration	Déplacements chimiques (ppm)	Intégration	$\frac{100 \times INT(OOH)}{MAX_{th}(OOH)}$
Acide oléique	4,04 , 4,09	0,14 , 0,02	11,2	0,14	14 %
Acide linoléique	4,13 , 4,22	0,05 , 0,05	11,2-11,4	0,12	12 %
Acide linoléique	4,03 – 4,30	0,14	11,3-11,4	0,14	14 %
Lécithine de Soja	4,13, 4,22	0,24 , 0,27	11,3-11,6	0,66	40

* Un rendement de 100% est atteint si chaque chaîne insaturée contient un hydroperoxyde.

Tableau 5-3. Coefficients d'extinction de la lécithine de soja et de ses acides gras polyinsaturés majoritaires.

Substrat Oxydé	ϵ_c	ϵ_c	ϵ_n	ϵ_n
	(233nm) (L.g ⁻¹ .cm ⁻¹)	(270nm) (L.g ⁻¹ .cm ⁻¹)	(233nm) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	(270nm) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Lécithine de soja PC	5,88	0,19	4557	147
Acide linoléique	5,38	-	1509	-
Acide linoléique	7,94	0,9	2211	251

Ces résultats (Tableau 5-3) confirment l'étude RMN avec des diènes et triènes conjugués bien plus concentrés dans la lécithine de soja oxydée que sa constitution en acides gras ne le laisserait présager. Concernant les diènes conjugués, alors que les acides linoléique et linoléique ne représentent qu'environ 70% des acides gras de la lécithine, cette dernière a un coefficient d'extinction molaire plus de deux fois supérieur à ces derniers. Au niveau des triènes, alors que l'acide linoléique ne représente qu'environ 10% de la lécithine, celle-ci a un coefficient

d'extinction molaire supérieur à la moitié de celui de cet acide. Ainsi, il est clair que l'oxydation de la lécithine de soja par photosensibilisation avec le bleu de méthylène suit un parcours privilégié par rapport aux acides gras. Il est vraisemblable qu'une forte interaction se produise entre le photosensibilisateur et les phospholipides, cela rejoignant les différences de coloration observées lors de l'utilisation du bleu de méthylène pour le dosage des lipides polaires.

Plan d'expériences

De façon à mieux comprendre et, à terme, mieux contrôler l'oxydation des phospholipides par photosensibilisation, il est important de préciser les principaux paramètres intervenant. Le temps de traitement est un paramètre intéressant car il dépend de la durée de vie du bleu de méthylène. Ce dernier se dégrade en présence de phospholipides et d'air, perdant à la fois sa charge positive et sa coloration. En effet, d'après des tests témoins, un échantillon composé uniquement de bleu de méthylène dans l'éthanol ne se dégrade pas après 8 heures d'illumination, un échantillon recouvert de papier aluminium et placé dans le soleil artificiel pendant 8 heures ne réagit quasiment pas et un échantillon préalablement mis sous azote ne réagit pas non plus, indiquant que c'est bien la réaction du bleu de méthylène avec l'air et les phospholipides sous illumination qui provoque sa dégradation. Une fois que ce dernier est consommé, l'oxydation ne procède plus par photosensibilisation. Des tests ont ainsi été réalisés en suivant l'oxydation avec le temps pour un ratio phospholipides/air fixé (5mL d'une solution de phospholipides à 20mg/mL et 15mL d'air) et trois concentrations différentes de bleu de méthylène. Ils montrent qu'à une concentration de 10^{-3} M dans l'éthanol, le bleu de méthylène se dégrade lentement et une absorbance est encore mesurable après 13 heures d'illumination (absorbance à 290nm). A une concentration plus faible, 10^{-4} M, il n'est que très peu coloré après 8H et à une concentration de 10^{-5} M, il est totalement décoloré. Si le temps est ainsi un paramètre important, la production d'oxygène singulet est directement dépendante de la quantité d'oxygène et de bleu de méthylène. Si le temps est fixé à 8h, il est possible de faire varier la concentration en bleu de méthylène et la quantité d'air pour observer plusieurs réponses ayant trait à la nature et au rendement des composés oxydés mais aussi les propriétés de vésicules formées avec ces derniers.

De façon à observer un large domaine de variations, cinq valeurs de $\log(1/V)$ sont choisies pour le volume (V) de la solution de phospholipides et trois valeurs de $\log(C)$ pour la concentration en bleu de méthylène. Un plan d'expériences est ainsi réalisé avec une matrice de Doehlert comprenant 2 paramètres avec 15 expériences (Tableau 5-4). Celles-ci se décomposent en 7 expériences servant à bâtir un modèle, 3 expériences qui sont des répétitions pour déterminer

une variance expérimentale et enfin 4 expériences tests servant à tester les capacités prédictives du modèle.

Tableau 5-4. Description des différentes expériences de la matrice de Doehlert utilisée pour l'oxydation de lécithine de soja par photosensibilisation au bleu de méthylène.

EXP.	V (mL)	[MB] (mol.L ⁻¹)	Log(1/V) valeur réelle	Log ([MB]) valeur réelle	Log(1/V) valeur X1	Log ([MB]) valeur X2
1	2	1x10 ⁻⁴	-0,3	-4	1	0
2	20	1x10 ⁻⁴	-1,3	-4	-1	0
3	3,5	1x10 ⁻³	-0,55	-3	0,5	0,866
4	11	1x10 ⁻⁵	-1,05	-5	-0,5	-0,866
5	3,5	1x10 ⁻⁵	-0,55	-5	0,5	-0,866
6	11	1x10 ⁻³	-1,05	-3	-0,5	0,866
7	6	1x10 ⁻⁴	-0,8	-4	0	0
8 répétition	6	1x10 ⁻⁴	-0,8	-4	0	0
9 répétition	6	1x10 ⁻⁴	-0,8	-4	0	0
10 répétition	11	1x10 ⁻³	-1,05	-3	-0,5	0,866
11 point test	6	1x10 ⁻³	-0,8	-3	0	0,866
12 point test	6	1x10 ⁻⁵	-0,8	-4	0	-0,866
13 point test	15	1x10 ⁻³	-1,18	-3	-0,76	0,866
14 point test	15	1x10 ⁻⁵	-1,18	-5	-0,76	-0,866

Les diverses réponses analysées peuvent être listées (Tableau 5-5) avec les valeurs observées et prédites par les différents modèles. Concernant l'oxydation des phospholipides, le rendement (Rdt) d'hydroperoxydes et les coefficients d'extinction (ϵ_{233}) correspondant aux diènes conjugués sont mesurés. De même, le ratio entre diènes et triènes conjugués ($\epsilon_{233}/\epsilon_{270}$) est calculé. Concernant les vésicules formées à partir de ces phospholipides oxydés, les réponses étudiées sont la taille granulométrique moyenne en intensité (Z), le potentiel zêta ζ , et l'absorbance finale de solutions de vésicules soumises à des tests de perméabilité (A_{inf}). Toutes ces réponses sont détaillées par la suite.

Tableau 5-5. Valeurs des différentes réponses du plan d'expérience.

Exp.	X1	X2	Rdt	Rdt	ϵ_{233}	ϵ_{233}	$\epsilon_{233}/\epsilon_{270}$	$\epsilon_{233}/\epsilon_{270}$	Z	Z	ζ	ζ	A_{inf}	A_{inf}
			obs.	pred.	obs.	pred.	obs.	pred.	obs.	pred.	obs.	pred.	obs.	pred.
			%	%	L.g ⁻¹ .cm ⁻¹	L.g ⁻¹ .cm ⁻¹			nm	nm	mV	mV		
1	1	0	63,13	69,21	13,89	15,00	27,54	27,86	146	141	-0,03	-6,13	0,114	0,113
2	-1	0	26,25	20,17	5,20	4,10	15,96	15,64	338	342	4,08	10,18	0,409	0,410
3	0,5	0,866	60,63	54,55	15,91	14,81	16,17	15,85	126	130	5,24	11,34	0,138	0,193
4	-0,5	-0,866	30,63	36,71	4,54	5,65	28,59	28,91	523	518	2,54	-3,56	0,253	0,252
5	0,5	-0,866	43,13	43,96	6,74	5,64	27,71	27,39	308	312	2,55	8,65	0,190	0,191
6	-0,5	0,866	2,50	5,86	3,24	3,89	1,98	2,11	134	126	47,60	39,85	0,362	0,376
7	0	0	43,75	43,96	9,02	8,81	29,77	32,31	228	237	4,31	3,54	0,163	0,161
8	0	0	45,00	43,96	8,70	8,81	32,80	32,31	248	237	3,33	3,54	0,166	0,161
9	0	0	43,13	43,96	8,72	8,81	34,36	32,31	236	237	2,97	3,54	0,155	0,161
10	-0,5	0,866	3,13	5,86	3,44	3,89	1,91	2,11	122	126	38,20	39,85	0,391	0,376
11	0	0,866	26,25	30,02	8,23	9,17	4,25	11,62	96	127	26,00	25,97	0,169	0,233
12	0	-0,866	40,00	36,70	6,21	5,46	29,71	30,79	284	414	-1,72	2,92	0,231	0,197
13	-0,76	0,866	0,63	-6,57	2,64	1,30	1,52	-4,93	122	126	42,50	46,77	0,546	0,470
14	-0,76	-0,866	16,25	36,86	2,72	5,89	20,06	25,85	360	573	-2,30	-7,23	0,414	0,300

Corrélations

Les corrélations entre les différentes réponses et variables (Tableau 5-6) pourront également servir de base à l'interprétation des résultats de ce plan.

Tableau 5-6. Coefficients de corrélation entre les différentes variables

	X1 <i>log(1/V)</i>	X2 <i>log(C)</i>	<i>Rendement</i>	ϵ_{233nm}	$\epsilon_{233nm}/\epsilon_{270nm}$	<i>Z moyen</i>	ζ	A_{inf}
X1	1							
X2	-0,06	1						
<i>Rendement</i>	0,82	-0,31	1					
ϵ_{233nm}	0,83	0,14	0,89	1				
$\epsilon_{233nm}/\epsilon_{270nm}$	0,44	-0,74	0,75	0,39	1			
<i>Z moyen</i>	-0,29	-0,85	0,09	-0,31	0,56	1		
ζ	-0,38	0,76	-0,77	-0,45	-0,88	-0,60	1	
A_{inf}	-0,84	0,17	-0,87	-0,81	-0,63	0,03	0,56	1

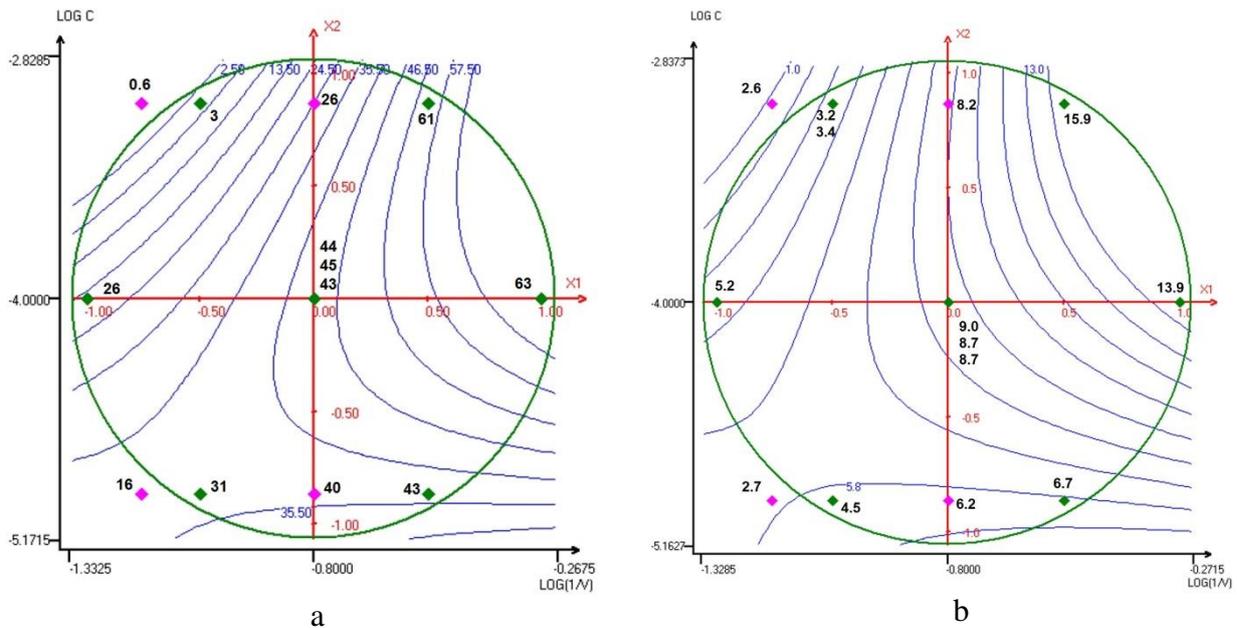
Rendement et coefficients d'extinction

Le rendement de la réaction d'hydroperoxydation (soit la quantité d'hydroperoxydes produits par rapport à la quantité obtenue si toutes les chaînes insaturées contenaient un hydroperoxyde), a été déterminé par l'intégration des signaux RMN correspondant aux hydroperoxydes (-OOH). Le modèle proposé est :

$$Y = 44,76 + 26,43 \cdot \log(1/V) - 3,15 \log C_{MB} - 1,27 [\log(1/V)]^2 - 16,72 [\log C_{MB}]^2 + 17,75 \log(1/V) \times \log C_{MB}$$

$$R^2 = 0,915$$

Le détail statistique de l'analyse des réponses se trouve en annexe (ANNEXE 19). L'analyse de la variance du modèle proposé pour cette réponse indique une faible probabilité que le modèle ne décrive pas correctement les valeurs expérimentales ($P_1 < 0,01$). Ainsi, la régression est hautement significative. Cependant, la comparaison des expériences répétées montre une faible erreur expérimentale qui ne permet pas d'englober les différences trouvées entre le modèle et l'expérience ($P_2 = 0,041$). Le modèle reste qualitatif et permet déjà de comprendre que le rendement est particulièrement dépendant de $\log(1/V)$. Selon le Tableau 5-6, cette dépendance est d'autant plus remarquable. Ainsi, le rendement dépend bien plus du volume d'air dans le milieu que de la concentration en bleu de méthylène. Une augmentation de la concentration en bleu de méthylène ne s'accompagnant d'ailleurs pas forcément d'une augmentation du rendement, celui-ci étant maximal à des concentrations intermédiaires de photosensibilisateur (Figure 5-6a).



Cette baisse de rendement aux fortes concentrations de bleu de méthylène soulève plusieurs hypothèses. Certains auteurs ont affirmé que le bleu de méthylène pouvait polymériser à haute concentration et perdre ainsi en efficacité. Selon certains (Bergmann et O'Konski, 1963; Florence et Naorem, 2014; Tafulo *et al.*, 2009), la présence de dimères et trimères pourrait être déterminée par des absorbances à plus faibles longueurs d'onde que le monomère. Ainsi, des analyses des spectres UV/visible pour différentes concentrations de bleu de méthylène dans l'éthanol ont été effectuées. Celles-ci ont montré que les ratios des absorbances à 654 nm sur les absorbances à 616nm (dimère) et 490nm (trimères) ne diminuaient pas avec la concentration. Ces résultats rejoignent ceux qui ont déjà été observés avec le méthanol (Zhao et Malinowski, 1999) et ce qui avait été déjà remarqué avec l'éthanol à température ambiante il y a plus de 70 ans (Lewis *et al.*, 1943), contrairement à ce qui est généralement observé avec l'eau. Par contre, aux hautes concentrations de bleu de méthylène, lorsque le volume d'air est faible, la quantité d'oxygène est insuffisante pour dégrader ce photosensibilisateur de façon significative le long des huit heures de réaction. Le milieu conserve ainsi une absorbance très importante à 654 nm, la longueur d'onde caractéristique pour la génération d'oxygène singulet. Plusieurs essais ont été réalisés pour déterminer justement le coefficient d'extinction du bleu de méthylène seul à cette longueur d'onde. L'importante valeur trouvée, $\epsilon_{MB(654nm)}=258 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, proche de la valeur de $260\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ donnée par la littérature (Mahmood *et al.*, 2013) permet de calculer l'atténuation subie par la lumière le long de sa traversée d'un échantillon de bleu de méthylène. En lien avec l'expérience, cela indique que 99,9% de la lumière de cette longueur d'onde est absorbée après seulement un parcours optique de 1mm dans une solution à 35mg/100mL de bleu de méthylène.

(Figure 5-7). Ainsi, l'échantillon n'est pas illuminé en profondeur et la réaction se fait difficilement aux hautes concentrations en bleu de méthylène.

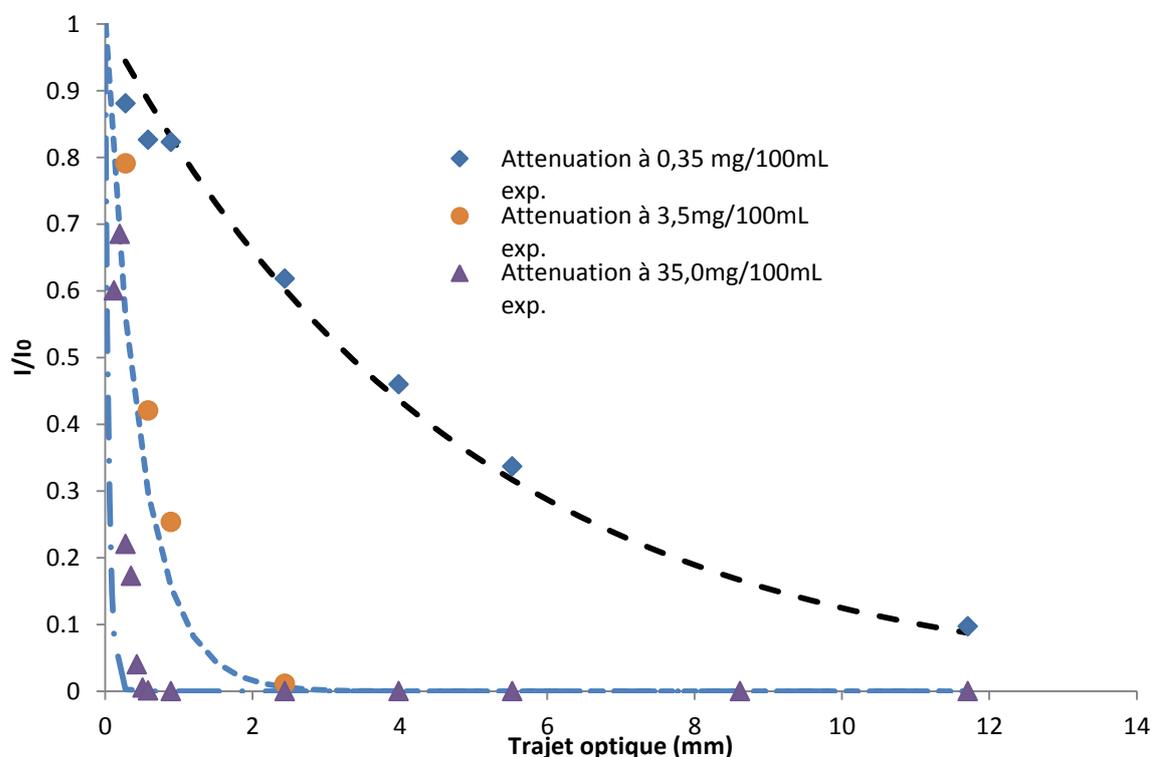


Figure 5-7. Atténuation de la lumière ($\lambda=654\text{nm}$) selon le trajet optique en fonction de la concentration en bleu de méthylène.

Les observations faites sur le rendement peuvent être appliquées au coefficient d'extinction à 233nm (Figure 5-6b). Celui-ci se détermine en mesurant l'absorbance à 233nm pour plusieurs concentrations de phospholipides. Le modèle proposé est :

$$\varepsilon_{233\text{nm}} = 8,91 + 5,71 \times \log(1/V) + 2,17 \times \log C_{\text{MB}} + 0,48 \times [\log(1/V)]^2 - 2,38 \times [\log C_{\text{MB}}]^2 + 4,59 \times \log(1/V) \times \log C_{\text{MB}}$$

$$R^2 = 0,934$$

Les deux réponses sont fortement corrélées comme la production d'hydroperoxydes s'accompagne généralement de la formation de diènes. Si le modèle est ici plus qualitatif que quantitatif, il est important de noter que le coefficient d'extinction ne diminue pas aux conditions d'oxydation les plus poussées (volume maximal d'air et concentration la plus élevée de bleu de méthylène). Ainsi, il semble que les doubles liaisons conjuguées ne sont pas significativement dégradées par une scission oxydative. Selon certains chercheurs, l'absence de produits de scission oxydative prouve que l'oxydation par photosensibilisation se produit principalement par un mécanisme de type II, impliquant l'oxygène singulet (Itri *et al.*, 2014).

Concernant les triènes conjugués et notamment le ratio des coefficients d'extinction 233nm/270nm (diènes conjugués sur triènes conjugués), il faut tout d'abord noter que le bleu de méthylène possède une bande d'absorption centrée sur 290nm et, par conséquent, peut intervenir dans l'absorbance mesurée à 270nm. Cette perturbation n'est valable que dans le cas de la plus forte concentration en bleu de méthylène, lorsque la quantité d'air est trop faible pour avoir induit une dégradation importante. Plusieurs expériences montrent que, dans ce cas, l'extinction à 270nm peut être surestimée d'environ 10% et donc le ratio légèrement sous-estimé.

Ce ratio est parfaitement décrit par le modèle polynomial suivant :

$$\epsilon_{233\text{nm}/270\text{nm}} = 32,31 + 6,11 \times \log(1/V) - 11,07 \times \log C_{\text{MB}} - 10,56 \times [\log(1/V)]^2 - 14,81 \times [\log C_{\text{MB}}]^2 + 8,81 \times \log(1/V) \times \log C_{\text{MB}}$$

$$R^2 = 0,991$$

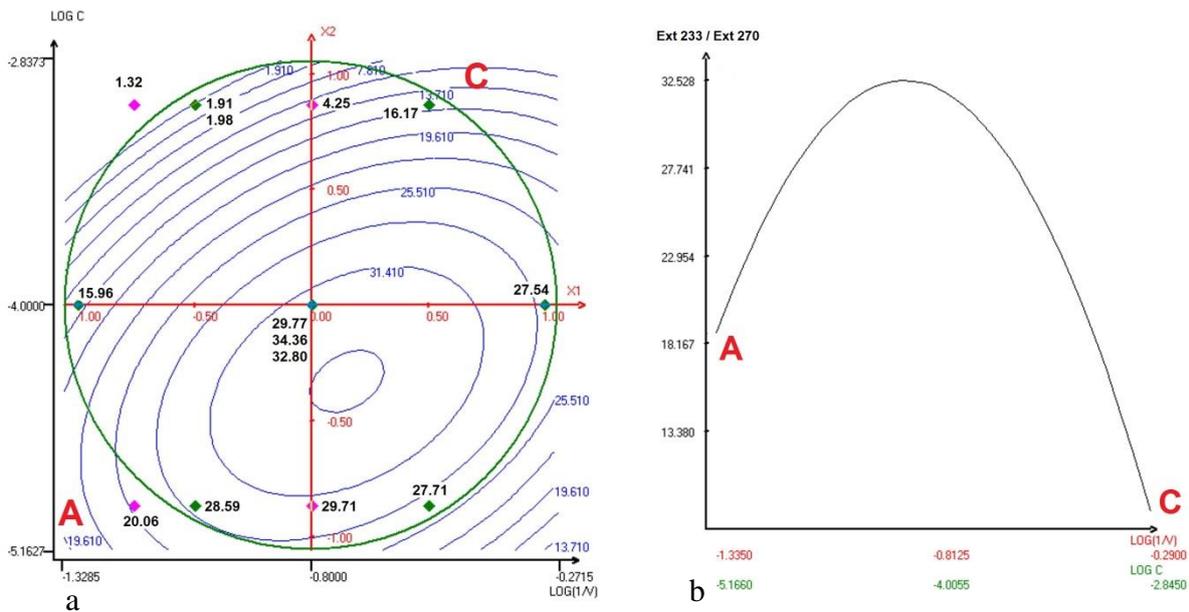


Figure 5-8. Courbe d'isoréponse du ratio des coefficients d'extinction $\epsilon_{233\text{nm}/270\text{nm}}$ (a), Evolution de ce ratio en suivant la ligne A-C entre un milieu A faiblement concentré en bleu de méthylène et sous faible volume d'air à un milieu C concentré en bleu de méthylène et sous un grand volume d'air (b).

Ce modèle possède une meilleure validité que celui obtenu pour l'extinction à 233nm. Si les points tests sont considérés, il apparaît que deux valeurs calculées (expériences 11 et 13, Tableau 5-5) sont significativement différentes des valeurs expérimentales. Le modèle reste donc principalement descriptif.

Le tableau des corrélations, (Tableau 5-6), la courbe d'isoréponse (Figure 5-8a) et l'équation ci-dessus confirment que le ratio des coefficients d'extinction est inversement corrélé

avec la concentration en bleu de méthylène mais aucune relation linéaire n'existe entre des conditions peu oxydantes et fortement oxydantes (Figure 5-8b). Une hypothèse peut être formulée considérant que lorsque le volume d'air est faible et que le bleu de méthylène est fortement concentré, les phospholipides sont uniquement dégradés en surface de l'échantillon, subissant une forte concentration d'oxygène singulet dans un volume réduit, ce qui pourrait induire une oxydation importante. Avec de plus hauts niveaux d'oxygène, le bleu de méthylène se dégrade peu à peu, permettant une illumination graduelle de l'échantillon et ainsi une homogénéisation des mécanismes d'oxydation.

Taille et Potentiel Zêta des vésicules

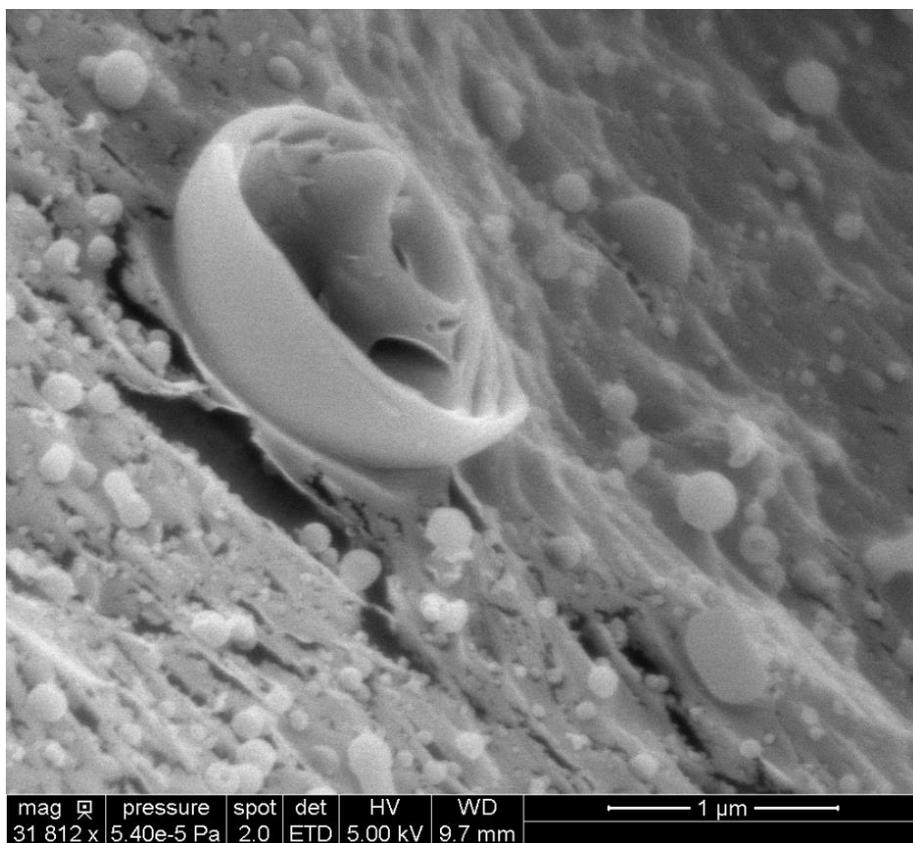


Figure 5-9. Image en CRYO-MEB d'une solution de vésicules de phosphatidylcholine de soja dispersées dans l'eau par ultrasonication.

1 mL d'une solution de lécithine de soja dans l'éthanol absolu (20mg/mL), après évaporation de l'éthanol, a été dispersée dans 2mL d'eau distillée par ultrasonication (3min avec sonde de 3mm de diamètre, pulsation : 5s ON/10s OFF, amplitude : 57μm/20%). Après refroidissement à haute pression (LEICA EM ICE), elle a été observée en microscopie électronique à balayage. La Figure 5-9 semble montrer une vésicule multi-lamellaire de lécithine

de soja, sans doute coupée en deux par la cryofracture. Son diamètre est alors supérieur à 1 μm . Elle est entourée d'un grand nombre d'objets plus petits. Même si l'eau refroidie peut prendre la forme de petits objets sphériques, il peut s'agir de petites vésicules.

L'observation précise de vésicules inférieures à 100nm nécessiterait une plus grande résolution microscopique (par exemple en microscopie électronique à transmission) pour obtenir une distribution granulométrique en nombre. Cependant, les vésicules formées avec les phospholipides oxydés peuvent être analysées très simplement par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Dans cette analyse, la distribution est obtenue selon l'intensité diffusée, les objets de plus gros diamètres diffusant davantage la lumière et étant alors davantage représentés que les petites vésicules. Les solutions contiennent une population trop polydisperse pour pouvoir correctement manipuler le signal obtenu de façon à facilement transformer la distribution en intensité en une distribution en volume ou en nombre. Ainsi, seule la moyenne granulométrique en intensité (Z-moyen) donne des résultats stables. Cependant, d'un point de vue qualitatif, l'obtention de mesures indiquant la présence de vésicules de diamètre inférieur à 20nm est un signe que l'ultrasonication a principalement généré des liposomes unilamellaires (Akbarzadeh *et al.*, 2013). Les résultats concernant la moyenne en volume et en nombre sont disponibles en annexe (ANNEXE 20).

L'analyse statistique concernant Z-moyen montre une bonne pertinence du modèle ($P_1 < 0,01$) et une validité correcte ($P_2 = 31,9$). L'équation relative à cette réponse est :

$$Z = 237 - 101 \times \log(1/V) - 166 \times \log C_{MB} + 4 \times [\log(1/V)]^2 + 45 \times [\log C_{MB}]^2 + 121 \times \log(1/V) \times \log C_{MB}$$

$$R^2 = 0,997$$

La plus faible taille des vésicules dans les échantillons oxydés peut provenir d'une déstabilisation des vésicules due à l'oxydation mais peut aussi indiquer que les phospholipides oxydés autorisent une affinité plus importante avec l'eau et donc des tensions interfaciales plus faibles, ce qui peut permettre d'obtenir davantage de surface entre phospholipides et l'eau et donc des vésicules plus petites. L'hypothèse de l'éjection de produits de peroxydation solubles soulevée par des chercheurs (Caetano *et al.*, 2007) ne semble pas pertinente même si elle pourrait participer au phénomène pour les forts taux d'oxydation.

Cette réponse n'est que peu corrélée avec le rendement mais est inversement corrélée avec la concentration en bleu de méthylène. En effet, de petites vésicules sont obtenues à des hautes concentrations en bleu de méthylène, même avec de faibles niveaux d'oxydation. La courbe

d'isoréponse (Figure 5-10) montre bien ce comportement. Malgré sa présence à des concentrations molaires bien plus faibles que celle des phospholipides ($1\text{mM} \ll 25\text{mM}$), le bleu de méthylène pourrait fortement contribuer aux propriétés de surface des vésicules. Comme ce composé est positivement chargé, une mesure du potentiel zêta peut apporter des éclaircissements.

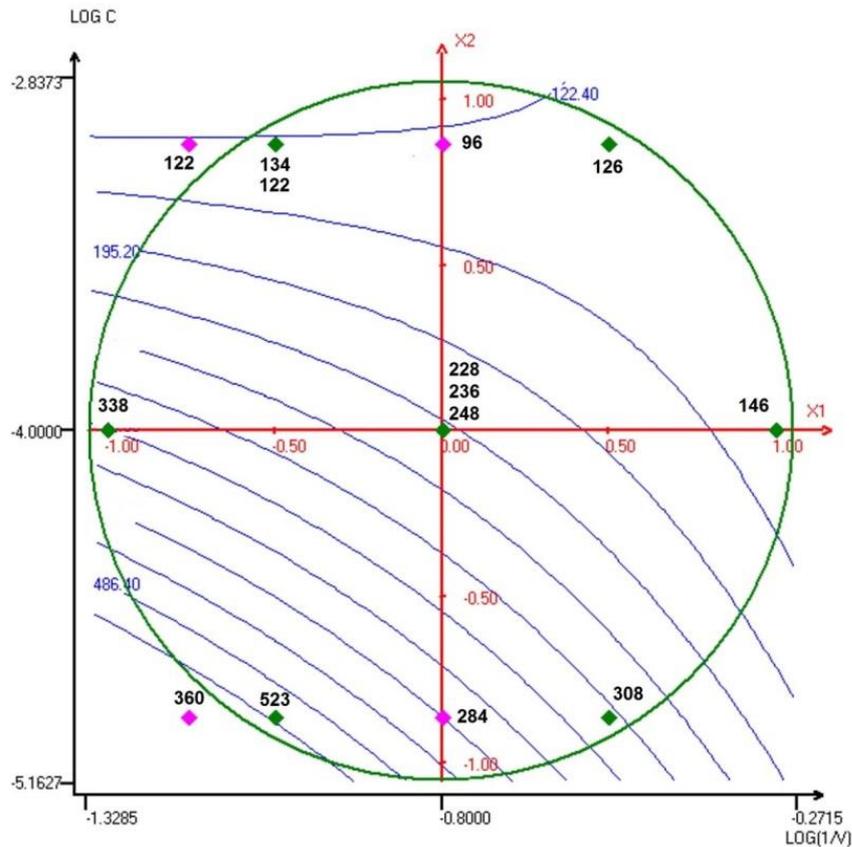


Figure 5-10. Courbe d'isoréponse de la taille moyenne en intensité (nm) des vésicules formées à partir des phospholipides oxydés au cours des différentes expériences du plan.

En analysant le potentiel zêta des différentes solutions de vésicules, un modèle peut être utilisé avec une bonne pertinence ($P_1=0,867$) même si la validité du modèle demeure faible ($P_2=3,46$).

Rappelons ici que la nature zwitterionique de la phosphatidylcholine pourrait laisser présager un potentiel zêta nul des vésicules. Cependant, lorsque des vésicules sont formées avec uniquement de la lécithine de soja non oxydée, un potentiel zêta négatif est obtenu ($-8,66 \pm 0,42$ mV $N=3$). Ainsi, la charge de la molécule est tout aussi importante que l'exposition de cette dernière vers le milieu extérieur. La phosphatidylcholine semble exposer davantage son groupement phosphate que son groupement choline (Chibowski et Szcześ, 2016; Makino *et al.*, 1991). Quand le bleu de méthylène est ajouté à une forte concentration, s'il est non dégradé, alors le potentiel zêta est positif (Figure 5-11). Ce potentiel peut même atteindre des valeurs supérieures

à 40mV et induire ainsi de fortes répulsions électrostatiques entre les vésicules, ce qui peut permettre de limiter leur agrégation et coalescence et partiellement expliquer la plus faible taille des vésicules obtenues. Par contre, lorsque le bleu de méthylène est dégradé et que sa charge a ainsi disparu, des potentiels zêtas négatifs sont à nouveau obtenus. La forte contribution du bleu de méthylène au potentiel zêta, confirmée par un haut coefficient de corrélation, implique le positionnement de cette molécule à la surface des vésicules, proche des phospholipides, ce qui rejoint la plus forte réactivité de ce dernier avec les phospholipides qu'avec les acides gras.

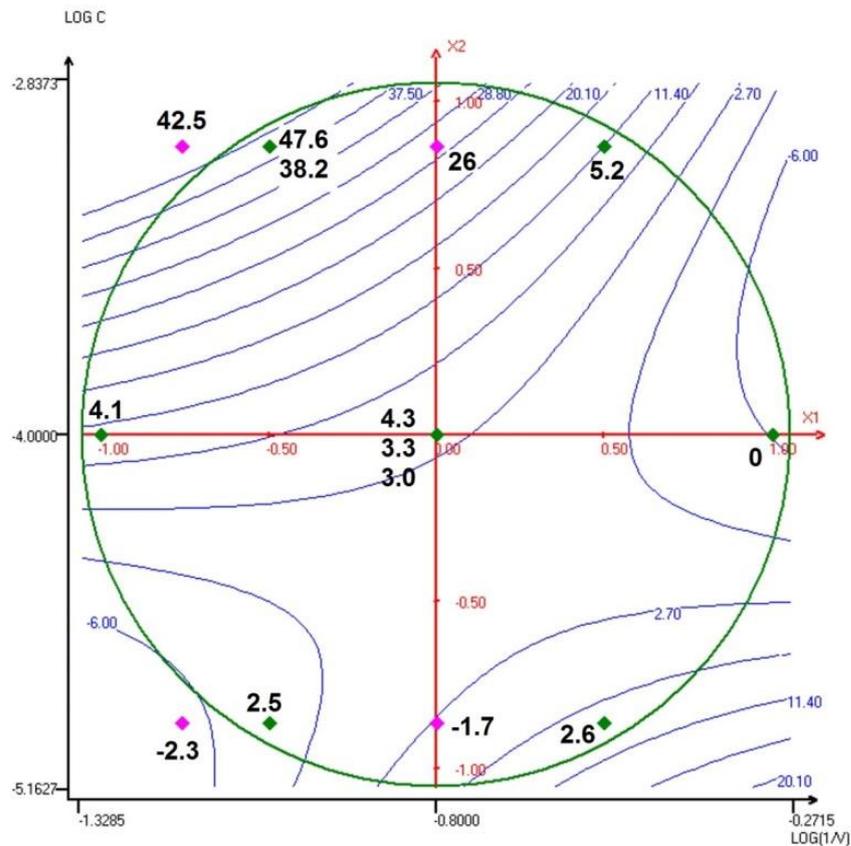


Figure 5-11. Courbe d'isoréponse du potentiel zêta des vésicules formées à partir des phospholipides oxydés au cours des différentes expériences du plan.

Le bleu de méthylène pourrait s'adsorber sur la surface zwitterionique et changer l'orientation du dipôle P-N (Haugen et May, 2007). Il est ainsi possible qu'en plus de sa charge propre, il permette d'augmenter l'expression de la charge positive portée par le groupement choline. De même, il est étonnant de constater que des potentiels zêta positifs sont aussi observés avec de faibles concentrations de bleu de méthylène et de faibles volumes de solution (soit des volumes d'air importants), alors que le bleu de méthylène est ainsi totalement dégradé et a sans doute perdu sa charge positive. Dans ce cas, le potentiel zêta provient exclusivement de la conformation du

groupe phosphocholine. Selon certains chercheurs, celle-ci peut dépendre de la force ionique (Makino *et al.*, 1991) et, en effet, une augmentation de la conductivité est constatée avec l'augmentation de la concentration en bleu de méthylène. Cependant, à la faible concentration considérée, selon cette étude, la charge négative du groupement phosphate devrait être plus importante. En l'absence de photosensibilisation, l'hypothèse peut être faite de produits d'oxydation différents impliquant le groupement phosphate ou interagissant préférentiellement avec lui. Cependant, la RMN, dans le mode ^1H ou ^{31}P , ne permet pas d'identifier de tels composés. Une autre possibilité est une plus grande orientation des acides gras hydroperoxydés vers la phase aqueuse externe, interagissant potentiellement avec les groupements anioniques même si des chercheurs indiquent que les hydroperoxydes restent dans le cœur de la membrane (Siani *et al.*, 2016).

Etude de perméabilité

Méthode de mesure :

Les liposomes ont des perméabilités différentes selon les solutés qui les traversent. Ainsi, ils sont en général très perméables aux gaz et à l'eau mais beaucoup moins aux ions et d'autres molécules organiques. Ainsi, lorsqu'une vésicule renferme un sel à une concentration différente du milieu extérieur, la pression osmotique qui va résulter de cette différence de concentration va avoir principalement pour effet d'augmenter la quantité d'eau à l'intérieur de la vésicule pour diminuer la concentration du soluté ou de diminuer cette quantité d'eau pour augmenter cette concentration. Ainsi, la vésicule va changer de taille selon qu'elle contient plus ou moins d'eau. Si la perméabilité du soluté n'est pas négligeable, cette variation de taille sera compensée par la perte ou le gain de soluté. En considérant que le taux de perméation d'un soluté obéit à la première loi de diffusion de Fick et dépend de la variation de concentration en solutés, la quantité de soluté dans une vésicule varie de façon exponentielle (Clerc et Thompson, 1995) :

$N_{\text{soluté}} = A_s + B_s \cdot \exp(-k_s \cdot t)$ où A_s et B_s sont des constantes, k_s est la constante de perméabilité du soluté et $N_{\text{soluté}}$ est la quantité de molécules de soluté dans la vésicule. La quantité de molécules d'eau dans la vésicule varie selon la même loi :

$$N_w = A_w + B_w \cdot \exp(-k_w \cdot t).$$

Le volume de la vésicule dépendra du nombre de molécules d'eau et de solutés. Ainsi :

$$V_{liposome} = V_{inf} + B.exp(-k_s t) + C.exp(-k_w t)$$

où V_{inf} est le volume de la vésicule au temps infini, B et C, les contributions respectives du soluté et de l'eau au volume du liposome.

Selon la théorie de Mie, le facteur d'efficacité de diffusion de la lumière Q_{diff} s'écrit (Bernal *et al.*, 1999; Mie, 1908):

$$Q_{diff} = Re \left[\frac{8}{3} x^4 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \right] \text{ avec } x = \frac{2\pi r}{\lambda} \cdot N_{eau} \text{ et } m = \frac{N_{liposome}}{N_{eau}}$$

N_i est l'indice de réfraction du composé i , λ est la longueur d'onde, r , le rayon de la particule diffusante. Pour une particule non absorbante, l'extinction est seulement causée par la diffusion et $Q_{ext} = Q_{diff}$.

L'absorbance ou la densité optique peut s'écrire, en considérant toutes les particules, un trajet optique L et une concentration de Z particules par unité de volume (Mulvaney et Liz-Marzán, 2003) :

$$OD_{\lambda} = Z\pi r^2 L Q_{scat} \cdot \log(e)$$

Ainsi, l'absorbance dépend de r^6 ou V^2 et il est possible d'écrire :

$OD_{\lambda} = A_{inf} + \sum_i A_i \exp(-k_i t)$ où les constantes k_i dépendent des constantes de perméabilité de l'eau et du soluté et A_{inf} est l'absorbance au temps infini.

Dans le cas où la vésicule est un osmomètre idéal, alors la perméation du soluté est très inférieure à celle de l'eau et le volume de la vésicule peut s'écrire :

$$V_{liposome} = V_{inf} + C.exp(-k_w t)$$

Ainsi, il est possible de modéliser les changements d'absorbance par une loi exponentielle :

$Abs = Ab_{seq} + \Delta A \exp(-kt)$ avec Ab_{seq} : l'absorbance à l'équilibre (temps infini), ΔA la variation d'absorbance entre celle à $t=0$ (Abs_0) et celle à l'équilibre : $\Delta A = Abs_0 - Ab_{seq}$; k une constante.

Celle loi peut être corrélée au volume des vésicules. Cependant, le choc osmotique que peut subir une vésicule est en général si bref que le changement de taille initial est difficilement mesurable par la mesure de l'absorbance. Par contre, la remise à l'équilibre de la vésicule est

suffisamment lente pour pouvoir être observée. Ainsi, une augmentation d'absorbance est alors reliée à une diminution de taille des vésicules tandis qu'une diminution d'absorbance à une augmentation de taille.

La perméabilité des vésicules est directement dépendante de la nature et de la densité des phospholipides les constituant. Sur une vésicule composée de phospholipides non oxydés, la perméabilité de l'eau est de plusieurs ordres de grandeur supérieure à celle d'un sel comme KCl. Il est donc intéressant de comprendre comment l'oxydation des phospholipides peut modifier la perméabilité des vésicules formées à l'eau et à ce sel. Tout d'abord, la perméabilité d'une vésicule formée exclusivement de DLPC (dilinoleylphosphatidylcholine) a été comparée avec celle d'une vésicule formée de lécithine de soja. Pour provoquer les phénomènes de perméation et observer les changements d'absorbance, des vésicules renfermant une solution de KCl à 0,1M vont être dispersées dans une solution hypertonique de KCl 2M.

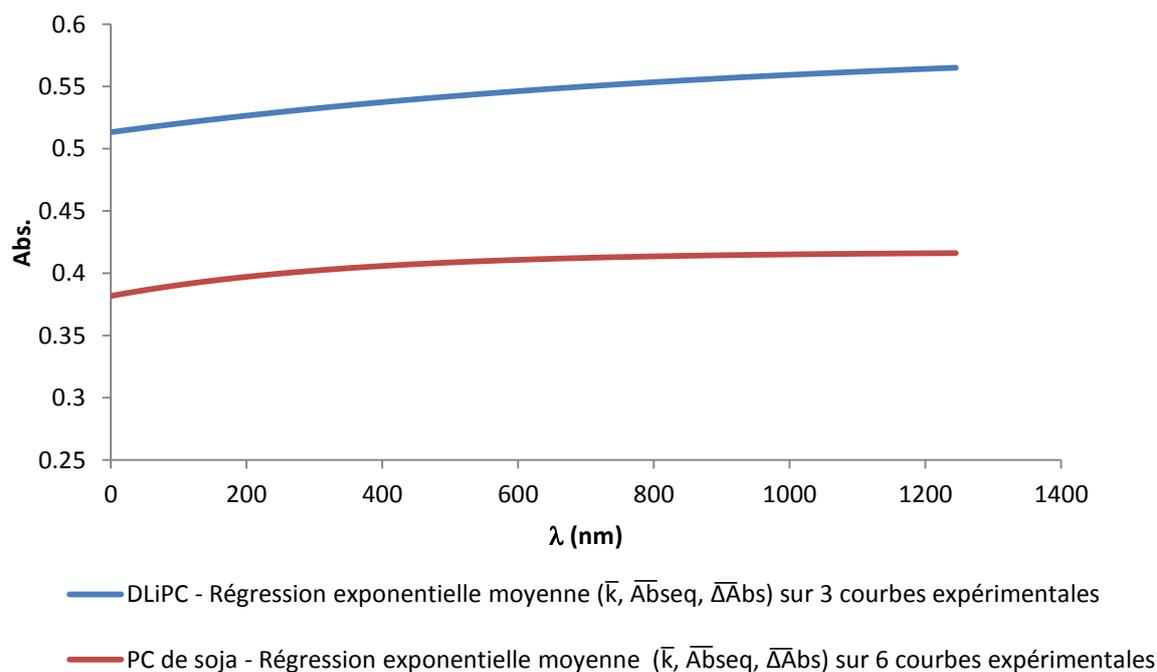


Figure 5-12. Comparaison des régressions exponentielles ($Abs = \Delta Abs \cdot \text{Exp}(-k \cdot t) + Abs_{sequ}$) de l'évolution de l'absorbance de solutions de KCl 2M après l'ajout de solutions hypotoniques (0,1M de KCl) de vésicules de DLiPC ou de lécithine de soja

10mg de phospholipides, dissous dans 0,5mL d'éthanol, après évaporation de ce solvant par bullage d'azote, sont dispersés sous ultrasons (1min avec sonde de 3mm de diamètre, pulsation : 5s ON/10s OFF, amplitude : 29%) dans 1mL d'une solution de KCl 0,1M. Pour éviter une trop grande absorbance et la diffusion multiple, un volume de seulement 25 μ L de cette solution est

ensuite versé dans une cuvette de 1,5mL de KCl 2M. Celle-ci est rapidement agitée manuellement avant de mesurer l'évolution de son absorbance à une longueur d'onde de 450nm.

La pression osmotique qui va s'exercer sur les vésicules va tendre à équilibrer les concentrations intra et extravésiculaires, cet équilibre se produisant d'autant plus vite que la perméabilité aqueuse est importante. L'absorbance des vésicules de DLPC va augmenter avec le temps ($Abs_0 - Abs_{eq.} = -0,072 \pm 0,001$; $Abs_{eq.} = 0,585 \pm 0,028$). Un profil similaire est observé pour la phosphatidylcholine de soja mais avec une plus faible absorbance et une variation moins prononcée, ce qui suggère une plus faible perméabilité de ces vésicules à l'eau (Figure 5-12).

La barrière principale à la perméabilité est généralement la partie la plus ordonnée de la bicouche, la plus dense. Les insaturations amènent un arrangement moins compact et ordonné des chaînes et une augmentation de la fluidité membranaire, ce qui peut entraîner davantage de pores transitoires et augmenter la perméabilité de l'eau. La phosphatidylcholine de soja, comprenant à la fois des chaînes saturées, mono et polyinsaturées, contient moins d'insaturations que la dilinoleylphosphatidylcholine et est donc moins perméable à l'eau.

Si l'évolution de l'absorbance des vésicules issues du plan d'expériences est considérée, il apparaît que, pour nombre d'entre eux, l'absorbance ne varie pas de façon significative, rendant une modélisation de ΔAbs impossible. Cependant, quelques constats peuvent être effectués. L'échantillon correspondant à l'expérience 14, très peu oxydé, a un comportement proche de celui de la lécithine de soja. Les échantillons oxydés avec peu de bleu de méthylène (4, 5 et 12) mais une concentration moyenne à élevée d'air montrent une diminution d'absorbance avec le temps, indiquant ainsi un gonflement des vésicules traduit par une augmentation de la perméation de KCl. Les échantillons avec une concentration moyenne à élevée de bleu de méthylène mais réalisés avec peu d'air (2 et 13), forment de petites vésicules avec une forte absorbance qui augmente avec le temps, indiquant ainsi une rétractation des vésicules due au flux d'eau. Cette haute absorbance peut être partiellement causée par l'absorption due au bleu de méthylène en plus de la diffusion due aux vésicules. Les phospholipides oxydés avec des volumes d'air et des concentrations de bleu de méthylène moyennes et hautes (1, 3, 7, 8, 9, 11) ont formé des suspensions de vésicules d'une faible absorbance qui n'a pas varié avec le temps, indiquant une absence de gonflement/rétractation. Cette faible absorbance peut être liée à la faible taille des vésicules et l'absence de variation à une haute perméabilité membranaire. Ce comportement est aussi observé pour les échantillons correspondant aux expériences 6 et 10, malgré de faibles rendements d'hydroperoxydes et de faibles extinctions à 233nm. Cela peut être alors dû à la haute

concentration de bleu de méthylène, suggérant que cette dernière pourrait augmenter la perméabilité membranaire à de bas niveaux d'oxydation.

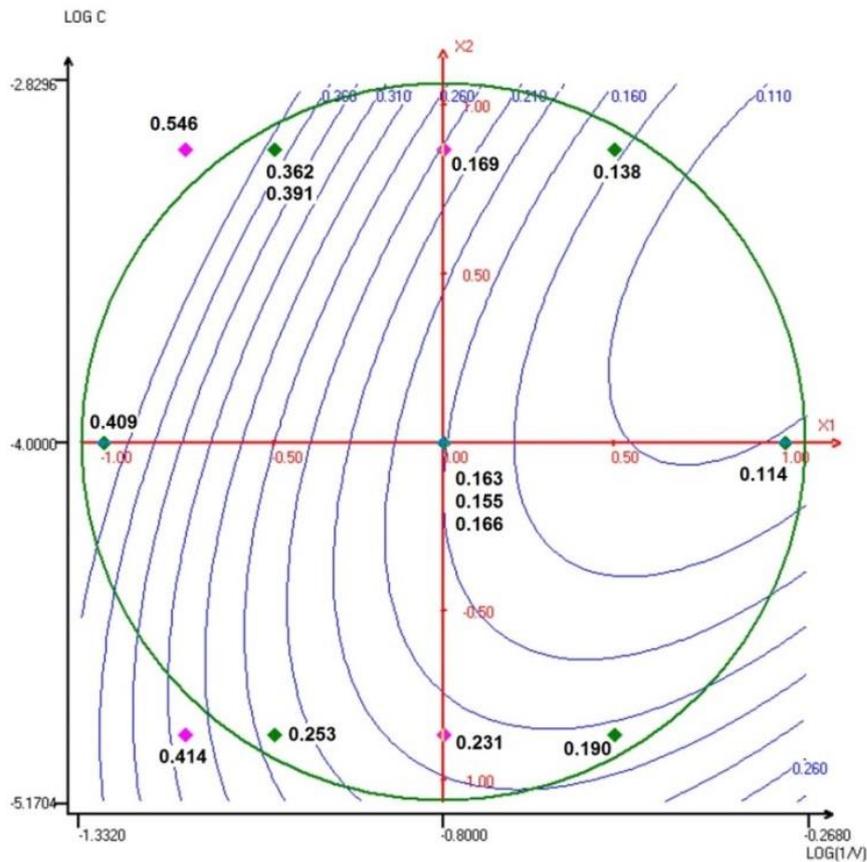


Figure 5-13. Courbe d'isoréponse de l'absorbance à finale (ou à l'équilibre) des vésicules

La surface de réponse correspondant à l'absorbance finale (A_{inf}) peut être obtenue (Figure 5-13) et il est nécessaire de la comparer à la taille initiale des vésicules. L'analyse statistique montre que le modèle est pertinent ($P_1 < 0,01$) avec une très bonne validité ($P_2 = 84,1$). L'équation du modèle polynomial correspondant à l'absorbance finale est :

$$A_{inf} = 0,161 - 0,149 \times \log(1/V) + 0,021 \times \log C_{MB} + 0,100 \times [\log(1/V)]^2 + 0,071 \times [\log C_{MB}]^2 - 0,0102 \times \log(1/V) \times \log C_{MB}$$

$$R^2 = 0,996$$

Les points tests divergent peu des valeurs calculées et, ainsi, le modèle décrit bien les valeurs expérimentales avec une capacité prédictive. Cette dernière serait améliorée en augmentant les degrés de liberté. La surface de réponse ressemble peu à celle de la taille des vésicules. Même si la contribution du bleu de méthylène à l'absorbance doit être prise en compte, l'équation précédente

et le Tableau 5-6 indiquent que l'absorbance à l'équilibre est principalement corrélée au volume de solution tandis que la taille des vésicules est inversement corrélée avec la concentration en bleu de méthylène. A la fois le rendement et les coefficients d'extinction sont inversement corrélés à l'absorbance finale, celle-ci n'étant par conséquent pas dépendante de la taille initiale mais plutôt de la quantité d'hydroperoxydes des phospholipides formant la membrane vésiculaire.

5.1.ii. Modification chimique de l'émulsion

Les phospholipides présents initialement dans les oléosomes des graines ne se retrouvent que partiellement dans l'émulsion obtenue par broyage aqueux des graines, sans doute du fait de l'action enzymatique des phospholipases. Des essais d'oxydation d'une émulsion de tournesol ont cependant été réalisés. Les essais d'oxydation par photosensibilisation pour les phospholipides ont montré que ces derniers s'oxydent bien plus facilement que les acides gras qui les composent. Les oléosomes de tournesol sont composés à leur surface d'une monocouche de phospholipides recouverte de protéines membranaires. Ainsi, il serait intéressant de déterminer s'il est possible d'oxyder ces phospholipides de façon à modifier la perméabilité de la membrane. Cela permettrait d'élargir les possibilités de vectorisation utilisant les oléosomes ou de permettre une extraction facilitée des triglycérides. Les oléosomes sont extraits sous forme d'une émulsion concentrée lors du broyage aqueux des graines suivi d'une centrifugation. L'émulsion comporte environ 50% de lipides. Parmi les lipides, les phospholipides représentent 0,14% massique. 400mg d'émulsion contiendraient ainsi un peu moins de 300 µg de phospholipides. Un lot d'émulsion fourni début novembre 2017 et obtenu par broyage aqueux de 5% de graines de tournesol très haut oléique sous fort cisaillement (Broyeur Silverson à double Rotor + Homogénéisateur haute pression avec 3 cycles à 600 bars) sert d'échantillon de base. Six tubes à essai sont d'abord préparés dans l'éthanol ou l'eau distillée avec ou sans bleu de méthylène.

1. Après homogénéisation à la spatule, 400mg d'émulsion sont prélevés et complétés à 10 mL avec une solution de bleu de méthylène à 3,5mg/100mL d'éthanol pour avoir une concentration d'environ 20mg de lipides/mL
2. De même, 2g d'émulsion sont additivés de 2mL d'une solution de bleu de méthylène à 35mg/25mL dans l'éthanol et homogénéisés au vortex de façon à additiver le photosensibilisateur avec le moins de dilution possible.
3. Un blanc est réalisé avec 2g d'émulsion et 2mL d'éthanol pur.
4. Un blanc est réalisé avec 400mg d'émulsion complétés à 10 mL avec de l'eau distillée.

5. De même que pour l'échantillon 1, 400mg d'émulsion sont ici complétés à 10mL avec une solution de bleu de méthylène à 3,5mg de MB/100mL d'eau distillée.
6. Enfin, 2g d'émulsion avec 2 mL d'une solution de bleu de méthylène à 0,35mg/100mL dans l'éthanol sont réalisés.

Les 6 tubes sont alors placés en quinconce sur un portoir métallique et illuminés pendant 8 heures sous lampe Xénon au sein de l'appareil ATLAS SUNTEST. La température monte jusqu'à 58°C. Après l'illumination, les aspects diffèrent peu entre les blancs et les échantillons traités. Les échantillons 3 et 6 montrent une phase huileuse en surface. Les échantillons 4 et 5 montrent une séparation de phase classique avec présence d'une phase aqueuse et d'une émulsion. L'échantillon 1 montre une phase éthanolique colorée en phase supérieure. L'échantillon 2 est resté très foncé. Les diamètres moyens en volume D(4:3) et la largeur de la distribution (SPAN) des échantillons sont mesurés par granulométrie laser (MALVERN MASTERSIZER 2000) et peuvent être comparés (Tableau 5-7).

Tableau 5-7. Analyse granulométrique des émulsions des différents essais (l'écart-type des mesures est indiqué).

Echantillon	Conditions	D(4:3) (μm)	SPAN
Référence (Emulsion native)		1,96 \pm 0,09	1,051
Essai 1	400mg, 10mL EtOH, 3,5mg MB/100mL	3,81 \pm 2,27	3,098
Essai 2	2g, 2mL EtOH, 140mg MB /100mL	9,72 \pm 2,01	3,518
Essai 3	2g, 2mL EtOH, 0mg MB /100mL	8,07 \pm 1,33	3,294
Essai 4	400mg, 10mL eau, 0mg MB /100mL	2,74 \pm 0,29	1,534
Essai 5	400mg, 10mL eau, 3,5mg MB /100mL	2,87 \pm 0,29	1,593
Essai 6	2g, 2mL EtOH, 0,35mg MB /100mL	8,49 \pm 1,60	3,328

La taille moyenne des émulsions n'est pas significativement différente entre les échantillons additivés de bleu de méthylène et les autres (Tableau 5-7, Figure 5-14). En effet, l'essai 4 donne des gouttelettes semblables à l'essai 5 et l'essai 2 aux essais 3 et 6. L'essai 1, traité avec de l'éthanol, semble donner des gouttelettes un peu plus grosses que les essais 4 et 5 traités avec de l'eau. Par contre, les émulsions peu diluées (essai 2, 3 et 6) donnent des gouttelettes bien plus grosses et avec une distribution de taille (SPAN) plus large, le ratio Solvant/Emulsion étant certainement le facteur le plus influent (Figure 5-15).

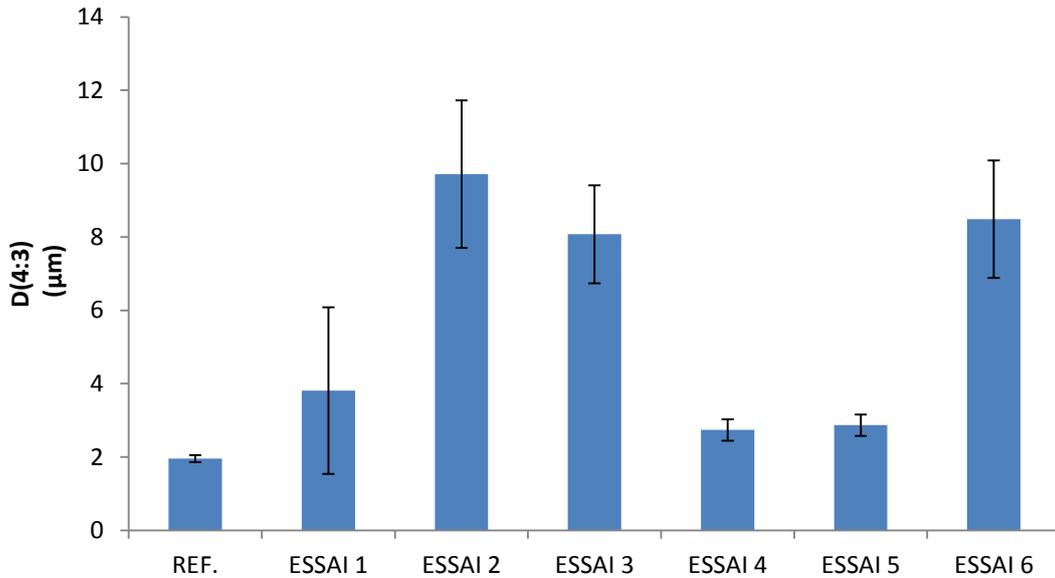


Figure 5-14. Taille moyenne volumique (D(4 :3) des gouttelettes de l'émulsion en fonction des essais

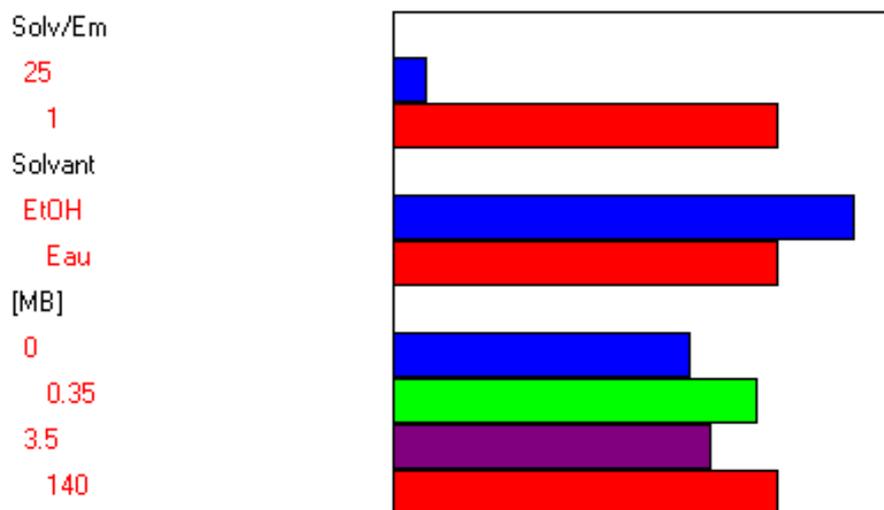


Figure 5-15. Approche qualitative de l'influence des différents facteurs sur la taille moyenne volumique D(4 :3) des gouttelettes de l'émulsion (Solv/Em : Rapport volumique Solvant/Emulsion) – Construction sous NEMRODW 2000.

Après centrifugation, le milieu se sépare en une phase émulsionnée (crème) et une phase aqueuse ou hydroalcoolique avec une faible différence entre les essais avec et sans bleu de méthylène. Les phases hydroalcooliques sont facilement extraites du milieu et les phases aqueuses sont extraites à la pipette, sous la couche de crème. Sur les phases émulsionnées, 9mL d'un mélange chloroforme/méthanol 2 :1 (en volume) sont ajoutés avant homogénéisation au vortex. L'ensemble est laissé reposer avant centrifugation à 5000xg. Les phases chloroforme/méthanol sont récupérées indépendamment des phases aqueuses ou hydroalcooliques. L'ensemble est mis à sécher sous azote jusqu'à stabilisation du poids. Ensuite, l'absorbance à 233 et 270 nm est

mesurée pour chaque échantillon avec des dilutions diverses dans l'éthanol pour calculer les coefficients d'extinction massique correspondants. Une moyenne pondérée est alors calculée entre les coefficients obtenus sur les phases aqueuses/hydroalcooliques et ceux obtenus sur les phases émulsionnées (Figure 5-16).

Rappelons que le coefficient d'extinction à 233nm est relié à la quantité de diènes dans les molécules tandis que le coefficient d'extinction à 270nm est relié à la quantité de triènes dans les molécules. Si les essais 4 et 5 sont comparés, il apparaît que les coefficients d'extinction sont plus élevés dans l'essai 5 correspondant à un ajout de bleu de méthylène. Concernant les essais concentrés 2, 3 et 6, l'échantillon le plus riche en bleu de méthylène (essai 2) a le coefficient d'extinction à 270 nm le plus élevé, suivi de l'échantillon 6 et du 3 dans l'ordre des concentrations en bleu de méthylène. Par contre, concernant le coefficient d'extinction à 233 nm, l'essai n°3, ne contenant pourtant pas de bleu de méthylène, a un coefficient d'extinction plus élevé que les essais 2 et 6. Il n'est pas exclu, en l'absence de répétition des expériences, que ce résultat puisse provenir d'un biais opératoire. L'hypothèse peut être sinon faite que l'émulsion puisse contenir des composés photosensibles (chlorophylle...) ou tout simplement s'oxyder selon d'autres voies, le milieu étant resté à 58°C pendant 8 heures.

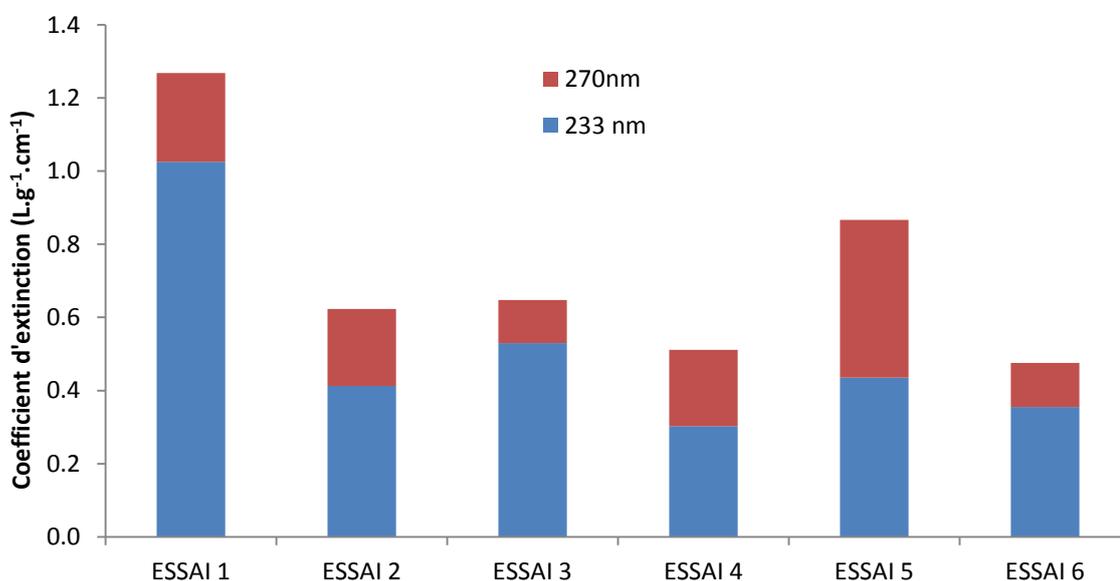


Figure 5-16. Comparaison des coefficients d'extinction massique à 233 et 270nm pour les différents essais

L'échantillon 1 est celui qui comporte le coefficient d'extinction à 233nm le plus élevé. Cet essai est équivalent à l'essai 5 sauf que le solvant est ici de l'éthanol. Ainsi, dans l'éthanol, l'oxydation en diènes semble être beaucoup plus efficace que dans l'eau (Figure 5-16, Figure 5-17).

De même, il apparaît que la concentration optimale en bleu de méthylène soit de 3,5mg/100mL (essais 1 et 5), une concentration à 140mg/100mL (essai 2) étant beaucoup trop importante pour l'obtention de diènes/triènes et une concentration à 0,35mg/100mL donnant des résultats égaux ou inférieurs à ceux obtenus sans bleu de méthylène (Figure 5-17a, Figure 5-17b).

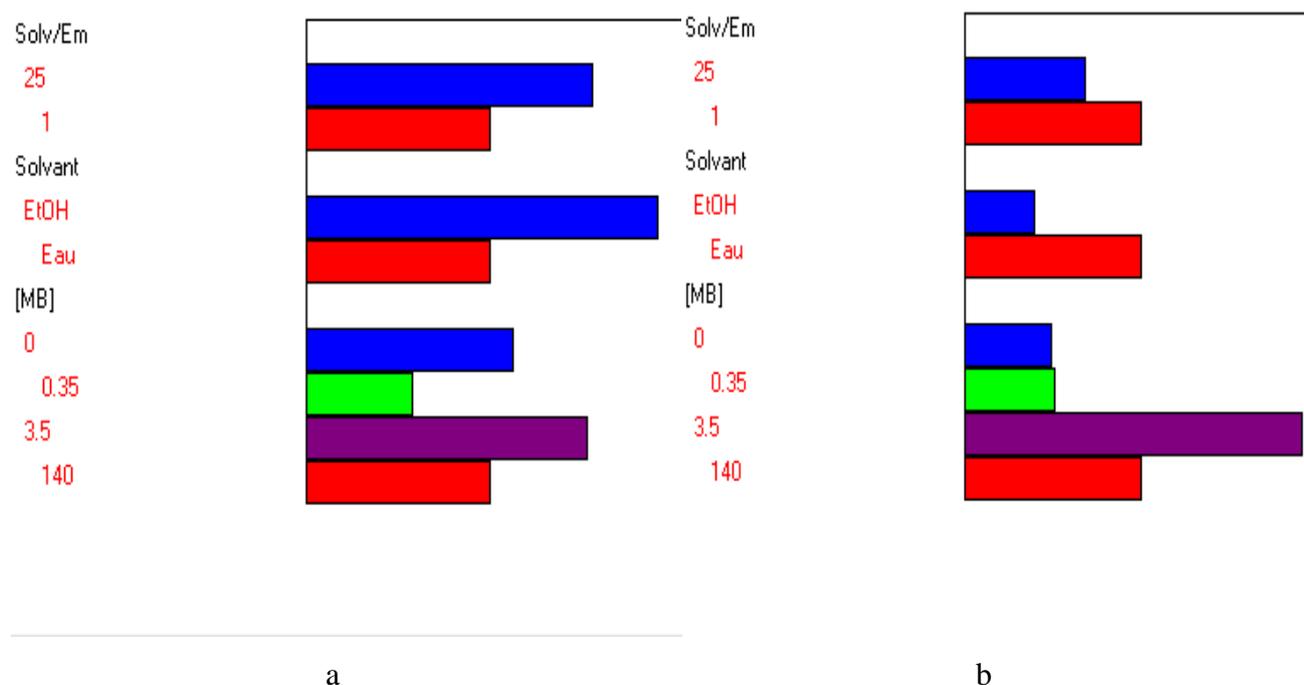


Figure 5-17. Influence des différents facteurs sur l'extinction à 233nm (a) et à 270 nm (b)

En conclusion, d'après ces quelques essais préliminaires, il semblerait que l'éthanol permet d'améliorer l'effet du bleu de méthylène. Une concentration en bleu de méthylène de 3,5mg/100mL est préférable pour augmenter l'oxydation de l'émulsion. De même, une trop forte concentration de l'émulsion provoque, après illumination, une augmentation de la taille des gouttelettes avec une démixtion plus prononcée.

Ces différents essais montrent une absence de fragilisation de l'émulsion avec un déphasage qui n'est pas accéléré et ainsi une tendance à la coalescence non augmentée aux conditions d'oxydation utilisées. Il faut cependant rappeler la faible quantité de phospholipides dans l'émulsion. De même, l'importance de ces derniers sur la stabilité des oléosomes doit être relativisée, la membrane contenant également des oléosines et autres protéines membranaires qui sont moins susceptibles d'être affectées par l'oxydation.

5.2. Etude *in silico*

5.2.i. Les phospholipides, le bleu de méthylène et l'oxygène singulet

Dans un premier temps, il convient de s'intéresser aux phospholipides pris individuellement, particulièrement la phosphatidylcholine sous la forme DLPC, forme préférentielle de la lécithine de soja utilisée dans les expériences *in vitro*. Après recherche du meilleur conformère en mécanique moléculaire avec l'algorithme MM3, la géométrie de ce dernier est optimisée en mode semi-empirique avec l'algorithme PM7 et le modèle de solvation implicite COSMO en considérant l'éthanol comme solvant. Pour ce modèle de solvation, il faut considérer le milieu comme une phase continue de constante diélectrique fixée (ici, 24,3 pour l'éthanol) avec une interaction avec le solvant considérant le rayon effectif de ce dernier. L'éthanol a un rayon effectif de 2,85 Å alors qu'il n'est que de 1,3 Å pour l'eau. Pour des géométries complexes, la modélisation ne peut traiter des rayons effectifs importants et il est alors conseillé de conserver le rayon effectif de l'eau.

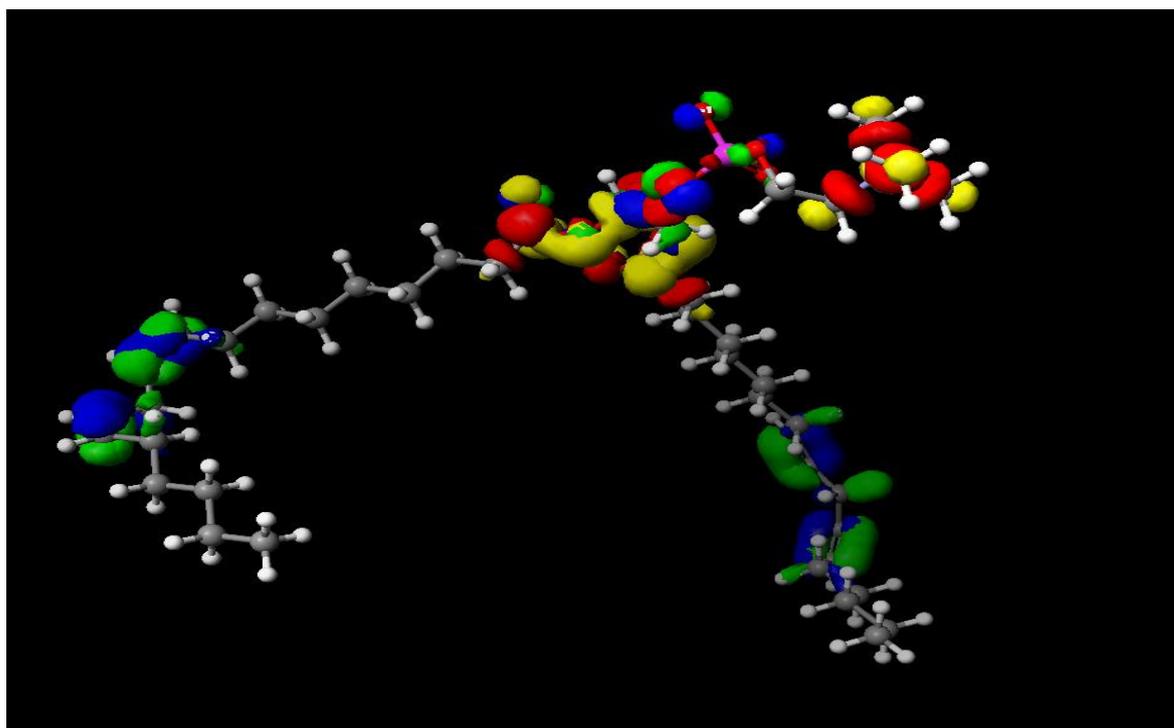


Figure 5-18. Représentation 3D de DLPC (couleur des atomes : gris -> carbone, blanc -> hydrogène, violet -> phosphore, rouge -> oxygène, bleu -> azote, couleur des orbitales : bleu, vert -> HOMO, rouge, jaune ->LUMO)

Il est alors possible de considérer les orbitales HOMO et LUMO de la molécule DLPC (Figure 5-18). Si les orbitales occupées de plus hautes énergies (HOMO, HOMO-1, HOMO-2, HOMO-3 et HOMO-4) sont représentées, il apparaît que ces dernières (en bleu et vert) sont principalement

localisées au niveau des doubles liaisons (HOMO à HOMO-3) et du groupement phosphate (HOMO-4) tandis que les orbitales LUMO (LUMO, LUMO+1, LUMO+2, LUMO+3, LUMO+4) sont principalement localisées au niveau des liaisons esters (LUMO, LUMO+2, LUMO+3, LUMO+4) et du groupement choline (LUMO+1).

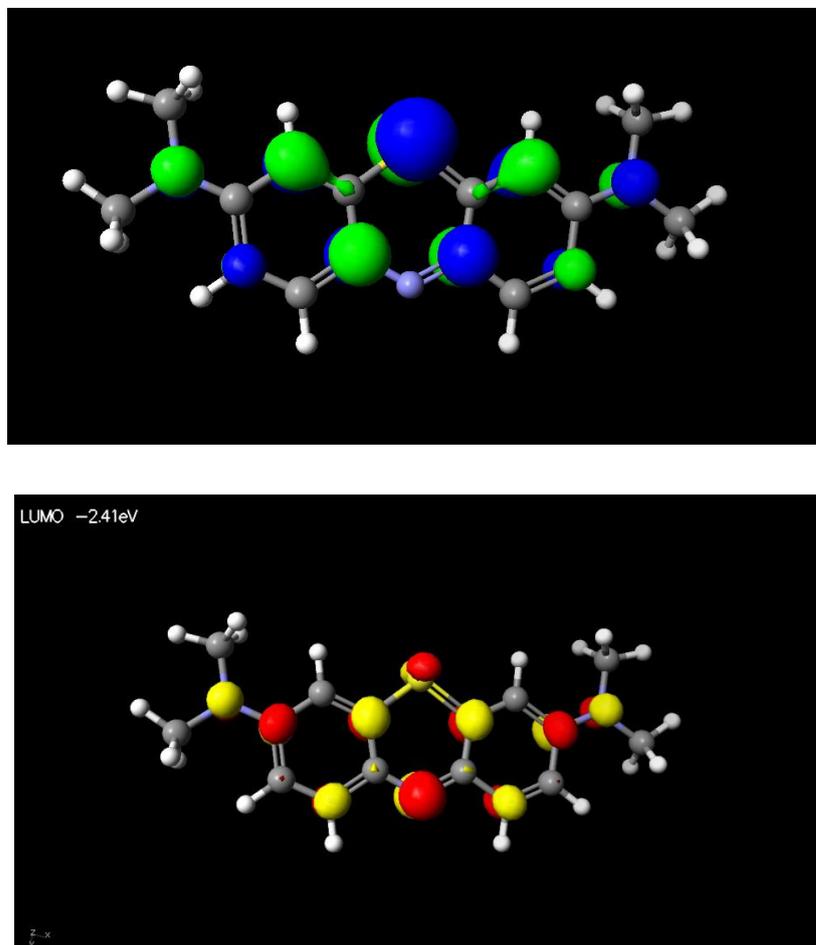
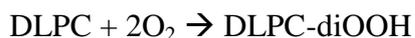


Figure 5-19. Orbitales HOMO et LUMO du bleu de méthylène selon une modélisation MM3+PM6/COSMO (éthanol)

Le bleu de méthylène semble avoir une densité LUMO importante sur l'azote cyclique et une densité HOMO importante sur l'atome de soufre (Figure 5-19). Les niveaux HOMO et LUMO de DLPC sont respectivement à $-9,57\text{eV}$ et $0,32\text{eV}$ tandis que pour le bleu de méthylène ils sont respectivement à $-8,34\text{eV}$ et à $-2,41\text{eV}$. Il y a ainsi peu de chances d'interaction électronique entre les niveaux HOMO de l'un et les LUMO de l'autre mais une interaction ionique est possible du fait de la charge positive du bleu de méthylène et de la charge négative du groupement phosphate de DLPC. La recherche de l'énergie des états de transition correspondant à des mécanismes d'oxydation de type I ou II demanderait une modélisation DFT complexe. Il est cependant possible de comparer les énergies de réaction relatives des différents hydroperoxydes produits à partir de l'acide linoléique et de ceux produits à partir de DLPC (Tableau 5-8) :



L'énergie de formation de l'oxygène singulet a été calculée dans le vide à 25,7 kcal/mol. La valeur expérimentale trouvée dans la littérature (Herzberg, 1950) est de 22,5 kcal/mol. Le formalisme semi-empirique ne permet cependant pas toujours de comparer de manière absolue les énergies trouvées avec les valeurs expérimentales. Les énergies de formation sont ainsi données à titre plutôt indicatif :

Tableau 5-8. Energies de formation de différents hydroperoxydes selon une modélisation semi-empirique PM7-COSMO ($\epsilon=24,3$; $R_{\text{solvant}} = 1,3 \text{ \AA}$)

Molécule	Position de l'hydroperoxyde (<i>n° chaîne - n° carbone</i>)	Energie de formation (kcal/mol)	Energie de réaction (kcal/mol)	Différence entre chaînes 1 et 2	Différence entre C9 et C13
Ac. linoléique		-144			
Ac. linoléique-OOH	9	-164	-68		
	13	-170	-74		-6
DLPC		-521			
DLP-OOH	1-9OOH	-560	-87	19	
	2-9OOH	-541	-68		
	1-13OOH	-558	-85	9	-2
	2-13OOH	-550	-76		
	1-09OOH, 2-09OOH	-587	-162		
	1-13OOH, 2-13OOH	-586	-160		
	1-09OOH, 2-13OOH	-572	-146		
	1-13OOH, 2-09OOH	-584	-158		

D'après ces calculs, il apparaît que le gain énergétique produit par l'hydroperoxydation est supérieur lorsque la réaction se fait sur la chaîne 1 du phospholipide, des différences de 26 kcal/mol et 9 kcal/mol étant respectivement trouvées entre 1-9OOH et 2-9OOH et entre 1-13OOH et 2-13OOH. La position de l'hydroperoxyde au carbone 13, de par la liaison hydrogène permise avec le groupement phosphate, procure également un gain énergétique par rapport à la position 9 même si cela est plus significatif sur l'acide gras (-6 kcal/mol) ou la deuxième chaîne des phospholipides (-9 kcal/mol) que pour la première chaîne (-2 kcal/mol). Notons aussi, dans le cas

d'une double oxydation, le plus faible gain énergétique d'une configuration 1-9OOH, 2-13OOH (-146 kcal/mol) par rapport aux autres (de -158 à -162 kcal/mol), sans doute du fait de gênes stériques.

5.2.ii. Organisation de phospholipides oxydés

De façon à mieux comprendre les phénomènes de perméation au sein des liposomes ou vésicules, il est possible de s'intéresser à l'organisation des phospholipides oxydés au sein d'une bicouche lipidique. Plusieurs bicouches de DLPC ont été modélisées avec différentes proportions de phospholipides hydroperoxydés. Malgré les résultats précédents, de façon à rendre compte d'une insaturation majoritairement placée sur la deuxième chaîne de la phosphatidylcholine (voir bibliographie), l'hydroperoxyde se place sur cette chaîne.

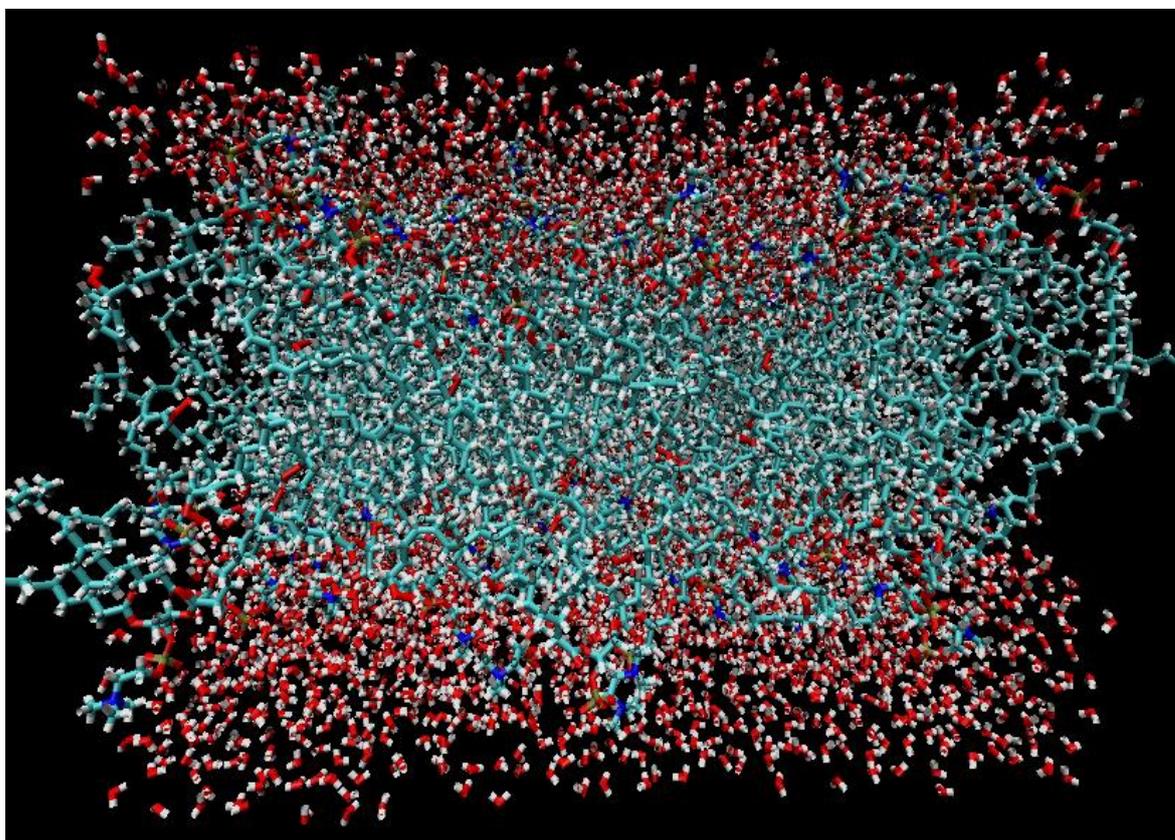


Figure 5-20. Représentation d'une bicouche de phospholipides (ici DLPC + 50% de 9-DLPC-OOH) après 2ns de production.

Ainsi, une bicouche a été réalisée avec 90 molécules de phospholipides par couche avec 0, 1, 5, 9, 45, 75 et 90 molécules de DLPC hydroperoxydé en position 9 ou 13. L'ensemble est entouré de molécules d'eau (Figure 5-20). Après une phase d'équilibration de la bicouche, celle-ci est laissée évoluer à 300K pendant 2 ns. Malgré les phases d'équilibration, certaines configurations

mettent plus ou moins de temps pour atteindre une aire par lipide (voir Figure 1-16, p. 53) ou une épaisseur stable. Ainsi, seules les valeurs entre 1 et 2ns sont considérées pour les calculs (Tableau 5-9). Cela permet de comparer l'aire par lipide, l'épaisseur de la membrane ainsi que le taux de recouvrement des deux couches lipidiques (Détails dans l'ANNEXE 13). La Figure 5-20 montre l'intrication des deux couches de phospholipides. La tête polaire (atome d'azote en bleu) de ces derniers se trouve bien ancrée dans la phase aqueuse tandis que les chaînes grasses se déploient plus ou moins vers l'intérieur.

Tableau 5-9. Caractéristiques d'une bicouche phospholipidique selon les calculs de dynamique moléculaire

	Aire/Lipide oxydé (Å ²)	Aire/Lipide natif (Å ²)	Aire/Lipide total (Å ²)	Epaisseur de la membrane (Å)	Fraction de recouvrement de couches
DLPC	-	73,00±1,98	73,00±1,33	36,09±0,47	0,374±0,016
1% 9-DLPC-OOH	79,27±15,77	73,55±2,04	73,61±1,03	35,77±0,36	0,356±0,009
5% 9-DLPC-OOH	78,34±11,73	73,68±2,03	73,89±0,78	35,78±0,41	0,358±0,011
10% 9-DLPC-OOH	79,77±10,02	73,39±2,29	74,03±1,23	35,59 ±0,47	0,368±0,024
50% 9-DLPC-OOH	81,18±3,38	76,77±4,00	78,98±0,88	33,08±0,24	0,387±0,011
75% 9-DLPC-OOH	81,37±3,40	84,11±6,70	82,07±0,75	31,88±0,22	0,414±0,010
100% 9-DLPC-OOH	88,50±4,02	-	88,50±0,57	30,09±0,22	0,471±0,010
50% 13-DLPC-OOH	82,77±4,36	82,58±3,96	82,67±0,91	32,14±14	0,404±0,015
100% 13-DLPC-OOH	90,60 ±10,30	-	90,60 ±0,88	28,84±0,29	0,468±0,007
25% 9-DLPC-OOH, 25% 13-DLPC-OOH	85,31±7,5	78,49±4,8	81,90±1,59	32,55±0,65	0,437±0,009

NOTE : Les valeurs sont indiquées comme la moyenne des 1000 trames (couvrant 1ns) avec l'écart-type des valeurs obtenues au cours de cette période.

L'aire par lipide, qui est calculée à 73,00±1,98 Å² pour DLPC est déjà une valeur assez élevée du fait des insaturations et se rapproche de la valeur de 70,3±0,1 Å² modélisée par ailleurs (Doktorova *et al.*, 2017). Cette aire semble augmenter dès l'incorporation d'une seule molécule oxydée dans la membrane, avec une très forte variabilité au cours du temps, le milieu s'équilibrant

plus difficilement. Elle continue ensuite à augmenter selon une variation qui semble exponentielle (Figure 5-21).

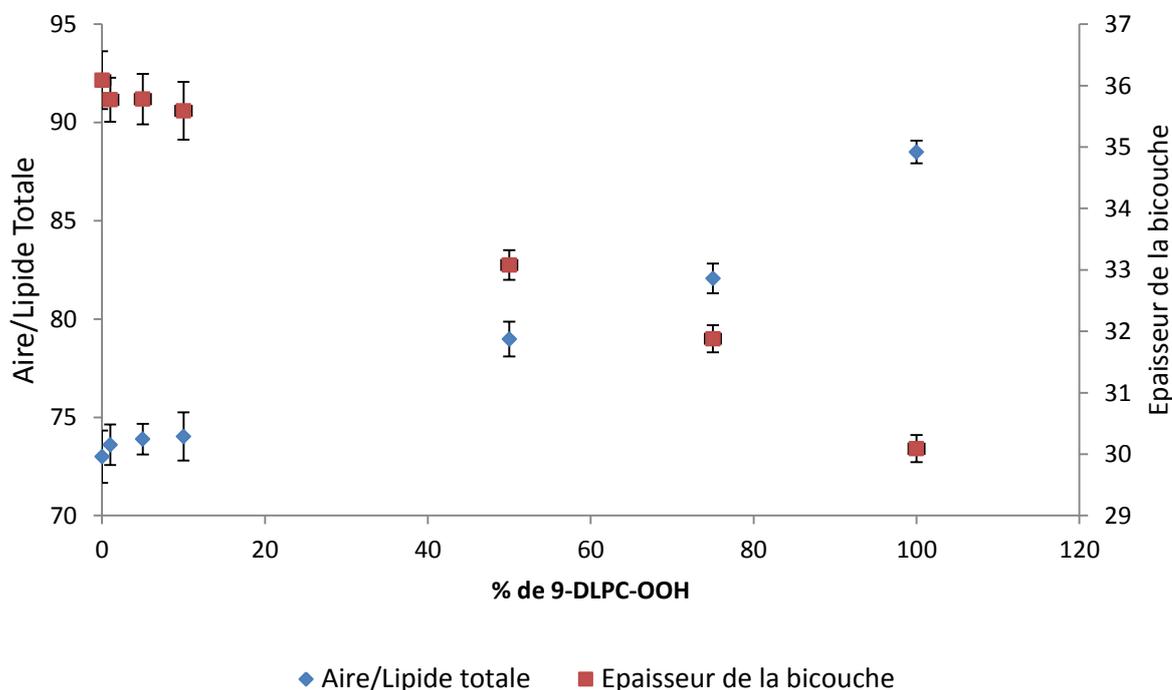


Figure 5-21. Evolution de l'aire par lipide totale et de l'épaisseur d'une bicouche de DLPC selon le taux d'incorporation de 9-DLPC-OOH.

Concernant les hydroperoxydes en position 9 ou 13, il semblerait que la position 13 entraîne une augmentation plus importante de l'aire par lipide si la configuration à 50% de phospholipides oxydés est analysée. Ainsi, la configuration 13 autorise une organisation moins compacte des phospholipides que la position 9, elle-même moins compacte que la molécule non oxydée.

L'épaisseur moyenne de la membrane, du fait d'une imbrication plus importante des chaînes, diminue avec le pourcentage de phospholipides oxydés. Cette diminution semble linéaire. Une carte en trois dimensions de l'épaisseur de la membrane moyennée dans le temps permet de bien visualiser l'évolution du système avec le taux d'oxydation (Figure 5-22). Jusqu'à 10% d'incorporation, malgré une épaisseur moyenne stable, les collines (épaisseur supérieure à 35 angströms - violet à rouge) disparaissent peu à peu. De 10 à 100% d'incorporation, des vallées se forment (vert à bleu) et s'élargissent. A 100% d'incorporation, de nombreuses zones d'une épaisseur inférieure à 26 Å sont présentes. Ce phénomène est accentué avec le composé 13-DLPC-OOH (Figure 5-23) comme cela était prévisible selon le calcul de l'épaisseur moyenne. Dans ce cas, l'épaisseur devient même inférieure à 22 Å à certains endroits.

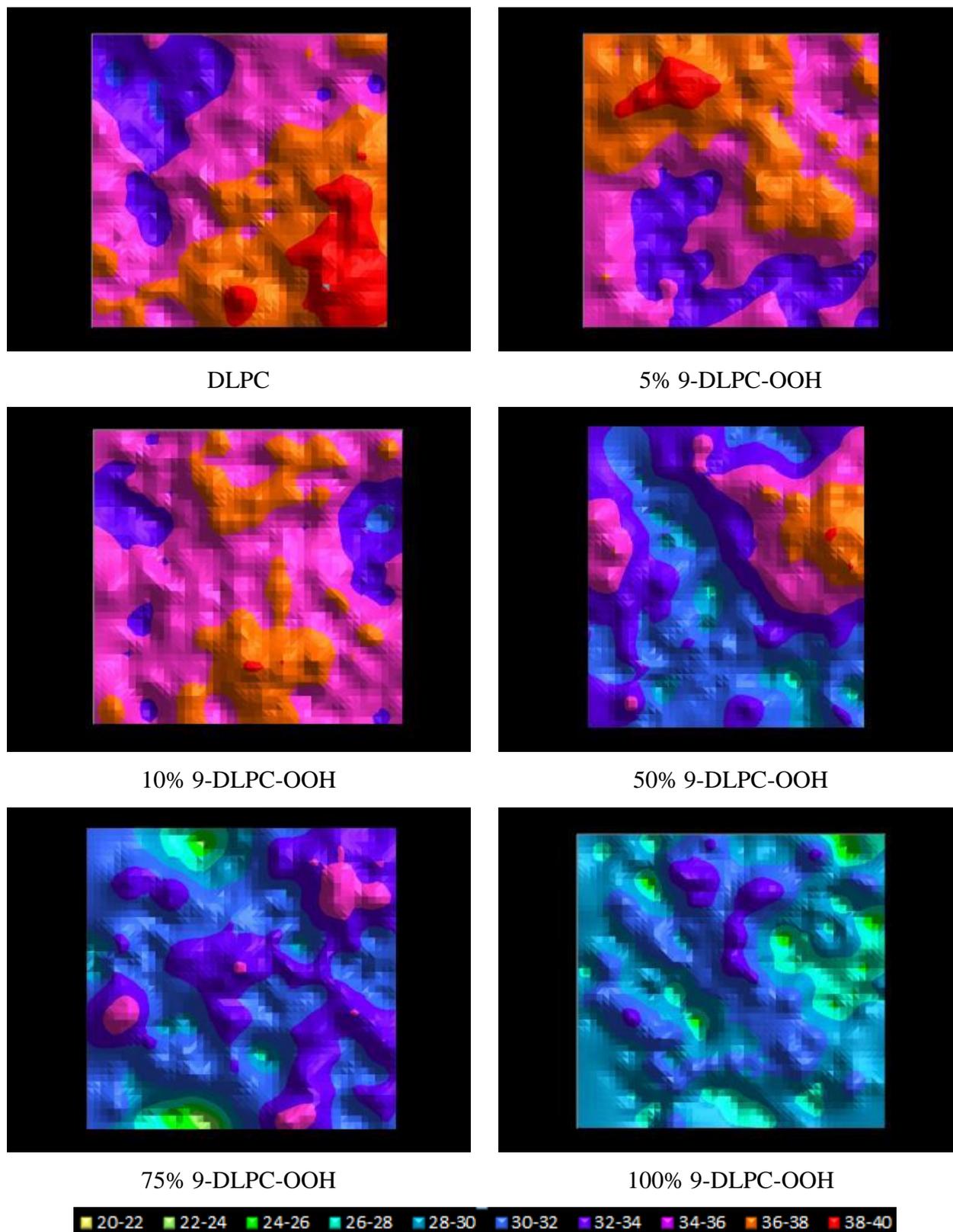


Figure 5-22. Evolution de la distribution de l'épaisseur de la membrane (en Å) selon le taux d'incorporation de 9-DLPC-OOH

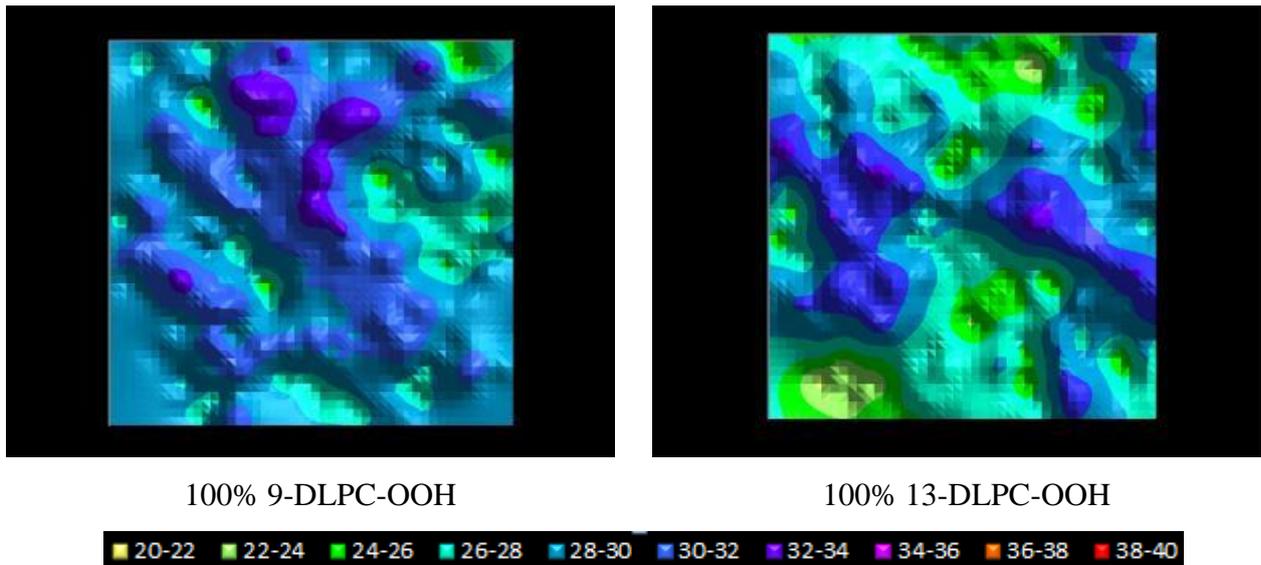


Figure 5-23. Comparaison des cartes d'épaisseur de la membrane entre 100% 9-DLPC-OOH et 100% 13-DLPC-OOH

Enfin, concernant le taux de recouvrement massique entre les couches (fraction of mass overlap), il augmente assez légèrement avec la quantité de molécules oxydées, mais aucun flip-flop de phospholipides n'est observé.

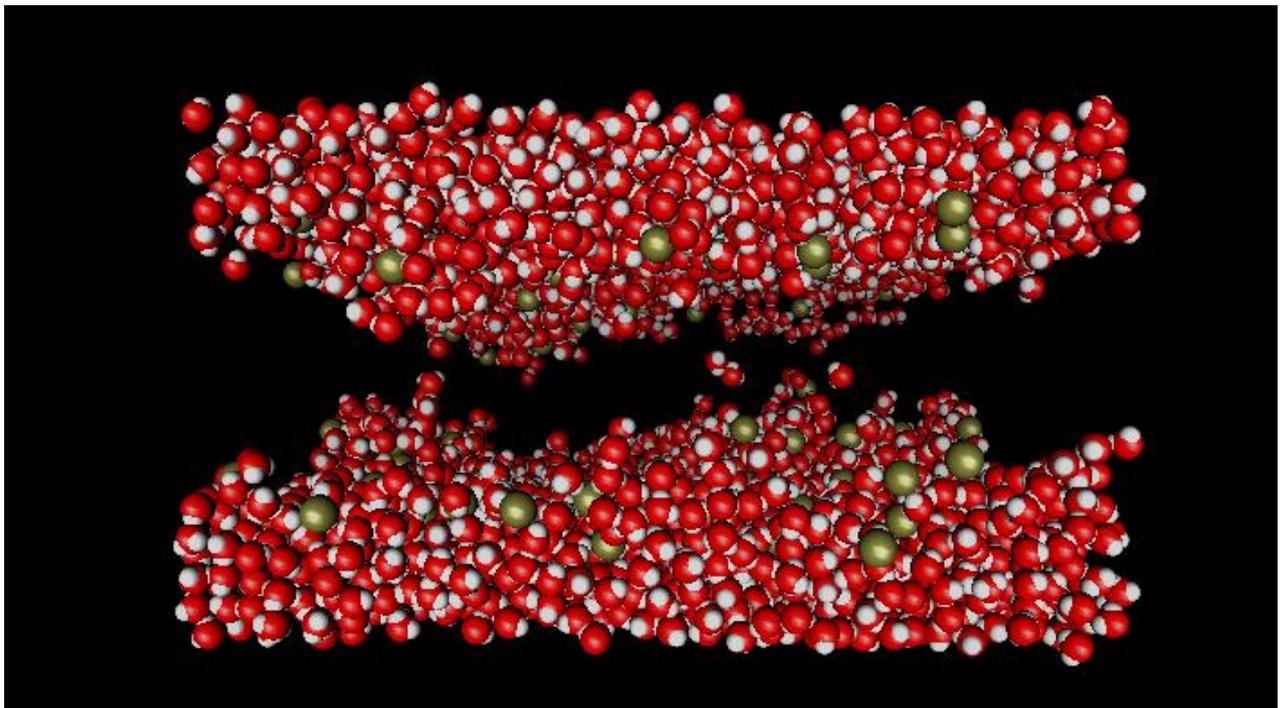


Figure 5-24. Représentation des phases aqueuses d'une bicouche de phospholipides (ici 100% de 9OOHDLIPC) après 1ns de production (en couleur or : atomes de phosphore des phospholipides).

Les bicouches formées avec de hauts pourcentages de phospholipides oxydés montrent la présence de molécules d'eau pouvant passer d'une couche à l'autre, la formation de fils d'eau

devenant possible, comme le montre la Figure 5-24. D'ailleurs, si la répartition des molécules d'eau le long de l'axe perpendiculaire à la membrane (axe z) ne change pas vraiment jusqu'à 10% d'incorporation d'hydroperoxydes, au-delà de 50%, la zone hydrophobe se rétrécit fortement (Figure 5-25).

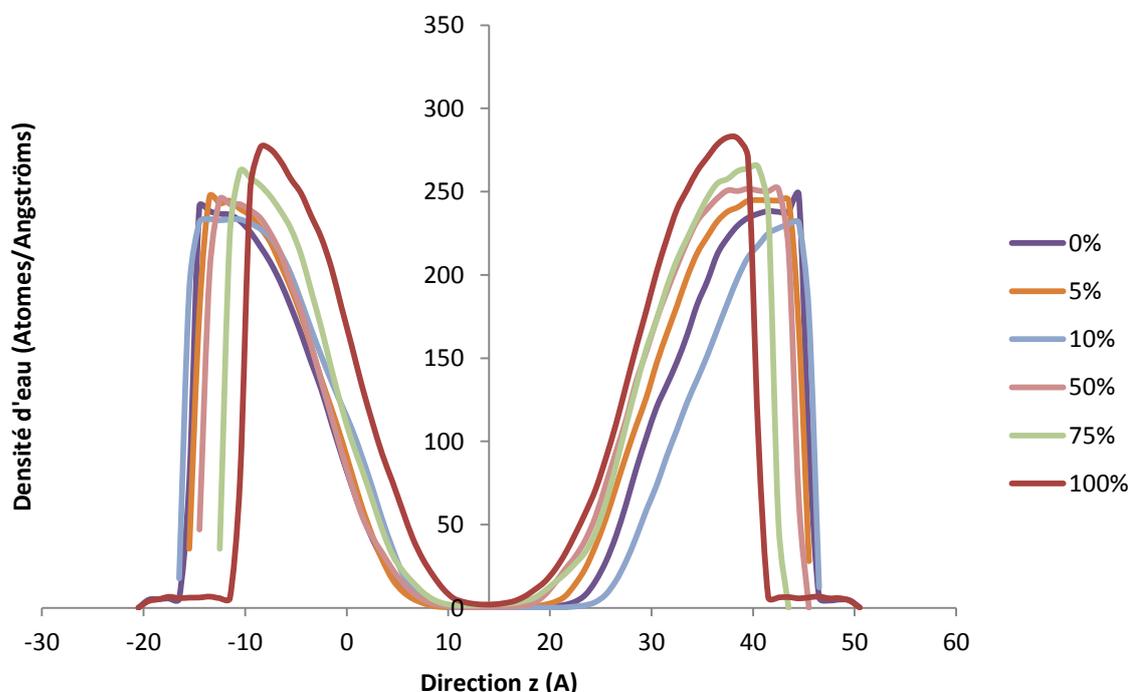


Figure 5-25. Profil de densité d'eau au niveau de la membrane en fonction du taux d'incorporation de 9-DLPC-OOH

5.2.iii. Organisation de vésicules

De façon à comprendre et évaluer certaines propriétés des vésicules formées avec les phospholipides oxydés, il est possible de modéliser leur formation. Le grand nombre de molécules d'eau (~7420) et de phospholipides (256) impliqués incite à simplifier la modélisation par un système gros-grains. Par exemple, 9,9-DLPC-OOH est représenté par 18 grains au lieu de 138 atomes. La fonction hydroperoxyde permettant une augmentation importante de la polarité du grain auquel elle est rattachée, un mode P2 (le maximum étant P4) est attribué à ce dernier (Ileri Ercan *et al.*, 2018) (Figure 5-26). La molécule 13,13-DLPC-OOH est construite de la même manière. La formation d'une vésicule uniquement constituée de DLPC se compare à celle d'une vésicule constituée uniquement de 13,13-DLPC-OOH. Des programmes détaillés en annexe (ANNEXE 14) permettent alors de calculer certains paramètres du système au cours du temps comme la distance moyenne entre les groupements phosphate.

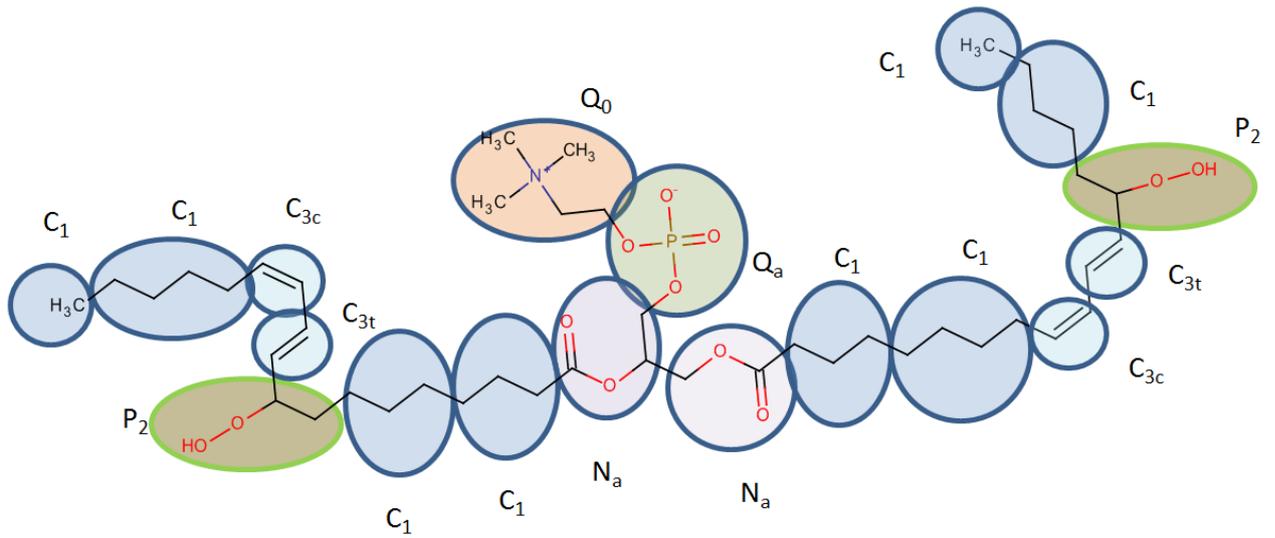


Figure 5-26. Représentation des grains de la molécule 13,9-DLPC-OOH avec leurs attributs selon MARTINI

a. Formation de la vésicule

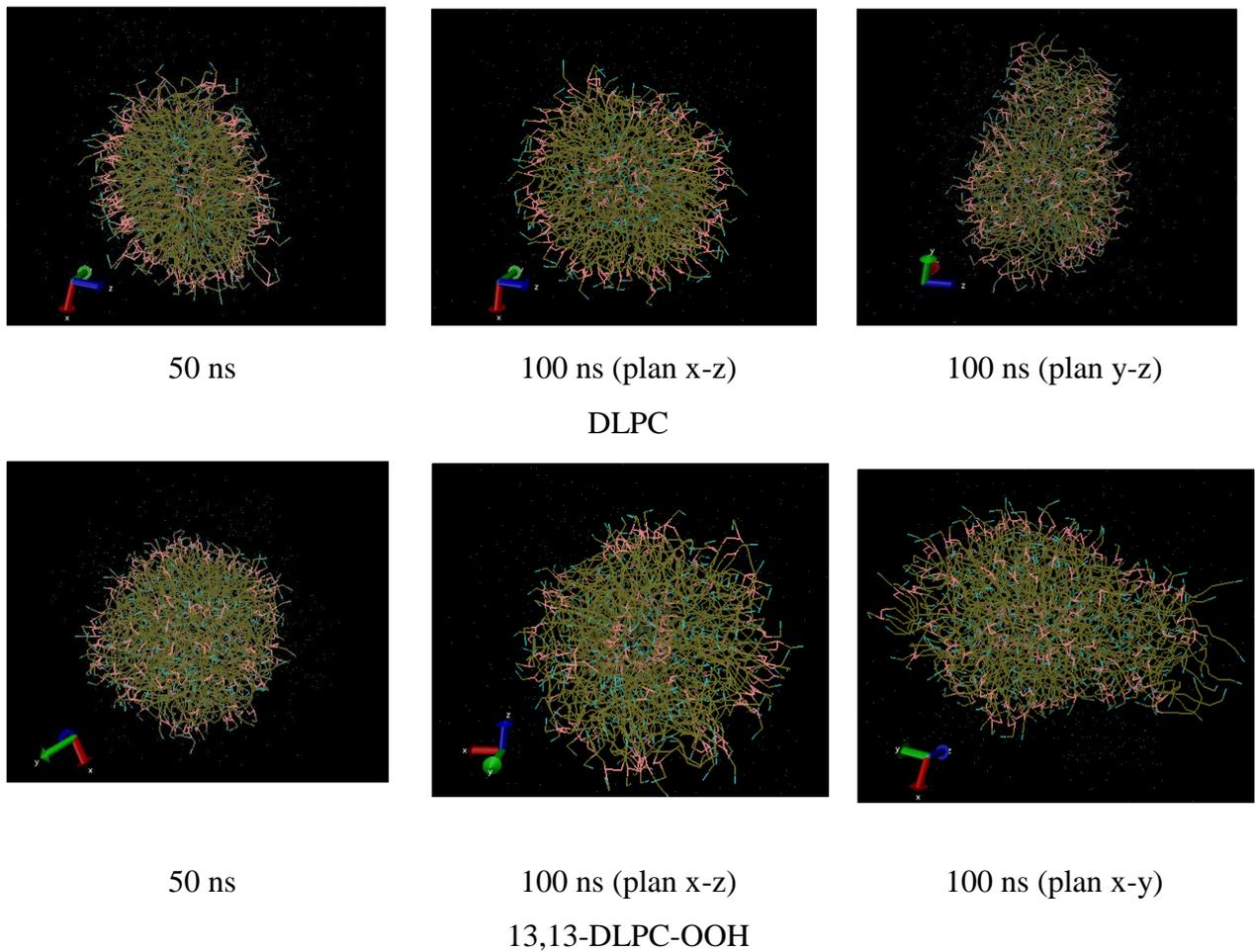


Figure 5-27. Observation de vésicules phospholipidiques à différents temps de simulation (les molécules d'eau ne sont pas représentées par souci de visibilité). En rose : groupes esters (grains N_a).

Au bout de 50ns, une vésicule sphérique se constitue dans les deux cas avec une bicouche de phospholipides. Les têtes polaires (repérées par les groupements esters en rose) se retrouvent tournées vers l'extérieur aqueux et l'intérieur de la vésicule, permettant un fin cœur aqueux. Au bout de 100ns, la vésicule a pris une forme cylindrique, tirant sans doute vers une bicouche plane (Figure 5-27). Cependant, si la surface de la vésicule est observée plus attentivement, il apparaît une plus grande inhomogénéité de la distribution des composés polaires en son sein. Si la distance entre les têtes hydrophiles est comparée selon les deux cas (Figure 5-28), aucune différence significative n'est observée, ce qui indique que les groupements hydroperoxydes ne suffisent pas à écarter de façon significative les groupements phosphocholines. Ce résultat semble contredire les résultats de la modélisation d'une membrane alors qu'ici les phospholipides sont doublement oxydés. Cependant, les deux simulations sont peu comparables. En effet, les temps de simulation sont différents (100ns ici contre 1 ou 2 ns pour la modélisation « tout atome »), le paramétrage gros-grains donne une précision moins importante et ce n'est pas l'aire par lipide qui est considérée mais la distance entre têtes polaires. Cela peut entraîner un résultat différent étant donné que dans le cadre de la formation d'une vésicule, les possibilités d'arrangement des phospholipides sont plus importantes (courbure de la membrane).

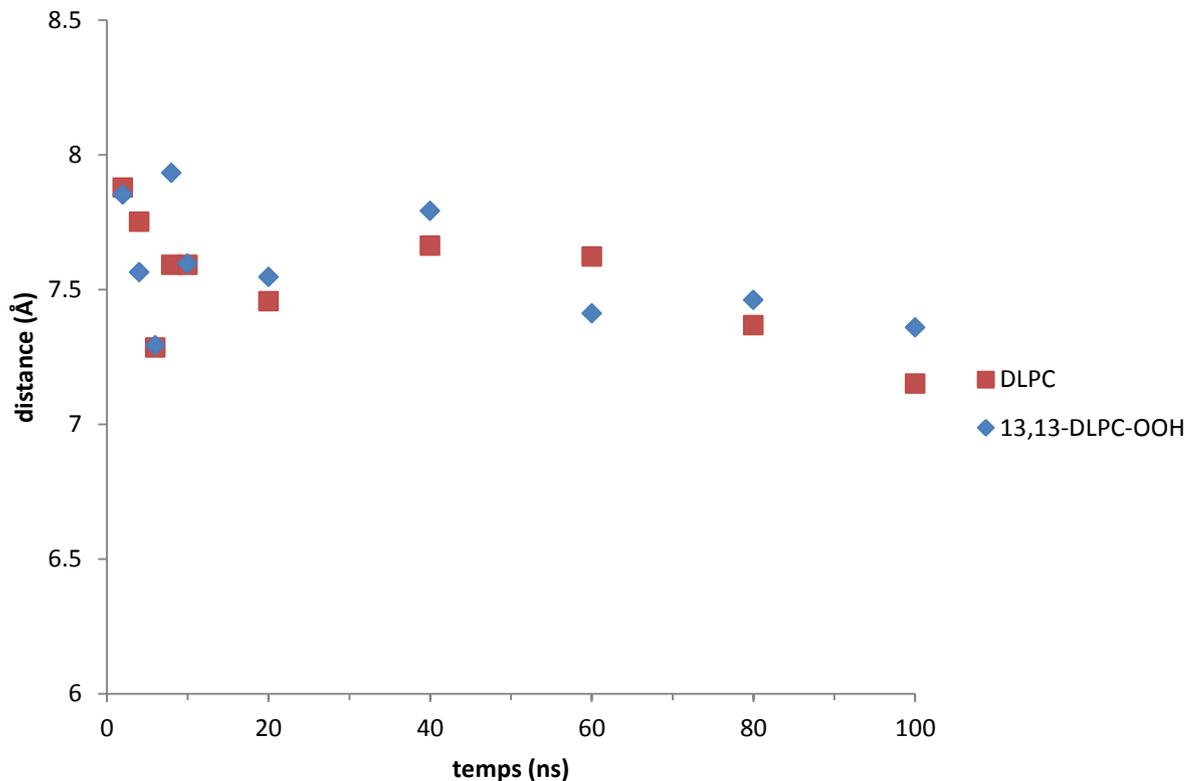


Figure 5-28. Distance moyenne entre têtes hydrophiles au cours de la formation des vésicules

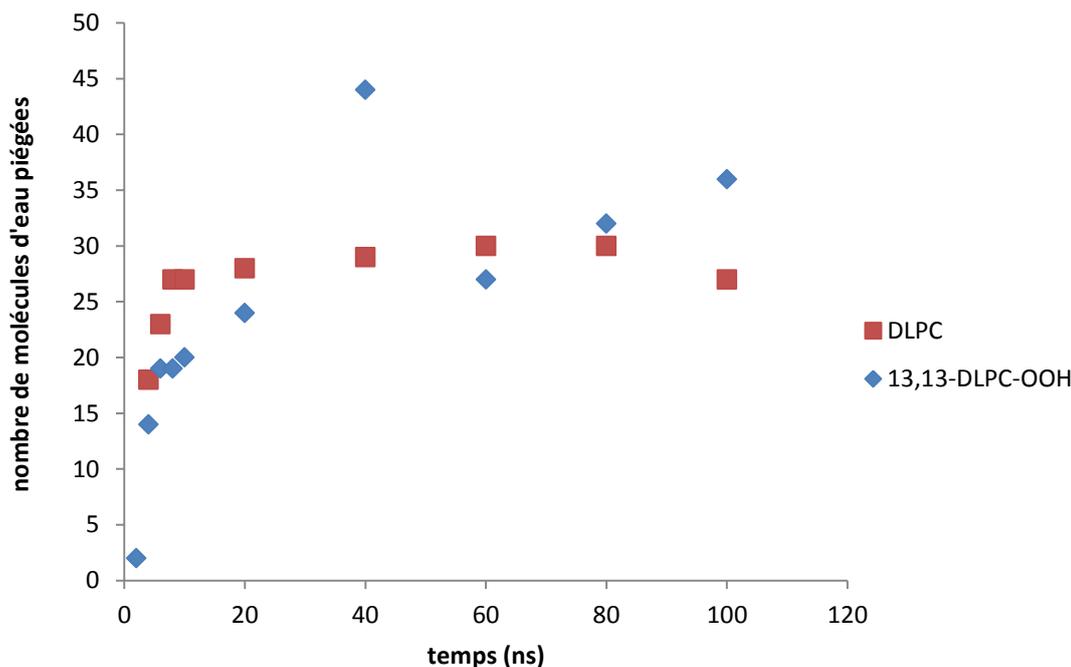


Figure 5-29 Nombre de molécules d'eau au sein de la vésicule selon le temps de simulation

Concernant le nombre de molécules d'eau qui sont piégées par la vésicule durant le temps de modélisation, un équilibre est vite arrivé dans le cas non oxydé tandis que le système est plus erratique dans le cas oxydé avec une tendance à l'augmentation du piégeage avec le temps (Figure 5-29). De même, si le cas non oxydé se limite à un centre hydrophile, le cas oxydé peut voir l'apparition simultanée de plusieurs poches hydrophiles au sein de la vésicule. Celle-ci est ainsi moins homogène et sa perméabilité à l'eau est renforcée, certainement par la présence de défauts ou un volume libre plus important.

b. Perméation des ions

Quelle que soit la concentration en KCl observée (0,1M à 2M), aucune perméation d'ion n'est observée dans la vésicule durant un temps de modélisation de 100ns. Même si la modélisation gros-grains ne rend pas compte de l'évolution de vésicules micrométriques et si le phénomène des fils d'eau est sans doute délicat à observer par ce biais, ce résultat semble indiquer que la perméation ionique, tout du moins dans des petites vésicules, viendrait d'une inhomogénéité plus importante dans la composition de ces dernières, avec la présence de produits d'oxydation secondaires ou de l'influence du bleu de méthylène. En effet, une étude récente (Ileri Ercan *et al.*, 2018), en utilisant également la modélisation gros-grains nous montre qu'une bicouche oxydée devient plus perméable au bleu de méthylène, ce dernier modifiant les propriétés de la membrane

par une augmentation de l'aire membranaire et une diminution de la diffusivité latérale de la bicouche. L'influence de telles modifications sur une perméation ionique reste cependant à déterminer.

5.3. Conclusion sur la modification chimique des phospholipides

En prenant l'exemple d'une lécithine de soja, l'oxydation des phospholipides a pu se faire par photosensibilisation dans l'éthanol avec de très faibles quantités de bleu de méthylène. Un plan d'expériences a permis de déterminer l'influence de la concentration de ce photosensibilisateur et de la quantité d'air sur l'oxydation des phospholipides et les vésicules qu'ils peuvent ensuite former. Ainsi, ces deux paramètres jouent un grand rôle dans la taille des vésicules, leur potentiel surfacique mais également leur perméabilité. La modélisation moléculaire révèle ainsi que les phospholipides hydroperoxydés rendent la membrane moins épaisse avec une aire par lipide plus grande ce qui permet une plus grande perméabilité de l'eau mais cela ne semble pas avoir d'effet notable pour les ions. Selon la modélisation gros-grains, même avec un haut degré d'hydroperoxydation, les vésicules se forment et la membrane reste intacte. La présence d'un plus grand nombre de poches d'eau pourrait mener à la formation de fils d'eau plus nombreux pouvant augmenter la perméation ionique dans les temps plus longs. Cependant, l'augmentation de la perméabilité de KCl observée expérimentalement avec le taux d'oxydation pourrait provenir de la présence, même en faibles quantités, d'hétérogénéités dans la membrane qui peuvent être des produits d'oxydation secondaires formés au cours de la photosensibilisation ou par la suite. De même, les interactions des phospholipides avec le bleu de méthylène, si elles peuvent rendre compte de la taille et de la charge surfacique des vésicules pourraient de même affecter la perméabilité membranaire. Ainsi, un contrôle de la perméabilité des vésicules nécessiterait une grande précision dans une fenêtre étroite de photosensibilisation des phospholipides. Cela permettrait de jouer à la fois sur la formation sélective des hydroperoxydes, le degré d'oxydation des phospholipides et leur concentration.

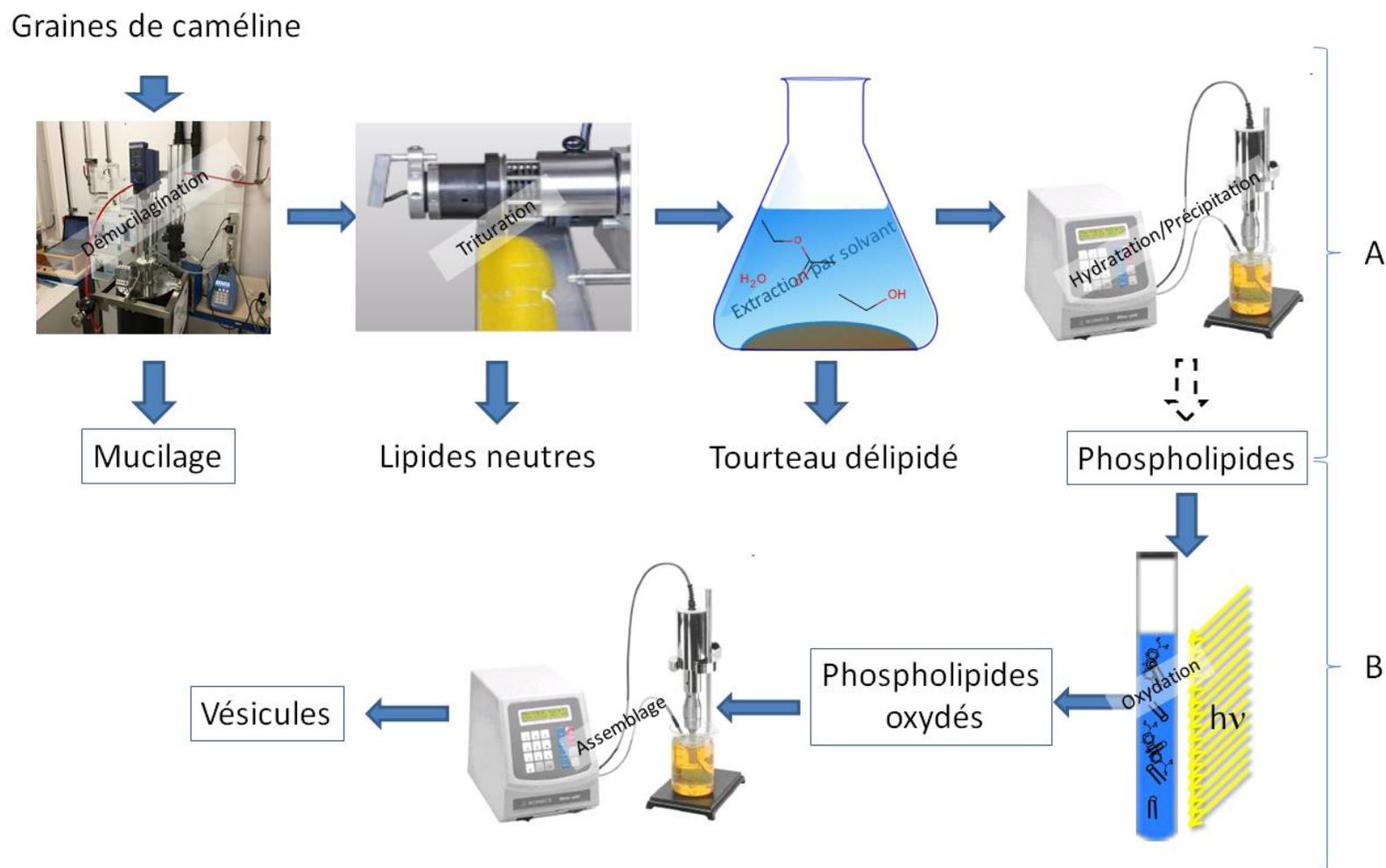


Figure B. Schéma représentant les différentes étapes suivies pour l'obtention de phospholipides à partir de graines de caméline (A) et de vésicules à partir de phospholipides oxydés (B). Les principaux produits étudiés sont encadrés.

Conclusion générale

L'étude menée ici a permis de **développer les différentes étapes** permettant l'obtention d'une **vésicule phospholipidique modifiée chimiquement** à partir de phospholipides et celles permettant d'obtenir ces derniers par un procédé intégré à partir d'une graine oléoprotéagineuse à mucilage comme la caméline (Figure B). S'appuyant fortement sur la **technologie ultrasonore**, elle procède tout d'abord par un **enrichissement** progressif de la matière traitée en phospholipides en valorisant les sous-produits. Un procédé en milieu aqueux utilisant une canalisation à ultrasons d'une puissance volumique d'environ 650W/L permet en premier lieu d'extraire le mucilage des graines. Ce dernier composé ne contient pas de lipides mais est constitué de protéines (8-15%), minéraux (5-10%) et polysaccharides (80-85%) valorisables. Le suivi de son extraction par diverses méthodes d'**analyse in situ** (pH-métrie, conductimétrie, réfractométrie, couple moteur) montre que celle-ci s'effectue de façon non linéaire, une partie plus adhérente à la graine nécessitant un temps de traitement plus long et/ou un cisaillement plus important. Celui produit par les ultrasons peut être augmenté par une **recirculation** du milieu, les deux s'alliant alors pour accélérer la diffusion des composés. Les minéraux et les polysaccharides acides sont plus rapidement extraits que les protéines et polysaccharides neutres. A mesure que le temps d'extraction augmente, les polysaccharides du mucilage deviennent plus riches en glucose et les protéines plus riches en acide glutamique aux temps longs. Ce mucilage a un **pouvoir gélifiant et épaississant** qui est alors modulé par les conditions de son extraction. Ainsi, un traitement plus court ou avec un cisaillement plus faible produit un mucilage aux propriétés élastiques plus prononcées. Les graines dé mucilaginées semblent plus facilement exprimer leurs lipides neutres par trituration mécanique, un rendement massique de 36% en lipides étant obtenu par rapport à la masse de graines. Si l'huile extraite avec les graines traitées est légèrement plus riche en phospholipides que l'huile extraite de graines natives, la quasi-totalité des phospholipides reste dans le tourteau. Les lipides de ce dernier peuvent alors être extraits par des mélanges de **solvants verts** comme l'éthanol et l'acétate d'éthyle. Le ratio entre les deux joue un rôle important dans la nature et la quantité de phospholipides extraits dans l'huile. Enfin, les phospholipides sont idéalement précipités de l'huile par ajout d'eau finement dispersée sous ultrasons. Cette récupération est aisément suivie par une **méthode spectrophotométrique au bleu de méthylène** développée dans le cadre de ces travaux. L'utilisation de différentes concentrations de ce composé

utilisé comme photosensibilisateur, ainsi que différents volumes d'air permettent une **modulation de l'oxydation** de la phosphatidylcholine. Ce phospholipide oxydé, en synergie avec le bleu de méthylène, autorise l'obtention de vésicules de taille réduite et de **perméabilité augmentée** par rapport à des phospholipides natifs. Cela peut élargir les domaines d'applications de ces vésicules, au vu de la variabilité des longueurs et largeurs des voies d'accès des nutriments aux cellules animales ou végétales. L'utilisation de la dynamique moléculaire permet de comparer différentes organisations de phospholipides hydroperoxydés et de comprendre l'influence de l'oxydation sur l'arrangement des lipides et la perméabilité. Il en ressort que si l'aire par lipide augmente et l'épaisseur membranaire diminue avec le taux d'hydroperoxydes, l'intégrité membranaire est conservée. Si la perméabilité des vésicules à l'eau est augmentée, elle n'est pas sensiblement modifiée pour un sel comme le chlorure de potassium dans les temps considérés. La compréhension des différences entre cette modélisation et les observations expérimentales nécessite ainsi la considération de produits d'oxydation plus diversifiés ou secondaires et de leurs interactions avec le bleu de méthylène.

De nombreuses pistes ont pu être abordées au cours de ces travaux et laissent entrevoir des possibilités d'association des phospholipides et du mucilage pour permettre la formation de radeaux glucolipidiques, en référence aux radeaux lipidiques (RAFTS). Les bicouches phospholipidiques associées aux protéines, glucides et minéraux du mucilage pourraient constituer une structure à la fois rigide et flexible, permettant le transport facilité de ces composés d'intérêt vers des cellules végétales ou animales. Certaines pistes mériteraient d'être davantage explorées. Ne pouvant être exhaustif, quelques exemples peuvent être détaillés. Ainsi, concernant le mucilage extrait des graines, l'analyse de la nature des polysaccharides permettrait de confirmer l'extraction de cellulose concomitamment à celle du mucilage adhérent. Le suivi de l'évolution de la taille des polysaccharides selon le temps et les conditions d'extraction permettrait de déterminer l'influence respective des ultrasons et de l'hydrodynamique sur la rupture des liaisons osidiques. Au niveau de l'extraction des phospholipides du tourteau, le mélange de solvants doit encore être optimisé de façon à améliorer le rapport « rendement/empreinte écologique ». L'utilisation d'eutectiques profonds pourrait même être envisagée avec un mélange de chlorure de choline avec des acides ou sels appropriés. La purification des phospholipides obtenus par une voie mécanique sans solvant organique doit de même être approfondie. Enfin, les variations de distribution des classes de phospholipides selon les conditions d'extraction devraient être plus profondément analysées pour une extraction plus sélective des phospholipides. L'étude de l'oxydation des phospholipides devrait ainsi prendre en compte d'autres classes que la phosphatidylcholine de façon à évaluer

l'influence de la tête polaire sur la photosensibilisation avec le bleu de méthylène. Des essais de dynamique moléculaire avec ce composé pourraient contribuer à une meilleure compréhension de ses interactions avec les phospholipides seuls ou sous forme de vésicules en présence d'eau et de sel. Cela pourrait contribuer à un contrôle encore plus précis non seulement de l'oxydation des phospholipides mais de la formation des vésicules et de leur formulation. Dans ce dernier cas, l'utilisation du mucilage précédemment extrait pourrait intervenir en tant qu'épaississant mais aussi pour compléter les apports glucidiques, minéraux et protéiques dans le cadre d'une formulation à but de nutrition humaine, animale ou végétale. Il conviendrait alors d'étudier la toxicité et écotoxicité des phospholipides oxydés et des résidus de bleu de méthylène. Pour une valorisation des phospholipides oxydés seuls, la mesure de leurs propriétés interfaciales par tensiométrie statique et dynamique et l'évaluation de leur stabilité selon diverses conditions thermiques ou chimiques devraient être effectuées. De même, les vésicules obtenues pourraient être davantage caractérisées, notamment par microscopie électronique en transmission et leur perméabilité pourrait être mesurée précisément avec d'autres substances par fluorimétrie. Enfin, la méthode de dosage de composés polaires par spectrophotométrie au bleu de méthylène mériterait quelques ajustements avec d'autres types de composés polaires à d'autres concentrations pour pouvoir lui fournir un plus grand champ d'applications.

Références

- Abidi, S.L., List, G.R., Rennick, K.A., 1999. Effect of genetic modification on the distribution of minor constituents in canola oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 463 - 467. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0025-3>
- Abraham, R.J., Byrne, J.J., Griffiths, L., Perez, M., 2006. ¹H chemical shifts in NMR: Part 23, the effect of dimethyl sulphoxide versus chloroform solvent on ¹H chemical shifts. *Magn. Reson. Chem.* 44, 491-509. <https://doi.org/10.1002/mrc.1747>
- Aikens, J., Dix, T.A., 1993. Hydrodioxyl (perhydroxyl), peroxy, and hydroxyl radical-initiated lipid peroxidation of large unilamellar vesicles (liposomes): comparative and mechanistic studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 516-525. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1455>
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Alter, M., Gutfinger, T., 1982. Phospholipids in several vegetable oils. *Riv Ital Sostanze Grasse* 59, 14-18.
- Ambrosewicz-Walacik, M., Tańska, M., Rotkiewicz, D., 2015. Phospholipids of rapeseeds and rapeseed oils: factors determining their content and technological significance—a review. *Food Rev. Int.* 31, 385-400. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1022831>
- Arnold, L.K., Choudhury, R.B.R., 1962. Ethanol extraction of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 39, 379-380. <https://doi.org/10.1007/BF02631987>
- Atkins, P.W., De Paula, J., 2010. *Atkins' Physical chemistry*, 9th ed. ed. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Aubry, J.M., Cazin, B., 1988. Chemical sources of singlet oxygen. 2. Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions. *Inorg. Chem.* 27, 2013-2014. <https://doi.org/10.1021/ic00285a001>
- Bachar, M., Brunelle, P., Tieleman, D.P., Rauk, A., 2004. Molecular dynamics simulation of a polyunsaturated lipid bilayer susceptible to lipid peroxidation. *J. Phys. Chem. B* 108, 7170-7179. <https://doi.org/10.1021/jp036981u>
- Barry, P.H., Lynch, J.W., 1991. Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J. Membr. Biol.* 121, 101-117. <https://doi.org/10.1007/BF01870526>
- Battino, R., 1981. *Oxygen and ozone*, 1st ed. ed, Solubility data series. Pergamon, Oxford ; New York.
- Beermann, C., Green, A., Möbius, M., Schmitt, J.J., Boehm, G., 2003. Lipid class separation by HPLC combined with GC FA analysis: Comparison of seed lipid compositions from different *Brassica napus* L. varieties. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80, 747 - 753. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0767-0>
- Belayneh, H.D., Wehling, R.L., Cahoon, E., Ciftci, O.N., 2018. Lipid composition and emulsifying properties of *Camelina sativa* seed lecithin. *Food Chem.* 242, 139 - 146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.082>
- Belayneh, H.D., Wehling, R.L., Reddy, A.K., Cahoon, E.B., Ciftci, O.N., 2017. Ethanol-modified supercritical carbon dioxide extraction of the bioactive lipid components of *camelina sativa* seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 94, 855-865. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-2993-z>
- Beranova, L., Cwiklik, L., Jurkiewicz, P., Hof, M., Jungwirth, P., 2010. Oxidation changes physical properties of phospholipid bilayers: fluorescence spectroscopy and molecular simulations. *Langmuir* 26, 6140-6144. <https://doi.org/10.1021/la100657a>

- Bergenstahl, B., 2008. Physicochemical aspects of an emulsifier functionality, in: Hasenhuettl, G.L., Hartel, R.W. (Éd.), *Food Emulsifiers and Their Applications*. Springer New York, New York, NY, p. 173-194. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75284-6_6
- Berger, O., Edholm, O., Jähnig, F., 1997. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.* 72, 2002-2013. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78845-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78845-3)
- Bergmann, K., O’Konski, C.T., 1963. A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer, and complexes with montmorillonite. *J. Phys. Chem.* 67, 2169 - 2177. <https://doi.org/10.1021/j100804a048>
- Bernal, R., Manzanares, J., Espinoza-Beltrán, F.J., Ramirez-Bon, R., Vorobiev, Y.V., González-Hernández, J., 1999. Structural evolution of colloidal particles in porous SiO_2 coatings. *Jpn. J. Appl. Phys.* 38, 857-862. <https://doi.org/10.1143/JJAP.38.857>
- Bhagya, S., 1992. Extraction of soybean (*Glycine max.*) with hexane-acetic acid: Effect on oil quality. *Food Chem.* 44, 123-125. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90323-T](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90323-T)
- Bhattacharyya, L., Rohrer, J.S. (Éd.), 2012. *Applications of ion chromatography for pharmaceutical and biological products: bhattacharyya/ion chromatography in pharma*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9781118147009>
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484-489.
- Boehme, K., Brauer, H.D., 1992. Generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions. *Inorg. Chem.* 31, 3468 - 3471. <https://doi.org/10.1021/ic00042a024>
- Borah, N., Mapelli, S., Pecchia, P., Chaliha, B., Proteem Saikia, S., 2019. Adaptation of *Camelina sativa* (L.) Crantz in Assam, India: agronomic, physiological and biochemical aspects of a potential biofuel feedstock. *Biofuels* 1-8. <https://doi.org/10.1080/17597269.2018.1537205>
- Braga, C., Travis, K.P., 2005. A configurational temperature Nosé-Hoover thermostat. *J. Chem. Phys.* 123, 134101. <https://doi.org/10.1063/1.2013227>
- Breil, C., Abert Vian, M., Zemb, T., Kunz, W., Chemat, F., 2017. “Bligh and Dyer” and Folch methods for solid-liquid-liquid extraction of lipids from microorganisms. comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with alternative solvents. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 708. <https://doi.org/10.3390/ijms18040708>
- Bresseleers, G.J.M., Goderis, H.L., Tobback, P.P., 1984. Measurement of the glucose permeation rate across phospholipid bilayers using small unilamellar vesicles Effect of membrane composition and temperature. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 772, 374-382. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(84\)90154-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(84)90154-8)
- Brodowsky, I.D., Oliw, E.H., 1992. Metabolism of 18:2(n - 6), 18:3(n - 3), 20:4(n - 6) and 20:5(n - 3) by the fungus *Gaeumannomyces graminis*: Identification of metabolites formed by 8-hydroxylation and by w2 and w3 oxygenation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 1124, 59-65. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90126-G](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90126-G)
- Brunchi, C.-E., Morariu, S., Bercea, M., 2014. Intrinsic viscosity and conformational parameters of xanthan in aqueous solutions: Salt addition effect. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 122, 512-519. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.07.023>
- Brunner, J., Graham, D.E., Hauser, H., Semenza, G., 1980. Ion and sugar permeabilities of lecithin bilayers: Comparison of curved and planar bilayers. *J. Membr. Biol.* 57, 133 - 141. <https://doi.org/10.1007/BF01868999>
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Éd.), 2015. *Biochemistry & molecular biology of plants*, 2. ed. ed. Wiley Blackwell, Chichester.

- Bullen, H.E., Soldati-Favre, D., 2016. A central role for phosphatidic acid as a lipid mediator of regulated exocytosis in apicomplexa. *FEBS Lett.* 590, 2469 - 2481. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12296>
- Buré, C., Solgadi, A., Yen-Nicolaÿ, S., Bardeau, T., Libong, D., Abreu, S., Chaminade, P., Subra-Paternault, P., Cansell, M., 2016. Electrospray mass spectrometry as a tool to characterize phospholipid composition of plant cakes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500345>
- Bushway, A.A., Wilson, A.M., Houston, L., Bushway, R.J., 1984. Selected properties of the lipid and protein fractions from chia seed. *J. Food Sci.* 49, 555 - 557. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb12466.x>
- Caetano, W., Haddad, P.S., Itri, R., Severino, D., Vieira, V.C., Baptista, M.S., Schröder, A.P., Marques, C.M., 2007. Photo-induced destruction of giant vesicles in methylene blue solutions. *Langmuir* 23, 1307-1314. <https://doi.org/10.1021/la061510v>
- Cafiso, D.S., Hubbell, W.L., 1983. Electrogenic H⁺/OH⁻ movement across phospholipid vesicles measured by spin-labeled hydrophobic ions. *Biophys. J.* 44, 49 - 57. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(83\)84276-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(83)84276-3)
- Calzada, E., Onguka, O., Claypool, S.M., 2016. Phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease, in: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, p. 29-88. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.001>
- Campos, B.E., Dias Ruivo, T., da Silva Scapim, M.R., Madrona, G.S., de C. Bergamasco, R., 2016. Optimization of the mucilage extraction process from chia seeds and application in ice cream as a stabilizer and emulsifier. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 874 - 883. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.021>
- Cansell, M., Bardeau, T., Morvan, E., Grélard, A., Buré, C., Subra-Paternault, P., 2017. Phospholipid profiles of oleaginous pressed cakes using nmr and gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 94, 1219-1223. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3022-y>
- Cao, X., Li, N., Qi, G., Sun, X.S., Wang, D., 2018. Effect of spray drying on the properties of camelina gum isolated from camelina seeds. *Ind. Crops Prod.* 117, 278 - 285. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.017>
- Capitani, M.I., Corzo-Rios, L.J., Chel-Guerrero, L.A., Betancur-Ancona, D.A., Nolasco, S.M., Tomás, M.C., 2015. Rheological properties of aqueous dispersions of chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage. *J. Food Eng.* 149, 70 - 77. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.043>
- Capitani, M.I., Ixtaina, V.Y., Nolasco, S.M., Tomás, M.C., 2013. Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chia (*Salvia hispanica* L.) nutlets from Argentina: Microstructure, composition and mucilage of chia nutlets. *J. Sci. Food Agric.* 93, 3856-3862. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6327>
- Cardenas, A.E., Shrestha, R., Webb, L.J., Elber, R., 2015. Membrane permeation of a peptide: it is better to be positive. *J. Phys. Chem. B* 119, 6412 - 6420. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b02122>
- Castejón, N., Luna, P., Señoráns, F.J., 2017. Ultrasonic removal of mucilage for pressurized liquid extraction of omega-3 rich oil from chia seeds (*salvia hispanica* l.). *J. Agric. Food Chem.* 65, 2572-2579. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05726>
- Cenacchi, T., Bertoldin, T., Farina, C., Fiori, M.G., Crepaldi, G., Azzini, C.F., Girardello, R., Bagozzi, B., Garuti, R., Vivaldi, P., Belloni, G., Bordin, A., Durando, M., Lo Storto, M., Bertoni, L., Battistoni, A., Cacace, C., Arduini, P., Bonini, A., Caramia, M.P., Vaglieri, G., Brusomini, A., Donà, G., March, A., Campi, N., Cannas, P., Casson, F., Cavallarin, G., Delia, M., Cristianini, G., Louvier, O., Mello, F., Fameli, R., Urbani de Gheltoff, N., De Candia, O., Nante, G., Cattoni, C., Forte, P.L., Loreggian, M., Targa, A., Mansoldo, G.,

- Noro, G., Meggio, A., Pedrazzi, F., Bonmartini, F., Ruggiano, C., Peruzza, M., Olivari, G., Recaldin, E., Bellunato, C., Rigo, G., Marin, M., Marinangeli, L., Saracino, A., Miceli, O., Lovo, G., Scarpa, R., Battistello, L., Tomat, E., Bernava, B., Olivo, P., Verga, G., Merli, G., Zerman, A.M., Crivellaro, R., Vozza, A., Ziliotto, G.R., Favaretto, V., Allegro, L., 1993. Cognitive decline in the elderly: A double-blind, placebo-controlled multicenter study on efficacy of phosphatidylserine administration. *Aging Clin. Exp. Res.* 5, 123-133. <https://doi.org/10.1007/BF03324139>
- Çengel, Y.A., Cimbala, J.M., Chagnes, A., Griveau, S., Lair, V., Ringuédé, A., Çengel, Y.A., 2017. Ecoulement externe : Traînée et portance, in: *Mécanique des fluides*. p. 581-631.
- Chacon, J.N., McLearnie, J., Sinclair, R.S., 1988. Singlet oxygen yields and radical contributions in the dye-sensitised photo-oxidation in methanol of esters of polyunsaturated fatty acids (oleic, linoleic, linolenic and arachidonic). *Photochem. Photobiol.* 47, 647 - 656. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1988.tb02760.x>
- Chaon, J.N., Jamieson, G.R., Sinclair, R.S., 1987. Dye sensitised photo-oxidation of the methyl and phenyl esters of oleic and linoleic acids. *Chem. Phys. Lipids* 43, 81 - 99. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90028-4](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90028-4)
- Chapman, K.D., 1991. Acquisition of membrane lipids by differentiating glyoxysomes: role of lipid bodies. *J. Cell Biol.* 115, 995-1007. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.4.995>
- Cherian, G., 2012. *Camelina sativa* in poultry diets: Opportunities and challenges, in: *Biofuel co-products as livestock feed - opportunities and challenges. camelina sativa in poultry diets: Opportunities and challenges*. Makkar, H.P.S., p. 303-310.
- Chernenko, T.V., Talipova, M., Glushenkova, A.I., Umarov, A.U., Rakhimov, D., 1983. Lipids of cottonseed kernels. *Chem. Nat. Compd.* 19, 407-410. <https://doi.org/10.1007/BF00575692>
- Chernenko, T.V., Talipova, M., Guskova, S.D., Glushenkova, A.I., 1993. Polar lipids of cotton seeds and the products of their processing. *Chem. Nat. Compd.* 29, 157 - 160. <https://doi.org/10.1007/BF00630105>
- Chibowski, E., Szczeń, A., 2016. Zeta potential and surface charge of DPPC and DOPC liposomes in the presence of PLC enzyme. *Adsorption* 22, 755-765. <https://doi.org/10.1007/s10450-016-9767-z>
- Chiu, S.-W., Pandit, S.A., Scott, H.L., Jakobsson, E., 2009. An improved united atom force field for simulation of mixed lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B* 113, 2748 - 2763. <https://doi.org/10.1021/jp807056c>
- Chow, M.C., Ho, C.C., 2002. Chemical composition of oil droplets from palm oil mill sludge. *J. Oil Palm Res.* 14, 25-34.
- Clerc, S.G., Thompson, T.E., 1995. Permeability of dimyristoyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer membranes with coexisting gel and liquid-crystalline phases. *Biophys. J.* 68, 2333-2341. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80415-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80415-7)
- Cohen, B.E., 1975. The permeability of liposomes to nonelectrolytes. I. Activation energies for permeation. *J. Membr. Biol.* 20, 205-234.
- Cohen, B.E., Bangham, A.D., 1972. Diffusion of small non-electrolytes across liposome membranes. *Nature* 236, 173-174. <https://doi.org/10.1038/236173a0>
- Conn, K.L., Tewari, J.P., Dahiya, J.S., 1988. Resistance to *Alternaria brassicae* and phytoalexin-elicitation in rapeseed and other crucifers. *Plant Sci.* 56, 21 - 25. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(88\)90180-X](https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90180-X)
- Conte, E., Megli, F.M., Khandelia, H., Jeschke, G., Bordignon, E., 2013. Lipid peroxidation and water penetration in lipid bilayers: A W-band EPR study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828, 510-517. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.09.026>
- Cornelis, P.A.V.O., Vliegthart, J.F.G., Crawford, C.G., Gardner, H.W., 1982. Structural analysis of diastereomeric methyl-9-hydroxy trans-12,13-epoxy-10-trans-octadecenoates.

- Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab. 713, 173-6. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(82\)90180-1](https://doi.org/10.1016/0005-2760(82)90180-1)
- Cui, S.W., 2001. Flaxseed Gum, in: Polysaccharide Gums from Agricultural Products: Processing, Structures and Functionality. Technomic Publishing Company, p. 59-101.
- Cui, W., Eskin, M.N.A., Biliaderis, C.G., 1994a. Yellow mustard mucilage: chemical structure and rheological properties. Food Hydrocoll. 8, 203-214. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80333-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80333-0)
- Cui, W., Eskin, M.N.A., Biliaderis, C.G., 1994b. Fractionation, structural analysis, and rheological properties of water-soluble yellow mustard (*sinapis alba* L.) polysaccharides. J. Agric. Food Chem. 42, 657-664. <https://doi.org/10.1021/jf00039a011>
- Cui, W., Eskin, M.N.A., Biliaderis, C.G., 1993a. Chemical and physical properties of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) mucilage. Food Chem. 46, 169 - 176. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90032-B](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90032-B)
- Cui, W., Eskin, M.N.A., Biliaderis, C.G., 1993b. Water-soluble yellow mustard (*Sinapis alba* L.) polysaccharides: partial characterization, molecular size distribution and rheological properties. Carbohydr. Polym. 20, 215-225. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(93\)90153-U](https://doi.org/10.1016/0144-8617(93)90153-U)
- Cui, W., Mazza, G., 1996. Physicochemical characteristics of flaxseed gum. Food Res. Int. 29, 397-402. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(96\)00005-1](https://doi.org/10.1016/0963-9969(96)00005-1)
- Cui, W., Mazza, G., Biliaderis, C.G., 1994c. Chemical structure, molecular size distributions, and rheological properties of flaxseed gum. J. Agric. Food Chem. 42, 1891 - 1895. <https://doi.org/10.1021/jf00045a012>
- Cvengroš, J., Pavlovičová, A., Gladišová, G., Černý, J., 1999. Rapeseed oil methyl esters with low phosphorus content. Lipid - Fett 101, 261 - 265. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4133\(199907\)101:7<261::AID-LIPI261>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4133(199907)101:7<261::AID-LIPI261>3.0.CO;2-5)
- Cwiklik, L., Jungwirth, P., 2010. Massive oxidation of phospholipid membranes leads to pore creation and bilayer disintegration. Chem. Phys. Lett. 486, 99 - 103. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.01.010>
- Daniel, C.R.A., Rodrigues, N.M., da Costa, N.B., Freire, R.O., 2015. Are quantum chemistry semiempirical methods effective to predict solid state structure and adsorption in metal organic frameworks? J. Phys. Chem. C 119, 23398 - 23406. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b05599>
- David R. Lide, 2005a. Concentrative properties of aqueous solutions, in: CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005. <<http://www.hbcpnetbase.com>>, CRC Press, Boca Raton, FL.
- David R. Lide, 2005b. Properties of amino acids, in: CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005. <<http://www.hbcpnetbase.com>>, CRC Press, Boca Raton, FL.
- De Gier, J., Mandersloot, J.G., Van Deenen, L.L.M., 1968. Lipid composition and permeability of liposomes. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 150, 666 - 675. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(68\)90056-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(68)90056-4)
- de Souza, R.M., Siani, P., Schmidt, T.F., Itri, R., Dias, L.G., 2017. Methylene blue location in (hydroperoxidized) cardiolipin monolayer: implication in membrane photodegradation. J. Phys. Chem. B 121, 8512-8522. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b04824>
- Deamer, D.W., Bramhall, J., 1986. Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. Chem. Phys. Lipids 40, 167-188. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(86\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(86)90069-1)
- Dean, J.A., Lange, N.A. (Éd.), 1999. Lange's handbook of chemistry, 15. ed. ed, McGraw-Hill handbooks. McGraw-Hill, New York, NY.
- Deleu, M., Vaca-Medina, G., Fabre, J.-F., Roiz, J., Valentin, R., Mouloungui, Z., 2010. Interfacial properties of oleosins and phospholipids from rapeseed for the stability of oil bodies in

- aqueous medium. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 80, 125 - 132.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.036>
- Dewar, M.J.S., Thiel, W., 1977. Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 4899 - 4907.
<https://doi.org/10.1021/ja00457a004>
- D.H. Putnam, J.T. Budin, L.A. Field, W.M. Breene, 1993. Camelina: A promising low-input oilseed. *J. Janick and J.E. Simon*, p. 314-322.
- Di Paolo, G., De Camilli, P., 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651-657. <https://doi.org/10.1038/nature05185>
- Doktorova, M., Harries, D., Khelashvili, G., 2017. Determination of bending rigidity and tilt modulus of lipid membranes from real-space fluctuation analysis of molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 16806 - 16818.
<https://doi.org/10.1039/C7CP01921A>
- DuBois, Michel., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, Fred., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Duong-Ly, K.C., Gabelli, S.B., 2014. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, p. 85 - 94.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>
- Eisenberg, W.C., Anand, J., Wang, S., Stevenson, R.J., 1992. Oxidation of phosphatidylcholine membranes by singlet oxygen generated in the gas phase. *Photochem. Photobiol.* 56, 441 - 445. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb02186.x>
- El Batal, H., Hasib, A., Ouattmane, A., Jaouad, A., Naïmi, M., 2012. Rheology and influence factor of Locust Bean Gum solution. *Rev. Génie Ind.* 8, 55-62.
- Elfak, A.M., Pass, G., Morley, R.G., 1977. The viscosity of dilute solutions of guar gum and locust bean gum with and without added sugars. *J. Sci. Food Agric.* 28, 895 - 899.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740281005>
- Elsebaïy, L., Elmahdy, A., Moustafa, E., Mohamed, M., 1980. A modified method for the isolation and quantification of oil seed phospholipids. *Food Chem.* 5, 217 - 229.
[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(80\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(80)90013-8)
- Emaga, T., Rabetafika, H., Blecker, C., Paquot, M., 2012. Kinetics of the hydrolysis of polysaccharide galacturonic acid and neutral sugars chains from flaxseed mucilage.
- Engels, C., Hendrickx, M., De Samblanx, S., De Gryze, I., Tobback, P., 1986. Modelling water diffusion during long-grain rice soaking. *J. Food Eng.* 5, 55 - 73.
[https://doi.org/10.1016/0260-8774\(86\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0260-8774(86)90019-1)
- Erskine, A.J., Jones, J.K.N., 1957. The structure of linseed mucilage, part I. *Can. J. Chem.* 35.
- Evon, Ph., Amalia Kartika, I., Cerny, M., Rigal, L., 2013. Extraction of oil from jatropha seeds using a twin-screw extruder: Feasibility study. *Ind. Crops Prod.* 47, 33 - 42.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.034>
- Fabre, J.-F., Cerny, M., Cassen, A., Mouloungui, Z., 2018. Effect of methylene blue on the formation of oxidized phospholipid vesicles (preprint). *Bioengineering*.
<https://doi.org/10.1101/403634>
- Fabre, J.-F., Lacroux, E., Cerny, M., Mouloungui, Z., 2015a. Barriers to the release of flaxseed oil bodies and ways of overcoming them. *OCL* 22, D607. <https://doi.org/10.1051/ocl/2015058>
- Fabre, J.-F., Lacroux, E., Valentin, R., Mouloungui, Z., 2015b. Ultrasonication as a highly efficient method of flaxseed mucilage extraction. *Ind. Crops Prod.* 65, 354 - 360.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.015>

- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M., 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207.
- Fedeniuk, R.W., Biliaderis, C.G., 1994. Composition and physicochemical properties of linseed (*linum usitatissimum* L.) mucilage. *J. Agric. Food Chem.* 42, 240 - 247. <https://doi.org/10.1021/jf00038a003>
- Felisberto, M.H.F., Wahanik, A.L., Gomes-Ruffi, C.R., Clerici, M.T.P.S., Chang, Y.K., Steel, C.J., 2015. Use of chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage gel to reduce fat in pound cakes. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 1049-1055. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.114>
- Feller, S.E., Yin, D., Pastor, R.W., MacKerell, A.D., 1997. Molecular dynamics simulation of unsaturated lipid bilayers at low hydration: parameterization and comparison with diffraction studies. *Biophys. J.* 73, 2269 - 2279. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78259-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78259-6)
- Ferguson, M.A.J., Williams, A.F., 1988. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 285 - 320. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.001441>
- Finkelstein, A., 1976. Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* 68, 127-135. <https://doi.org/10.1085/jgp.68.2.127>
- Flaten, G.E., Dhanikula, A.B., Luthman, K., Brandl, M., 2006. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.08.007>
- Florence, Ng., Naorem, H., 2014. Dimerization of methylene blue in aqueous and mixed aqueous organic solvent: A spectroscopic study. *J. Mol. Liq.* 198, 255 - 258. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.06.030>
- Frank, A.W., 2013. Phospholipids, in: *Chemistry of Plant Phosphorus Compounds*. Elsevier, p. 159-304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407194-0.00004-4>
- Fujikawa, M., Ano, R., Nakao, K., Shimizu, R., Akamatsu, M., 2005. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: Application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 4721-4732. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.076>
- Gallucci, E., Micelli, S., Lippe, C., 1971. Non-electrolyte permeability across thin lipid membranes. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 79, 881 - 887. <https://doi.org/10.3109/13813457109104847>
- Gamini, R., Chandler, D., s. d. Residue-based coarse graining using MARTINI force field in namd.
- Gandin, E., Lion, Y., Van de Vorst, A., 1983. Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives. *Photochem. Photobiol.* 37, 271-278. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x>
- Garcia-Ochoa, F., Casas, J.A., 1992. Viscosity of locust bean (*Ceratonia siliqua*) gum solutions. *J. Sci. Food Agric.* 59, 97-100. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740590114>
- Gardarin, A., Dürr, C., Mannino, M.R., Busset, H., Colbach, N., 2010. Seed mortality in the soil is related to seed coat thickness. *Seed Sci. Res.* 20, 243 - 256. <https://doi.org/10.1017/S0960258510000255>
- Gardner, H.W., Simpson, T.D., Hamberg, M., 1993. Transformation of fatty acid hydroperoxides by alkali and characterization of products. *Lipids* 28, 487 - 495. <https://doi.org/10.1007/BF02536079>
- Gardner, H.W., Weisleder, D., 1972. Hydroperoxides from oxidation of linoleic and linolenic acids by soybean lipoxygenase: Proof of the trans-11 double bond. *Lipids* 7, 191-193. <https://doi.org/10.1007/BF02533062>

- Garrec, J., Monari, A., Assfeld, X., Mir, L.M., Tarek, M., 2014a. Lipid Peroxidation in Membranes: The Peroxyl Radical Does Not “Float”. *J. Phys. Chem. Lett.* 5, 1653-1658. <https://doi.org/10.1021/jz500502q>
- Garrec, J., Monari, A., Assfeld, X., Mir, L.M., Tarek, M., 2014b. Lipid peroxidation in membranes: the peroxyl radical does not “float”. *J. Phys. Chem. Lett.* 5, 1653-1658. <https://doi.org/10.1021/jz500502q>
- Gerritsen, W.J., De Kruijff, B., Verkleij, A.J., De Gier, J., Van Deenen, L.L.M., 1980. Ca²⁺-induced isotropic motion and phosphatidylcholine flip-flop in phosphatidylcholine-cardiolipin bilayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 598, 554 - 560. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(80\)90035-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(80)90035-8)
- Gharagheizi, F., Ilani-Kashkouli, P., Kamari, A., Mohammadi, A.H., Ramjugernath, D., 2014. Group contribution model for the prediction of refractive indices of organic compounds. *J. Chem. Eng. Data* 59, 1930-1943. <https://doi.org/10.1021/je5000633>
- Giesecking, R.L.M., Ratner, M.A., Schatz, G.C., 2018. Benchmarking semiempirical methods to compute electrochemical formal potentials. *J. Phys. Chem. A* 122, 6809 - 6818. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.8b05143>
- Goh, K.K.T., Matia-Merino, L., Chiang, J.H., Quek, R., Soh, S.J.B., Lentle, R.G., 2016. The physico-chemical properties of chia seed polysaccharide and its microgel dispersion rheology. *Carbohydr. Polym.* 149, 297-307. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.126>
- Goh, S.H., Khor, H.T., Gee, P.T., 1982. Phospholipids of palm oil (*Elaeis guineensis*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59, 296-299. <https://doi.org/10.1007/BF02662230>
- Gollnick, K., 2007. Type II Photooxygenation Reactions in Solution, in: Noyes, W.A., Hammond, G.S., Pitts, J.N. (Éd.), *Advances in Photochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. 1-122. <https://doi.org/10.1002/9780470133361.ch1>
- Gómez-Díaz, D., Navaza, J.M., Quintáns-Riveiro, L.C., 2008. Intrinsic viscosity and flow behaviour of arabic gum aqueous solutions. *Int. J. Food Prop.* 11, 773 - 780. <https://doi.org/10.1080/10942910701596918>
- Gopalakrishnan, N., Narayanan, C.S., Mathew, A.G., Arumughan, C., 1987. Lipid composition of coconut cake oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64, 539-541. <https://doi.org/10.1007/BF02636390>
- Goraj-Moszora, I., Drozdowski, B., 1990. Composition of phospholipids of various rapeseed varieties. *Ann Acad Med Silesiensis* 20, 7-12.
- Gottschalk, P., Paczkowski, J., Neckers, D.C., 1986. Factors influencing the quantum yields for rose bengal formation of singlet oxygen. *J. Photochem.* 35, 277 - 281. [https://doi.org/10.1016/0047-2670\(86\)87059-9](https://doi.org/10.1016/0047-2670(86)87059-9)
- Graham, D.E., Lea, E.J.A., 1972. The effect of surface charge on the water permeability of phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 274, 286 - 293. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(72)90177-0)
- Green, A.A., 1932. Studies in the physical chemistry of the proteins. X. The solubility of hemoglobin in solutions of chlorides and sulfates of varying concentration. *J. Biol. Chem.* 95, 47.
- Guerrero, A., Casals, I., Busquets, M., Leon, Y., Manresa, A., 1997. Oxydation of oleic acid to (E)-10-hydroperoxy-8-octadecenoic and (E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acids by *Pseudomonas* sp. 42A2. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 1347, 75-81. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00056-8)
- Gunstone, F.D. (Éd.), 2008. *Phospholipid technology and applications*, Oily Press lipid library. The Oily Press, Bridgewater.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., 1994. Occurrence and characterisation of oils and fats, in: *The Lipid Handbook*.

- Guo, B.-Y., Wen, B., Shan, X.-Q., Zhang, S.-Z., Lin, J.-M., 2005. Separation and determination of phospholipids in plant seeds by nonaqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1074, 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.062>
- Guo, Y., Baulin, V.A., Thalmann, F., 2016. Peroxidised phospholipid bilayers: insight from coarse-grained molecular dynamics simulations. *Soft Matter* 12, 263 - 271. <https://doi.org/10.1039/C5SM01350J>
- Gutknecht, J., 1988. Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes. Effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers. *J. Gen. Physiol.* 69, 779 - 794. <https://doi.org/10.1085/jgp.69.6.779>
- Haines, T.H., Liebovitch, L.S., 1995. A molecular mechanism for the transport of water across phospholipid bilayers., in: *Permeability Stab. Lipid Bilayers*. CRC, p. 123-36.
- Hamama, A.A., Bhardwaj, H.L., Starner, D.E., 2003. Genotype and growing location effects on phytosterols in canola oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80, 1121 - 1126. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0829-3>
- Harned, H.S., Owen, B.B., 1963. *The physical chemistry of electrolytic solutions*. Reinhold Pub. Corp.
- Haugen, A., May, S., 2007. The influence of zwitterionic lipids on the electrostatic adsorption of macroions onto mixed lipid membranes. *J. Chem. Phys.* 127, 215104. <https://doi.org/10.1063/1.2803075>
- Hauser, H., Oldani, D., Phillips, M.C., 1973. Mechanism of ion escape from phosphatidylcholine and phosphatidylserine single bilayer vesicles. *Biochemistry* 12, 4507 - 4517. <https://doi.org/10.1021/bi00746a032>
- Herchi, W., Bouali, I., Bahashwan, S., Rochut, S., Boukhchina, S., Kallel, H., Pepe, C., 2012. Changes in phospholipid composition, protein content and chemical properties of flaxseed oil during development. *Plant Physiol. Biochem.* 54, 1 - 5. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.008>
- Hermetter, A., Kopec, W., Khandelia, H., 2013. Conformations of double-headed, triple-tailed phospholipid oxidation lipid products in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828, 1700-1706. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.030>
- Hernandez, L.M., 2012. Mucilage from chia seeds (*Salvia hispanica*): microstructure, physico-chemical characterization and applications in food industry. Pontifica Universidad catolica de Chile, Santiago de Chile.
- Herzberg, G., 1950. *Molecular spectra and molecular structure*. I, I., D. Van Nostrand, Princeton (N.J.); Toronto; London.
- Hohenberg, P., Kohn, W., 1964. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* 136, B864 - B871. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.B864>
- Hu, X., Liu, Chongyi., 1999. Separation of flaxseed mucilage from flaxseed shells by a dry process.
- Hudiyanti, D., Radifar, M., Raharjo, T.J., Narsito, N., Noegrohati, S., 2014. A coarse-grained molecular dynamics simulation using namd package to reveal aggregation profile of phospholipids self-assembly in water. *J. Chem.* 2014, 1 - 6. <https://doi.org/10.1155/2014/273084>
- Hunt, K., Jones, J.K.N., 1962. The structure of linseed mucilage, part II. *Can. J. Chem.* 40.
- Huster, D., Jin, A.J., Arnold, K., Gawrisch, K., 1997. Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by ¹⁷O NMR. *Biophys. J.* 73, 855 - 864. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78118-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78118-9)
- Iacazio, G., Langrand, G., Baratti, J., Buono, G., Triantaphylides, C., 1990. Preparative, enzymic synthesis of linoleic acid (13S)-hydroperoxide using soybean lipoxygenase-1. *J. Org. Chem.* 55, 1690-1691. <https://doi.org/10.1021/jo00292a056>

- IATA, 2018. Sustainable Aviation Fuels, Fact sheet.
- Ileri Ercan, N., Stroeve, P., Tringe, J.W., Faller, R., 2018. Molecular dynamics modeling of methylene blue–dopc lipid bilayer interactions. *Langmuir* 34, 4314 - 4323. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00372>
- Imeson, A., 2011. Food stabilisers, thickeners and gelling agents. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Inanaga, S., Arima, E., Nishihara, T., 1990. Effect of Ca on composition of fat body of peanut seed. *Plant Soil* 122, 91-96. <https://doi.org/10.1007/BF02851914>
- I.R. Siddiqui, S.H. Yiu, J.D. Jones, M. Kalab, 1986. Mucilage in yellow mustard (*Brassica Hirta*) seeds. *Food Microstruct.* 5, 157-162.
- Itri, R., Junqueira, H.C., Mertins, O., Baptista, M.S., 2014. Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. *Biophys. Rev.* 6, 47-61.
- Jansen, M., Blume, Alfred., 1995. A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayers composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chains. *Biophys. J.* 68, 997-1008.
- Jaramillo, D.P., Roberts, R.F., Coupland, J.N., 2011. Effect of pH on the properties of soy protein–pectin complexes. *Food Res. Int.* 44, 911 - 916. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.057>
- Jensen, J.H., Swain, C.J., Olsen, L., 2017. Prediction of pKa values for druglike molecules using semiempirical quantum chemical methods. *J. Phys. Chem. A* 121, 699-707.
- Jin, B., Hopfinger, A.J., 1996. Characterization of lipid membrane dynamics by simulation: 3. Probing molecular transport across the phospholipid bilayer. *Pharm. Res.* 13, 1786-1794.
- Jo, S., Kim, T., Im, W., 2007. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. *PLoS ONE* 2, e880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000880>
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V.G., Im, W., 2008. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* 29, 1859-1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Jo, S., Lim, J.B., Klauda, J.B., Im, W., 2009. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophys. J.* 97, 50 - 58. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.04.013>
- John, J.V., Park, H., Lee, H.R., Suh, H., Kim, I., 2015. Simultaneous extraction of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from soybean lecithin: Extraction of soy lecithin. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 1647 - 1654. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400396>
- Jorissen, B.L., Brouns, F., Van Boxtel, M.P.J., Ponds, R.W.H.M., Verhey, F.R.J., Jolles, J., Riedel, W.J., 2001. The influence of soy-derived phosphatidylserine on cognition in age-associated memory impairment. *Nutr. Neurosci.* 4, 121 - 134. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2001.11747356>
- J.P. Cherry, W.H. Kramer, 1989. Plant sources of Lecithin, in: *Lecithins : Sources, Manufacture and Uses*. Szuhaj, B.F., The American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois.
- Jurkiewicz, P., Olżyńska, A., Cwiklik, L., Conte, E., Jungwirth, P., Megli, F.M., Hof, M., 2012. Biophysics of lipid bilayers containing oxidatively modified phospholipids: Insights from fluorescence and EPR experiments and from MD simulations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1818, 2388-2402. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.020>
- Kanai, M., Mano, S., Hayashi, M., Nishimura, M., 2016. Designing novel breeding strategies for producing high-oil crops based on a molecular understanding of triacylglycerol metabolism, in: Araujo, S., Balestrazzi, A. (Éd.), *New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64465>

- Kartika, I.A., Pontalier, P.Y., Rigal, L., 2005. Oil extraction of oleic sunflower seeds by twin screw extruder: influence of screw configuration and operating conditions. *Ind. Crops Prod.* 22, 207-222. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.01.001>
- Kawai, Y., Ogamo, A., Nakagawa, Y., 1999. Formation of the aldehydic choline glycerophospholipids in human red blood cell membrane peroxidized with an azo initiator. *J. Biochem. (Tokyo)* 126, 115-120.
- Khabiri, M., Roeselova, M., Cwiklik, L., 2012. Properties of oxidized phospholipid monolayers: An atomistic molecular dynamics study. *Chem. Phys. Lett.* 519 - 520, 93 - 99. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.11.016>
- Khandelia, H., Mouritsen, O.G., 2009. Lipid gymnastics: evidence of complete acyl chain reversal in oxidized phospholipids from molecular simulations. *Biophys. J.* 96, 2734 - 2743. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.007>
- Kim, W., Rho, H., Hong, Y., Yeom, M., Shin, S., Yi, J., Lee, M.-S., Park, H., Cho, D., 2013. Determination and comparison of seed oil triacylglycerol composition of various soybeans (*glycine max (l.)*) using 1h-nmr spectroscopy. *Molecules* 18, 14448 - 14454. <https://doi.org/10.3390/molecules18114448>
- Kirkhus, B., Lundon, A.R., Haugen, J.-E., Vogt, G., Borge, G.I.A., Henriksen, B.I.F., 2013. Effects of environmental factors on edible oil quality of organically grown *camelina sativa*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3179-3185. <https://doi.org/10.1021/jf304532u>
- Klauda, J.B., Monje, V., Kim, T., Im, W., 2012. Improving the CHARMM Force Field for Polyunsaturated Fatty Acid Chains. *J. Phys. Chem. B* 116, 9424 - 9431. <https://doi.org/10.1021/jp304056p>
- Klauda, J.B., Venable, R.M., Freites, J.A., O'Connor, J.W., Tobias, D.J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov, I., MacKerell, A.D., Pastor, R.W., 2010. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *J. Phys. Chem. B* 114, 7830-7843. <https://doi.org/10.1021/jp101759q>
- Knothe, G., Kenar, J.A., 2004. Determination of the fatty acid profile by 1H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 88-96. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300880>
- Kochevar, I.E., Redmond, R.W., 2000. [2] Photosensitized production of singlet oxygen, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, p. 20 - 28. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)19004-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)19004-4)
- Kohn, W., Sham, L.J., 1965. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* 140, A1133-A1138. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.140.A1133>
- Kondoh, H., Kawabe, S., 1975. Phospholipids in Castor Seeds. *Agric. Biol. Chem.* 39, 745-746. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.39.745>
- Kooijman, E.E., Chupin, V., de Kruijff, B., Burger, K.N.J., 2003. Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid: biophysical properties of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic* 4, 162 - 174. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00086.x>
- Kooijman, E.E., Tieleman, D.P., Testerink, C., Munnik, T., Rijkers, D.T.S., Burger, K.N.J., de Kruijff, B., 2007. An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins. *J. Biol. Chem.* 282, 11356 - 11364. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609737200>
- Kotova, E.A., Kuzevanov, A.V., Pashkovskaya, A.A., Antonenko, Y.N., 2011. Selective permeabilization of lipid membranes by photodynamic action via formation of hydrophobic defects or pre-pores. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 2252-2257. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.05.018>
- Krishnamurthy, M.N., Chandrasekhara, N., 1983. Polar lipids of coconut. *J. Food Sci. Technol.* 20, 206-9.

- Krishnamurty, S., Stefanov, M., Mineva, T., Bégu, S., Devoisselle, J.M., Goursot, A., Zhu, R., Salahub, D.R., 2008a. Density functional theory-based conformational analysis of a phospholipid molecule (dimyristoyl phosphatidylcholine). *J. Phys. Chem. B* 112, 13433-13442. <https://doi.org/10.1021/jp804934d>
- Krishnamurty, S., Stefanov, M., Mineva, T., Begu, S., Devoisselle, J.M., Goursot, A., Zhu, R., Salahub, D.R., 2008b. Lipid thermodynamics: melting is molecular. *ArXiv08060822 Cond-Mat*.
- Kučerka, N., Liu, Y., Chu, N., Petrache, H.I., Tristram-Nagle, S., Nagle, J.F., 2005. Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using x-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 88, 2626-2637. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.056606>
- Kučerka, N., Nagle, J.F., Sachs, J.N., Feller, S.E., Pencer, J., Jackson, A., Katsaras, J., 2008. Lipid bilayer structure determined by the simultaneous analysis of neutron and x-ray scattering data. *Biophys. J.* 95, 2356-2367. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.132662>
- Kulkarni, A.S., Khotpal, H.A., R., Bhakare, H.A., 1991. Phospholipids and glycolipids in the oil from some varieties of *Elaeis guineensis* in India. *J. Oil Palm Res.* 3, 363-368.
- Lambeth, J.D., Ryu, S.H., 1996. Glycerolipids in signal transduction, in: *New Comprehensive Biochemistry*. Elsevier, p. 237-255. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60516-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60516-5)
- Lee, J., Cheng, X., Swails, J.M., Yeom, M.S., Eastman, P.K., Lemkul, J.A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J.C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V.S., Case, D.A., Brooks, C.L., MacKerell, A.D., Klauda, J.B., Im, W., 2016. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* 12, 405 - 413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
- Leung, S.S.F., Mijalkovic, J., Borrelli, K., Jacobson, M.P., 2012. Testing physical models of passive membrane permeation. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 1621 - 1636. <https://doi.org/10.1021/ci200583t>
- Lewis, G.N., Goldschmid, O., Magel, T.T., Bigeleisen, J., 1943. Dimeric and other forms of methylene blue: absorption and fluorescence of the pure monomer ¹. *J. Am. Chem. Soc.* 65, 1150-1154. <https://doi.org/10.1021/ja01246a037>
- Li, N., Qi, G., Sun, X.S., Wang, D., 2016. Characterization of gum isolated from Camelina seed. *Ind. Crops Prod.* 83, 268-274. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.029>
- Li, N., Qi, G., Sun, X.S., Wang, D., Bean, S., Blackwell, D., 2014. Isolation and Characterization of Protein Fractions Isolated from Camelina Meal. *Trans. ASABE* 57, 169 - 178. <https://doi.org/10.13031/trans.57.10455>
- Lieb, W.R., Stein, W.D., 1969. Biological membranes behave as non-porous polymeric sheets with respect to the diffusion of non-electrolytes. *Nature* 224, 240 - 243. <https://doi.org/10.1038/224240a0>
- Lipinski, C.A., 2004. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* 1, 337-341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings IPII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3-25.1. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3-26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, 3-25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)

- Lis, M., Wizert, A., Przybylo, M., Langner, M., Swiatek, J., Jungwirth, P., Cwiklik, L., 2011. The effect of lipid oxidation on the water permeability of phospholipids bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 17555. <https://doi.org/10.1039/c1cp21009b>
- Liu, D., Ma, F., 2011. Soybean phospholipids, in: Krezhova, D. (Éd.), *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*. InTech.
- Liu, S., Cao, C., Li, Z., 1998. Approach to estimation and prediction for normal boiling point (NBP) of alkanes based on a novel molecular distance-edge (MDE) vector, λ . *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 38, 387-394. <https://doi.org/10.1021/ci970109z>
- Liu, X., Shiihara, M., Taniwaki, N., Shirasaka, N., Atsumi, Y., Shiojiri, M., 2015. Phosphatidylserine: Biology, Technologies, and Applications, in: *Polar Lipids*. Elsevier, p. 145-184. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-044-3.50010-8>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Luzio, G.A., 2004. Determination of galacturonic acid content of pectin using a microtiter plate assay. *Proc Fla State Hort Soc* 117, 416-421.
- MacLean, W.C., Warwick, P., Food and Agriculture Organization of the United Nations (Éd.), 2003. *Food energy: methods of analysis and conversion factors: report of a technical workshop, Rome, 3-6 December 2002*, FAO food and nutrition paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Macquet, A., Ralet, M.-C., Kronenberger, J., Marion-Poll, A., North, H.M., 2007. In situ, chemical and macromolecular study of the composition of *arabidopsis thaliana* seed coat mucilage. *Plant Cell Physiol.* 48, 984-999. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm068>
- Mahdi Kadivar, 2001. *Studies on integrated processes for the recovery of mucilage, hull, oil and protein from solin (low linolenic acid flax)*. University of Saskatchewan, Canada.
- Mahmood, T., Anwer, F., Mahmood, I., Kishwar, F., Wahab, A., 2013. Solvatochromic effect of Methylene Blue in different solvents with different polarity.
- Makino, K., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H., Kondo, T., 1991. Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophys. Chem.* 41, 175 - 183. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(91\)80017-L](https://doi.org/10.1016/0301-4622(91)80017-L)
- Mansour, M., Shrestha, P., Belide, S., Petrie, J., Nichols, P., Singh, S., 2014. Characterization of oilseed lipids from “DHA-producing *camelina sativa*”: a new transformed land plant containing long-chain omega-3 oils. *Nutrients* 6, 776 - 789. <https://doi.org/10.3390/nu6020776>
- Marrink, S.J., Berendsen, H.J.C., 1996. Permeation process of small molecules across lipid membranes studied by molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem.* 100, 16729 - 16738. <https://doi.org/10.1021/jp952956f>
- Marrink, S.-J., Berendsen, H.J.C., 1994. Simulation of water transport through a lipid membrane. *J. Phys. Chem.* 98, 4155-4168. <https://doi.org/10.1021/j100066a040>
- Marrink, S.J., de Vries, A.H., Mark, A.E., 2004. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. *J. Phys. Chem. B* 108, 750-760. <https://doi.org/10.1021/jp036508g>
- Marrink, S.J., Sok, R.M., Berendsen, H.J.C., 1996. Free volume properties of a simulated lipid membrane. *J. Chem. Phys.* 104, 9090-9099. <https://doi.org/10.1063/1.471442>
- Marshall, P.N., 1976. The composition of stains produced by the oxidation of Methylene Blue. *Histochem. J.* 8, 431-442.
- Martin, B.A., Wilson, R.F., 1985. Subcellular compartmentation of fatty acid and triacylglycerol synthesis in developing soybean seed. *Agrochimica* 29, 89-96.

- Martínez, L., Andrade, R., Birgin, E.G., Martínez, J.M., 2009. PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* 30, 2157-2164. <https://doi.org/10.1002/jcc.21224>
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., Lee, Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.* 339, 69-72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- Mathai, J.C., Tristram-Nagle, S., Nagle, J.F., Zeidel, M.L., 2008. Structural determinants of water permeability through the lipid membrane. *J. Gen. Physiol.* 131, 69 - 76. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709848>
- Mathieu, D., Nony, J., Phan-Tan-Luu, R., 2000. NEMRODW. LPRAI, Marseille.
- Mazari, A., Iwamoto, S., Yamauchi, R., 2010. Effects of Linoleic Acid Position in Phosphatidylcholines and Cholesterol Addition on Their Rates of Peroxidation in Unilamellar Liposomes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1013 - 1017. <https://doi.org/10.1271/bbb.90896>
- Mazza, G., Biliaderis, C.G., 1989. Functional Properties of Flax Seed Mucilage. *J. Food Sci.* 54, 1302-1305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05978.x>
- McIntosh, T.J., Simon, S.A., 1986. Area per molecule and distribution of water in fully hydrated dilauroylphosphatidylethanolamine bilayers. *Biochemistry* 25, 4948-4952.
- Megli, F.M., Conte, E., Russo, L., 2010. Comparative 5-doxylstearoyllecithin and 3-doxylochlestane EPR spin labeling study of phospholipid bilayer perturbation by different oxidized lecithin species. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1798, 1886-1898. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.017>
- Megli, F.M., Russo, L., 2008. Different oxidized phospholipid molecules unequally affect bilayer packing. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 143 - 152. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.014>
- Megli, F.M., Russo, L., Conte, E., 2009. Spin labeling EPR studies of the properties of oxidized phospholipid-containing lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788, 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.002>
- Meng, X., Ye, Q., Pan, Q., Ding, Y., Wei, M., Liu, Y., van de Voort, F.R., 2014. Total phospholipids in edible oils by in-vial solvent extraction coupled with ftir analysis. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3101-3107. <https://doi.org/10.1021/jf404880v>
- Merkel, P.B., Kearns, D.R., 1972a. Remarkable solvent effects on the lifetime of 1.DELTA.g oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 1029-1030. <https://doi.org/10.1021/ja00758a071>
- Merkel, P.B., Kearns, D.R., 1972b. Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 7244-7253. <https://doi.org/10.1021/ja00776a003>
- Meyer, H., 1899. Theorie der Alkoholnarkose. *Arch Exp Pathol Pharmakol* 42, 109-118.
- Mie, G., 1908. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* 330, 377-445. <https://doi.org/10.1002/andp.19083300302>
- Millichip, M., Tatham, A.S., Jackson, F., Griffiths, G., Shewry, P.R., Stobart, A.K., 1996. Purification and characterization of oil-bodies (oleosomes) and oil-body boundary proteins (oleosins) from the developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem. J.* 314, 333-337. <https://doi.org/10.1042/bj3140333>
- Mills, C.T., Goldhaber, M.B., 2010. On silica-based solid phase extraction techniques for isolating microbial membrane phospholipids: Ensuring quantitative recovery of phosphatidylcholine-derived fatty acids. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1179 - 1182. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.03.023>
- Mishkind, M., 2000. Phosphatidylethanolamine – in a pinch. *Trends Cell Biol.* 10, 368. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01826-2](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01826-2)

- Mishra, D., Das, S., Krishnamurthy, S., Pal, S., 2013. Understanding the orientation of water molecules around the phosphate and attached functional groups in a phospholipid molecule: a DFT-based study. *Mol. Simul.* 39, 937 - 955. <https://doi.org/10.1080/08927022.2013.783701>
- Missner, A., Pohl, P., 2009. 110 Years of the Meyer-Overton Rule: Predicting Membrane Permeability of Gases and Other Small Compounds. *ChemPhysChem* 10, 1405 - 1414. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900270>
- Mitragotri, S., Johnson, M.E., Blankschtein, D., Langer, R., 1999. An analysis of the size selectivity of solute partitioning, diffusion, and permeation across lipid bilayers. *Biophys. J.* 77, 1268 - 1283. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76978-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76978-X)
- Montanari, L., Fantozzi, P., Snyder, J.M., King, J.W., 1999. Selective extraction of phospholipids from soybeans with supercritical carbon dioxide and ethanol. *J. Supercrit. Fluids* 14, 87 - 93. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(98\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(98)00110-7)
- Moran, P.A.P., 1950. A test for the serial independence of residuals. *Biometrika* 37, 178 - 181. <https://doi.org/10.1093/biomet/37.1-2.178>
- Moser, B.R., 2010. Camelina (*Camelina sativa* L.) oil as a biofuels feedstock: Golden opportunity or false hope? *Lipid Technol.* 22, 270 - 273. <https://doi.org/10.1002/lite.201000068>
- Mulvaney, P., Liz-Marzán, L.M., 2003. Rational material design using a core-shell nanocrystals, in: Antonietti, M. (Ed.), *Colloid Chemistry I*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 225 - 246. https://doi.org/10.1007/3-540-36408-0_8
- Muñoz, L.A., Cobos, A., Diaz, O., Aguilera, J.M., 2012. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *J. Food Eng.* 108, 216 - 224. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037>
- Murphy, E.J., 2011. Versatile camelina: the future of biofuel and much more. *Inform* 22, 601 - 664.
- Myllymaki, Olavi., 2000. Processing of flaxseed. US 6440479 B1.
- Nagle, J.F., Mathai, J.C., Zeidel, M.L., Tristram-Nagle, S., 2008. Theory of passive permeability through lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* 131, 77 - 85. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709849>
- Nagle, J.F., Tristram-Nagle, S., 2000. Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* 1469, 159 - 195. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00016-2)
- Naran, R., Chen, G., Carpita, N.C., 2008. Novel rhamnogalacturonan and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage. *Plant Physiol.* 148, 132 - 141. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123513>
- Nash, A.M., Frankel, E.N., 1986. Limited extraction of soybeans with hexane. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63, 244 - 246. <https://doi.org/10.1007/BF02546147>
- Neckers, D.C., 1989. Rose Bengal. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 47, 1 - 29. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(89\)85002-6](https://doi.org/10.1016/1010-6030(89)85002-6)
- Neff, W.E., Frankel, E.N., Miyashita, K., 1990. Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols. I. Trilinoleoylglycerol. *Lipids* 25, 33 - 39. <https://doi.org/10.1007/BF02562425>
- Neto, A.J.P., Cordeiro, R.M., 2016. Molecular simulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1858, 2191 - 2198. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.018>
- Nitsche, J.M., Kasting, G.B., 2016. A universal correlation predicts permeability coefficients of fluid- and gel-phase phospholipid and phospholipid-cholesterol bilayers for arbitrary solutes. *J. Pharm. Sci.* 105, 1762 - 1771. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.02.012>
- Nitsche, J.M., Kasting, G.B., 2013. Permeability of fluid-phase phospholipid bilayers: assessment and useful correlations for permeability screening and other applications. *J. Pharm. Sci.* 102, 2005 - 2032. <https://doi.org/10.1002/jps.23471>

- Nockrashy, A.S.E., Frampton, V.L., 1970. Über den azeotropen Aceton-Hexan-Wasser-Extrakt von Schrot der Gattung *Gossypium*, der vorher mit Petroläther entfettet wurde. *Ö Fette Wachse* 96, 747-750.
- Noordam, P.C., van Echteld, C.J.A., de Kruijff, B., Verkleij, A.J., de Gier, J., 1980. Barrier characteristics of membrane model systems containing unsaturated phosphatidylethanolamines. *Chem. Phys. Lipids* 27, 221 - 232. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(80\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0009-3084(80)90037-7)
- Nor, O.M., Humphrey, M., Richard, H., 2003. Scaling-up the production of 13S-hydroxy-9Z,11E-octadecadienoic acid (13S-HODE) through chemoenzymatic technique. *Bull. Korean Chem. Soc.* 24, 397-399. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2003.24.3.397>
- North, H.M., Berger, A., Saez-Aguayo, S., Ralet, M.-C., 2014. Understanding polysaccharide production and properties using seed coat mutants: future perspectives for the exploitation of natural variants. *Ann. Bot.* 114, 1251-1263. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu011>
- Nzai, J.M., Proctor, A., 1999. Soy lecithin phospholipid determination by fourier transform infrared spectroscopy and the acid digest/arseno-molybdate method: A comparative study. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 61-66. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0048-9>
- Nzai, J.M., Proctor, A., 1998. Determination of phospholipids in vegetable oil by fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 1281 - 1289. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0173-x>
- Offem, J.O., Egbe, E.O., Onen, A.I., 1993. Changes in lipid content and composition during germination of groundnuts. *J. Sci. Food Agric.* 62, 147 - 155. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620207>
- Ogunniyi, D.S., 2006. Castor oil: a vital industrial raw material. *Bioresour. Technol.* 97, 1086-1091.
- Omogbai, F.E., 1990. Lipid composition of tropical seeds used in the Nigerian diet. *J. Sci. Food Agric.* 50, 253-255. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740500212>
- Oomah, B.D., Kenaschuk, E.O., Cui, W., Mazza, G., 1995. Variation in the composition of water-soluble polysaccharides in flaxseed. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1484 - 1488. <https://doi.org/10.1021/jf00054a013>
- Oomah, B.D., Mazza, G., 1993. Flaxseed proteins—a review. *Food Chem.* 48, 109 - 114. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90043-F](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90043-F)
- Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A.E., Van Gunsteren, W.F., 2004. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* 25, 1656 - 1676. <https://doi.org/10.1002/jcc.20090>
- Orbach, E., 1980. The nonelectrolyte permeability of planar lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* 75, 427-436. <https://doi.org/10.1085/jgp.75.4.427>
- Orifici, S.C., Capitani, M.I., Tomás, M.C., Nolasco, S.M., 2018. Optimization of mucilage extraction from chia seeds (*Salvia hispanica* L.) using response surface methodology: Extraction mucilage of chia. *J. Sci. Food Agric.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.8974>
- Overton, E., 1901. Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeiner Pharmakologie. Gustav Fischer:Jena, Germany.
- Pardun, H., 1989. Pflanzenlecithine - wertvolle Hilfs- und Wirkstoffe? *Fett Wiss. Technol. Sci. Technol.* 91, 45-58. <https://doi.org/10.1002/lipi.19890910202>
- Parrinello, M., Rahman, A., 1981. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 52, 7182-7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>
- Parrinello, M., Rahman, A., 1980. Crystal structure and pair potentials: a molecular-dynamics study. *Phys. Rev. Lett.* 45, 1196-1199. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.45.1196>

- Pasini, F., Riciputi, Y., Verardo, V., Caboni, M.F., 2013. Phospholipids in cereals, nuts and some selected oilseeds, in: *Recent Research Developments in Lipids*.
- Paula, S., Volkov, A.G., Deamer, D.W., 1998. Permeation of halide anions through phospholipid bilayers occurs by the solubility-diffusion mechanism. *Biophys. J.* 74, 319 - 327. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77789-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77789-6)
- Paula, S., Volkov, A.G., Van Hoek, A.N., Haines, T.H., Deamer, D.W., 1996. Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophys. J.* 70, 339-348. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79575-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79575-9)
- Peleg, M., 1988. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *J. Food Sci.* 53, 1216-1217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb13565.x>
- Peterlin, P., Arrigler, V., Diamant, H., Haleva, E., 2012. Permeability of phospholipid membrane for small polar molecules determined from osmotic swelling of giant phospholipid vesicles, in: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Elsevier, p. 301 - 335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396534-9.00010-6>
- Porter, N.A., Wolf, R.A., Weenen, H., 1980. The free radical oxidation of polyunsaturated lecithins. *Lipids* 15, 163 - 167. <https://doi.org/10.1007/BF02540963>
- Prajapati, V.D., Jani, G.K., Moradiya, N.G., Randeria, N.P., 2013. Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydr. Polym.* 92, 1685 - 1699. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.021>
- Prior, E.M., Vadke, V.S., Sosulski, F.W., 1991. Effect of heat treatments on canola press oils. I. Non- triglyceride components. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 401 - 406. <https://doi.org/10.1007/BF02663756>
- Przybyło, M., Drabik, D., Łukawski, M., Langner, M., 2014. Effect of monovalent anions on water transmembrane transport. *J. Phys. Chem. B* 118, 11470 - 11479. <https://doi.org/10.1021/jp505687d>
- Przybylski, R., Eskin, N.A.M., 1991. Phospholipid composition of canola oils during the early stages of processing as measured by TLC with flame ionization detector. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 241-245. <https://doi.org/10.1007/BF02657617>
- Qi, G., Li, N., Sun, X.S., Shi, Y., Wang, D., 2016. Effects of glycerol and nanoclay on physiochemical properties of camelina gum-based films. *Carbohydr. Polym.* 152, 747-754. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.068>
- Qi, P.X., Chau, H.K., Fishman, M.L., Wickham, E.D., Hotchkiss, A.T., 2014. Investigation of molecular interactions between β -lactoglobulin and sugar beet pectin by multi-detection HPSEC. *Carbohydr. Polym.* 107, 198-208. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.080>
- Qian, K.Y., Cui, S.W., Wu, Y., Goff, H.D., 2012. Flaxseed gum from flaxseed hulls: Extraction, fractionation, and characterization. *Food Hydrocoll.* 28, 275 - 283. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.019>
- Qiao, B., Olvera de la Cruz, M., 2013. Driving force for water permeation across lipid membranes. *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 3233-3237. <https://doi.org/10.1021/jz401730s>
- Rabinovich, A.L., Balabaev, N.K., Alinchenko, M.G., Voloshin, V.P., Medvedev, N.N., Jedlovsky, P., 2005. Computer simulation study of intermolecular voids in unsaturated phosphatidylcholine lipid bilayers. *J. Chem. Phys.* 122, 084906. <https://doi.org/10.1063/1.1850903>
- Ralet, M.-C., Crépeau, M.-J., Vigouroux, J., Tran, J., Berger, A., Sallé, C., Granier, F., Botran, L., North, H.M., 2016. Xylans provide the structural driving force for mucilage adhesion to the arabidopsis seed coat. *Plant Physiol.* 171, 165 - 178. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00211>

- Redmond, R.W., Gamlin, J.N., 1999. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* 70, 391-475. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb08240.x>
- Reis, A., Spickett, C.M., 2012. Chemistry of phospholipid oxidation. *Oxidized Phospholipids - Their Prop. Interact. Proteins* 1818, 2374 - 2387. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.02.002>
- Riske, K.A., Sudbrack, T.P., Archilha, N.L., Uchoa, A.F., Schroder, A.P., Marques, C.M., Baptista, M.S., Itri, R., 2009. Giant vesicles under oxidative stress induced by a membrane-anchored photosensitizer. *Biophys. J.* 97, 1362 - 1370. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.023>
- Rosignol, M., Uso, T., Thomas, P., 1985. Relationship between fluidity and ionic permeability of bilayers from natural mixtures of phospholipids. *J. Membr. Biol.* 87, 269 - 275. <https://doi.org/10.1007/BF01871227>
- Ruiz-Lopez, N., Haslam, R.P., Napier, J.A., Sayanova, O., 2014. Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. *Plant J.* 77, 198-208. <https://doi.org/10.1111/tpj.12378>
- Ruiz-Lopez, N., Sayanova, O., Napier, J.A., Haslam, R.P., 2012. Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. *J. Exp. Bot.* 63, 2397-2410. <https://doi.org/10.1093/jxb/err454>
- Runas, K.A., Malmstadt, N., 2015. Low levels of lipid oxidation radically increase the passive permeability of lipid bilayers. *Soft Matter* 11, 499 - 505. <https://doi.org/10.1039/C4SM01478B>
- Sanchez, Y.M., 2014. Characterization and rheological properties of *camelina sativa* gum: interactions with xanthan gum, guar gum, and locust bean gum. KANSAS STATE UNIVERSITY.
- Sarv, V., 2017. A comparative study of camelina, canola and hemp seed processing and products. Toronto.
- Sarv, V., Trass, O., Diosady, L.L., 2017. Preparation and characterization of *camelina sativa* protein isolates and mucilage. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 94, 1279 - 1285. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3031-x>
- Sheldon, R.A., 2014. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chem* 16, 950-963. <https://doi.org/10.1039/C3GC41935E>
- Shvedova, A.A., Tyurina, Y.Y., Tyurina, V.A., Kikuchi, Y., Kagan, V.E., Quinn, P.J., 2001. Quantitative analysis of phospholipid peroxidation and antioxidant protection in live human epidermal keratinocytes. *Biosci. Rep.* 21, 33 - 43. <https://doi.org/10.1023/A:1010430000701>
- Siani, P., de Souza, R.M., Dias, L.G., Itri, R., Khandelia, H., 2016. An overview of molecular dynamics simulations of oxidized lipid systems, with a comparison of ELBA and MARTINI force fields for coarse grained lipid simulations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1858, 2498-2511. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.031>
- Silversand, C., Haux, C., 1997. Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 703, 7-14.
- Simpson, T.D., Nakamura, L.K., 1989. Phospholipid degradation in membranes of isolated soybean lipid bodies. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66, 1093 - 1096. <https://doi.org/10.1007/BF02670091>
- Singer, F.A.W., Taha, F.S., Mohamed, S.S., Gibriel, A., Nawawy, M.E., 2011. Preparation of mucilage/protein products from flaxseed. *Am. J. Food Technol.* 6, 260 - 278. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.260.278>

- Singer, M., 1981. Permeability of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 28, 253-267. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(81\)90012-8](https://doi.org/10.1016/0009-3084(81)90012-8)
- Singleton, J.A., Pattee, H.E., 1981. Computation of conversion factors to determine the phospholipid content in peanut oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58, 873 - 875. <https://doi.org/10.1007/BF02672961>
- Singleton, J.A., Stikeleather, L.F., 1995. High-performance liquid chromatography analysis of peanut phospholipids. II. Effect of postharvest stress on phospholipid composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 485-488. <https://doi.org/10.1007/BF02636095>
- Snyder, H.E., 2004. A better way to extract soybeans. *inform* 15, 575-576.
- Spiller, W., Kliesch, H., Wöhrle, D., Hackbarth, S., RöDer, B., Schnurpfeil, G., 1998. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. *J. Porphyr. Phthalocyanines JPP* 02, 145 - 158. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1409\(199803/04\)2:2<145::AID-JPP60>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1409(199803/04)2:2<145::AID-JPP60>3.0.CO;2-2)
- Sriperm, N., Pesti, G.M., Tillman, P.B., 2011. Evaluation of the fixed nitrogen-to-protein (N:P) conversion factor (6.25) versus ingredient specific N:P conversion factors in feedstuffs. *J. Sci. Food Agric.* 91, 1182-1186. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4292>
- Stein, W.D., 1986. Simple Diffusion across the Membrane Bilayer, in: *Transport and Diffusion Across Cell Membranes*. Elsevier, p. 69-112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-664660-3.50007-7>
- Stewart, J.J.P., 2016. MOPAC2016. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA.
- Stillwell, W., 2016a. Membrane polar lipids, in: *An Introduction to Biological Membranes*. Elsevier, p. 63-87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63772-7.00005-1>
- Stillwell, W., 2016b. Bioactive Lipids, in: *An Introduction to Biological Membranes*. Elsevier, p. 453-478. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63772-7.00020-8>
- Subczynski, W.K., Hyde, J.S., Kusumi, A., 1989. Oxygen permeability of phosphatidylcholine-cholesterol membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 4474 - 4478. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.12.4474>
- Sugii, T., Takagi, S., Matsumoto, Y., 2005. A molecular-dynamics study of lipid bilayers: Effects of the hydrocarbon chain length on permeability. *J. Chem. Phys.* 123, 184714. <https://doi.org/10.1063/1.2102900>
- Sunder, K.S., 2008. Process for the extraction of high grade soy lecithin in powder and liquid form. 203177.
- Szuhaj, B.F. (Éd.), 1989. Lecithins: sources, manufacture & uses, AOCs monograph. American Oil Chemists' Society, Champaign, Ill.
- Szydlowskaczerniak, A., 2007. MIR spectroscopy and partial least-squares regression for determination of phospholipids in rapeseed oils at various stages of technological process. *Food Chem.* 105, 1179-1187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.038>
- Tafulo, P.A.R., Queirós, R.B., González-Aguilar, G., 2009. On the “concentration-driven” methylene blue dimerization. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 73, 295-300. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.02.033>
- Tanfani, F., Ambrosini, A., Bertoli, E., 1990. Differential scanning calorimetry characterization of oxidized egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 1268 -1273. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)91165-O](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)91165-O)
- Tanfani, F., Bertoli, E., 1989. Permeability of oxidized phosphatidylcholine liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 241-246. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92127-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92127-X)
- Tanfani, F., Curatola, G., Bertoli, E., 1989. Steady-state fluorescence anisotropy and multifrequency phase fluorometry on oxidized phosphatidylcholine vesicles. *Chem. Phys. Lipids* 50, 1-9. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(89\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0009-3084(89)90021-2)

- Tanielian, C., Golder, L., Wolff, C., 1984. Production and quenching of singlet oxygen by the sensitizer in dye-sensitized photo-oxygenations. *J. Photochem.* 25, 117 - 125. [https://doi.org/10.1016/0047-2670\(84\)87016-1](https://doi.org/10.1016/0047-2670(84)87016-1)
- Tanielian, C., Mechin, R., Shakirullah, M., 1992. Origin of dye bleaching and polymer degradation in the methylene blue-sensitized photo-oxygenation of polybutadiene. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 64, 191 - 199. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(92\)85106-5](https://doi.org/10.1016/1010-6030(92)85106-5)
- Tanielian, C., Wolff, C., 1984. Efficiency of singlet oxygen production from the O₂ quenching of the excited singlet and triplet states of rubrene, in: Bors, W., Saran, M., Tait, D. (Ed.), *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*. DE GRUYTER, Berlin, New York. <https://doi.org/10.1515/9783110866537.517>
- Taylor, W., F.L.S., M.S.A., M.B.S., 1847. On the Cultivation of the « Gold of Pleasure ». *Farmers Mag.* 470-471.
- Teneva, O.T., Zlatanov, M.D., Antova, G.A., Angelova-Romova, M.Y., Marcheva, M.P., 2014. Lipid composition of flaxseeds. *Bulg. Chem. Commun.* 46, 465 - 472.
- Tepper, H.L., Voth, G.A., 2006. Mechanisms of Passive Ion Permeation through Lipid Bilayers: Insights from Simulations. *J. Phys. Chem. B* 110, 21327 - 21337. <https://doi.org/10.1021/jp064192h>
- Terao, J., Hirota, Y., Kawakatsu, M., Matsushita, S., 1981. Structural analysis of hydroperoxides formed by oxidation of phosphatidylcholine with singlet oxygen. *Lipids* 16, 427 - 432. <https://doi.org/10.1007/BF02535010>
- Terashima, M., Hibi, K., Katoh, S., 1999. Permeability of small hydrophilic solutes in small unilamellar vesicle (SUV). *Biochem. Eng. J.* 4, 77 - 79. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00025-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00025-X)
- Theisen, A., 2000. *Refractive increment data-book for polymer and biomolecular scientists*. Nottingham University Press, Nottingham.
- Tieleman, D.P., Marrink, S.-J., 2006. Lipids out of equilibrium: energetics of desorption and pore mediated flip-flop. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 12462 - 12467. <https://doi.org/10.1021/ja0624321>
- Timilsena, Y.P., Adhikari, R., Barrow, C.J., Adhikari, B., 2016a. Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chem.* 212, 648 - 656. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.017>
- Timilsena, Y.P., Adhikari, R., Kasapis, S., Adhikari, B., 2016b. Molecular and functional characteristics of purified gum from Australian chia seeds. *Carbohydr. Polym.* 136, 128 - 136. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.035>
- Timilsena, Y.P., Adhikari, R., Kasapis, S., Adhikari, B., 2015. Rheological and microstructural properties of the chia seed polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 991 - 999. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.040>
- Toyosaki, T., 1996. Mechanism of methylene blue bleaching by lipoxygenase. *J. Sci. Food Agric.* 70, 75 - 78. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199601\)70:1<75::AID-JSFA467>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199601)70:1<75::AID-JSFA467>3.0.CO;2-A)
- Träuble, H., 1971. The movement of molecules across lipid membranes: A molecular theory. *J. Membr. Biol.* 4, 193 - 208. <https://doi.org/10.1007/BF02431971>
- Tumolo, T., Angnes, L., Baptista, M.S., 2004. Determination of the refractive index increment (dn/dc) of molecule and macromolecule solutions by surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* 333, 273 - 279. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.010>
- Tzen, J.T.C., Cao, Y., Laurent, P., Ratnayake, C., Huang, A.H.C., 1993a. Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiol.* 101, 267 - 276.

- Tzen, Jtc., Cao, Yz., Laurent, P., Ratnayake, C., Huang, Ahc., 1993b. Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species. *Plant Physiol.* 101, 267 - 276. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.267>
- Uphoff, A., Hermansson, M., Haimi, P., Somerharju, P., 2008. Analysis of complex lipidomes, in: *Medical Applications of Mass Spectrometry*. Elsevier, p. 223 - 249. <https://doi.org/10.1016/B978-044451980-1.50013-6>
- USDA Economic Research Service, 2018. *Oil Crops Yearbook*.
- Usui, Y., Kamogawa, K., 1974. A Standard system to determine the quantum yield of singlet oxygen formation in aqueous solution. *Photochem. Photobiol.* 19, 245 - 247. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1974.tb06506.x>
- van den Hoogen, B.M., van Weeren, P.R., Lopes-Cardozo, M., van Golde, L.M.G., Barneveld, A., van de Lest, C.H.A., 1998. A microtiter plate assay for the determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 257, 107-111. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2538>
- van der Paal, J., Neyts, E.C., Verlackt, C.C.W., Bogaerts, A., 2016. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. *Chem Sci* 7, 489-498. <https://doi.org/10.1039/C5SC02311D>
- van Nieuwenhuyzen, W., Tomás, M.C., 2008. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 472 - 486. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800041>
- Vance, D.E., 1996. Glycerolipid biosynthesis in eukaryotes, in: *New Comprehensive Biochemistry*. Elsevier, p. 153-181. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60513-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60513-X)
- Vaughn, S.F., Kenar, J.A., Felker, F.C., Berhow, M.A., Cermak, S.C., Evangelista, R.L., Fanta, G.F., Behle, R.W., Lee, E., 2013. Evaluation of alternatives to guar gum as tackifiers for hydromulch and as clumping agents for biodegradable cat litter. *Ind. Crops Prod.* 43, 798-801. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.002>
- Vijayalakshmi, B., Rao, S.V., 1972. Fatty acid composition of phospholipids in seed oils containing unusual acids. *Chem. Phys. Lipids* 9, 82 - 86. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(72\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0009-3084(72)90035-7)
- Vioque, E., Maza, M.P., 1973. Estudio de los fosfolípidos de la almendra de aceituna. *Grases Aceites* 24, 323-326.
- Vladimirov, Yu.A., Olenev, V.I., Suslova, T.B., Cheremisina, Z.P., 1980. Lipid Peroxidation in Mitochondrial Membrane, in: Rodolfo Paoletti and David Kritchevsky (Éd.), *Advances in Lipid Research*. Elsevier, p. 173-249.
- Voiniciuc, C., Guenl, M., Schmidt, M.H.-W., Usadel, B., 2015a. Highly branched xylan made by IRX14 and MUCI21 links mucilage to arabidopsis seeds. *Plant Physiol.* pp.01441.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01441>
- Voiniciuc, C., Yang, B., Schmidt, M., Günl, M., Usadel, B., 2015b. Starting to gel: how arabidopsis seed coat epidermal cells produce specialized secondary cell walls. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 3452-3473. <https://doi.org/10.3390/ijms16023452>
- Volinsky, R., Cwiklik, L., Jurkiewicz, P., Hof, M., Jungwirth, P., Kinnunen, P.K.J., 2011. Oxidized phosphatidylcholines facilitate phospholipid flip-flop in liposomes. *Biophys. J.* 101, 1376-1384. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.07.051>
- Volkov, A.G., Paula, S., Deamer, D.W., 1997. Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42, 153-160. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(96\)05097-0](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(96)05097-0)
- Von Der Haar, D., Müller, K., Bader-Mittermaier, S., Eisner, P., 2014. Rapeseed proteins – Production methods and possible application ranges. *OCL* 21, D104. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013038>

- Vorobyov, I., Olson, T.E., Kim, J.H., Koeppe, R.E., Andersen, O.S., Allen, T.W., 2014. Ion-induced defect permeation of lipid membranes. *Biophys. J.* 106, 586 - 597. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.027>
- Wagner, H., Wolff, P., 1964. Isolierung und analytik pflanzlicher phosphatide und sphingolipide. *Fette Seifen Anstrichm.* 66, 425-429. <https://doi.org/10.1002/lipi.19640660601>
- Walker, J.M., 1994. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation, in: *Basic Protein and Peptide Protocols*. Humana Press, New Jersey, p. 5 - 8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:5>
- Walker, M., Tehseen, M., Doblin, M.S., Pettolino, F.A., Wilson, S.M., Bacic, A., Golz, J.F., 2011. The transcriptional regulator LEUNIG_HOMOLOG regulates mucilage release from the arabidopsis testa. *PLANT Physiol.* 156, 46-60. <https://doi.org/10.1104/pp.111.172692>
- Walter, A., Gutknecht, J., 1986. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 90, 207-217. <https://doi.org/10.1007/BF01870127>
- Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F., 1997. Removal of flaxseed mucilage by chemical and enzymatic treatments. *Food Chem.* 59, 47 - 55. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00093-3)
- Wang, J.-Y., Shibata, T., Ueki, T., Miyazawa, T., 1995. Susceptibility for hydroperoxide formation of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in liposomes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 41, 273-280. <https://doi.org/10.3177/jnsv.41.273>
- Wang, S., He, L., Guo, J., Zhao, J., Tang, H., 2015. Intrinsic viscosity and rheological properties of natural and substituted guar gums in seawater. *Int. J. Biol. Macromol.* 76, 262-268. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.002>
- Warrand, J., Michaud, P., Picton, L., Muller, G., Courtois, B., Ralainirina, R., Courtois, J., 2005. Structural investigations of the neutral polysaccharide of *Linum usitatissimum* L. seeds mucilage. *Int. J. Biol. Macromol.* 35, 121 - 125. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.12.006>
- Warrand, J., Michaud, P., Picton, L., Muller, G., Courtois, B., Ralainirina, R., Courtois, J., 2003. Large-scale purification of water-soluble polysaccharides from flaxseed mucilage, and isolation of a new anionic polymer. *Chromatographia* 58, 331 - 335. <https://doi.org/10.1365/s10337-003-0060-4>
- Weihrauch, J.L., Son, Y.-S., 1983. Phospholipid content of foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 1971 - 1978. <https://doi.org/10.1007/BF02669968>
- Western, T.L., Skinner, D.J., Haughn, G.W., 2000. Differentiation of mucilage secretory cells of the arabidopsis seed coat. *Plant Physiol.* 122, 345 - 356. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.345>
- Wilson, M.A., Pohorille, A., 1996. Mechanism of unassisted ion transport across membrane bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6580-6587. <https://doi.org/10.1021/ja9540381>
- Wong-ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Peter Tieleman, D., Monticelli, L., 2007. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* 93, 4225-4236. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112565>
- Woods, D.L., Downey, R.K., 1980. Mucilage from yellow mustard. *Can. J. Plant Sci.* 60, 1031-1033. <https://doi.org/10.4141/cjps80-146>
- Wratten, M.L., Van Ginkel, G., Van't Veld, A.A., Bekker, A., Van Faassen, E.E., Sevanian, A., 1992. Structural and dynamic effects of oxidatively modified phospholipids in unsaturated lipid membranes. *Biochemistry* 31, 10901-10907. <https://doi.org/10.1021/bi00159a034>
- Wu, D.-T., Lam, S.-C., Cheong, K.-L., Wei, F., Lin, P.-C., Long, Z.-R., Lv, X.-J., Zhao, J., Ma, S.-C., Li, S.-P., 2016a. Simultaneous determination of molecular weights and contents of water-soluble polysaccharides and their fractions from *Lycium barbarum* collected in China. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129, 210-218. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.005>

- Wu, E.L., Cheng, X., Jo, S., Rui, H., Song, K.C., Dávila-Contreras, E.M., Qi, Y., Lee, J., Monje-Galvan, V., Venable, R.M., Klauda, J.B., Im, W., 2014. CHARMM-GUI *Membrane Builder* toward realistic biological membrane simulations. *J. Comput. Chem.* 35, 1997-2004. <https://doi.org/10.1002/jcc.23702>
- Wu, M., Li, D., Wang, L., Zhou, Y., Mao, Z., 2010. Rheological property of extruded and enzyme treated flaxseed mucilage. *Carbohydr. Polym.* 80, 460 - 466. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.003>
- Wu, Y., Cui, W., Eskin, N.A.M., Goff, H.D., 2009. Fractionation and partial characterization of non-pectic polysaccharides from yellow mustard mucilage. *Food Hydrocoll.* 23, 1535 - 1541. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.10.010>
- Wu, Y., Hui, D., Eskin, N.A.M., Cui, S.W., 2016b. Water-soluble yellow mustard mucilage: A novel ingredient with potent antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 91, 710-715. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.088>
- Wu, Y., Wang, T., 2003. Phospholipid class and FA compositions of modified soybeans processed with two extraction methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80, 127 - 132. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0664-6>
- Wüstenberg, T. (Éd.), 2014. General overview of food hydrocolloids, in: *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, p. 1-68. <https://doi.org/10.1002/9783527682935.ch01>
- Xiang, T.-X., Anderson, B.D., 1998. Influence of chain ordering on the selectivity of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes for permeant size and shape. *Biophys. J.* 75, 2658-2671. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77711-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77711-2)
- Xiang, T.X., Anderson, B.D., 1997. Permeability of acetic acid across gel and liquid-crystalline lipid bilayers conforms to free-surface-area theory. *Biophys. J.* 72, 223 - 237. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78661-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78661-2)
- Xing, X., Hsieh, Y.S.Y., Yap, K., Ang, M.E., Lahnstein, J., Tucker, M.R., Burton, R.A., Bulone, V., 2017. Isolation and structural elucidation by 2D NMR of planteose, a major oligosaccharide in the mucilage of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Carbohydr. Polym.* 175, 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.059>
- Yazu, K., Ukegawa, K., Yamamoto, Y., Niki, Etsuo., 1994. Effects of the nitrogen moieties of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine on the autoxidation of these phospholipids in aqueous dispersions. *Yukagaku* 43, 350-6.
- Yeagle, P.L., 2016. Lipid-protein interactions in membranes, in: *The Membranes of Cells*. Elsevier, p. 291-334. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800047-2.00012-7>
- Yoshida, H., Abe, S., Hirakawa, Y., Takagi, S., 2001a. Roasting effects on fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in sesame (*Sesamum indicum*) seeds. *J. Sci. Food Agric.* 81, 620-626. <https://doi.org/10.1002/jsfa.857>
- Yoshida, H., Hirakawa, Y., Abe, S., 2001b. Influence of microwave roasting on positional distribution of fatty acids of triacylglycerols and phospholipids in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103, 201 - 207. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200104\)103:4<201::AID-EJLT201>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200104)103:4<201::AID-EJLT201>3.0.CO;2-6)
- Yoshida, H., Hirakawa, Y., Tomiyama, Y., Nagamizu, T., Mizushima, Y., 2005. Fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in peanut seeds (*Arachis hypogaea* L.) following microwave treatment. *J. Food Compos. Anal.* 18, 3 - 14. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.12.004>
- Yoshida, H., Takagi, S., Kajimoto, G., Yamaguchi, M., 1997. Microwave roasting and phospholipids in soybeans (*Glycine max.* L.) at different moisture contents. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 117-124. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0155-4>

- Yust, M.M., Pedroche, J., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J., 2003. Improvement of protein extraction from sunflower meal by hydrolysis with alcalase. *Grasas Aceites* 54, 419-423. <https://doi.org/10.3989/gya.2003.v54.i4.230>
- Yusupov, M., Wende, K., Kupsch, S., Neyts, E.C., Reuter, S., Bogaerts, A., 2017. Effect of head group and lipid tail oxidation in the cell membrane revealed through integrated simulations and experiments. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06412-8>
- Zhao, H., Brown, P.H., Schuck, P., 2011. On the distribution of protein refractive index increments. *Biophys. J.* 100, 2309-2317. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.004>
- Zhao, X., Qiao, L., Wu, A.-M., 2017. Effective extraction of Arabidopsis adherent seed mucilage by ultrasonic treatment. *Sci. Rep.* 7, 40672.
- Zhao, Z., Malinowski, E.R., 1999. Determination of the hydration of methylene blue aggregates and their dissociation constants using visible spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 53, 1567-1574. <https://doi.org/10.1366/0003702991946028>
- Zubr, J., 2010. Carbohydrates, vitamins and minerals of *Camelina sativa* seed. *Nutr. Food Sci.* 40, 523-531. <https://doi.org/10.1108/00346651011077036>
- Zubr, J., 1997. Oil-seed crop: *Camelina sativa*. *Ind. Crops Prod.* 6, 113-119.

Liste des figures

Figure 1-1. Image du développement du mucilage des graines	10
Figure 1-2. Image du mucilage d' <i>arabidopsis thaliana</i>	10
Figure 1-3. Structure et développement de la coque d' <i>arabidopsis thaliana</i>	11
Figure 1-4. Mucilage de lin révélé au rouge de ruthénium	13
Figure 1-5. Schéma illustrant la formation et l'implosion d'une bulle de cavitation.....	15
Figure 1-6. Représentation d'une bicouche avec acide phosphatidique	22
Figure 1-7. Structure d'une membrane cellulaire.....	27
Figure 1-8. Illustration de graines d' <i>arabidopsis</i>	27
Figure 1-9. Illustration d'un oléosome avec la monocouche de phospholipides	28
Figure 1-10. Représentation de la production mondiale (en millions de tonnes) de différentes huiles végétales	28
Figure 1-11. Processus d'oxydation de la chaîne grasse d'un phospholipide (LH).	39
Figure 1-12. Représentation d'états excités du dioxygène.....	41
Figure 1-13. Représentation de la photosensibilisation avec le bleu de méthylène.....	43
Figure 1-14. Mécanismes réactionnels simplifiés de la réaction entre l'acide linoléique et l'oxygène singulet	44
Figure 1-15. Mouvement d'une molécule d'eau le long d'une couche de phospholipides selon le déplacement d'irrégularités	50
Figure 1-16. Illustration montrant l'aire par lipide A et l'aire de surface libre (A-A ₀).....	53
Figure 1-17. Mécanismes de perméation des ions au travers de membranes lipidiques.....	55
Figure 1-18. Représentation de l'augmentation de l'aire par lipide suite à la formation d'un hydroperoxyde.....	57
Figure 1-19. Deux molécules issues de la scission oxydative de phospholipides.....	58
Figure 2-1. Module utilisé pour l'agitation des graines dans la canalisation à ultrasons.....	72
Figure 2-2. Montage de la colonne à ultrasons en mode batch avec la circulation du liquide au sein des différents instruments de mesure.....	73
Figure 2-3. Système de filtration du mucilage	74
Figure 2-4. Exemple de chromatogramme d'un mucilage de caméline.....	76
Figure 2-5. Courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination de la teneur protéique en équiv. BSA selon Lowry	77

Figure 2-6. Droite d'étalonnage obtenue lors de la détermination de la teneur en sucres de coques et broyats de caméline	79
Figure 2-7. Droite d'étalonnage obtenue lors de la détermination de la teneur en sucres d'échantillons de mucilage lyophilisé.	79
Figure 2-8. Courbe de calibration utilisée pour le dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz en microplaque.....	80
Figure 2-9. Schéma simplifié du parcours lumineux au sein d'un spectrophotomètre à deux cuves et deux lampes.....	84
Figure 2-10. Illustration du potentiel Zêta	87
Figure 2-11. Illustration de la vis de compression et du cylindre d'extraction avec la zone de libération d'huile.	90
Figure 2-12. Extrait d'un fichier .cgc définissant un fragment ou grain de la modélisation gros grains	92
Figure 2-13. Fichier topologique définissant les polarités et les liaisons des différents grains de la molécule.	93
Figure 2-14. Code utilisé pour ajouter des molécules de KCl à une concentration de 0,1M au système	93
Figure 3-1. Evolution de la masse d'un ensemble de graines selon le nombre d'individus	99
Figure 3-2. Photographies de l'empilement de graines de caméline dans l'éthanol et dans l'eau	100
Figure 3-3. Vue d'une coupe de la coque et de la surface de l'endosperme	101
Figure 3-4. Image de cellules de l'endosperme à plusieurs grossissements	101
Figure 3-5. Représentation de plusieurs couches de la graine avec le temps mis par l'eau pour accéder à chacune des zones.	103
Figure 3-6. Schémas des systèmes d'extraction du mucilage avec une canalisation à ultrasons.	106
Figure 3-7. Evolution du couple et de la température au cours du temps lors de la démulcination de graines de caméline pendant 80 minutes avec début du traitement ultrasonore à partir de 55 minutes.	108
Figure 3-8. Evolution du couple et de la température au cours du temps lors de la démulcination de graines de caméline avec début des ultrasons à 55 minutes, arrêt à 75 minutes avec ajout de pectinase, reprise à 105 minutes et arrêt à 115 minutes.	108

Figure 3-9. Evolution du couple et de la température au cours du temps lors de la démucilagination de graines de caméline avec mise en route des ultrasons dès le début du traitement.....	109
Figure 3-10. Evolution de l'indice de réfraction et du taux de matière sèche selon le temps de traitement.....	111
Figure 3-11. Variation de l'indice de réfraction en fonction du taux de matière sèche.	111
Figure 3-12. Evolution du pH avec le temps lors de la démucilagination de graines de caméline	113
Figure 3-13. Mesure de la conductivité du milieu au cours de l'extraction du mucilage de graines de Caméline	117
Figure 3-14. Représentation possible du gradient de vitesse de l'écoulement laminaire dans a : un tuyau de diamètre légèrement supérieur à la taille d'une graine b : un tuyau d'un diamètre largement supérieur à la taille d'une graine	118
Figure 3-15. Comparaison des matières sèches des extraits aqueux selon le système d'analyse utilisé lors du procédé	119
Figure 3-16. Evolution de la température du milieu avec le temps d'extraction	121
Figure 3-17. Rendements d'extraction des différentes expériences effectuées.....	122
Figure 3-18. Evolution du rendement d'extraction selon le temps d'extraction	122
Figure 3-19. Courbe d'isoréponse du rendement d'extraction du mucilage selon le temps d'extraction et l'amplitude des ultrasons.	123
Figure 3-20. Comparaison des teneurs en protéines telles qu'estimées par un dosage des protéines selon la méthode de Lowry.....	124
Figure 3-21. Courbe d'isoréponse de la teneur en protéines équivalent BSA selon le temps d'extraction et l'amplitude des ultrasons.	125
Figure 3-22. Courbes d'écoulement des différents mucilages à une concentration de 0,1% ..	126
Figure 3-23. Courbe d'isoréponse de la viscosité mesurée à un gradient de cisaillement de $50s^{-1}$ selon l'amplitude des ultrasons et le temps d'extraction.	127
Figure 3-24. Courbe d'isoréponse du facteur de perte du mucilage entre 0,01 et 1Hz pour une déformation de 0,5% selon le temps d'extraction et l'amplitude ultrasonore.....	128
Figure 3-25. Représentation de l'écoulement du milieu d'extraction (graines + fluide rhéofluidifiant) en mode de recirculation.....	129
Figure 3-26. Comparaison des distributions en monosaccharides des polysaccharides de différents mucilages.	133

Figure 3-27. Composition en acides aminés des protéines de mucilages extraits selon plusieurs expériences classées selon la teneur en acide glutamique (Glu).* : essai effectué avec les ultrasons (A=40%, p=4, t=30') avec une agitation manuelle.	134
Figure 3-28. Evolution de la teneur relative en acide glutamique selon le temps de traitement. Le temps effectif d'action des ultrasons et leur amplitude sont précisés.	135
Figure 3-29. Comparaison des teneurs en protéines déterminées par dosage de l'azote selon Kjeldahl, par la méthode de Lowry et par HPIC.	136
Figure 3-30. Taux de cendres de différents mucilages obtenus.	137
Figure 3-31. Evolution du rendement d'extraction des cendres en fonction du temps.	138
Figure 4-1. Zones de transparence de plusieurs solvants usuels.	144
Figure 4-2. Spectre infrarouge d'une huile de colza avec différents ajouts de lécithine de soja.	149
Figure 4-3. Spectre UV/Visible (de 495 à 795nm) d'une huile de colza à différentes concentrations de lécithine de soja, en présence de bleu de méthylène et après dilution 1/10 dans le cyclohexane.	151
Figure 4-4. Evolution de l'absorbance à 635 et 597nm d'une huile diluée dans le cyclohexane en fonction de la quantité de phospholipides.	152
Figure 4-5. Evolution du spectre UV/Visible d'une huile additivée de phospholipides.	152
Figure 4-6. Evolution de l'absorbance du bleu de méthylène (664 nm) dans une huile de colza selon la concentration en phospholipides.	153
Figure 4-7. Représentation des absorbances maximales moyennes mesurées selon les composés analysés.	154
Figure 4-8. Représentation des carbones « primaires » et « tertiaires » dans DLPC.	156
Figure 4-9. Spectre RMN ¹ H de la lécithine de soja commerciale VWR.	158
Figure 4-10. Spectres d'absorbance dans le visible des huiles extraites à partir de graines à 8% d'humidité (8% H).	168
Figure 4-11. Spectres d'absorbance dans le visible des huiles extraites à partir de graines à 4% d'humidité.	168
Figure 4-12. Spectres d'absorbance dans le visible des huiles extraites à partir de graines à 15% d'humidité.	169
Figure 4-13. Evolution de la solubilité de la carboxyhémoglobine de cheval selon la concentration de plusieurs sels.	171
Figure 4-14. Rendement d'extraction de matière sèche/lipidique selon les solvants utilisés.	175

Figure 4-15. Comparaison des rendements d'extraction des phospholipides du tourteau de caméline démulcinée selon les différents essais.....	177
Figure 5-1. Superposition des spectres RMN de l'acide oléique (bleu) et de l'acide oléique oxydé (rouge) par photosensibilisation.	187
Figure 5-2. Diagramme 2D en cosy ^1H - ^1H d'un acide oléique hydroperoxydé.....	188
Figure 5-3. Analyse en ^1H RMN d'un acide linoléique hydroperoxydé.....	190
Figure 5-4. Analyses en COSY ^1H - ^1H d'un acide linoléique hydroperoxydé.....	191
Figure 5-5. Spectre ^1H RMN correspondant au DLPC oxydé.	193
Figure 5-6. Courbes d'isoréponse du rendement (a) et du coefficient d'extinction à 233nm (b)	201
Figure 5-7. Atténuation de la lumière ($\lambda=654\text{nm}$) selon le trajet optique en fonction de la concentration en bleu de méthylène.	202
Figure 5-8. Courbe d'isoréponse du ratio des coefficients d'extinction $\epsilon_{233\text{nm}}/270\text{nm}$	203
Figure 5-9. Image en CRYO-MEB d'une solution de vésicules de phosphatidylcholine de soja dispersées dans l'eau par ultrasonication.	204
Figure 5-10. Courbe d'isoréponse de la taille moyenne en intensité (nm) des vésicules formées à partir des phospholipides oxydés au cours des différentes expériences du plan.	206
Figure 5-11. Courbe d'isoréponse du potentiel zêta des vésicules formées à partir des phospholipides oxydés au cours des différentes expériences du plan.....	207
Figure 5-12. Comparaison des régressions exponentielles ($\text{Abs}=\Delta\text{Abs}.\text{Exp}(-k.t)+\text{Abs}_{\text{equ}}$) de l'évolution de l'absorbance de solutions de KCl 2M après l'ajout de solutions hypotoniques (0,1M de KCl) de vésicules de DLiPC ou de lécithine de soja.....	210
Figure 5-13. Courbe d'isoréponse de l'absorbance à finale (ou à l'équilibre) des vésicules..	212
Figure 5-14. Taille moyenne volumique (D(4 :3) des gouttelettes de l'émulsion en fonction des essais.....	215
Figure 5-15. Approche qualitative de l'influence des différents facteurs sur la taille moyenne volumique D(4 :3) des gouttelettes de l'émulsion.	215
Figure 5-16. Comparaison des coefficients d'extinction massique à 233 et 270nm pour les différents essais	216
Figure 5-17. Influence des différents facteurs sur l'extinction à 233nm (a) et à 270 nm (b)..	217
Figure 5-18. Représentation 3D de DLPC	218
Figure 5-19. Orbitales HOMO et LUMO du bleu de méthylène selon une modélisation MM3+PM6/COSMO (éthanol).....	219

Figure 5-20. Représentation d'une bicouche de phospholipides.....	221
Figure 5-21. Evolution de l'aire par lipide totale et de l'épaisseur d'une bicouche de DLPC selon le taux d'incorporation de 9-DLPC-OOH.	223
Figure 5-22. Evolution de la distribution de l'épaisseur de la membrane (en Å) selon le taux d'incorporation de 9-DLPC-OOH.....	224
Figure 5-23. Comparaison des cartes d'épaisseur de la membrane entre 100% 9-DLPC-OOH et 100% 13-DLPC-OOH.....	225
Figure 5-24. Représentation des phases aqueuses d'une bicouche de phospholipides	225
Figure 5-25. Profil de densité d'eau au niveau de la membrane en fonction du taux d'incorporation de 9-DLPC-OOH.....	226
Figure 5-26. Représentation des grains de la molécule 9,9-DLPC-OOH avec leurs attributs selon MARTINI	227
Figure 5-27. Observation de vésicules phospholipidiques à différents temps de simulation .	227
Figure 5-28. Distance moyenne entre têtes hydrophiles au cours de la formation des vésicules	228
Figure 5-29 Nombre de molécules d'eau au sein de la vésicule selon le temps de simulation	229

Liste des tableaux

Tableau 1-1. Nombre de références concernant le mucilage de Lin, arabidopsis, moutarde et chia selon SCIFINDER, consulté en mars 2019.	9
Tableau 1-2. Quantité de mucilage et composition en protéines et minéraux de ce dernier dans diverses graines.	12
Tableau 1-3. Propriétés de mucilages et quelques épaississants/gélifiants utilisés comme additifs alimentaires..	18
Tableau 1-4. Composition des phospholipides de soja	29
Tableau 1-5. Composition en acides gras des phospholipides de soja.....	30
Tableau 1-6. Concentration en phospholipides de diverses graines, de l'huile extraite des graines et du tourteau	30
Tableau 1-7. Classes de phospholipides dans différentes graines.....	32
Tableau 1-8. Répartition des acides gras des phospholipides de plusieurs graines	33
Tableau 1-9. Teneur en phospholipides de plusieurs huiles de colza en fonction de leur traitement et de différentes références.	37
Tableau 1-10. Vitesse de disparition de l'oxygène singlet (K_d) dans plusieurs solvants.....	41
Tableau 1-11. Comparaison du rendement d'oxygène singlet entre plusieurs photosensibilisateurs	45
Tableau 1-12. Principaux produits d'oxydation du bleu de méthylène.....	46
Tableau 1-13. Perméabilité de l'eau mesurée pour plusieurs bicouches de phospholipides (..	48
Tableau 1-14. Perméabilité de divers solutés mesurée dans quelques bicouches lipidiques	48
Tableau 1-15. Différentes propriétés mesurées dans différentes études sur des phospholipides ou membranes oxydées	61
Tableau 1-16. Principales études de modélisation moléculaire sur des phospholipides oxydés	66
Tableau 2-1. Caractéristiques des calibrations effectuées sur différents monosaccharides (MonoS).	75
Tableau 2-2. Détail des éluants utilisés pour l'analyse chromatographique des phospholipides	83
Tableau 2-3. Gradient d'éluion au sein de la chromatographie HPLC/ELSD	83
Tableau 3-1. Conditions d'extraction du mucilage avec une colonne à ultrasons selon différents modes d'agitation.....	107
Tableau 3-2. Valeurs de dn/dc pour plusieurs composés dans l'eau.....	110

Tableau 3-3. pKa de quelques monosaccharides	114
Tableau 3-4. Valeurs des pKa et des pI des principaux acides aminés des protéines végétales	115
Tableau 3-5. Points isoélectriques de différentes protéines	115
Tableau 3-6. Mobilités ioniques de différentes espèces	116
Tableau 3-7. Différentes expériences de démulcination en mode de recirculation selon un plan de Doehlert	120
Tableau 3-8. Ratio Glucose/Arabinose et Glucose/Rhamnose pour plusieurs mucilages	133
Tableau 4-1. Principales longueurs d'onde caractéristiques de la phosphatidylcholine de soja.	145
Tableau 4-2. Rapport des coefficients d'extinction phospholipides/triglycérides à différentes longueurs d'onde	147
Tableau 4-3. Changements de couleur observés immédiatement après addition de différentes quantités de lécithine de soja dans 10mL d'huile de colza selon le volume de solution de bleu de méthylène introduit.	150
Tableau 4-4. Principaux acides gras constitutifs de la lécithine de soja tels que déterminés par RMN selon deux méthodes et par chromatographie en phase gazeuse (CG)	160
Tableau 4-5. Conditions de traitement ultrasonore utilisées pour extraire les phospholipides d'une huile de colza.....	161
Tableau 4-6. Bilan des essais de récupération des phospholipides	162
Tableau 4-7. Bilan des essais de récupération des phospholipides sans solvant.....	163
Tableau 4-8. Distribution des classes de phospholipides dans la graine de caméline.	163
Tableau 4-9. Teneur en phospholipides de diverses graines et distribution relative (% rel.) des classes.....	164
Tableau 4-10. Distribution des acides gras des lipides neutres et polaires de la graine de caméline	165
Tableau 4-11. Conditions d'extraction de l'huile en presse monovis sur des graines de Caméline.....	167
Tableau 4-12. Classes des phospholipides de l'huile de tourteaux de caméline.....	170
Tableau 4-13. Evaluation de la récupération des phospholipides selon l'absorbance du milieu en présence de bleu de méthylène.	173
Tableau 4-14. Détails des essais d'extraction des phospholipides avec utilisation de solvants	176

Tableau 4-15. Paramètres de solubilité de Hansen et log K_{ow} de différents solvants de polarité décroissante	178
Tableau 5-1. Attribution des pics en RMN du carbone et couplages selon la RMN HSQC $^{13}C-^1H$	194
Tableau 5-2. Rendements en hydroperoxydes des différents substrats.....	196
Tableau 5-3. Coefficients d'extinction de la lécithine de soja et de ses acides gras polyinsaturés majoritaires.....	196
Tableau 5-4. Description des différentes expériences de la matrice de Doehlert utilisée pour l'oxydation de lécithine de soja par photosensibilisation au bleu de méthylène.	198
Tableau 5-5. Valeurs des différentes réponses du plan d'expérience.	199
Tableau 5-6. Coefficients de corrélation entre les différentes variables	200
Tableau 5-7. Analyse granulométrique des émulsions des différents essais.....	214
Tableau 5-8. Energies de formation de différents hydroperoxydes selon une modélisation semi-empirique PM7-COSMO	220
Tableau 5-9. Caractéristiques d'une bicouche phospholipidique selon les calculs de dynamique moléculaire	222

ANNEXES

ANNEXE 1. Méthode HPIC	269
ANNEXE 2. Méthode de Lowry en microplaque.....	272
ANNEXE 3. Analyse des Acides Aminés	273
ANNEXE 4. Méthode de Dubois en microplaque.....	276
ANNEXE 5. Méthode de Blumenkrantz en microplaque.....	277
ANNEXE 6. Fichiers topologiques et de champ de force –Tout atome	279
ANNEXE 7. Etapes d'équilibration de la bicouche lipidique	282
ANNEXE 8. Etape de production de la bicouche lipidique.....	285
ANNEXE 9. Construction d'une bicouche lipidique avec Packmol	288
ANNEXE 10. Fichiers de configuration GROS-GRAINS	290
ANNEXE 11. Etape d'équilibration de la vésicule.....	293
ANNEXE 12. Etape de production de la vésicule	295
ANNEXE 13. Utilisation de l'outil Membplugin	298
ANNEXE 14. Calculs sur vésicules en Gros-Grains	300
ANNEXE 15. Analyse statistique “Plan d'expériences MUCILAGE“	305
ANNEXE 16. Ecoulement dans le système de recirculation	307
ANNEXE 17. Construction d'un modèle QSPR	308
ANNEXE 18. Comparaison des solvants deutérés en 1H RMN	309
ANNEXE 19. Analyse statistique “Plan d'expérience –phospholipides”	311
ANNEXE 20. Analyse granulométrique des vésicules.....	313
ANNEXE 21. Valorisation scientifique 2016-2019	314

ANNEXE 1. Méthode HPIC

Dosage des monosaccharides

Préparation des étalons

La gamme de solutions étalons est réalisée en fonction des monosaccharides susceptibles d'être présents dans le substrat. Une solution mère est préparée avec l'ensemble de ces monosaccharides dilués dans de l'eau ultra-pure (UHQ). Pour ceux dont les temps de rétention sont proches (ribose et fructose par exemple), des solutions avec un seul monosaccharide sont également préparées.

Tableau A 1. Monosaccharides calibrés pour l'analyse des mucilages

Monosaccharides	Gamme de concentrations mg/100mL
Glucose	0 – 100
Xylose	0 – 60
Mannose	0 – 10
Fucose	0 – 5
Rhamnose	0 – 50
Galactose	0 – 50
Arabinose	0 – 100
Fructose	0 – 50

Préparation des solutions

100mg de mucilage lyophilisés sont pesés précisément puis 1,25mL d' H_2SO_4 72% sont ajoutés. L'ensemble est laissé reposer 30min et est ensuite dilué avec 13,5mL d'eau distillée.

3 à 5 prélèvements sont alors effectués, placés à l'étuve à 103°C pendant des durées différentes (de 15 à 120 minutes). A la sortie de l'étuve, 3,6mL de NaOH à 32% sont ajoutés dans chaque échantillon. Ceux-ci sont dilués 50 fois avec de l'eau UHQ (1mL dans 50mL) et sont ensuite stockés à 6°C. Avant analyse, les solutions sont filtrées à 0,20 μm .

Analyse

La séquence d'injection doit comporter les différents étalons, une ligne d'eau puis les échantillons sont injectés du plus hydrolysé au moins hydrolysé. Des lignes d'eau sont ajoutées régulièrement de même que des étalons pour vérifier la présence d'une dérive des temps de rétention. Le programme d'injection est « Sucres 3 avec passeur » détaillé ci-dessous

METHODE « SUCRES 3 AVEC PASSEUR »

```

Sampler.AcquireExclusiveAccess
  Sampler_DiverterValve.Position_1
  Flush Volume = 250
  Column_TC.AcquireExclusiveAccess
  AM_HP2.State    B
  AM_LP1.State    Open
  Pressure.LowerLimit = 200 [psi]
  Pressure.UpperLimit = 3000 [psi]
  MaximumFlowRamp = 6.00 [ml/min²]
  %A.Equate = "%A"
  %B.Equate = "%B"
  %C.Equate = "%C"
  %D.Equate = "%D"
  CR_TC = Off
  Wait FlushState
  EDet1.Mode = IntAmp
  EDet1.CellControl = On
  Data_Collection_Rate = 1.00 [Hz]
  pH.UpperLimit = 13.00
  pH.LowerLimit = 10.00
  WaveformName = "Carbohydrates (Standard Quad)"
  WaveformDescription = "Carbohydrates (std. quad. potential)"
  Electrode = AgCl
  Waveform Time = 0.000, Potential = 0.100, GainRegion = Off, Ramp = On,
Integration = Off
  Waveform Time = 0.200, Potential = 0.100, GainRegion = On, Ramp = On,
Integration = On
  Waveform Time = 0.400, Potential = 0.100, GainRegion = Off, Ramp = On,
Integration = Off
  Waveform Time = 0.410, Potential = -2.000, GainRegion = Off, Ramp = On,
Integration = Off
  Waveform Time = 0.420, Potential = -2.000, GainRegion = Off, Ramp = On,
Integration = Off
  Waveform Time = 0.430, Potential = 0.600, GainRegion = Off, Ramp = On,
Integration = Off

```

```
Waveform Time = 0.440, Potential = -0.100, GainRegion = Off, Ramp = On,
Integration = Off
Waveform Time = 0.500, Potential = -0.100, GainRegion = Off, Ramp = On,
Integration = Off, LastStep = On
Flow = 1.000 [ml/min]
%B = 0.0 [%]
%C = 0.0 [%]
%D = 0.0 [%]
NeedleHeight = 2 [mm]
CutSegmentVolume = 30 [.]
SyringeSpeed = 3
CycleTime = 0 [min]
WaitForTemperature = False
Column_TC.Mode = Off
Wait SampleReady
-10.000 Concentration = 1.00 [mM]
0.000 EDet1.Autozero
Load
Wait CycleTimeState
Inject
Wait InjectState
ED_1.AcqOn
Sampler.ReleaseExclusiveAccess
39.000 Concentration = 1.00 [mM]
40.000 Concentration = 100.00 [mM]
48.000 Concentration = 100.00 [mM]
49.0 ED_1.AcqOff

Concentration = 100. [mM]
Column_TC.ReleaseExclusiveAccess
50.000 Concentration = 1.00 [mM]
End
```

ANNEXE 2. Méthode de Lowry en microplaque

Dosage des protéines équivalent BSA

Cette méthode s'appuie sur le protocole de Lowry avec le « Modified Lowry Protein Assay Kit » fourni par Thermofischer. Cette méthode s'appuie sur le manuel disponible avec le kit, disponible à l'adresse suivante (lien actif en janvier 2019) :

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011229_Mod_Lowry_Protein_Asy_UG.pdf

En fonction d'une estimation de la concentration protéique des échantillons à doser, plusieurs solutions étalons de BSA et un blanc ont été préparés en partant d'une ampoule de standard d'albumine (1mL à 2mg/mL). Les échantillons de mucilage lyophilisés ont été dilués dans de l'eau distillée.

40µL de chaque standard et chaque échantillon ont été pipetés dans les puits d'une microplaque en faisant des duplicats. Ensuite, 200µL du réactif de Lowry (sulfate de cuivre) ont été ajoutés dans chaque puits en utilisant une pipette multi-canaux. La microplaque a alors été agitée avec l'appareil BMG Labtech pendant 30 secondes à vitesse modérée (200rpm) et laissée reposer 10 minutes.

20µL du réactif de Folin-Ciocalteu ont alors été ajoutés (sous sorbonne) dans chaque puits avec la pipette multi-canaux. L'ensemble a été mélangé 30 secondes à 200 rpm et laissé incubé 30 minutes.

L'absorbance a alors été mesurée à 750 nm toutes les 30 secondes pendant 2'30s et le maximum de chaque puits a été enregistré et corrigé avec la moyenne des blancs. Une fois la courbe d'étalonnage réalisée, pour chaque échantillon, la valeur moyenne des deux puits a été calculée et une incertitude a été calculée à 68 % de confiance.

ANNEXE 3. Analyse des Acides Aminés

Utilisation de l'appareil HPIC Biochrome

Préparation des échantillons

5mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 6N sont ajoutés à 100mg de mucilage lyophilisé dans un tube en verre (pyrex). De l'azote est mis à buller dans le tube pendant 2 minutes (pour éviter l'oxydation des acides aminés) avant de le fermer hermétiquement et le placer à l'étuve à 103°C. Après 24 heures d'hydrolyse, l'échantillon est laissé refroidir à température ambiante puis mis à un pH 2,2 avec de la soude 30% puis une soude plus diluée. Il est ensuite dilué à 25mL avec la solution de chargement (tampon à pH 2,20) et filtré à 0,2µm avant d'être versé dans un vial.

L'analyse est ensuite réalisée selon le protocole suivant

Cette partie s'appuie sur le document de travail rédigé par Golnaz Sender et Jean-François Fabre en 2013.

Analyse :

Allumer l'appareil, le passeur et l'ordinateur. Ouvrir le « Biosys Manuel » (bureau). Vérifier que la température du passeur soit à 4°C. Dans la fenêtre « Biosys Manuel » choisir « View », puis « Fluidics diagram ». Cocher « Reaction coil » puis régler la température à 135°C. L'affichage de température devient rouge le temps du chauffage. Sur l'appareil tourner les deux boutons noirs en position « drain ». Pour purger avec chaque tampon, sélectionner « Buffer », rentrer un par un le numéro des bouteilles de tampon 1, 2...6. Attendre 1-3 minutes pour purger avec chaque tampon avant de mettre le numéro suivant.

Une fois que la température atteint 135°C (Biosys Manuel), purger la Ninhydrine. Pour cela d'abord choisir et cocher buffer 1, puis cocher « Nin ».

A la fin de la purge retourner les boutons à la position initiale (coil et colonne).

NB : le tampon 6 et la Ninhydrine ne peuvent pas être lancés simultanément.

NB : cocher « override » sinon les erreurs « low pressure » bloquent le « Biosys Manuel ».

Vérifier que la lampe soit bien allumée (dans l'appareil) sinon cocher « lamp » pour l'allumer.

Vérifier que le tuyau de vidange d'eau fait un goutte à goutte.

Pour créer le programme de l'essai, sur le bureau ouvrir « Biosys Programmer ». Faire « insert », puis « programme » et choisir le « file name » adapté. Commencé par un programme de régénération puis le programme d'analyse. A l'origine, il s'agit de « 99610Naohp.prg » mais il a été depuis optimisé pour améliorer la séparation des pics. Placer les échantillons dans le passeur et vérifier qu'il est bien en mode « serial ». Dans « Biosys Programmer » faire « insert list » et rentrer des échantillons sur la liste (« sample id », quantité d'injection, numéro vial). Placer un blanc (solution tampon pH 2,2) et un échantillon étalon (par exemple level 3 (c-à-d standard 1 avec une injection de 40 µL) avant les échantillons à analyser. Ajouter également à la fin de la liste le même échantillon étalon. Le programme finit par le « Flush ».

NB. N'utiliser jamais le même nom pour deux échantillons (vials) différents. Le fichier ne sera pas enregistré.

Dans « Biosys Fluidics » ou « Biosys Manuel » ouvrir « control », « reagent management », et corriger les volumes de chaque tampon. Puis dans « Biosys programmer », « control » ouvrir « expected reagent usage » et vérifier que les quantités soient suffisantes.

Pour commencer l'analyse dans « Biosys programmer » faire « Run ».

Traitement des données :

A la fin de l'analyse, sur le bureau ouvrir « Ezchrome elite » puis « file », « sequence » and « open ». Chercher la séquence souhaitée en organisant les dossiers par date dans le c:/data biochrome-30.

1) Choix de la méthode d'intégration

Faire File –Open – Method et choisir la méthode à utiliser pour l'intégration. De même, si nécessaire, changer les méthodes (ex. EGN20130913.met) dans la colonne correspondante de la séquence. Pour cela choisir la méthode sur la première ligne, ouvrir et choisir la bonne méthode. Puis faire clic droit sur la ligne corrigée et choisir « fill down » pour appliquer les méthodes sur toutes les lignes.

2) Vérification de l'étalonnage

Si nous faisons un étalonnage complet il faut cliquer sur « unknown » , choisir « clear all calib » juste pour le premier échantillon de la série des standards. Ensuite, on indique les level

correspondant à chaque étalon. Si nous faisons juste la vérification de l'étalonnage sur un ou deux points, choisir la ligne correspondant à un étalon. Dans la colonne « level » corriger la valeur (ex. « level 3 »). Puis Choisir « clear calibration at level ». Cet étalon remplace l'ancien étalon existant de même « level ».

3) Vérification des résultats

Sur la ligne étalon, faire clic droit et choisir « open data ». Vérifier en haut de la fenêtre que la méthode soit la bonne méthode puis faire « analysis » . Regarder que les pics soient correctement identifiés.

NB . Si les pics ne sont pas bien identifiés, revenir sur l'onglet « method », choisir « peak groups » (ou) et corriger manuellement le temps de rétention. Si les temps de rétention sont fortement décalés, il faut le signaler sur le carnet de suivi et aux personnes responsables de l'appareil.

4) Compilation des résultats

D'abord choisir les lignes correspondant aux étalons, faire clic droit et choisir « process sequence » (ou). Puis choisir « selection » et « start ».

Une fois que les étalons ont été compilés, il faut vérifier la calibration. Pour cela dans l'onglet « méthode », choisir « review calibration » (ou). Vérifier que les points étalons ajoutés se trouvent sur une droite pour tous les acides aminés avec un bon coefficient de détermination ($R^2 > 0.99$)

NB. La longueur d'onde est de 440 pour la plupart des acides aminés. Cela peut être modifié (à 570) en haut de page.

Si l'étalonnage est bon, choisir la ligne du premier échantillon et faire « process sequence » mais en choisissant « all » et « start ».

Les rapports pdf sont créés à cette étape c:\data-Bichrom-30\rapport-pdf

ANNEXE 4. Méthode de Dubois en microplaque

Dosage du sucre équivalent glucose

Le protocole s'appuie sur le kit « Total Carbohydrate analysis kit » fourni par Sigma-Aldrich.

Différents étalons de glucose sont réalisés à partir d'une solution à 2mg/mL par dilution avec de l'eau distillée. 50µL de chaque étalon sont alors versés dans les puits d'une microplaque en quartz en réalisant des triplicats.

100mg de différents mucilages lyophilisés sont tout d'abord préalablement dilués dans 25mL d'eau distillée. 10µL de la solution sont ensuite versés dans des puits et complétés à 50µL avec la solution tampon.

150µL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés à chaque puits avec une pipette multi-canaux et l'ensemble est bien mélangé par pipetage. La plaque en quartz est ensuite placée dans un caisson fermé en téflon et mise 30 minutes dans une étuve à 90°C. Après la réaction, 30µL du réactif de Dubois sont ajoutés à chaque puits avec la pipette multi-canaux et l'ensemble est agité 300 secondes au sein du lecteur de microplaque du spectrophotomètre BMG Labtech. Après 60 secondes d'agitation supplémentaire à 200rpm, l'absorbance est mesurée à 490nm.

Après correction des valeurs selon le blanc, une droite d'étalonnage est obtenue et permet de remonter à la concentration des échantillons en équivalent glucose.

ANNEXE 5. Méthode de Blumenkrantz en microplaque

Préparation des différentes solutions

- Solution de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ à 120nM dans du H_2SO_4 96%

Dans un erlenmeyer on pèse 0,603g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ puis on ajoute environ 20mL de H_2SO_4 96%. Cette solution est placée aux ultrasons jusqu'à dissolution complète du sel dans l'acide (minimum 2h). Une fois la solution homogène, elle est transvasée dans une fiole de 25mL qui est complétée avec du H_2SO_4 96% en rinçant l'erlenmeyer.

- Solution de m-hydroxydiphenyl

Pour cela il faut préparer deux solutions en parallèle qui ne seront mises en contact qu'au dernier moment.

Solution 1 : H_2SO_4 80% (v/v). Dans une fiole jaugée de 10 mL sont introduits 1mL d'eau distillée puis 8,29 mL d'acide sulfurique à 96%. L'ensemble est complété à l'eau distillée.

Solution 2 : M-hydroxydiphenyl dans le DMSO à 100 mg/mL. Dans un vial sont pesés 100 mg de M-hydroxydiphenyl et 1mL de DMSO est ajouté. Le vial est agité afin de dissoudre le réactif dans le DMSO.

Au dernier moment, (avant de devoir le verser dans les puits de la microplaque, la solution finale de m-hydroxydiphenyl est préparée. 200 μL de la solution dans le DMSO sont ajoutés à 4,8mL d'acide H_2SO_4 à 80%(v/v).

Préparation des solutions étalons pour la courbe de calibration

Dans une fiole jaugée de 100mL, 20 mg d'acide d-galacturonique sont pesés et la fiole est complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. A partir de la solution mère obtenue (concentration de 200mg/L), les solutions filles sont formées de la façon suivante :

Tableau A 2. Etalons préparés pour la calibration de l'acide galacturonique

Volume de solution mère	Volume d'eau distillée ajoutée	Volume total de solution	Concentration
1 mL	0.5 mL	1,5 mL	150 mg/L
1 mL	1 mL	2 mL	100 mg/L
1 mL	3 mL	4 mL	50 mg/L
1 mL	4 mL	5 mL	40 mg/L
1 mL	7 mL	8 mL	25 mg/L
1 mL	15 mL	16 mL	12.5 mg/L

Préparation des échantillons

- Hydrolyse des graines :

Environ 150 mg de graines broyées sont pesées et insérées dans des flacon en verre de 15 mL. 1,5 mL d'acide sulfurique à 96% sont ajoutés sur les graines broyées et les flacons sont laissés à température ambiante pendant 30 min. Ensuite 8,5 mL d'eau distillée sont ajoutés et les flacons sont placés 30 min dans une étuve à 100°C. Une fois sortis de l'étuve, les flacons sont laissés refroidir puis le contenu est placé dans une fiole jaugée de 50 mL complétée avec de l'eau distillée en rinçant le flacon.

- Préparation des solutions de mucilages :

Environ 25 mg de mucilage lyophilisés sont pesés et placés dans une fiole jaugée de 50 mL complétée avec de l'eau distillée. La fiole est bien agitée afin de dissoudre totalement le mucilage dans l'eau.

- Préparation de la microplaque :

Pour chaque puits de la μ plaque (en quartz) (blanc, calibration ou échantillons) 40 μ L de solution à doser sont insérés (pour les blancs c'est 40 μ L d'eau distillée). Ensuite 200 μ L de la solution acide de Na₂B₄O₇ sont ajoutés puis le tout est agité par aspiration dans la micropipette plusieurs fois. La microplaque est mise à agiter 5 min dans le spectrophotomètre (200 rpm) puis mise à incuber 30min à 100°C. Après refroidissement jusqu'à température ambiante, l'absorbance de référence des puits est mesurée à 540 nm. Ensuite, 40 μ L de la solution de m-hydroxydiphenyl fraîchement préparée sont ajoutés. Le tout est agité par aspiration dans la micropipette plusieurs fois pour assurer une bonne homogénéité et ainsi favoriser la réaction qui confère sa couleur à la solution. La plaque est mise à agiter pendant 2 min puis une mesure de l'absorbance à 540 nm est réalisée toutes les deux minutes pendant 60 minutes afin de faire un suivi cinétique. L'absorbance de référence est retirée des mesures d'absorbances réalisées après ajout du m-hydroxydiphenyl et la concentration en acide uronique est extrapolée à partir de la courbe de calibration.

ANNEXE 6. Fichiers topologiques et de champ de force –Tout atome

Base CHARMM36

La base des fichiers topologiques et de champ de force utilisés est déjà disponible avec le package NAMDVMD. (respectivement « CHARMM36 All-Hydrogen Lipid Topology File » et « CHARMM36 All-Hydrogen Parameter File »), parfois nommés avec le préfixe « top_all36 » ou « par_all36 ». Ils sont basés sur plusieurs articles (Klauda *et al.*, 2012, 2010). Les paramètres concernant les hydroperoxydes ont été ajoutés en modifiant les paramètres du DLPC normal (Garrec *et al.*, 2014b). Ici, sont placées uniquement les parties modifiées concernant les DLPC hydroperoxydés en position 9 et 13. Le DLPC normal est déjà configuré.

Ajouts au fichier topologique top_all36_lipid_MISC.....

```
MASS -1 HGP1    1.00800 H ! Hydrogen hydroperoxide
MASS -1 HGA1    1.00800 H ! Hydrogen carbon hydroperoxide
MASS -1 CG31    12.01100 C ! hydroperoxide
MASS -1 OG31    15.99940 O ! hydroperoxyde
```

.....

```
RESI DLP9      0.00 ! 1-9 hydroperoxylinoleyl, 2-linoleoyl--sn-glycero-3-Phosphatidylcholine
```

.....

```
GROUP          !          |
ATOM C29 CG31  0.08 !    H9R ---C29 |
ATOM H9R HGA1  0.09 !          | O9Y
ATOM O9Y OG31 -0.14 !          | |
ATOM O9Z OG31 -0.39 !          | O9Z---H9Z |
ATOM H9Z HGP1  0.36 !          |
GROUP          !    H10R---C210      |
ATOM C210 CEL1 -0.15 !          || (TRANS) |
ATOM H10R HEL1  0.15 !          ||          |
GROUP          !    H11R---C211      |
ATOM C211 CEL1 -0.15 !          |          |
ATOM H11R HEL1  0.15 !    H12R---C212      | |          |
GROUP          !          || (CIS)      |
ATOM C212 CEL1 -0.15 !          ||          |
ATOM H12R HEL1  0.15 !    H13R---C213      |
```

.....

```
! Chain from C2
```

.....

```
BOND C28 H8R    C28 H8S    C28 C29
BOND C29 H9R    C29 O9Y    O9Y O9Z
BOND O9Z H9Z
BOND C29 C210
DOUBLE C210 C211
BOND C210 H10R
BOND C211 H11R    C211 C212
BOND C212 H12R
```

```

DOUBLE C212 C213
BOND C213 H13R C213 C214
BOND C214 H14R C214 H14S C214 C215
BOND C215 H15R C215 H15S C215 C216
BOND C216 H16R C216 H16S C216 C217
BOND C217 H17R C217 H17S C217 C218
BOND C218 H18R C218 H18S C218 H18T

```

! IC table from CHARMM ic generate

!	I	J	K	L	R(I(J/K))	T(I(JK/KJ))	PHI	T(JKL)	R(KL)
IC	C27	C28	C29	C210	1.5744	111.76	-44.62	112.65	1.502
IC	C210	C28	*C29	H9R	1.502	112.65	-123.73	112.43	1.1
IC	C28	C29	C210	C211	1.538	112.65	-88.01	122.62	1.45
IC	C211	C29	*C210	H10R	1.45	122.62	-180	118.69	1.1
IC	C28	C29	O9Y	O9Z	1.502	109.73	69.41	106.67	1.4588
IC	C28	C210	*C29	H9R	1.502	112.65	-122.97	110.8	1.111
IC	C28	C210	*C29	O9Y	1.502	112.65	120.01	102.69	1.415
IC	C29	O9Y	O9Z	H9Z	1.415	106.67	125.95	104.5	0.9726
IC	C29	C210	C211	C212	1.502	122.62	178.87	121.77	1.34
IC	C212	C210	*C211	H11R	1.34	121.77	180.00	119.12	1.100
IC	C210	C211	C212	C213	1.45	121.77	-168.51	125.2	1.401
IC	C213	C211	*C212	H12R	1.401	125.2	-180	117.4	1.100
IC	C211	C212	C213	C214	1.5595	129.71	-2.78	124.41	1.5034
IC	C214	C212	*C213	H13R	1.5034	124.41	0.00	112.53	1.1
IC	C212	C213	C214	C215	1.4010	124.41	-158.80	108.96	1.5671

RESI DL13 0.00 ! ! 1-13 hydroperoxylinoleyl, 2-linoleoyl--sn-glycero-3-phosphatidylcholine

....

```

GROUP      !      H9R ---C29
ATOM C29 CEL1 -0.15 !      ||
ATOM H9R HEL1 0.15 !      ||
GROUP      !      H10R---C210      |
ATOM C210 CEL1 -0.15 !      | (CIS) |
ATOM H10R HEL1 0.15 !      |      |
GROUP      !      H11R---C211      |
ATOM C211 CEL1 -0.15 !      ||      |
ATOM H11R HEL1 0.15 !      H12R---C212      | |      |
GROUP      !      | (TRANS)      |
ATOM C212 CEL1 -0.15 !      |      |
ATOM H12R HEL1 0.15 !      H13R---C213---H13Y      |
GROUP      !      |      |
ATOM C213 CG31 0.08 !      H13R ---C213      |
ATOM H13R HGA1 0.09 !      | O13Y
ATOM O13Y OG31 -0.14 !      | |
ATOM O13Z OG31 -0.39 !      | O13Z---H13Z |
ATOM H13Z HGP1 0.36 !      |
GROUP      !      H14R---C214---H14S      |
ATOM C214 CTL2 -0.18 !      |      |
ATOM H14R HAL2 0.09 !      |      |
ATOM H14S HAL2 0.09 !      H15R---C215      |

```

.....

! Chain from C2

.....

BOND C28 H8R C28 H8S C28 C29
 BOND C29 H9R
 DOUBLE C29 C210
 BOND C210 H10R C210 C211
 BOND C211 H11R C212 C213
 BOND C212 H12R
 DOUBLE C211 C212
 BOND C213 H13R C213 C214 C213 O13Y
 BOND O13Y O13Z O13Z H13Z
 BOND C214 H14R C214 H14S C214 C215

...

IC C27 C28 C29 C210 1.5744 112.00 -120.83 129.97 1.3959
 IC C210 C28 *C29 H9R 1.3959 129.97 175.44 112.43 1.1000
 IC C211 C210 C29 C28 1.5595 129.71 -2.78 124.41 1.5034
 IC C211 C213 *C212 H12R 1.45 122.62 -180 118.69 1.1
 IC C214 C213 O13Y O13Z 1.502 109.73 69.41 106.67 1.4588
 IC C214 C212 *C213 H13R 1.502 112.65 -122.97 110.8 1.111
 IC C214 C212 *C213 O13Y 1.502 112.65 120.01 102.69 1.415
 IC C213 O13Y O13Z H13Z 1.415 106.67 125.95 104.5 0.9726
 IC C213 C212 C211 C210 1.502 122.62 178.87 121.77 1.34
 IC C210 C212 *C211 H11R 1.34 121.77 180.00 119.12 1.100
 IC C212 C211 C210 C29 1.45 121.77 -168.51 125.2 1.401
 IC C29 C211 *C210 H10R 1.401 125.2 -180 117.4 1.100
 IC C28 C210 *C29 H9R 1.5034 124.41 0.00 112.53 1.1
 IC C210 C29 C28 C27 1.4010 124.41 -158.80 108.96 1.5671
 IC C213 C215 *C214 H14R 1.5132 112.00 -130.36 105.76 1.1110
 IC H14R C213 *C214 H14S 1.1110 104.52 -122.37 111.15 1.1110
 IC C216 C215 C214 C213 1.4872 118.52 -179.47 112.00 1.5132
 IC C213 C215 *C214 H14R 1.5132 112.00 -130.36 105.76 1.1110

END

Fichier de champ de force par_all36_cgenff.prm

CG31 0.0 -0.0320 2.0000 ! C hydroperoxyde
 OG31 0.0 -0.1000 1.6500 ! O de l'hydroperoxyde

Fichier de champ de force par_all36_lipid.prm

!atom type Kb b0

CG31 OG31 719.520 1.415
 OG31 OG31 512.450 1.459
 CEL1 CG31 729.512 1.502
 CG31 HGA1 617.590 1.111
 CG31 OG31 719.520 1.415
 CG31 CTL2 444.700 1.538
 OG31 HGP1 871.500 0.973

ANNEXE 7. Etapes d'équilibration de la bicouche lipidique

6 étapes d'équilibration de la membrane vont être effectuées. La première est indiquée ci-dessous. Les autres diffèrent principalement par le temps d'équilibration.

1 – 25000 steps soit 25 ps (1ps/step)

2 – 25000 steps soit 25 ps

3 - 25000 steps soit 25 ps

4 – 100000 steps soit 200 ps (2ps/step)

5 – 100000 steps soit 200 ps

6 – 100000 steps soit 200 ps

Soit un total de 375000 steps, 675ps ou 0,675ns

```

structure          ionized.psf
coordinates        ionized.pdb

set temp           303.15;
set outputname    step6.1_equilibration;

source            step5_assembly.namd.str

temperature       $temp;

outputName        step6.1_equilibration;
# base name for output from this run
# NAMD writes two files at the end, final coord and vel
# in the format of first-dyn.coor and first-dyn.vel

firsttimestep     0;
# last step of previous run
restartfreq       500;
# 500 steps = every 1ps
dcdfreq           1000;

dcdUnitCell       yes;
# the file will contain unit cell info in the style of
# charmm dcd files. if yes, the dcd files will contain
# unit cell information in the style of charmm DCD files.
xstFreq           1000;
# XSTFreq: control how often the extended system configuration
# will be appended to the XST file
outputEnergies    125;
# 125 steps = every 0.25ps
# The number of timesteps between each energy output of NAMD
outputTiming      1000;
# The number of timesteps between each timing output shows
# time per step and time to completion

# Force-Field Parameters
paraTypeCharmm    on;
# We're using charmm type parameter file(s)
# multiple definitions may be used but only one file per definition
parameters        toppar/par_all36m_prot.prm
parameters        toppar/par_all36_na.prm

```

```

parameters      toppar/par_all36_lipid.prm
parameters      toppar/par_all36_cgenff.prm
parameters      toppar/toppar_water_ions.str
parameters      toppar/toppar_all36_lipid_miscellaneous.str
parameters      toppar/toppar_all36_lipid_model.str
parameters      toppar/toppar_all36_lipid_prot.str

# These are specified by CHARMM
exclude          scaled1-4
# non-bonded exclusion policy to use "none,1-2,1-3,1-4,or scaled1-4"
# 1-2: all atoms pairs that are bonded are going to be ignored
# 1-3: 3 consecutively bonded are excluded
# scaled1-4: include all the 1-3, and modified 1-4 interactions
# electrostatic scaled by 1-4scaling factor 1.0
# vdW special 1-4 parameters in charmm parameter file.
1-4scaling      1.0
switching       on
vdwForceSwitching yes;
# New option for force-based switching of vdW
# if both switching and vdwForceSwitching are on CHARMM force
# switching is used for vdW forces.
# You have some freedom choosing the cutoff
cutoff          12.0;
# may use smaller, maybe 10., with PME
switchdist      10.0;
# cutoff - 2.
# switchdist - where you start to switch
# cutoff - where you stop accounting for nonbond interactions.
# correspondence in charmm:
# (cutnb,ctofnb,ctonnb = pairlistdist,cutoff,switchdist)
pairlistdist    16.0;
# stores all the pairs within the distance. It should be larger
# than cutoff( + 2.)
stepspercycle   20;
# 20 redo pairlists every ten steps
pairlistsPerCycle 2;
# 2 is the default
# cycle represents the number of steps between atom reassignments
# this means every 20/2=10 steps the pairlist will be updated

# Integrator Parameters
timestep        1.0;          # fs/step
rigidBonds      all;
# Bound constraint all bonds involving H are fixed in length
nonbondedFreq   1;
# nonbonded forces every step
fullElectFrequency 1;
# PME every step

# Constant Temperature Control ONLY DURING EQUILB
reassignFreq     500;
# reassignFreq: use this to reassign velocity every 500 steps
reassignTemp     $temp;

# Periodic Boundary conditions. Need this since for a start...
if { $boxtype == "hexa" } {

```

```

    set b [expr {$a / 2 * sqrt(3)}]
    set d [expr {$a / 2}]
    set wrapnearst on
} else {
    set wrapnearst off
    set d 0.0
}

cellBasisVector1    $a    0.0    0.0;    # vector to the next image
cellBasisVector2    $d    $b    0.0;
cellBasisVector3    0.0    0.0    $c;
cellOrigin          $xcen $ycen $zcen;    # the *center* of the cell

wrapWater           on;
# wrap water to central cell
wrapAll             on;
# wrap other molecules too
wrapNearest $wrapnearst;
# use for non-rectangular cells (wrap to the nearest image)

# PME (for full-system periodic electrostatics)
PME                 yes;
PMEInterpOrder      6;
# interpolation order (spline order 6 in charmm)
PMEGridSpacing      1.0;
# maximum PME grid space / used to calculate grid size

# Pressure and volume control
useGroupPressure    yes;
# use a hydrogen-group based pseudo-molecular viral to calculate
pressure and
# has less fluctuation, is needed for rigid bonds (rigidBonds/SHAKE)
useFlexibleCell     yes;
# yes for anisotropic system like membrane
useConstantRatio    yes;
# keeps the ratio of the unit cell in the x-y plane constant A=B

langevin            on
langevinDamping     1.0
langevinTemp        $temp
langevinHydrogen    off

# A partir de la troisieme phase d'équilibre, le bloc suivant est
ajouté

## constant pressure
#langevinPiston     on
#langevinPistonTarget 1.01325
#langevinPistonPeriod 50.0
#langevinPistonDecay 25.0
#langevinPistonTemp  $temp

minimize 10000

numsteps 90000000
run 25000

```

ANNEXE 8. Etape de production de la bicouche lipidique

Après équilibration, la bicouche est observée pendant 1 nanoseconde à atmosphère contrôlée. Un autre fichier de production peut être également ajouté pour un temps supplémentaire

```

structure      ionized.psf
coordinates    ionized.pdb

set temp       303.15;
outputName     step7.1_production; # base name for output from this run
              # NAMD writes two files at the end, final coord and vel
              # in the format of first-dyn.coor and first-dyn.vel

set inputname  step6.6_equilibration;
binCoordinates $inputname.coor; # coordinates from last run (binary)
binVelocities  $inputname.vel; # velocities from last run (binary)
extendedSystem $inputname.xsc; # cell dimensions from last run (binary)
restartfreq    500;             # 500 steps = every 1ps
dcdfreq       1000;
dcdUnitCell   yes;             # the file will contain unit cell info in the style of
                              # charmm dcd files. if yes, the dcd files will contain
                              # unit cell information in the style of charmm DCD files.
xstFreq       500;             # XSTFreq: control how often the extended system configuration
                              # will be appended to the XST file
outputEnergies 125;           # 125 steps = every 0.25ps
                              # The number of timesteps between each energy output of NAMD
outputTiming   500;           # The number of timesteps between each timing output shows
                              # time per step and time to completion

# Force-Field Parameters
paraTypeCharmm on;           # We're using charmm type parameter file(s)
                              # multiple definitions may be used but only one file per definition
parameters     toppar/par_all36m_prot.prm
parameters     toppar/par_all36_na.prm
parameters     toppar/par_all36_carb.prm
parameters     toppar/par_all36_lipid.prm
parameters     toppar/par_all36_cgenff.prm
parameters     toppar/toppar_water_ions.str
parameters     toppar/toppar_all36_lipid_miscellaneous.str
source step5_assembly.namd.str

# These are specified by CHARMM
exclude        scaled1-4     # non-bonded exclusion policy to use "none,1-2,1-3,1-4,or
scaled1-4"
                              # 1-2: all atoms pairs that are bonded are going to be ignored
                              # 1-3: 3 consecutively bonded are excluded
                              # scaled1-4: include all the 1-3, and modified 1-4 interactions
                              # electrostatic scaled by 1-4scaling factor 1.0

```

```

# vdW special 1-4 parameters in charmm parameter file.
1-4scaling      1.0
switching       on
vdwForceSwitching yes;      # New option for force-based switching of vdW
                        # if both switching and vdwForceSwitching are on CHARMM force
                        # switching is used for vdW forces.

# You have some freedom choosing the cutoff
cutoff          12.0;      # may use smaller, maybe 10., with PME
switchdist      10.0;      # cutoff - 2.
                        # switchdist - where you start to switch
                        # cutoff - where you stop accounting for nonbond interactions.
                        # correspondence in charmm:
                        # (cutnb,ctofnb,ctonnb = pairlistdist,cutoff,switchdist)
pairlistdist    16.0;      # stores the all the pairs with in the distance it should be larger
                        # than cutoff( + 2.)
stepscycle      20;        # 20 redo pairlists every ten steps
pairlistsPerCycle 2;        # 2 is the default
                        # cycle represents the number of steps between atom reassignments
                        # this means every 20/2=10 steps the pairlist will be updated

# Integrator Parameters
timestep        2.0;        # fs/step
rigidBonds      all;        # Bound constraint all bonds involving H are fixed in length
nonbondedFreq   1;         # nonbonded forces every step
fullElectFrequency 1;      # PME every step

wrapWater       on;        # wrap water to central cell
wrapAll         on;        # wrap other molecules too
if { $boxtype == "hexa" } {
wrapNearest     on;        # use for non-rectangular cells (wrap to the nearest image)
} else {
wrapNearest     off;       # use for non-rectangular cells (wrap to the nearest image)
}

# PME (for full-system periodic electrostatics)
PME             yes;
PMEInterpOrder  6;         # interpolation order (spline order 6 in charmm)
PMEGridSpacing  1.0;       # maximum PME grid space / used to calculate grid size

# Constant Pressure Control (variable volume)
useGroupPressure yes;      # use a hydrogen-group based pseudo-molecular viral to
                        # calculate pressure and
                        # has less fluctuation, is needed for rigid bonds (rigidBonds/SHAKE)
useFlexibleCell  yes;      # yes for anisotropic system like membrane
useConstantRatio yes;     # keeps the ratio of the unit cell in the x-y plane constant A=B

langevinPiston  on;        # Nose-Hoover Langevin piston pressure control
langevinPistonTarget 1.01325; # target pressure in bar 1atm = 1.01325bar
langevinPistonPeriod 50.0;  # oscillation period in fs. correspond to pgamma
T=50fs=0.05ps

```

```
                                # f=1/T=20.0(pgamma)
langevinPistonDecay 25.0;      # oscillation decay time. smaller value corresponds to larger
random
                                # forces and increased coupling to the Langevin temp bath.
                                # Equall or smaller than piston period
langevinPistonTemp $temp;     # coupled to heat bath

# Constant Temperature Control
langevin      on;             # langevin dynamics
langevinDamping 1.0;         # damping coefficient of 1/ps (keep low)
langevinTemp  $temp;         # random noise at this level
langevinHydrogen off;       # don't couple bath to hydrogens
margin
                                5;
# run
numsteps      1000000;       # run stops when this step is reached
run           1000000;       # 1ns
```

ANNEXE 9. Construction d'une bicouche lipidique avec Packmol

Un fichier texte est créé d'extension .inp.

Les fichiers pdb de l'eau et des lipides sont placés dans le même dossier que le fichier de configuration (Attention, le fichier pdb du phospholipide doit avoir ses atomes nommés et numérotés en fonction des fichiers topologiques définis). Sous cygwin64 ou cygwin32, le fichier est appelé par : ./packmol < conf.inp

Exemple de fichier de configuration pour une bicouche comportant un certain nombre de lipides oxydés

```
# Double couche lipidique entourée d'eau

# Chaque atome de différentes molécules sera éloigné des autres d'au
moins 2 angströms.

tolerance 2.0

# Type de fichier pdb

filetype pdb

# Fichier de sortie

output bilayer09_05pc.pdb

# Couche d'eau sous les lipides
# Les 3 premiers nombres sont les coordonnées x,y,z minimales pour les
molécules d'eau et les autres nombres sont les coordonnées maximales.
La couche d'eau a ici des côtés de 100 angströms dans les directions x
et z et 20 angströms dans la direction z.

structure watermm3.pdb
  number 3000
  inside box 0. 0. -20. 100. 100. 0.
end structure

# Couche d'eau au-dessus des lipides

structure watermm3.pdb
  number 3000
  inside box 0. 0. 30. 100. 100. 50.
end structure

# Première couche de lipides. Les têtes polaires sont orientées vers
les molécules d'eau.
# 86 lipides non oxydés seront placés dans une couche de côté 100 et de
hauteur 20. Les atomes 2 et 6 du fichier pdb, qui appartiennent à la
tête polaire, sont contraints à être en dessous du plan z=2 et les
```

atomes 88 et 133, qui correspondent à la terminaison hydrophobe devront être au dessus du plan $z=5$.

```
structure DLPC.pdb
  number 86
  inside box 0. 0. 0. 100. 100. 20.
  atoms 2 6
    below plane 0. 0. 1. 2.
  end atoms
  atoms 88 133
    over plane 0. 0. 1. 5.
  end atoms
end structure
```

4 lipides oxydés seront placés dans une couche de côté 100 et de hauteur 20. Les atomes 2 et 6 du fichier pdb, qui appartiennent à la tête polaire, sont contraints à être en dessous du plan $z=2$ et les atomes 88 et 133, qui correspondent à la terminaison hydrophobe devront être au dessus du plan $z=5$.

```
structure DLPC900H.pdb
  number 4
  inside box 0. 0. 0. 100. 100. 20.
  atoms 2 6
    below plane 0. 0. 1. 2.
  end atoms
  atoms 88 133
    over plane 0. 0. 1. 5.
  end atoms
end structure
```

Seconde couche de lipides
Ici, les têtes polaires sont orientées vers les molécules d'eau qui sont au dessus de la bicouche lipidique. Les plans sont $z=25$ et $z=28$

```
structure DLPC.pdb
  number 86
  inside box 0. 0. 10. 100. 100. 30.
  atoms 88 133
    below plane 0. 0. 1. 25.
  end atoms
  atoms 2 6
    over plane 0. 0. 1. 28.
  end atoms
end structure
```

```
structure DLPC900H.pdb
  number 4
  inside box 0. 0. 10. 100. 100. 30.
  atoms 88 133
    below plane 0. 0. 1. 25.
  end atoms
  atoms 2 6
    over plane 0. 0. 1. 28.
  end atoms
end structure
```

ANNEXE 10. Fichiers de configuration GROS-GRAINS

Fichier de définition des grains.

Les différents grains du fichier sont détaillés dans le tableau ci-dessous. Ils sont encadrés par les balises CGBEGIN et CGEND et nommés par la première ligne. Ensuite, le nom du résidu (DLP ici) précède le nom de l'atome compris dans le grain. Ce fichier est utilisé par le module CG builder du logiciel VMD.

#Grain CH3 terminal 1 CGBEGIN DLP CH3A 0 DLP C46 0 DLP H117 0 DLP H118 0 DLP H119 0 CGEND	#Grain phosphate CGBEGIN DLP PO4 0 DLP P32 0 DLP O31 0 DLP O33 0 DLP O34 0 DLP O35 0 DLP C17 0 DLP H76 0 DLP H77 0 CGEND	CGBEGIN DLP PRA2 0 DLP C25 0 DLP C24 0 DLP C26 0 DLP H86 0 DLP H87 0 DLP H88 0 DLP H89 0 DLP H90 0 DLP H91 0 CGEND	CGBEGIN DLP PRA6 0 DLP C50 0 DLP C51 0 DLP C52 0 DLP C53 0 DLP H124 0 DLP H125 0 DLP H126 0 DLP H127 0 DLP H128 0 DLP H129 0 DLP H130 0 DLP H131 0 CGEND
#Grain CH3 terminal 2 CGBEGIN DLP CH3B 0 DLP C54 0 DLP 2H13 0 DLP 3H13 0 DLP 4H13 0 CGEND	#Grain entre phosphate et chaîne 1 CGBEGIN DLP EST1 0 DLP C18 0 DLP H78 0 DLP H79 0 DLP C20 0 DLP O19 0 DLP O30 0 CGEND	#Grain de l'hydroperoxyde CGBEGIN DLP PRA3 0 DLP C28 0 DLP C27 0 DLP O135 0 DLP O136 0 DLP H92 0 DLP H93 0 DLP H94 0 DLP H137 0 CGEND	CGBEGIN DLP EST2 0 DLP C16 0 DLP H75 0 DLP O12 0 DLP C10 0 DLP O11 0 CGEND
#Grain Choline CGBEGIN DLP CHOL 0 DLP N38 0 DLP C40 0 DLP C39 0 DLP C41 0 DLP H100 0 DLP H101 0 DLP H102 0 DLP H103 0 DLP H104 0 DLP H105 0 DLP H106 0 DLP H107 0 DLP H108 0 DLP C36 0 DLP C37 0 DLP H96 0 DLP H97 0 DLP H98 0 DLP H99 0 CGEND	#1er grain de la chaîne 1 CGBEGIN DLP PRA1 0 DLP C22 0 DLP C21 0 DLP C23 0 DLP H80 0 DLP H81 0 DLP H82 0 DLP H83 0 DLP H84 0 DLP H85 0 CGEND	CGBEGIN DLP PRA4 0 DLP C29 0 DLP C47 0 DLP H95 0 DLP H120 0 CGEND CGBEGIN DLP PRA5 0 DLP C48 0 DLP C49 0 DLP H122 0 DLP H123 0 CGEND	CGBEGIN DLP PRB1 0 DLP C8 0 DLP C9 0 DLP C7 0 DLP H65 0 DLP H66 0 DLP H67 0 DLP H68 0 DLP H69 0 DLP H70 0 CGEND

CGBEGIN DLP PRB3 0 DLP C2 0 DLP C3 0 DLP O138 0 DLP O139 0 DLP H140 0 DLP H56 0 DLP H57 0 DLP H58 0 CGEND	CGBEGIN DLP PRB4 0 DLP C1 0 DLP C13 0 DLP H55 0 DLP H72 0 CGEND	CGBEGIN DLP PRB5 0 DLP C14 0 DLP C15 0 DLP H73 0 DLP H74 0 CGEND	CGBEGIN DLP PRB6 0 DLP C42 0 DLP C43 0 DLP C44 0 DLP C45 0 DLP H109 0 DLP H110 0 DLP H111 0 DLP H112 0 DLP H113 0 DLP H114 0 DLP H115 0 DLP H116 0 CGEND
---	---	--	--

Fichier topologique selon MARTINI (exemple d'un hydroperoxyde en position 13).

27 1

```

RESI DL2  0.0  !
ATOM CHOL  QO  1.0  ! LE FRAGMENT CHOLINE A UNE INDICATION CHARGE +1
ATOM PO4  QaL -1.0  ! LE FRAGMENT PO4 A UNE INDICATION CHARGE -1 (de même accepteur
d'hydrogène a)
ATOM EST1  NaL  0.0  ! LE FRAGMENT EST1 EST NON POLAIRE, ACCEPTEUR D'HYDROGENE
ATOM P2A1  C1  0.0  ! LES FRAGMENTS CARBONES SONT APOLAIRES
ATOM P2A2  C1  0.0  !
ATOM P2A3  C3c  0.0  ! LE FRAGMENT DE LA PREMIERE DOUBLE LIAISON EST PLUS
POLAIRE QU'UNE LIAISONS SIMPLE et la liaison est CIS
ATOM P2A4  C3t  0.0  ! LE FRAGMENT DE LA PREMIERE DOUBLE LIAISON EST PLUS
POLAIRE QU'UNE LIAISONS SIMPLE et la liaison est TRANS
ATOM P2A5  P2  0.0  ! LE FRAGMENT HYDROPEROXYDE EST POLAIRE, MIS AU NIVEAU 2
ATOM P2A6  C1  0.0  !
ATOM CH3A  C1  0.0  !
ATOM EST2  NaL  0.0  !
ATOM P2B1  C1  0.0  !
ATOM P2B2  C1  0.0  !
ATOM P2B3  C3c  0.0  !
ATOM P2B4  C3t  0.0  !
ATOM P2B5  P2  0.0  !

```

```

ATOM P2B6 C1 0.0      !
ATOM CH3B C1      0.0
! LES LIENS ENTRE FRAGMENTS SONT PRECISES ENSUITE
BOND CHOL PO4 PO4 EST2 EST2 EST1
BOND EST1 P2A1 P2A1 P2A2 P2A2 P2A3 P2A3 P2A4 P2A4 P2A5 P2A5 P2A6 P2A6
CH3A
BOND EST2 P2B1 P2B1 P2B2 P2B2 P2B3 P2B3 P2B4 P2B4 P2B5 P2B5 P2B6 P2B6
CH3B
ANGLE CHOL PO4 EST2 PO4 EST2 EST1 PO4 EST2 P2B1 EST1 EST2 P2B1 EST2 EST1
P2A1
! LES ANGLES SONT PRECISES ENSUITE
ANGLE EST1 P2A1 P2A2 P2A1 P2A2 P2A3 P2A2 P2A3 P2A4 P2A3 P2A4 P2A5 P2A4
P2A5 P2A6 P2A5 P2A6 CH3A
ANGLE EST2 P2B1 P2B2 P2B1 P2B2 P2B3 P2B2 P2B3 P2B4 P2B3 P2B4 P2B5 P2B4 P2B5
P2B6 P2B5 P2B6 CH3B

END

```

Fichier du champ de force selon MARTINI

Les fichiers du champ de force n'ont pas besoin d'être modifiés. Il sera fait appel aux fichiers déjà disponibles dans le tutoriel MARTINI de VMD (valide en février 2019) : <http://www.ks.uiuc.edu/training/tutorials/martini/rbcg-tutorial.pdf>

ANNEXE 11. Etape d'équilibration de la vésicule

```
set outputname system-min
set restart 0
set temperature 310
cosAngles on
structure solvate.psf
coordinates solvate.pdb
temperature $temperature
firsttimestep 0

paraTypeCharmm on
parameters martini-all-nonb.par
parameters martini-lipids-bonds-angles-dihedrals.par

exclude 1-2
1-4scaling 1.0
cutoff 12.0
martiniSwitching on
switching on
PME off
switchdist 9.0
pairlistdist 14.0
dielectric 15.0

# Integrator Parameters
timestep 20.0
nonbondedFreq 1
stepspercycle 10

# Constant Temperature Control
langevin yes ;# do langevin dynamics
langevinDamping 1 ;# damping coefficient (gamma) of 1/ps
langevinTemp $temperature
```

```
langevinHydrogen off ;# don't couple langevin bath to hydrogens
```

```
# Periodic Boundary Conditions
```

```
if {1} {
```

```
cellBasisVector1 115.537004 0 0
```

```
cellBasisVector2 0 115.473003 0
```

```
cellBasisVector3 0 0 114.858007
```

```
cellOrigin 40.466881 39.422688 39.596134
```

```
}
```

```
wrapAll on
```

```
# Constant Pressure Control (variable volume)
```

```
useGroupPressure no
```

```
useFlexibleCell yes
```

```
useConstantArea no
```

```
useConstantRatio yes
```

```
langevinPiston yes
```

```
langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
```

```
langevinPistonPeriod 2000. #usually 2000 for RBCG system
```

```
langevinPistonDecay 1000. #usually 1000 for RBCG system
```

```
langevinPistonTemp $temperature
```

```
# Output
```

```
outputName $outputname
```

```
restartfreq 1000
```

```
dcdfreq 1000
```

```
xstFreq 1000
```

```
outputEnergies 100
```

```
outputPressure 100
```

```
if {$restart == 0} {
```

```
minimize 5000
```

```
reinitvels $temperature
```

```
}
```

ANNEXE 12. Etape de production de la vésicule

```
set inputname system-min
set outputname system-npt-01
set restart 1

# Procédure pour récupérer le temps de l'ancienne simulation
proc get_first_ts { xscfile } {
  set fd [open $xscfile r]
  gets $fd
  gets $fd
  gets $fd line
  set ts [lindex $line 0]
  close $fd
  return $ts
}

set temperature 310
cosAngles on

structure solvate.psf
coordinates solvate.pdb

if {$restart == 1} {
  bincoordinates $inputname.restart.coor
  binvelocities $inputname.restart.vel
  extendedSystem $inputname.restart.xsc
  set currenttimestep [get_first_ts $inputname.restart.xsc]
  COMMotion yes
} else {
  temperature $temperature
  set currenttimestep 0
}
```

```
firsttimestep $currenttimestep

# Input
paraTypeCharmm    on
parameters        martini-all-nonb.par
parameters        martini-lipids-bonds-angles-dihedrals.par

# Force-Field Parameters
exclude           1-2
1-4scaling        1.0
cutoff            12.0
martiniSwitching  on
PME               off
switching         on
switchdist        9.0
pairlistdist      14
dielectric         15.0

# Integrator Parameters
timestep          20.0
nonbondedFreq     1
stepspercycle     10

# Constant Temperature Control
langevin          yes ;# do langevin dynamics
langevinDamping   1 ;# damping coefficient(gamma)5/ps
langevinTemp      $temperature
langevinHydrogen  off ;# don't couple langevin bath to hydrogens

# Periodic Boundary Conditions
if {1} {
cellBasisVector1  114.261002  0    0
cellBasisVector2  0    114.379002  0
cellBasisVector3  0    0    113.687006
```

```
cellOrigin    40.154392 40.343761 40.279522
}
wrapAll       on

# Constant Pressure Control (variable volume)
useGroupPressure  no # no hydrogens in CG hence set this to no inspite of 1 fs step
useFlexibleCell   yes
useConstantArea   no
useConstantRatio  yes

langevinPiston    yes
langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
#one may need to bump up the pressure constants at first
langevinPistonPeriod 2000. #usually 2000
langevinPistonDecay 1000. #usually 1000
langevinPistonTemp $temperature

# Output
outputName      $outputname
restartfreq     1000
dcdfreq        1000
xstFreq        1000
outputEnergies 1000
outputPressure 1000

# Minimization
if {$restart == 0} {
  minimize      20000
  reinitvels    $temperature
}

set totsitime 5000000
run [expr $totsitime - $currenttimestep]
```

ANNEXE 13. Utilisation de l'outil Membplugin

Calcul de l'aire par lipide

Ce module calcule à la fois l'aire totale par lipide et l'aire par lipide de chaque espèce d'une bicouche correctement alignée sur l'axe z. C'est le cas pour les bicouches construites avec le logiciel packmol. Le module utilise une sélection d'atomes (ici, les carbones du groupement choline) représentatifs de la molécule. Les coordonnées X et Y de ces atomes sont projetés sur un plan et ce dernier est ensuite divisé en polygones selon le programme tiers qvoronoi (inclus dans le plugin). Ensuite, l'aire de chaque polygone est calculée. Ce calcul est effectué pour toutes les trames de la simulation (10000 trames). Une aire par lipide moyenne est alors calculée. L'aire par lipide totale est calculée plus simplement, en effectuant la division de la surface de la face x-y du cube de simulation par le nombre de lipides.

Calcul de l'épaisseur de la membrane

Ici, l'épaisseur est calculée entre les atomes de phosphore à partir de leur distribution en masse selon l'axe z pour les deux couches. La distance entre les deux pics de distribution donne l'épaisseur de la membrane. Elle est ensuite moyennée dans le temps selon le nombre de trames choisi. Le module peut également réaliser une carte de l'épaisseur de la membrane à une résolution donnée. Ici, avec un découpage de la bicouche sous forme d'une grille d'une résolution de 2 angströms, le logiciel réalise une carte à chaque trame. En sélectionnant 1 trame sur 10, une carte moyennée dans le temps est obtenue. Pour pouvoir la représenter avec les couleurs et les plages de valeurs choisies, les données sont exportées sous excel et une macro est réalisée pour mettre les données sous forme de matrice utilisable dans les surfaces de réponse d'Excel :

Sub Matrice ()

```
Dim Lig1&, Lig2&, Esp1&, Curs&, Esp2&, Col&, Var1&, Moy! 'Déclaration des variables"
Esp1 = 2352 'Nombre de lignes entre deux trames "
Esp2 = 48 'Nombre de valeurs Y +1 "
Var1 = 0 'Variable augmentant entre chaque valeur X"
For LigA = 15 To 63 'Balayage des valeurs X en partant de la colonne 15 "
For Lig1 = 2 To Esp2 + 1 'Balayage des ordonnées pour une même abscisse X "
Curs = Lig1 + Esp2 * Var1 'Pour aller chercher la valeur de la prochaine abscisse'
Moy = Cells(Curs, 4).Value
For Lig2 = 1 To 99 'Balayage des trames pour un même point "
  MsgBox Lig2"
  Moy = Moy + Cells(Curs + Esp1, 4).Value
  Curs = Curs + Esp1
Next Lig2
```

```
Cells(Lig1 + 1, LigA).Value = Moy / 100 'Calcul et inscription de la moyenne par point ''  
Next Lig1  
Var1 = Var1 + 1 'On change de valeur X''  
Next LigA  
End Sub
```

Fraction de recouvrement

Ce module calcule la fraction de contacts atomiques entre les deux couches. Il compte donc tout simplement le nombre d'atomes en contact avec la couche opposée. On considère ici que deux atomes sont en contact lorsque leur distance est inférieure à 4 angströms. La valeur donnée est une moyenne sur l'ensemble des trames.

Profil de densité

Ici, la densité d'atomes particuliers (ici l'oxygène de l'eau) est calculée selon l'axe z avec une résolution de 1 angströms. La moyenne est alors calculée sur l'ensemble des trames.

ANNEXE 14. *Calculs sur vésicules en Gros-Grains*

Analyse de l'auto-assemblage des lipides par modélisation gros grains.

Ces calculs sont réalisés dans la console de VMD, après chargement des molécules et de la trajectoire à analyser (fichiers pdb, psf et dcd). Les codes ne sont pas optimisés.

Calcul du rayon de giration d'un liposome dans l'eau (eau nommée W et WAF)

Pour déterminer son évolution dans le temps (au cours des trames)

```
# On crée un nouveau fichier
set file [open "rgyr.dat" w]
# On fait une boucle sur le nombre de trames à analyser
for { set i 1 } { $i < 77 } { incr i } {
# On selectionne les lipides
set sel [atomselect top "not name W and not name WAF"]
$sel frame $i
$sel update
# On mesure le rayon de giration de l'ensemble des lipides
set dpr0 [measure rgyr $sel]
# Ce résultat est ajouté au fichier.
puts $file "$dpr0" }
close $file
```

Calcul de la distance entre phospholipides les plus proches en considérant le groupement PO4

Considérant 10 phospholipides sur 5 trames consécutives

```
set file [open "Dp-p.dat" w]
# On considère les trames de 1 à 5
for { set i 1 } { $i < 6 } { incr i } {
set dpr2 0
# On considère les 10 premiers phospholipides (pour des raisons de mémoire)
for { set k 0 } { $k < 10 } { incr k } {
set sel1 [atomselect top "residue $k and name PO4"]
```

```

$sel1 frame $i
# On considère tous les PO4 proches du phospholipide considéré (dans un rayon de 10
angströms)
set sel2 [atomselect top "name PO4 and (within 10 of residue $k) and not residue $k"]
$sel2 frame $i
$sel2 update
set dpr1 20
# Pour chaque PO4 trouvé, on mesure la distance
foreach residue [$sel2 get residue] {
set sel3 [atomselect top "name PO4 and residue $residue" ]
set dpr0 [measure rmsd $sel1 $sel3]
# Si la distance est plus faible qu'avec le PO4 calculé précédemment, la distance est mise à
jour
if { $dpr0 < $dpr1 } { set dpr1 $dpr0 } }
# On additionne les distances les plus courtes trouvées
set dpr2 [expr $dpr2 + $dpr1]
puts $file "La distance la plus courte pour le residu $k dans la trame $i est avec le residu
$residue : $dpr1"
}
# Et on en fait la moyenne
puts $file "La distance moyenne est : : [expr $dpr2/10]" }
close $file

```

Considérant 50 phospholipides sur 5 trames consécutives avec seulement la moyenne indiquée

```

# Une instruction pour libérer de la mémoire
foreach v [ info vars ] { unset $v }
set file [open "moyenne.dat" w]
for { set i 0 } { $i < 6 } { incr i } {
set dpr2 0
for { set k 0 } { $k < 50 } { incr k } {
set sel1 [atomselect top "residue $k and name PO4"]
$sel1 frame $i
set sel2 [atomselect top "name PO4 and (within 10 of residue $k) and not residue $k"]

```

```

$sel2 frame $i
$sel2 update
set dpr1 20
foreach residue [$sel2 get residue] {
set sel3 [atomselect top "name PO4 and residue $residue" ]
set dpr0 [measure rmsd $sel1 $sel3]
if { $dpr0 < $dpr1 } { set dpr1 $dpr0 } }
set dpr2 [expr $dpr2 + $dpr1] }
puts $file "the average distance for frame : $i : [expr $dpr2/50]" }
close $file

```

Considérant 50 phospholipides toutes les 100 trames (pendant 500 trames) avec seulement la moyenne indiquée

```

foreach v [ info vars ] { unset $v }
set file [open "DPCPC9-9OOH.dat" w]
for { set i 35 } { $i < 40 } { incr i } {
set dpr2 0
for {set k 0 } { $k < 50 } { incr k } {
set sel1 [atomselect top "residue $k and name PO4"]
set l [expr 100*$i]
$sel1 frame $l
set sel2 [atomselect top "name PO4 and (within 10 of residue $k) and not residue $k"]
$sel2 frame $l
$sel2 update
set dpr1 50
foreach residue [$sel2 get residue] {
set sel3 [atomselect top "name PO4 and residue $residue" ]
$sel3 frame $l
set dpr0 [measure rmsd $sel1 $sel3]
if { $dpr0 < $dpr1 } { set dpr1 $dpr0 } }
set dpr2 [expr $dpr2 + $dpr1] }
puts $file "La distance moyenne pour la trame : $l : [expr $dpr2/50]" }
close $file

```

Calcul du nombre de molécules d'eau au centre de la vésicule

Nombre de molécules d'eau au centre de la vésicule pour chaque trame : une distance maximale est définie par rapport à ce centre. On considère cette distance comme celle séparant le centre et le PO4 le plus éloigné moins deux longueurs moyennes des phospholipides plus une marge. Ce calcul n'est cependant pas valable en cas de présence de multiples poches d'eau et d'une vésicule éloignée de la forme sphérique.

```

set file [open "nbreEAU.dat" w]
set margeXYZ 15
set dpr0 1
set dpr1 1
for {set k 1} { $k < 100 } { incr k } {
  set sel2 [atomselect top "name PO4 and resid $k" ]
  set sel3 [atomselect top "name PRA1 and resid $k" ]
  set dpr0 [measure rmsd $sel2 $sel3]
  set dpr1 [expr $dpr0 + $dpr1]
}
set dpr0 [expr $dpr1/100]
for { set i 1 } { $i < 800 } { incr i } {
  set sel [atomselect top "name PO4" ]
  $sel frame $i
  $sel update
  set Xmax 10
  set Ymax 10
  set Zmax 10
  set Xmin 20
  set Ymin 20
  set Zmin 20
  foreach coord [$sel get {x y z}] {
    set Xcoord [lindex $coord 0]
    set Ycoord [lindex $coord 1]
    set Zcoord [lindex $coord 2]
    if {$Xcoord>$Xmax} { set Xmax $Xcoord }
    if {$Ycoord>$Ymax} { set Ymax $Ycoord }
  }
}

```

```

if { $Zcoord > $Zmax } { set Zmax $Zcoord }
if { $Xcoord < $Xmin } { set Xmin $Xcoord }
if { $Ycoord < $Ymin } { set Ymin $Ycoord }
if { $Zcoord < $Zmin } { set Zmin $Zcoord }
}
set centerX [expr ($Xmax + $Xmin)/2]
set dX [expr ($Xmax - $centerX - 2*$dpr0 - $margeXYZ)]
set centerY [expr ($Ymax + $Ymin)/2]
set dY [expr ($Ymax - $centerY - 2*$dpr0 - $margeXYZ)]
set centerZ [expr ($Zmax + $Zmin)/2]
set dZ [expr ($Zmax - $centerZ - 2*$dpr0 - $margeXYZ)]
set sel1 [atomselect top "(name W or name WAF) and (abs(x - $centerX) < $dX) and (abs(y-
$centerY) < $dY) and (abs(z-$centerZ) < $dZ)"]
set n [$sel1 num]
puts $file "frame : $i : $n"
close $file

```

On considère ici un cas simplifié où une molécule d'eau est au centre de la vésicule si sa distance par rapport au centre est inférieure à 20 angströms.

```

set file [open "nbreEAUdu20.dat" w]
set dutile 20
for { set i 1 } { $i < 800 } { incr i } {
set sel [atomselect top "name PO4" ]
$sel frame $i
$sel update
set coord [measure center $sel]
set centerX [lindex $coord 0]
set centerY [lindex $coord 1]
set centerZ [lindex $coord 2]
set sel1 [atomselect top "(name W or name WAF) and (abs(x - $centerX) < $dutile) and
(abs(y-$centerY) < $dutile) and (abs(z-$centerZ) < $dutile)"]
set n [$sel1 num]
puts $file "frame : $i : $n" }
close $file

```

ANNEXE 15. Analyse statistique “Plan d’expériences MUCILAGE”

Tableau A 3. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : rendement d’extraction

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	36.5378	9	4.0598	12.1465	0.667**
Résidus	1.6712	5	0.3342		
Validité	1.5379	3	0.5126	11.7	
Erreur	0.1333	2	0.0666		

*: significatif à un degré de confiance de 95%, ** : significatif à 99%*** : significatif à 99.9%.

Tableau A 4. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : teneur en protéines équivalent BSA

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	53.4806	9	5.9423	11.1217	0.815**
Résidus	2.6715	5	0.5343		
Validité	0.9994	3	0.3331	0.3985	77.1
Erreur	1.6721	2	0.8360		

Tableau A 5. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : viscosité à 50s⁻¹

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	12035.9	9	1337.32	7.9777	1.71*
Résidus	838.163	5	167.633		
Validité	543.84	3	98.1075	0.3608	79.2
Erreur	12874.0	2	271.92		

Tableau A 6. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : facteur de perte entre 0.01 et 1Hz

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	0.0290	9	0.0032	9.2473	1.23
Résidus	0.0017	5	0.0003		
Validité	0.0005	3	0.0002	0.2500	85.8
Erreur	0.0013	2	0.0006		

Tableau A 7. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : Module élastique

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	51.6610	9	5.7401	7.2049	2.13
Résidus	3.9835	5	0.7967		
Validité	2.7006	3	0.9002	1.4034	44.2
Erreur	1.2829	2	0.6414		

ANNEXE 16. *Écoulement dans le système de recirculation*

Une estimation de la vitesse de cisaillement peut être réalisée avec la formule générale suivante, en considérant un débit volumique (Q) de 6 m³ par heure et le rayon du tuyau de 14 mm :

$$\dot{\gamma} = \frac{4Q}{\pi.r^3} = 773,35 \text{ s}^{-1}$$

Les nombres de Reynolds des particules (p) et de l'écoulement (L) s'écrivent :

$$Re_p = \rho \frac{U.d_p}{\eta} \text{ et } Re_L = \rho \frac{V\phi}{\eta}.$$

Le diamètre ϕ du tuyau est de 28 mm. La dimension caractéristique d'une particule d_p et la masse volumique sont respectivement approximées à 1mm et 1000 g/L. La vitesse du flux V est de 2,7 m.s⁻¹ et la différence de vitesse entre le flux et une particule (U) est au maximum U=V. La viscosité est calculée selon le modèle de Sisko déterminé sur le mucilage extrait pour chaque expérience en considérant le taux de cisaillement général calculé ci-dessus.

EXP	MS de l'extrait (%)	Paramètres de l'équation de Sisko			σ (Pa) à $\dot{\gamma} = 773\text{s}^{-1}$	η à 1% de MS (mPa.s)	η_{corr} selon la MS (mPa.s)	Re _L Tuyau	Re _p Tuyau
		a	b	p					
PEX1	1,10	0,0093	0,297	0,344	10,11	13,07	14,36	5277	188
PEX2	0,41	0,0271	1,668	0,236	28,95	37,43	15,35	4939	176
PEX3	0,90	0,0197	0,718	0,348	22,51	29,10	26,19	2894	103
PEX4	0,57	0,0339	2,285	0,263	39,39	50,93	29,03	2611	93
PEX5	0,80	0,0313	1,681	0,220	31,49	40,72	32,57	2327	83
PEX6	0,60	0,0324	2,545	0,195	34,36	44,43	26,66	2843	102
PEX7	0,85	0,0207	0,878	0,252	20,65	26,70	22,69	3340	119
PEX8	0,58	0,0265	1,432	0,262	28,65	37,05	21,49	3527	126
PEX9	0,91	0,0206	0,722	0,296	21,08	27,25	24,80	3056	109
PEX10	0,73	0,0226	0,969	0,248	22,50	29,10	21,24	3568	127
PEX11	0,54	0,0257	1,552	0,220	26,57	34,36	18,56	4084	146
PEX12	0,70	0,0257	1,159	0,239	25,53	33,02	23,11	3279	117
PEX13	0,71	0,0165	0,943	0,222	16,93	21,89	15,54	4877	174
PEX14	0,69	0,0164	1,494	0,017	14,31	18,51	12,77	5935	212
PEX15	0,52	0,0246	1,242	0,254	25,75	33,30	17,31	4377	156

Le nombre de Reynolds de l'écoulement, en fin d'extraction, est compris entre 2000 et 6000 dans les tuyaux et, en effectuant les mêmes calculs, entre 200 et 600 au sein de la canalisation à ultrasons, d'un plus gros diamètre. Concernant le nombre de Reynolds particulaire, on trouve Re_p compris entre 80 et 210 au niveau des tuyaux et entre 2 et 7 au niveau de la canalisation à ultrasons.

ANNEXE 17. Construction d'un modèle QSPR

Au sein du logiciel SCIGRESS, après optimisation de leur géométrie en mécanique moléculaire (MM3) et en mode semi-empirique dans l'éthanol (PM6/COSMO), les molécules sont rassemblées dans un tableau (SPREADSHEET) et plusieurs propriétés sont alors calculées comme le moment dipolaire, la polarisabilité et l'énergie de formation. Ce tableau est ensuite importé depuis ADMEWORKS modelbuilder. Tous les descripteurs moléculaires disponibles sont alors calculés (555) pour les molécules et ajoutés à ceux déjà calculés par SCIGRESS. Après élimination des descripteurs contenant des valeurs nulles ou manquantes (missing value test et zero test), ne sont gardés que des descripteurs ayant des facteurs de corrélation inférieurs à 0,9 entre eux (Correlation test). Il reste encore une soixantaine de descripteurs. Parmi les algorithmes proposés pour sélectionner les meilleurs descripteurs, celui qui a donné les meilleurs résultats (en terme de R^2 /nombre de descripteurs) est PSO (Particle Swarm Optimization). Celui-ci permet de partir de différentes populations aléatoires de descripteurs et de sélectionner les populations permettant les modèles les plus performants tout en minimisant le nombre de descripteurs. Au cours de la recherche, les modèles retenus ($R^2 > 0,5$) sont classés selon le nombre de descripteurs qu'ils utilisent (leur nombre min et max et les descripteurs correspondants sont classés par le nombre de modèles les utilisant. Au fil de la sélection des populations, le nombre de descripteurs des modèles diminuent et il ressort alors que le paramètre MDEC13 est celui qui revient dans tous les modèles sélectionnés. Au final, le meilleur modèle est obtenu avec seulement 2 paramètres.

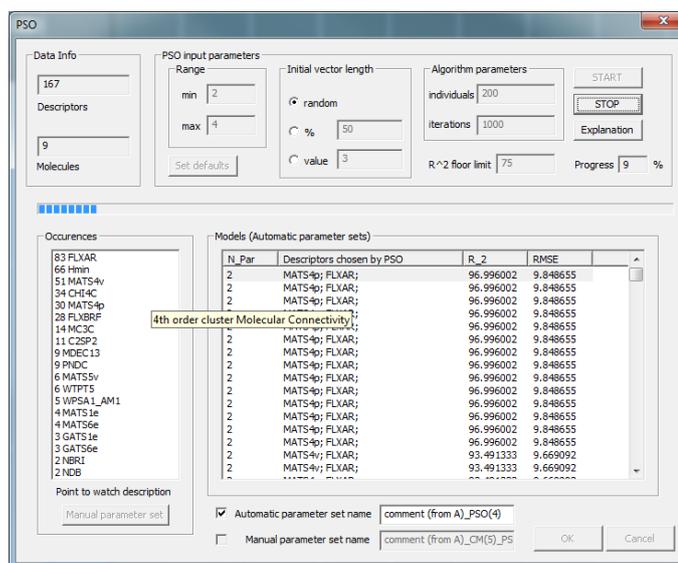


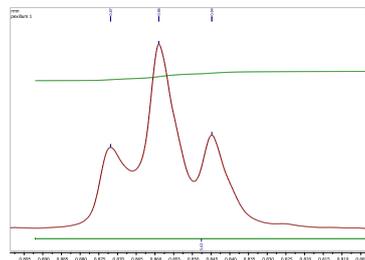
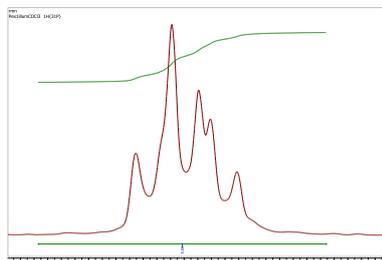
Figure. Algorithme PSO pour la recherche de modèles

ANNEXE 18. Comparaison des solvants deutérés en 1H RMN

PC commerciale oxydée CdCl3

PC commerciale oxydée DMSO d6

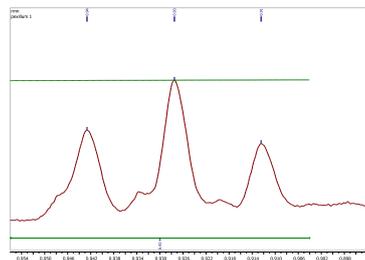
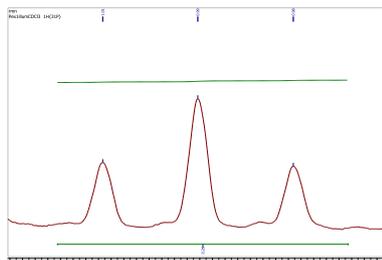
CH₃ terminal



2 triplets (0.89 et 0.90 ppm)

1 triplet (0.6 ppm J=6.8 Hz)

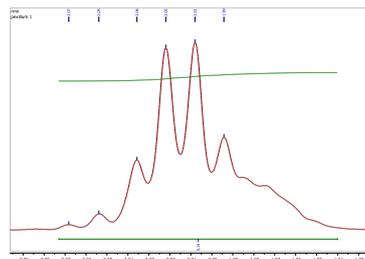
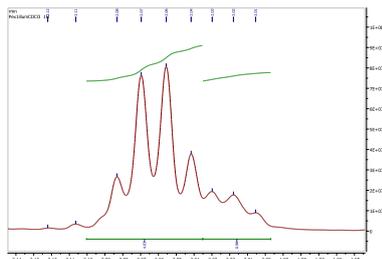
CH₃ terminal
acide
linoléique



1 triplet (0.99 ppm J=7.5 Hz)

1 triplet (0.93 ppm J=7.6 Hz)

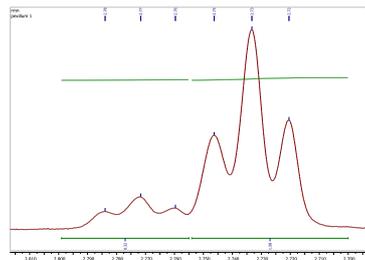
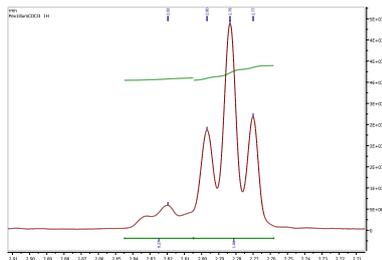
R-CH₂-C=C



1 quadruplet et 1 multiplet à 2.02 et 2.07 ppm

1 multiplet à 2.02 ppm

-C=C-CH₂-C=C-



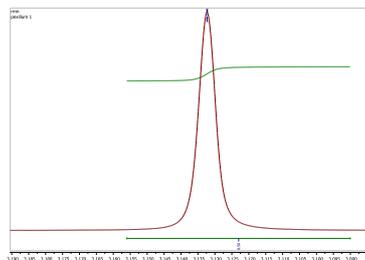
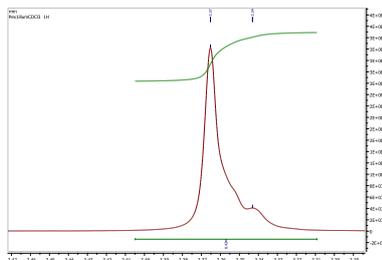
Triplets (2.78 et 2.82 ppm)

Triplets (2.73 et 2.77)

I : 1.66 et 0.27

I : 1.58 et 0.32

Référence
Choline



Singlet + Multiplet (3.37 ppm)

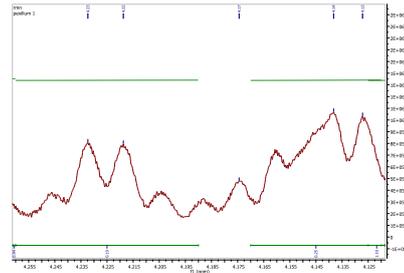
1 singlet (3.13 ppm)

I : 8.42

I : 8.56

Hydroperoxyde
(CH-OOH)

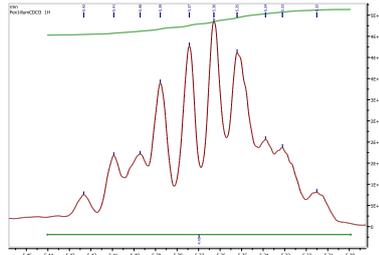
Absence de pics visibles



2 massifs à 4.13 et 4.22 ppm

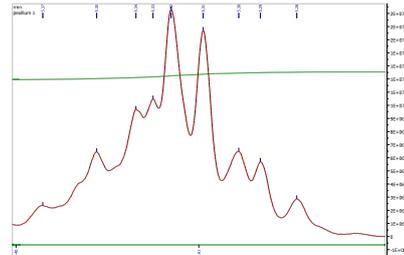
I : 0.25 et 0.19

Doubles liaisons
non conjuguées



Multiplets (5.32 à 5.42ppm)

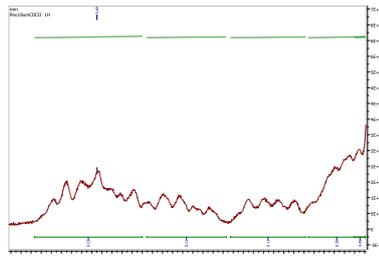
I : 4.45 ppm



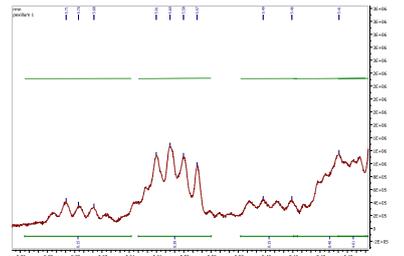
Multiplets (5.28 à 5.37ppm)

I : 4.61 ppm

Doubles liaisons
conjuguées 1

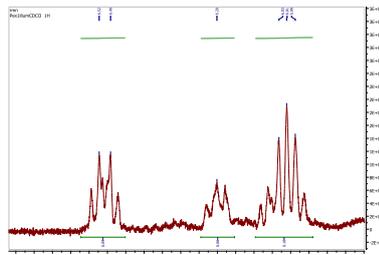


Ensemble de multiplets entre 5.42 et 5.70

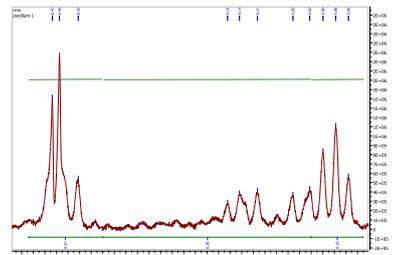


Ensemble de multiplets entre 5.41 et 5.70

Doubles liaisons
conjuguées 2



Ensemble de multiplets entre 6.00 et 6.50

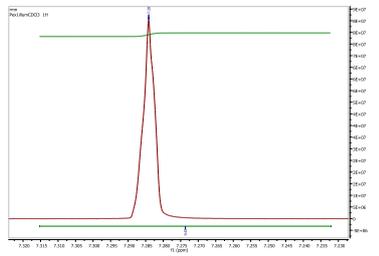


Ensemble de multiplets entre 6.00 et 6.50

Hydroperoxyde
(OOH)

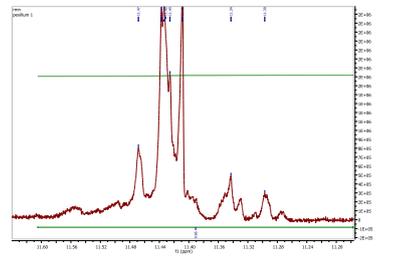
1 singulet à 7.28 ppm

I : 0.65



Ensemble de pics à 11.43 ppm

I : 0.66



ANNEXE 19. Analyse statistique "Plan d'expérience -phospholipides"

Tableau A 8. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : rendement d'oxydation

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	3706,57	5	741,31	14,45	< 0,01 ***
Résidus	205,27	4	51,32		
Validité	203,25	1	203,25	302,91	0,0413
Erreur	2,01	3	0,6710		***

*: significatif à un degré de confiance de 95%, ** : significatif à 99%*** : significatif à 99,9%.

Tableau A 9. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : coefficient d'extinction à 233nm

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	157,32	5	31,46	18,49	< 0,01 ***
Résidus	6,81	4	1,70		
Validité	6,72	1	6,72	239,28	0,0587 ***
Erreur	0,084	3	0,0281		

Tableau A 10. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : ratio des coefficients d'extinction (233nm/270nm)

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	1297,60	5	259,52	90,09	0,0332 ***
Résidus	11,52	4	2,87		
Validité	0,63	1	0,56	0,16	71,9
Erreur	10,90	3	3,63		

Tableau A 11. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : Taille Moyenne en intensité « Z »

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	1,41E+05	5	28223,4	294,52	<0,01***
Résidus	383,31	4	95,83		
Validité	123,38	1	123,38	1,42	31,9
Erreur	259,93	3	86,64		

Tableau A 12. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : Potentiel Zêta

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	2343,43	5	468,69	7,51	0,867**
Résidus	249,67	4	62,42		
Validité	204,53	1	204,53	13,59	3,46*
Erreur	45,14	3	15,05		

Tableau A 13. Analyse statistique du modèle polynomial pour la réponse : Absorbance finale

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Ratio (F-value)	Proba.
Régression	0,1130	5	0,0226	183,40	<0,01***
Résidus	0,0005	4	1,232E-04		
Validité	7,68E-06	1	7,682E-06	0,048	84,1
Erreur	0,0005	3	1,62E-04		

ANNEXE 20. Analyse granulométrique des vésicules

Les distributions en intensité, volume et nombre pour les solutions de vésicules formées avec des phospholipids oxydés sont exprimées ici avec la valeur moyenne et l'écart-type (N=3).

Expérience	Diamètre moyen en intensité (nm)	Diamètre moyen en volume (nm)	Diamètre moyen en nombre (nm)
1	145,7 ± 0,6	228,3 ± 87,3	35,3 ± 6,1
2	337,6 ± 14,8	1015 ± 158,6	59,4 ± 35,0
3	125,5 ± 12,0	171,7 ± 174,6	43,6 ± 18,3
4	523,0 ± 176,0	1070 ± 648,7	77,6 ± 36,1
5	307,7 ± 10,64	1361 ± 582,1	66,7 ± 48,4
6	133,9 ± 3,5	104,6 ± 83,1	23,8 ± 13,6
7	228,2 ± 5,2	636,7 ± 96,6	48,0 ± 13,3
8	235,6 ± 4,6	819,2 ± 228,6	50,9 ± 25,6
9	247,7 ± 8,0	907,5 ± 250,4	53,7 ± 23,0
10	122,4 ± 0,3	23,4 ± 6,8	10,6 ± 0,9
11	95,70 ± 0,7	23,5 ± 0,6	12,9 ± 0,5
12	284,2 ± 1,3	1466 ± 387	69,0 ± 63,1
13	121,8 ± 0,6	15,1 ± 1,49	6,4 ± 0,6
14	360,0 ± 18,7	1924 ± 69,1	72,0 ± 26,4
Sans illumination	268,4 ± 3,5	1051 ± 44,4	43,2 ± 12,5

ANNEXE 21. Valorisation scientifique 2016-2019

Congrès :

Fabre, J.-F., Cassen, A., Valentin, R., Mouloungui, Z. Controlled Singlet Oxygen Oxidation of Soybean Phospholipids. Congrès AOCS, Orlando, 3 mai 2017

Abstract : Oxidation of phospholipids has a huge impact on their hydrophobicity and the functional properties of vesicles formed in water. Using a controllable Xenon lamp (SUNTEST benchtop Xenon Instrument), soybean phosphatidylcholine in ethanol with different concentrations of a photosensitizer (methylene blue) was submitted to different irradiation powers and durations. At moderate conditions, this singlet oxygen oxidation mode induces the formation of hydroperoxidized phospholipids with conjugated insaturations. Spectrophotometric study and ¹H, ¹³C and ³¹P NMR analysis allow the control of the chemical modification of the phospholipids according to the experimental design performed. The ratio between conjugated dienes and conjugated trienes depends mainly on the duration of irradiation and the concentration of the pigment. A granulometric and zeta potential study also indicates the high importance of this parameter on the stability and size of the vesicles formed when oxidized pigments are redispersed in distilled water. As revealed by Differential Scanning Calorimetry, water trapping abilities of oxidized phospholipids are also altered. Coarse-grained molecular dynamics can help to understand the different arrangements of phospholipids in water according to a gradual modification of their fatty acid chains. Combining this experimental and theoretical approach, a better tailoring of oxidized phospholipids could be reached.

Fabre, J.-F., Lacroux, E., Cassen, A., Cerny, M., Grave G., Valentin, R., Mouloungui, Z. Physical stability of oleosomes dispersions extracted from oleoproteaginous seeds. Congrès « Oil bodies », Wageningen, 15 octobre 2018

Abstract : Oleosomes can be extracted from different oleoproteaginous seeds through a simple integrated process combining an aqueous crushing of the seeds at high shear rate and a phase separation through centrifugation. The obtained cream is composed of oleosomes naturally stabilized by native surfactants, mainly oleosins and phospholipids. It shows a majorly elastic rheological behavior and a good resistance to coalescence. This process preserves the size of oleosomes, minor compounds as sterols and tocopherols and the fatty acid composition of triglycerides. However, according to the seeds, phospholipids may be altered, as revealed by mass spectroscopy and gas chromatography. Stabilizing proteins are not only oleosins carried initially by the membrane of oleosomes but also other hydrosoluble proteins extracted from the seeds. They all play an important role on the stabilization of oil droplets, acting both on flocculation (as evaluated by zeta potential measurements at different pHs) and coalescence (as assessed by freeze/thaw cycles and scanning electron microscopy after spray-drying and freeze/drying). Use of oleosomes for a wide range of applications must then focus on the preservation of phospholipids and the good environmental conditions for the expression of protein surface properties.

Articles / Brevet :

Fabre, J.-F., Cerny, M., Cassen, A., Mouloungui, Z., 2018. Effect of methylene blue on the formation of oxidized phospholipid vesicles (soumis). *Bioengineering*. <https://doi.org/10.1101/403634>

Abstract : Soybean phosphatidylcholine, which is rich in linoleic acid, was oxidized with singlet oxygen through photosensitization with methylene blue. This compound facilitates the oxidation of phospholipids relative to the reaction with free unsaturated fatty acids. A response surface methodology was used to control oxidation, with methylene blue concentration and the amount of available air as independent variables. The conjugated diene-to triene ratio was then monitored. Hydroperoxide yield dependent principally on the amount of air, whereas photosensitizer concentration strongly influenced the size and zeta potential of vesicles formed by the sonication of oxidized phospholipids in water. Methylene blue plays an important role in the surface charge expression and ion permeability of these vesicles.

Wallis, C., Bonhomme, M., Fabre, J.-F., Mouloungui, Z., 2018. Effect of aliphatic chain length on the chemical structures of low molecular weight hyperbranched polyesters. *e-polymers* 18 (3), 229-235. <https://doi.org/10.1515/epoly-2016-0309>

Abstract : Low molecular weight hyperbranched (HB) polyesters were synthesized via melt polymerization from trimethylolpropane and three aliphatic dicarboxylic acids, namely, succinic acid (SA), adipic acid (AA) and dodecanedioic acid (DA). The degrees of branching (DBs) ranged between 30% and 75% depending on the monomer ratio. Their DB, cyclic index and terminal index were all determined, indicating that the shorter chain HB polyesters PE-SA and PE-AA showed a greater degree of intramolecular cyclization, compared to the longer aliphatic chains within PE-DA. The HB polyesters form stable colloidal suspensions in buffered aqueous media and were found to be pH responsive. The stability of the colloidal suspensions is enhanced by two factors: (1) increasing the aliphatic chain length and (2) increasing the pH of the solution for the same HB polyester.

Sujet connexe : Les polyesters hyperbranchés sont eux-mêmes utilisables en encapsulation.

Rahmalia, W., Fabre, J.-F., Usman, T., Mouloungui, Z., 2018. Adsorption characteristics of bixin on acid- and alkali-treated kaolinite in aprotic solvents. *Bioinorganic chemistry and applications*. 3805654/1-3805654/9. <https://doi.org/10.1155/2018/3805654>

Abstract : The adsorption of bixin in aprotic solvents onto acid- and alkali-treated kaolinite was investigated. Kaolinite was treated three times, for 6 h each, with 8M HCl or 5M KOH. The adsorbents were characterized by XRD, FT-IR, EDS, and BET-N₂. The effects of contact time and dye concentration on adsorption capacity and kinetics, electronic transition of bixin before and after adsorption, and also mechanism of bixin-kaolinite adsorption were investigated. Dye adsorption followed pseudo-second order kinetics and was faster in acetone than in dimethyl carbonate. The best adsorption results were obtained for KOH-treated kaolinite. In both of the solvents, the adsorption isotherm followed the Langmuir model and adsorption capacity was higher in dimethyl carbonate ($q_m = 0.43$ mg/g) than in acetone (0.29 mg/g). The adsorption capacity and kinetics of KOH-treated kaolinite ($q_m = 0.43$ mg/g, $k_2 =$

3.27 g/mg.min) were better than those of HCl-treated kaolinite ($q_m=0.21$ mg/g, $k_2=0.25$ g/mg.min) and natural kaolinite ($q_m=0.18$ mg/g, $k_2=0.32$ g/mg.min). There are shift in the band position of maximum intensity of bixin after adsorption on this adsorbent. Adsorption in this system seemed to be based essentially on chemisorption due to the electrostatic interaction of bixin with the strong basic and reducing sites of kaolinite.

Sujet connexe : La bixine est aussi un photosensibilisateur (pour d'autres applications) dont les propriétés électroniques peuvent être améliorées par adsorption sur argile.

Nyame Mendendy Boussambe G., Valentin R., Fabre, J-F., Navailles L., Nallet F., Gaillard C., Mouloungui Z., 2017 Self-assembling behavior of glycerol monoundecenoate in water. *Langmuir* 33(13), 3223-3233. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03584>

Abstract : The self-assembling properties of glycerol esters in water are well known. Still, few data on glycerol monoesters of undecylenic acid are available. The aim of this study was to highlight the behavior of glycerol monoundecenoate (GM-C11:1) in different diluted and concentrated states. Its self-assembling properties in water and upon solid inorganic surfaces were investigated in the diluted state using surface tension experiments, atomic force microscopy, and cryogenic transmission electron microscopy studies. In the concentrated state, the gelling properties in the presence of water were investigated using polarized light microscopy, differential scanning calorimetry (DSC), and small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments. GM-C11:1 at 100 mg/L self-assembles at the liquid/air interfaces as aggregates of approximately 20 nm in diameter, organized into concentric forms. These aggregates are spherical globules composed of several molecules of GM-C11:1. At higher concentrations (1000 and 10^4 mg/L), GM-C11:1 is able to uniformly coat liquid/air and liquid/solid interfaces. In bulk, GM-C11:1 forms spontaneously aggregates and vesicles. In a more concentrated state, GM-C11:1 assembles into lamellar L_β and L_α forms in water. By cross-referencing SAXS and DSC findings, we were able to distinguish between interlamellar water molecules strongly bound to GM-C11:1 and other molecules remaining unbound and considered to be "mobile" water. The percentage of water strongly bound was proportional to the percentage of GM-C11:1 in the system. In this case, GM-C11:1 appears to be an effective molecule for surface treatments for which water retention is important.

Sujet connexe : Le monoundécénoate de glycerol est un tensioactif qui peut de même s'organiser en bicouches et former des vésicules. Ses propriétés peuvent permettre une utilisation dans diverses applications comme dans les industries du bitume et/ou du béton :

Gaurat, F., Jakubowski, M., Nicolaie, A., Barsi, P., Mikhaïlenko, P., Baurion, M., Mouloungui, Z., Valentin, R., Nyame Mendendy Boussambe, G., Bertron, A., Fabre, J.-F., 2016. Compositions based on C7-15 mono- to tetra-alkylenoate of a mono- to tetra- C3-6 trialkanol as additives (such as release agents or curing agents) for placement of bituminous products and/or concrete. FR 3035659 A1.

Etude *in vitro* et *in silico* de l'extraction, modification chimique et assemblage de phospholipides pour la construction de nouvelles vésicules végétales : Exemple de la caméline

Dans le cadre de plusieurs projets de recherche impliquant des partenaires académiques, industriels, et centres techniques locaux et nationaux (CLE Région n°14050981 : SMON-FERT, Réseau Carnot 3BCAR : CAMELINOIL, ITE PIVERT n° 2015-GENESYS-WP3P18-063 PROBIORAF, FEDER Convention N°16004168 : CHIA-EASYNOV), des approches d'études génériques de schémas intégrés ont été conçues pour valoriser le mucilage et les phospholipides de graines oléoprotéagineuses à mucilage, prenant ici l'exemple de la caméline. Présent à la surface des graines, le mucilage peut être efficacement extrait par l'utilisation d'une colonne à ultrasons allié à des conditions de cisaillement adéquates. Sa composition et les propriétés qui peuvent en découler (comportement viscoélastique notamment) dépendent fortement des conditions de son extraction, en particulier du temps de traitement, comme le révèle le suivi continu de plusieurs paramètres (couple moteur, pH, conductivité, indice de réfraction). Riche en omega-3, l'huile est ensuite extraite des graines entières ou démucilaginées par pressage mono-vis pour les besoins alimentaires et de l'oléochimie dans ces différents programmes. Les phospholipides peuvent ensuite être récupérés par un traitement ultrasonore de l'huile en présence d'une faible quantité d'eau. Selon une méthode colorimétrique mise au point et des analyses chromatographiques, il apparaît que si le rendement d'extraction d'huile dépend du taux d'humidité des graines, l'huile extraite contient peu de phospholipides, ceux-ci se retrouvant principalement dans le tourteau. Etant démucilaginé, ce dernier peut se prêter plus facilement à un traitement aqueux. Cependant, l'activation d'enzymes dans ce milieu impose le recours à des solvants organiques. Un couple de solvants comme l'éthanol et l'acétate d'éthyle est utilisé en remplacement du couple traditionnel méthanol/chloroforme, donnant des rendements similaires avec un impact supposé bien moindre sur la santé, l'environnement, de même que sur les possibilités de valorisation du tourteau. La composition des phospholipides détermine en grande partie les propriétés des vésicules qu'ils peuvent former en milieu aqueux. Pour élargir ces propriétés, notamment dans le domaine de l'encapsulation d'éléments nutritifs ou éliciteurs pour les plantes dans le programme SMON-FERT, une modification chimique des phospholipides a été entreprise. L'utilisation de faibles concentrations (<0,1 mM) de bleu de méthylène, en présence d'air et sous illumination (pour la génération de l'oxygène singulet), permet l'obtention d'hydroperoxydes à partir de phospholipides modèles (lécithine de soja) dissous dans l'éthanol. La variation de la concentration en photosensibilisateur et du volume d'air disponible permet de moduler le rendement d'oxydation des phospholipides pour aboutir à des vésicules de différentes tailles, charges et perméabilités ioniques. Si des conditions oxydantes trop poussées aboutissent à la perte des propriétés d'encapsulation, des conditions modérées permettent l'obtention de vésicules plus petites avec une perméabilité accrue de l'eau et de KCl. La dynamique moléculaire en mode « tout atome » et « gros grains » permet de relier cette perméabilité accrue à une diminution de l'épaisseur de la membrane, une augmentation de l'aire occupée par phospholipide et une plus grande hétérogénéité des vésicules formées. La combinaison d'outils *in vitro* et *in silico* peut ainsi permettre de comprendre comment adapter la modification chimique des phospholipides aux propriétés fonctionnelles voulues.

Mots-clés : phospholipides, hydroperoxyde, mucilage, caméline, ultrasons, dynamique moléculaire, bleu de méthylène

ABSTRACT

***In vitro* and *in silico* study of the extraction, chemical modification and assembly of phospholipids for the elaboration of new vegetable vesicles: Example of camelina.**

Within the framework of several research projects involving academic and industrial partners as local and national technical centers (CLE Region n°1405050981 : SMON-FERT, Carnot network 3BCAR : CAMELINOIL, ITE PIVERT n° 2015-GENESYS-WP3P18-063 PROBIORAF, FEDER Convention N°16004168 : CHIA-EASYNOV), generic studies of integrated schemes have been designed to valorise mucilage and phospholipids from mucilaginous oilseeds, taking here the example of camelina. As the outermost surface layer of the seeds, mucilage can be effectively extracted by using an ultrasonic reactor with adequate shear conditions. Its composition and derived properties (as the viscoelastic behaviour) strongly depend on the parameters of its extraction, in particular the processing time, as revealed by the continuous monitoring of several responses (motor torque, pH, conductivity, refractive index). The omega-3 rich oil is then easily extracted from whole or demucilaginated seeds by single screw pressing for food and oleo-chemical needs in these different programs. According to chromatographic analyses and a specifically developed colorimetric method, it appears that if the oil extraction yield depends on the moisture content of the seeds, the phospholipid extraction yield remains low, these polar compounds being mainly found in the meal. Phospholipids can be recovered from the extracted oil by ultrasound-assisted precipitation with the presence of a small amount of water. Concerning the meal, as it is mucilage-free, it can be easily treated with water. However, the activation of enzymes in this solvent encourages the use of organic ones. A couple of solvents such as ethanol and ethyl acetate is used to replace the traditional methanol/chloroform mixture, giving similar yields with a supposedly much lower impact on health and environment, as well as on the potential further use of the meal. The composition of phospholipids largely determines the properties of the vesicles they can form in an aqueous medium. To extend these properties, particularly in the field of encapsulation of nutrients or elicitors for plants in the SMON-FERT program, a chemical modification of phospholipids has been undertaken. The use of low concentrations (<0.1 mM) of methylene blue, in the presence of air and under illumination (for the generation of singlet oxygen), allows the production of hydroperoxides from model phospholipids (soy lecithin) dissolved in ethanol. Using two variables (photosensitizer concentration and air volume) response surface methodology allows the oxidation to be modulated to produce vesicles of different sizes, charges and ionic permeability. If excessive oxidizing conditions result in the loss of encapsulation properties, moderate conditions allow the production of smaller vesicles with increased water and KCl permeability compared to unoxidized vesicles. Molecular dynamics study in "all atom" and "coarse grain" modes makes it possible to link this increased permeability to a decrease in membrane thickness, an increase in the area per lipid and a greater heterogeneity of the vesicles formed. The combination of *in vitro* and *in silico* tools can thus provide a way to adapt the chemical modification of phospholipids to the desired functional properties.

Keywords : phospholipids, hydroperoxide, mucilage, camelina, ultrasound, molecular dynamics, methylene blue